

**Aus der Universitäts- Augenklinik Tübingen
Department für Augenheilkunde
Schwerpunkt: Erkrankungen des vorderen und hinteren
Augenabschnittes
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K.- U. Bartz- Schmidt**

**Transplantation retinaler Pigmentepithelzellen auf
die Membrana limitans interna in vitro**

**Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhardt- Karls- Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Lena Greulich
aus
Würzburg
2008**

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. S. Grisanti

2. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Walter

Inhaltsverzeichnis

	Seitenzahl
Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	2
1.1 Lichtenergie und Photorezeptoren	2
1.2 Netzhaut	3
1.3 Photorezeptoren	4
1.4 Makula	5
1.5 Aderhaut	5
1.6 Membrana limitans interna	5
1.7 Retinale Pigmentepithelzellen	6
1.8 Transplantation von retinalen Pigmentepithelzellen im Tiermodell	9
1.9 Klinische Anwendbarkeit der Transplantation retinaler Pigmentepithelzellen	11
1.9.1 Alterbedingte Makuladegeneration	11
1.9.2 Bisherige Erfahrungen am Menschen	13
1.10 Ziel der Arbeit	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Humanes Ausgangsmaterial	16
2.2 Porkines Ausgangsmaterial	16
2.3 Präparation der Membrana limitans interna	16
2.4 Präparation der retinalen Pigmentepithelzellen und Aufbringen auf die ILM	18
2.5 Kultivierung und Photographien	19
2.6 Fixierung	20
2.7 Einbettung für die Elektronenmikroskopie	21
2.8 Elektronenmikroskopie	22

3. Ergebnisse	23
3.1 Porkine RPE-Zellen	23
3.1.1 Kultur und Lichtmikroskopie	23
3.1.2 Semidünnschnitte	25
3.1.3 Elektronenmikroskopie	25
3.2 Humane RPE-Zellen	28
3.2.1 Kultur und Lichtmikroskopie	28
3.2.2 Semidünnschnitte	30
3.2.3 Elektronenmikroskopie	30
3.3 Humane ARPE19-Zellen	31
3.3.1 Kultur und Lichtmikroskopie	31
4. Diskussion	33
5. Zusammenfassung	39
6. Literaturverzeichnis	40
Danksagung	45
Lebenslauf	46

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aM	amorphes Material
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
C	Coverslip
CNV	choroidale Neovaskularisationen
D-MEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
D-PBS	Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	fetal bovine serum (fetales Kälberserum)
ICG	Indocyanine-Grün-Lösung
ILM	internal limiting membrane (Membrana limitans interna)
hILM	humane Membrana limitans interna
IPM	Interphotorezeptor-Matrix
Lre(d)	doppelt liegende Lamina rara externa
M	Melanosomen
MV	Mikrovillie
NaOH	Natriumhydroxid
RCS-Ratte	Royal College of Surgeons Dystrophic Rat
RPE	retinales Pigmentepithel
hRPE	humane Pigmentepithelzellen
sRPE	Pigmentepithelzellen von Schweinen
tj	tight junctions

1. Einleitung

1.1 Lichtenergie und Photorezeptoren

Das optische System des Auges besteht aus der Kornea, den mit Kammerwasser gefüllten vorderen und hinteren Augenkammern, der als Blende dienenden Iris, der Linse und dem Glaskörper. Ins Auge einfallende Lichtstrahlen werden von diesem Linsensystem in optimaler Weise so gebrochen, dass sie sich auf der Netzhaut treffen und dort ein umgekehrtes und verkleinertes Bild der Umwelt entwerfen. Sie werden von den in den Lichtrezeptoren (Stäbchen und Zapfen) enthaltenen Sehfärbstoffen (Rhodopsin und Jodopsine) absorbiert und führen zu deren Zerfall. Es kommt zu einer Umwandlung der Lichtenergie in ein elektrisches Signal, welches zu einer Änderung des Membranpotentials der Photorezeptoren führt. Ab einer gewissen Höhe dieses Membranpotentials kommt es zum Erreichen einer Reizschwelle in den nachgeschalteten Ganglienzellen und zur Auslösung von Aktionspotentialen. Diese werden über die Axone der Ganglienzellen, die den Nervus opticus bilden für die zentrale Verarbeitung an Thalamus und Kortex weitergeleitet (1).

Damit die Lichtenergie umgesetzt werden kann, muss die ungestörte Funktion der in der Netzhaut enthaltenen Photorezeptoren und der sie versorgenden Strukturen gegeben sein. Wichtig für die Versorgung mit Nährstoffen und den Abtransport anfallender Abfallstoffe sind die direkt an die Außenglieder der Photorezeptoren angrenzenden retinalen Pigmentepithelzellen (RPE- Zellen) und die darunter liegende Aderhaut (Choroidea), über welche die Blutversorgung der Photorezeptoren und der RPE- Zellen stattfindet.

1.2 Netzhaut

Die Netzhaut ist entwicklungsgeschichtlich ein vorgeschobener Teil des Gehirns. Sie gliedert sich in die Pars caeca retinae und die Pars optica retinae. An der Ora serrata, einer gezackte Linie, die vor dem Äquator des Auges liegt, gehen die beiden Teile der Netzhaut ineinander über. Die Pars caeca, der lichtunempfindliche Teil, liegt vor der Ora serrata und überzieht als zweischichtiges Epithel Ziliarkörper und Iris.

Die Pars optica ist aus zwei Blättern aufgebaut und kleidet die hintere innere Oberfläche des Auges aus.

Während der Embryonalperiode bildet sich aus dem inneren Blatt des Augenbechers das Stratum nervosum retinae, aus dem äußeren Blatt das Stratum pigmentosum retinae. Beide Blätter legen sich aufeinander, ohne jedoch miteinander zu verwachsen.

Das äußere Blatt besteht aus einem einschichtigen, isoprismatischen Epithel (retinales Pigmentepithel s.u.) und ist nur an der Ora serrata sowie der Papilla nervi optici fest mit dem Stratum nervosum (inneres Blatt) verwachsen, reicht aber mit seinen Fortsätzen zwischen die Außenglieder der Stäbchen und Zapfen und bildet mit ihnen eine funktionelle Einheit.

Das innere Blatt wird in neun Schichten unterteilt und enthält Photorezeptoren (1. Neuron), bipolare Schaltzellen (2. Neuron), multipolare Ganglienzellen (3. Neuron) sowie retinale Gliazellen und die Nervenzellen für die Quervernetzung der Neurone (Horizontalzellen und amakrine Zellen).

Die äußere Körnerschicht enthält die Zellkörper der Photorezeptoren, die innere diejenigen der bipolaren Ganglienzellen sowie der Horizontalzellen, der amakrinen Zellen und der Gliazellen. Die Zellkörper der multipolaren Optikusganglienzellen liegen in der Ganglienzellschicht.

In den dazwischen liegenden plexiformen Schichten liegen die Synapsen.

Die Synapsen zwischen 1. und 2. Neuron liegen in der äußeren plexiformen Schicht; in diese schalten sich auch die Horizontalzellen ein.

In der inneren plexiformen Schicht liegen die Synapsen zwischen 2. und 3. Neuron sowie den amakrinen Zellen.

Der Zusammenhalt der Neurone wird durch die Neuroglia, vor allem die Müllerschen Stützzellen gewährleistet. Ihre Zellfortsätze erstrecken sich einerseits bis in die Membrana limitans externa, von der aus sie mit Mikrovilli zwischen die Stäbchen und Zapfen reichen, andererseits mit pinselartigen Stützpfeilern bis in die Membrana limitans interna (innerste Schicht des Stratum nervosum). Unter der Membrana limitans interna verlaufen in der Nervenfaserschicht die Axone der Optikusganglienzellen zur Papilla nervi optici. Zwischen Membrana limitans externa und dem Pigmentepithel liegt das Stratum neuroepitheliale mit den Außengliedern der Stäbchen und Zapfen. Es bildet die äußerste Schicht des Stratum nervosum (2).

1.3 Photorezeptoren

Die Rezeptorschicht des Auges enthält etwa 120 Millionen Stäbchen und 6-7 Millionen Zapfen. Die beiden Rezeptorsysteme sind ähnlich aufgebaut.

Sie bestehen aus einem Außen- und einem Innenglied, einem Perykarion und einem nach innen gerichteten Fortsatz mit Endkolben bzw. Endknöpfchen.

Die Außenglieder sind die eigentlichen Reizaufnahmeorgane. Sie bestehen aus dicht aufeinander gestapelten Membranscheibchen bzw. Membranblässchen (Zapfen), die aus Einstülpungen der Zellmembran hervorgehen. In diesen Membranscheibchen sind die Photopigmente lokalisiert. Die Stäbchen enthalten Rhodopsin und die Zapfen Jodopsin.

Die Sehfärbstoffe haben die Fähigkeit, Lichtquanten zu absorbieren, wobei sie eine chemische Umwandlung durchmachen.

Die Innenglieder der Photorezeptoren sind reich an Zellorganellen (Mitochondrien, Golgi-Apparat, Granula). Sie sind die „Stoffwechselorgane“ der Rezeptoren. Durch einen zilienartigen Verbindungsfaden hängen Außen- und Innenglied miteinander zusammen.

Die Membraneinscheibchen werden von den Innengliedern gebildet und wandern von der Basis des Außengliedes bis zu seiner Spitze, von wo aus sie in das Pigmentepithel übertreten und dort aufgelöst werden. Dieser Durchlauf dauert beim Säuger ungefähr 7-10 Tage (1,2).

1.4 Makula

Die Macula lutea ist eine in der zentralen Retina gelegene 5-6mm breite Zone welche nur Zapfen enthält. Hier wird das beste Farbsehen und die größte Sehschärfe erreicht (2).

1.5 Aderhaut

Über die Aderhaut (Choroidea) erfolgt die Blutversorgung der Photorezeptoren und des retinalen Pigmentepithels. Sie gliedert sich von außen nach innen in drei Schichten: die lamina vasculosa liegt der Sklera an, darauf folgt die lamina choroidokapillaris, dann die Bruch-Membran, die den RPE- Zellen anliegt (2).

1.6 Membrana limitans interna (ILM)

Die ILM ist die Basalmembran der Pars optica der Retina. Zu ihr gehören alle Strukturen, die zwischen dem Glaskörper und der Plasmamembran der Müllerzellen liegen. Sie besteht aus drei Schichten, der Lamina rara interna, der Lamina rara externa und der Lamina densa (3,4). Die der Plasmamembran der Müllerzellen anliegende Lamina rara interna hat eine irreguläre, gewellte Oberfläche. Die dem Glaskörper zugewandte Lamina rara externa ist glatt (5). Zwischen diesen beiden Schichten liegt die Lamina densa.

Über der Fovea und am Rand der Retina ist sie sehr dünn, während sie am hinteren Fundus wieder an Dicke zunimmt und stärker gefaltet ist. Auch in dieser Region nimmt die Dicke aber über den Gefäßen wieder stark ab (3,6) . Insgesamt nimmt die Dicke der ILM -eventuell durch Ablagerungen von Material aus den Müllerzellen- mit dem Alter zu (7).

Die ILM besteht aus Kollagen Typ I und IV, Glykoproteinen, Laminin und Fibronectin (6,8).

Sie ist PAS- positiv wie andere Basalmembranen in Körper und Auge z.B. die Linsenkapsel. Auch in der Elektronenmikroskopie zeigt sie die typischen Merkmale einer Basalmembran (5).

1.7 Retinale Pigmentepithelzellen (RPE- Zellen)

Das retinale Pigmentepithel liegt zwischen der Aderhaut, von der es durch seine Basalmembran, die oberste Schicht der Bruch-Membran, getrennt ist und der Photorezeptorschicht der Netzhaut. Es erstreckt sich als einschichtiges Epithel von der Sehnervenpapille bis zur Ora serrata.

Embryologisch entwickelt es sich aus der gleichen neuronalen Anlage wie die Netzhaut, differenziert sich aber zu einem sekretorischen Epithel und besitzt keine neuronale Funktion.

Die RPE- Zellen sind im Querschnitt kubisch und sechseckig in der Aufsicht. In der Makularegion haben sie einen Durchmesser von 10- 14 μm , zur Peripherie hin werden sie flacher und haben dort einen Durchmesser von bis zu 60 μm . Verbunden sind die Zellen durch apikal liegende tight junctions.

Die apikale, den Photorezeptoren zugewandte Plasmamembran der RPE- Zellen bildet viele Mikrovillie aus, die zwischen die Außensegmente der Stäbchen und Zapfen reichen und diese umschließen. Das apikale Zytoplasma enthält Elemente des Zytoskeletts wie Mikrotubuli und Mikrofilamente und den größten Anteil der Melanosomen. Darunter im Mittelteil der Zelle liegen der Zellkern, Golgie- Apparate, Lysosomen und endoplasmatisches Retikulum.

Die der Bruch- Membran zugewandte Plasmamembran der Zellen zeigt viele Membraneinfaltungen was zu einer Vergrößerung der Oberfläche für Absorption und Resorption führt.

Zwischen Photorezeptoren und RPE- Zellen im sogenannten subretinalen Raum befindet sich außer den apikalen Mikrovillie auch die Interphotorezeptormatrix (IPM).

Sie besteht aus Glykosaminoglykanen und Proteinen und legt sich an die Membrana limitans externa sowie die apikale Seite der RPE- Zellen an. Sie dient als Medium für den Transport von Nährstoffen, Retinoiden und Metaboliten durch den subretinalen Raum zwischen RPE- Zellen und Retina.

Roy H. Steinberg schreibt im Vorwort zu „The Retinal Pigment Epithelium“ (9) es gäbe zwei Funktionen, für welche die Notwendigkeit der Unterstützung von Photorezeptoren und Retina durch die RPE- Zellen gut erforscht wäre- die Phagozytose der Membranscheibchen der Außensegmente der Photorezeptoren und der Transport von Vitamin A zur Retina hin und von ihr weg. Zahlreiche andere Funktionen der RPE- Zellen werden als wichtige Faktoren für einen ungestörten Sehvorgang in den Photorezeptoren vermutet, ihre Zusammenhänge mit der Aufrechterhaltung einer intakten Netzhaut und ihrer Umgebung werden aber noch kontrovers diskutiert.

Wie oben beschrieben entstehen an der Basis der Außensegmente durch Einstülpung der Plasmamembran so genannte Membranscheibchen, die das Sehpigment enthalten und in einem Zyklus von ungefähr 7 bis 10 Tagen von der Basis zur Spitze des Außensegments wandern. Da diese Membranscheibchen Licht und Sauerstoff ausgesetzt sind, welche durch die Bildung von freien Radikalen zu einer Schädigung der Membranen führen können, ist eine ständige Entsorgung und Erneuerung der Membranscheibchen sehr wichtig.

An jedem Photorezeptor werden täglich mehr als 100 Membranscheibchen entsorgt.

An der Spitze des Außensegments gelegene, abgestoßene Membranscheibchen werden in Paketen von 30 bis 40 Scheibchen von den apikalen Mikrovillie der RPE- Zellen umgeben und als Phagosom in die Zelle aufgenommen. Die im rauen Endoplasmatischen Retikulum synthetisierten Verdauungsenzyme sind im Zytoplasma in Lysosomen enthalten.

Durch die Fusion des Phagosoms mit einem Lysosom kann das Material der Membranscheibchen durch hydrolytische Enzyme zersetzt werden.

Retinol und Fettsäuren können recycelt und Abfallstoffe durch die basale Plasmamembran ausgeschieden werden.

Ein Teil des membranösen Materials bleibt als Restkörperchen in der Zelle zurück und trägt zur Bildung von Lipofuszin bei.

Lipofuszin ist ein im ganzen Nervensystem vorkommendes „ Alterspigment“, dessen Bedeutung für die Pathologie des Auges noch nicht geklärt ist.

Jede RPE- Zelle nimmt so täglich mehr als 4000 Membranscheibchen auf, um diese zu verdauen und das anfallende Material weiterzuverwerten.

Der Sehfärbstoff der Photorezeptoren besteht aus einem Proteinanteil, dem Opsin und einem Vitamin A- Anteil in Form von 11- cis- Retinal, der einem Kreislauf im Auge zwischen Photorezeptoren, Interphotorezeptor- Matrix und RPE- Zellen unterliegt. Die Aufgabe der RPE- Zellen liegt in der Aufnahme, Speicherung und Umwandlung von Vitamin A (Retinol).

Das Sehpigment sitzt vor dem Einfall von Lichtenergie in der Lipiddoppelschicht der Membranscheibchen der Außenglieder. Durch die Lichtenergie kommt es zu einer Konformationsänderung des 11- cis- Retinal zu all- trans- Retinal und anschließend daran zu einem Zerfallsprozess, der bei Retinol und Opsin endet. Das entstandene Retinol wird durch die Phagozytose der Membranscheibchen der Außenglieder in die RPE- Zellen aufgenommen oder über die IPM zu den RPE- Zellen transportiert. Das in die RPE- Zelle gelangte Retinol wird an spezielle Proteine gebunden und kann dann durch die Esthersynthetase in den Mikrosomen der RPE- Zellen verestert werden. Dadurch wird es zu einer stabilen, nicht- toxischen Form des Vitamin A, die gut gespeichert werden kann und als Substrat für die Isomerisation des all- trans- Retinals zu 11- cis- Retinal. Dieses wird über die IPM wieder zu den Außengliedern transportiert, um sich dort mit Opsin zu Rhodopsin zu verbinden.

Über diesen Kreislauf hinaus können RPE- Zellen an ihrer basalen Membran Retinol aus dem Blut aufnehmen.

Als weitere wichtige Funktion der RPE- Zellen wird die Aufrechterhaltung des richtigen Milieus für die Photorezeptoren im subretinalen Raum angesehen.

Als Teil der Blut- Retina- Schranke verhindern die RPE- Zellen mit ihren apikalen Mikrovillie und den tight junctions das Eindringen ungewollter Moleküle und Flüssigkeit aus der Choroidea.

Andererseits können sie durch spezielle Transportproteine in der apikalen und basolateralen Membran die Zusammensetzung der Flüssigkeit im subretinalen Raum durch den Transport von Ionen, Flüssigkeit und Metaboliten beeinflussen. Wichtiger Faktor für diese Funktion ist auch die im subretinalen Raum gelegene IPM.

IPM und RPE- Zellen tragen durch die Regulation des Milieus im subretinalen Raum auch zu einer adäquaten Adhäsion der Netzhaut an die sie versorgenden Strukturen bei.

(nach „The Retinal Pigment Epithelium“ (9) und „Retinal Pigment Epithelial Transplantation“(10))

1.8 Transplantation von retinalen Pigmentepithelzellen im Tiermodell

Ziel einer Transplantation ist es, erkrankte Zellen, die ihre normale Funktion nicht erfüllen können, durch funktionstüchtiges Spendergewebe zu ersetzen.

In der Augenheilkunde ist dies eine wichtige Herausforderung, da degenerative Veränderungen der Retina eine häufige Ursache für eine Sehverschlechterung bis hin zur Erblindung sind (11). Die Netzhaut bietet im Vergleich zur Transplantation anderer Zellen des Gehirns den Vorteil, daß sie leichter zugänglich, gut sichtbar und genau erforscht ist.

Insbesondere die Pigmentepithelzellen sind gut zur Transplantation geeignet, da sie sich in vitro kultivieren lassen und nur in der Nachbarschaft der Sinneszellen liegen, aber selber keine Synapsen bilden.

Fortschritte in der wissenschaftlichen Akzeptanz dieser Methode wurden erzielt, als man eine positive Wirkung der Pigmentepitheltransplantation auf die hereditäre retinale Dystrophie der Royal College of Surgeons Dystrophic Rat (RCS- Ratte) nachweisen konnte (12).

Es handelt sich um einen Rattenstamm mit einer erblichen Netzhautdegeneration, bei dem es innerhalb von 60 Tagen nach der Geburt zur Erblindung kommt. Histologisch findet sich eine Anhäufung von Außengliedern und vollständige Destruktion der Photorezeptorzellen.

Man geht davon aus, dass die Pigmentepithelzellen bei dieser Krankheit nicht zur Phagozytose fähig sind (13, 14).

Li und Turner (15) konnten 1988 zeigen, dass die Transplantation von normalen, pigmentierten RPE- Zellen in den subretinalen Raum der RCS- Ratte die Photorezeptoren in der unmittelbaren Umgebung vor einer Degeneration schützt.

Anhand radioaktiver Markierung konnte das Anhaften der pigmentierten RPE- Zellen auf der Bruchmembran eine Woche nach der Transplantation gezeigt werden. Elektronenmikroskopisch zeigte sich eine normale Verbindung zwischen diesen transplantierten RPE- Zellen und den Außensegmenten der Photorezeptoren.

Im Vergleich mit intakten Netzhäuten konnten keine signifikanten Unterschiede in der Dicke der äußeren Körnerschicht oder der Länge der Innen- oder Außenglieder der Photorezeptoren über dem transplantierten Bereich nachgewiesen werden. Dies konnte über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten beobachtet werden (16).

Weitere Hinweise auf eine normale Funktion sowohl der transplantierten RPE- Zellen als auch der überlebenden Photorezeptoren wurden in folgenden Studien gefunden (17, 18, 19).

Es stellte sich jedoch heraus, dass, um das Überleben der Photorezeptoren über einen längeren Zeitraum -bis zu einem Jahr- zu erreichen, junge, gesunde RPE- Zellen zu einem frühen Zeitpunkt des Krankheitsprozesses transplantiert werden mussten (20).

Sowohl bei kultivierten RPE- Zellen als auch denen adulter Ratten zeigte sich eine signifikante, altersbezogene Abnahme der Fähigkeit, die Degeneration der Photorezeptoren aufzuhalten (21).

Das Ergebnis weiterer Studien war der Nachweis, dass durch die RPE- Zell- Transplantation eine Degeneration des tiefen, retinalen Gefäßnetzes und die Ausbildung von Neovaskularisationen aufgehalten werden konnte.

Dies ist von grosser Bedeutung, da Umbauvorgänge des Gefäßnetzes und Neovaskularisationen eine wichtige Rolle für die Prognose des Sehverlustes bei Erkrankungen wie der altersbedingten Makuladegeneration oder der diabetischen, proliferativen Retinopathie spielen(22).

Diese Ergebnisse führten zu Studien der RPE- Transplantation an zahlreichen anderen Spezies und zu weiteren Untersuchungen zur chirurgischen Technik der Transplantation, dem Überleben des Transplantates und der Immunantwort des Empfängers (11).

1.9 Klinische Anwendbarkeit der Transplantation retinaler Pigmentepithelzellen

Devjani schreibt 1995 (10), dass Erkrankungen des Menschen, die am ehesten für eine Transplantation von RPE- Zellen in Frage kämen, Degenerationen der Makula wie die altersbedingte Makuladegeneration, Morbus Stargardt, vitelliforme Makuladystrophie und andere sind. Besonders intensiv wurden in den vergangenen Jahren Möglichkeiten der Therapie der altersbedingten Makuladegeneration erforscht, da sie heute die häufigste Ursache einer Erblindung nach gesetzlicher Definition in den westlichen Industrienationen darstellt. Da angenommen wird, dass der primäre Defekt bei der altersbedingten Makuladegeneration im Pigmentepithel liegt, stellt die Transplantation von RPE- Zellen einen potenziellen Therapieansatz dar (23).

1.9.1 Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)

Die AMD manifestiert sich in zwei Hauptformen, der atrophischen oder trockenen Form und der sogenannten feuchten Form. Die trockene Form der AMD ist gekennzeichnet durch eine zunehmende Atrophie des Pigmentepithels und der Choriokapillaris.

Bei der feuchten Form kommt es zum Einsprossen choroidaler Neovaskularisationen (CNV) durch die Bruch-Membran in den subpigmentepithelialen und subretinalen Raum (24).

Bei Patienten mit AMD kommt es fast immer zu einem Verlust der Lesefähigkeit, aber sehr selten zu totaler Blindheit. Die feuchte Form der AMD zeigt dabei ein deutlich höheres Risiko nach kurzer Zeit die zentrale Sehschärfe zu verlieren (25).

Es kann zu Blutungen aus den CNV, der Bildung fibrovaskulärer Membranen und anschließend zu ausgedehnten fibrösen Vernarbungen der Netzhaut kommen.

Um das Risiko einer Blutung aus diesen pathologischen Gefäßen zu verringern, stehen heute je nach Lage der CNV verschiedene Therapiemöglichkeiten zur Verfügung.

Extrafoveal gelegene CNV können mit Hilfe eines Argon-Grün-Lasers verödet werden. Durch die Koagulation kann man spätere massive Blutungen verhindern. Bei vielen Patienten kommt die Laserkoagulation jedoch zu spät oder aufgrund der zentralen Lage der CNV nicht in Frage. Liegt die CNV unter der Fovea, kann eine sogenannte photodynamische Therapie durchgeführt werden, Porphyrin-Farbstoffe reichern sich im Gefäßendothel an und die CNV kann anschließend durch die Bestrahlung mit Laserlicht verödet werden, ohne die Photorezeptoren der Fovea zu zerstören.

Bei fortgeschrittenen subretinalen Neovaskularisationen, bei denen eine Laserkoagulation oder photodynamischen Therapie nicht möglich ist, kann die chorioidale Neovaskularisation auch chirurgisch entfernt werden. Dies führt oft zu einer Stabilisation der Sehschärfe (24).

Eine Verbesserung ist bei der alleinigen submakulären Membranextraktion nicht zu erreichen, da es bei der chirurgischen Exzision subfoveolärer Neovaskularisationsmembranen in der Regel zu einer gleichzeitigen Entfernung des einschichtigen RPE- Zellrasens kommt.

Dies führt zu einem irreversiblen Funktionsverlust der Fovea, da zum Überleben der Photorezeptoren eine intakte Pigmentepithelschicht notwendig ist (25).

Die Deckung des RPE- Zelldefektes durch die Transplantation von Pigmentepithelzellen würde hierbei theoretisch eine Möglichkeit zur Sehverbesserung bieten.

1.9.2 Bisherige Erfahrungen am Menschen

Die Transplantation homologer, fetaler RPE- Zellen in den Subretinalraum nach Membranextraktion bei exsudativer AMD, die den Vorteil junger, morphologisch hoch differenzierter Zellen bieten würde (23), führte zu einer Abstoßungsreaktion.

Diese zeigte sich anhand der Entwicklung eines Ödems der Retina, der Darstellung pathologischer Gefäße in der Fluoreszenzangiographie und einer Sehverschlechterung. In der Selben Studie stellte sich heraus, dass die Transplantation homologer, fetaler RPE- Zellen in den Subretinalraum von Patienten mit trockener AMD nicht zu Zeichen einer Abstoßungsreaktion führte (26). Es wird vermutet, dass der sonst immunologisch privilegierte Subretinalraum durch pathologische Veränderungen bei neovaskulärer AMD für zirkulierende Immunzellen zugänglich wird. Um die Abstoßungsreaktion zu vermeiden, wurde die Verwendung autologer RPE- Zellen zur Transplantation vorgezogen (25).

Der Versuch der Transplantation autologer RPE- Zellen nach chirurgischer CNV- Exzision bei Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration führte weder zu intraoperativen noch zu postoperativen signifikanten Komplikationen. Die Zellen wurden hierbei als Zellsuspension unter die zentrale Netzhaut transplantiert. Während dem Beobachtungszeitraum, der zwischen 12 und 24 Monaten lag, traten keine Rezidive der CNV auf. Eine Lesefähigkeit konnte jedoch nur bei 21% der Patienten erreicht werden (27). Es ist anzunehmen, dass die Manipulation der RPE- Zellen bei der Entnahme z.B. durch die mechanische Abtragung von der Bruch-Membran und die Verfahrensschritte außerhalb des Auges zu einem Verlust des normalen RPE- Zellphänotyps führen.

Es kommt zu einer Zelldedifferenzierung hin zu fibroblastenähnlichen Zellen und dem Verlust der Polarität der Zellen. Es bildet sich kein einschichtiger RPE- Zellrasen mit regelrechten interzellulären Verbindungen und einer intakten äußeren Blut- Retina- Schranke (25).

Stanga et al. (28) führten eine autologe „en- bloc,-“ Translokation von RPE, korrespondierender Bruch-Membran und der Aderhaut durch. Es zeigte sich jedoch kein befriedigendes, funktionelles Ergebnis. Im Vergleich zur Transplantation einer Zellsuspension bietet dieses Verfahren die Möglichkeit, das Trauma für die Zellen und somit das Risiko für eine Zelldedifferenzierung zu minimieren. Außerdem kann hierbei der physiologische, einschichtige RPE-Zellrasen erhalten werden. Die Aderhaut macht in einem RPE/Bruch-Membran/Aderhaut-Block 90% des vertikalen Ausmaßes aus. Man könnte annehmen, dass dies zu einer verlängerten Diffusionsstrecke zwischen der Aderhaut am Transplantationsort und den RPE- Zellen bzw. der äußeren Netzhautschicht führt. Um nach einer CNV- Exzision möglichst physiologische Verhältnisse im Subretinalraum der Makula zu schaffen, müsste idealerweise ein intakter RPE- Zellrasen ohne weitere Gewebsbestandteile transplantiert werden. Eine Strategie, um RPE- Zellen im Gewebeverband als „sheet“ zu transplantieren ,ist, RPE- Zellen auf einer artefiziellen Unterlage in vivo zu züchten und nach Erreichen der Zellkonfluenz zu transplantieren. Hierbei könnte fast ausschließlich der erforderliche einschichtige RPE- Zellrasen transplantiert werden. Die RPE- Zellen müssen jedoch außerhalb des Auges weiterverarbeitet und kultiviert werden, was die Gefahr der Dedifferenzierung birgt (25). Der Weg über die Zellkultur bietet aber auch die Möglichkeit, die Vitalität der Zellen zum Zeitpunkt der Transplantation sicherzustellen.

Dagegen können frisch entnommene Zellen während des Entnahmeprozesses geschädigt werden (23). Als Unterlagen für die Entwicklung solcher „sheet-Transplantate“ kamen verschiedene Materialien, z.B. Kollagen (29), vordere Linsenkapsel(30) und Amnionmembran (31) zum Einsatz. Micheli und Newsome fanden heraus, dass das Substrat, auf dem die RPE- Zellen anhaften, ihre Morphologie und Differenzierung beeinflusst (32).

Durch die Blockade bestimmter Proteine durch Antikörper konnte nachgewiesen werden, dass Laminin, Fibronectin, Vitronectin und Kollagen Typ IV Voraussetzungen für die Bindung von RPE- Zellen an die Bruch-Membran und von den Zellen selbst gebildeter Extrazellulärmatrix sind (33).

1.10 Ziel der Arbeit

In der Elektronenmikroskopie stellt sich die ILM homolog zur Bruch-Membran, der natürlichen Basalmembran der RPE- Zellen, dar (5).

Sie besteht aus Kollagen Typ I und IV, Laminin und Fibronectin; Molekülen also, die eine Adhäsion von Zellen ermöglichen (6).

Ihre Entnahme im Rahmen der Therapie bei Makulaforamen ist heute eine weithin akzeptierte chirurgische Methode. Es ist möglich die ILM ohne eine signifikante Schädigung angrenzender zellulärer Strukturen zu entnehmen (34). Diese Eigenschaften versprechen, dass die ILM sich gut als Unterlage für ein autologes RPE- sheet- Transplantat in einem zweizeitigen Vorgehen eignen würde.

In dieser Studie wurde untersucht ob es humanen (hRPE, ARPE19) und RPE- Zellen von Schweinen (sRPE) möglich ist, auf der ILM anzuhaften und anschließend in Kultur zu proliferieren. Anhand von Licht- und Elektronenmikroskopie wurde untersucht, ob die RPE- Zellen ihre normalen, morphologischen Merkmale in der Kultur erhalten konnten.

2. Material und Methoden

2.1 Humanes Ausgangsmaterial

Die humanen Spenderaugen (hRPE) (n=16) stammten von Korneaspendern im Alter von 35 bis 86 Jahren. Die Zeitspannen zwischen dem Versterben der Person und der Enukleation des Auges lagen zwischen 8 und 12 Stunden.

Eine schriftliche Einverständniserklärung lag in allen Fällen vor.

Bei der ARPE19-Zelllinie handelt es sich um eine von Dunn et al. isolierte Zelllinie, die sich durch ihre epitheliale Morphologie und rasche Proliferation auszeichnet. Sie besitzt strukturelle und funktionelle Eigenschaften, die für RPE- Zellen in vivo charakteristisch sind. Daher eignet sie sich für in vitro Untersuchungen über die Physiologie der RPE-Zellen (35).

Die verwendeten ARPE19-Zellen von ATCC wurden über die LCG Promochem GmbH bezogen.

2.2 Porkines Ausgangsmaterial

Die Schweinaugen (sRPE) (n=12) wurden zwei bis vier Stunden nach der Entnahme gekühlt im Labor angeliefert, anschließend wurden die RPE- Zellen herauspräpariert.

2.3 Präparation der Membrana limitans interna

Material:

Sterile Arbeitsbank (Microflow Biological Safety Cabin, Nunc)

Tiefkühltruhe (Liebherr Premium)

Mikroskop (Stemi 2000-C, Zeiss)

Kaltlichtquelle (KL 1500 electronic, Schott)

Gewebekulturschalen steril, 94/16 mm (CELLSTAR, Greiner bio-one)

D-PBS (Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline Nr. 14190094, GIBCO)

Indocyanine- Grün-Lösung (ICG-Pulsion, Pulsion Medical Systems)
Coverslips steril, 13mm Durchmesser, 0,2mm dick (Thermanox 174950, Nunc)
Parafilm (Parafilm „M“, Pechiney Plastic Packaging)
Eppendorf Reference Pipette
Schere
Pinzetten

Methode:

Es wurde ausschließlich humane Membrana limitans interna (hILM) präpariert. Nach Entnahme der Kornea im sterilen OP-Bereich wurden die Bulbi in einem D-PBS gefüllten Gefäß platziert und für die weitere Verarbeitung ins Labor gebracht. Alle weiteren Schritte im Labor erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Die weitere Präparation des Bulbus erfolgte in einer Gewebekulturschale. Mit der Schere wurde ein zirkulärer Schnitt in Höhe der Ora serrata gemacht. Der Glaskörper ließ sich dann durch Umkippen des Bulbus entfernen.

Nach Füllung des Bulbus mit D-PBS löste sich die Netzhaut von der Bulbuswand ab und konnte anschließend von der Sehnervenpapille abgeschnitten werden. Sie ließ sich durch Umkippen des Bulbus unbeschädigt in eine weitere mit D-PBS gefüllte Gewebekulturschale bringen.

Die RPE- Zellen wurden anschließend aus demselben Bulbus entnommen (s. 2.4).

Unter dem Mikroskop konnte die frei schwimmende Retina so ausgerichtet werden, dass die vitreale Seite nach oben zeigte. Dann erfolgte die Anfärbung der ILM mit einigen Tropfen ICG.

Mit Hilfe von zwei Pinzetten und durch Kaltlicht ausgeleuchtet wurde die ILM von der Retina abgezogen. Dies war an der Macula lutea möglich, nicht jedoch an der dünnen ILM der Netzhautperipherie.

Die 2-3mm großen ILM- Stücke wurden mit der Pinzette an ein schräg gehaltenes Coverslip angedrückt, durch langsames Herausziehen aus der Flüssigkeit breitete sich die ILM auf dem Coverslip aus. Beides wurde für bis zu einer Stunde unter der Sterilbank getrocknet, um ein Abgleiten der ILM vom Coverslip zu verhindern und ein gutes Anhaften der ILM zu gewährleisten.

Die mit ILM „beschichteten“ Coverslips wurden, falls nicht sofort weiterverarbeitet, in einer mit Parafilm ausgelegten Gewebekulturschale bei -21 Grad eingefroren.

2.4 Präparation der retinalen Pigmentepithelzellen und Aufbringen auf die ILM

Material:

ARPE19 Zellen (ATCC/ LCG Promochem)

Sterile Arbeitsbank (Microflow Biological Safety Cabin, Nunc)

Zentrifuge (Multifuge 3 s-r, Heraeus)

Inkubator (CO2 Autozero, Heraeus)

Wasserbad (GFL)

Gewebekulturschalen steril, 94/16 mm (CELLSTAR, Greiner bio- one)

Gewebekulturschalen steril, 35/10 mm (CELLSTAR, Greiner bio- one)

D-PBS (Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline Nr. 14190094, GIBCO)

D-MEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium Nr. 31885023, GIBCO)

FBS (fetal bovine serum Nr. 10270106, GIBCO)

Penicillin- Streptomycin (Nr. 15140122, GIBCO)

Trypsin- EDTA- Lösung (Nr. 25200072, GIBCO)

Zentrifugenröhrchen (Nunc)

Skalpell zum Einmalgebrauch steril (Feather Skalpell Nr.11, Milian USA)

Schere

Pinzette

Eppendorf Reference Pipette

Pasteurpipette

Methode:

Das Zellkulturmedium wurde im Verhältnis 445 ml D-MEM, 50 ml FBS und 5 ml Penicillin- Streptomycin gemischt.

Die in flüssigem Stickstoff konservierten ARPE19-Zellen wurden für etwa zwei Minuten im Wasserbad bei 37 Grad aufgetaut und anschließend in ein mit Zellkulturmedium gefülltes Zentrifugenröhrchen pipettiert.

Die Schweineaugen wurden ebenso wie die humanen Bulbi durch Aufschneiden im Bereich der Ora serrata und Entfernung von Glaskörper und Netzhaut für die Präparation der RPE- Zellen vorbereitet.

Der Augenbecher wurde nochmals mit D-PBS aufgefüllt, um verbliebene Retinastücke abzusaugen.

Der Augenbecher wurde mit einer Trypsin- EDTA- Lösung gefüllt und für 30 Minuten inkubiert, um die RPE- Zellen enzymatisch zu lösen. Anschließend konnten die RPE- Zellen mit einer vorne abgerundeten Pasteurpipette leicht von der Bulbuswand abgeschabt werden.

Die gelösten Zellen wurde in ein mit D- MEM gefülltes Zentrifugenröhrchen gebracht, um die enzymatische Wirkung zu stoppen.

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden mit den humanen RPE- Zellen der Spenderaugen (hRPE), den porkinen RPE- Zellen (sRPE) und den Zellen der ARPE19-Zelllinie in gleicher Weise ausgeführt.

Die Zellen wurden mit 500 Umdrehungen für zwei Minuten abzentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt.

Ein für mindestens eine Stunde aufgetautes, mit ILM „beschichtetes“ Coverslip wurde in eine kleine(s. o.) Gewebekulturschale gelegt, die RPE- Zellen resuspendiert und als ein das Coverslip überspannender Tropfen auf dieses aufgebracht.

Nachdem die Zellen auf die ILM und das Coverslip abgesunken waren, wurden vorsichtig drei bis fünf Milliliter Zellkulturmedium zugegeben.

2.5 Kultivierung und Photographien

Material:

Inkubator (CO2 Autozero, Heraeus)

Sterile Arbeitsbank (Microflow Biological Safety Cabin, Nunc)

Wasserbad (GFL)

Mikroskop (Inversmikroskop Nikon TMS-F, Nikon)

Fotokamera (Nikon F-301, Nikon)

Zellkulturmedium

Methode:

Die Kultivierung erfolgte im Inkubator.

Einen Tag nach dem Aufbringen der RPE- Zellen auf die ILM wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt.

In der Folge wurde das Zellkulturmedium alle zwei bis drei Tage erneuert, Aussehen und Wachstum der auf dem Coverslip und der ILM anhaftenden RPE- Zellen mittels Phasenkontrast im Mikroskop kontrolliert und Fotos in vierfacher und zehnfacher Vergrößerung angefertigt.

Die Zellen wurden unterschiedlich lange in Kultur belassen (s. Ergebnisse).

2.6 Fixierung

Material:

Nicht- sterile Arbeitsbank mit Abzug

Paraformaldehyd

Glutaraldehyd 25%

Cacodylatpuffer 0,2 m

Ampuwa

NaOH

Schnappdeckelflaschen 5 ml (Nr. 5480555, VWR international)

Pinzette

Methode:

Für die Fixierlösung nach Karnowsky wurde 2 g Paraformaldehyd in 25 ml Ampuwa auf 60 Grad erwärmt, tropfenweise NaOH bis zum Erreichen des Neutralpunktes zugegeben. Die abgekühlte Lösung wurde mit 10 ml Glutaraldehyd (25%) und 65 ml 0,2 molarem Cacodylatpuffers gemischt.

Die Coverslips mit ILM und RPE- Zellen wurden aus der Gewebekulturschale in die Schnappdeckelflaschen gebracht, drei bis vier Milliliter der Fixierlösung zugegeben und für zwölf bis achtzehn Stunden im Kühlschrank belassen.

2.7 Einbettung für die Elektronenmikroskopie

Material:

Cacodylatpuffer 0,1 m

Osmiumtetroxid 2%

Cacodylatpuffer 0,2 m

Ethanol 30%, 50%, 70%, 80%, 95%

Uranylacetat gesättigt in 70% Ethanol

Propylenoxid

Epon

Pasteurpipette aus Plastik

Methode:

Die Fixierlösung wurde aus den Schnappdeckelflaschen abgezogen, die Präparate mit 3 ml 0,1 molarem Cacodylatpuffer für zweimal jeweils 20 Minuten gespült. Die Nachfixierung erfolgte mit einem Gemisch aus 2ml 0.2 molarem Cacodylatpuffer und 2ml Osmiumtetroxid (2%) für eine Stunde unter Lichtabschluss. Anschließend wurde noch zwei Mal für je 20 Minuten mit 0,1 molarem Cacodylatpuffer gespült, dann in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%) für jeweils sieben Minuten entwässert.

Die Stückkontrastierung erfolgte mit Uranylacetat, gesättigt in 70% Ethanol, für eine Stunde unter Lichtabschluss; eine weitere Entwässerung mit 70%, 80% und 95% Ethanol folgte.

In Propylenoxid als intermediärer Phase wurde es für zweimal 15 Minute belassen. Unter Lichtabschluss wurde erst ein Gemisch aus Propylenoxid und Epon 1:1 und dann zweimalig reines Epon für jeweils eine Stunde auf das Präparat gegeben.

Das Präparat wurde aus dem Schnappdeckelfläschchen entnommen, in ein mit Epon gefülltes Plastikförmchen umplatziert, dieses zwölf Stunden bei 45 Grad und 24 Stunden bei 60 Grad polymerisiert.

2.8 Elektronenmikroskopie

Material:

Elektronenmikroskop (EM 900, Zeiss)

Säge

Schneidemaschine (Ultracut, Reichert und Jung)

Diamantmesser (Diatome)

Kupfer- Netze (Gritt) (2x1 mm, Agar)

Filmmaterial (Imago)

Kupfer- Einwegblenden

Toluidinblau

Uranylacetat

Bleicitrat

Methode:

Die gewünschte Stelle für den Schnitt wurde unter dem Mikroskop markiert und der Eponblock zurechtgesägt, Ultradünnschnitte (700 nm) angefertigt und mit Toluidinblau angefärbt. Anschließend wurden sie unter dem Mikroskop beurteilt und bei Zufriedenheit elektronenmikroskopische Schnitte (70 nm) angefertigt und auf ein Kupfer- Netz „aufgezogen“. Diese Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Nach der Elektronenmikroskopie wurden Photographien in unterschiedlicher Vergrößerung angefertigt.

Das Filmmaterial wurde entwickelt und die Negative mittels Adobe Photoshop weiterverarbeitet.

3. Ergebnisse

3.1 Porkine RPE- Zellen

Insgesamt entstanden zwölf sheet- Transplantate porkiner RPE- Zellen auf humaner ILM.

Diese Proben wurden zwischen drei und sieben Tagen in Kultur belassen. Während dieser Zeit erfolgte eine lichtmikroskopische Beobachtung des Verhaltens und Aussehens der Zellen. Anschließend erfolgte eine genauere Analyse der Morphologie der Zellen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie.

Als Vorbereitung der Elektronenmikroskopie wurden Semidünnschnitte (700nm) mit 1%-igem Toluidinblau gefärbt und ebenfalls lichtmikroskopisch beurteilt.

3.1.1 Kultur und Lichtmikroskopie

Es zeigte sich, dass die Zellen innerhalb der ersten zwei Tage auf der ILM anhafteten und sich in dem für RPE- Zellen typischen Pflastersteinrelief darstellten. Es war eine deutliche Pigmentierung der Zellen erkennbar (**Abb.1**).

Bis zum siebten Tag in Kultur war eine Konfluenz der Zellen und damit einhergehende Abnahme der Pigmentierung erkennbar.

Das Pflastersteinrelief blieb erhalten (**Abb.2**).

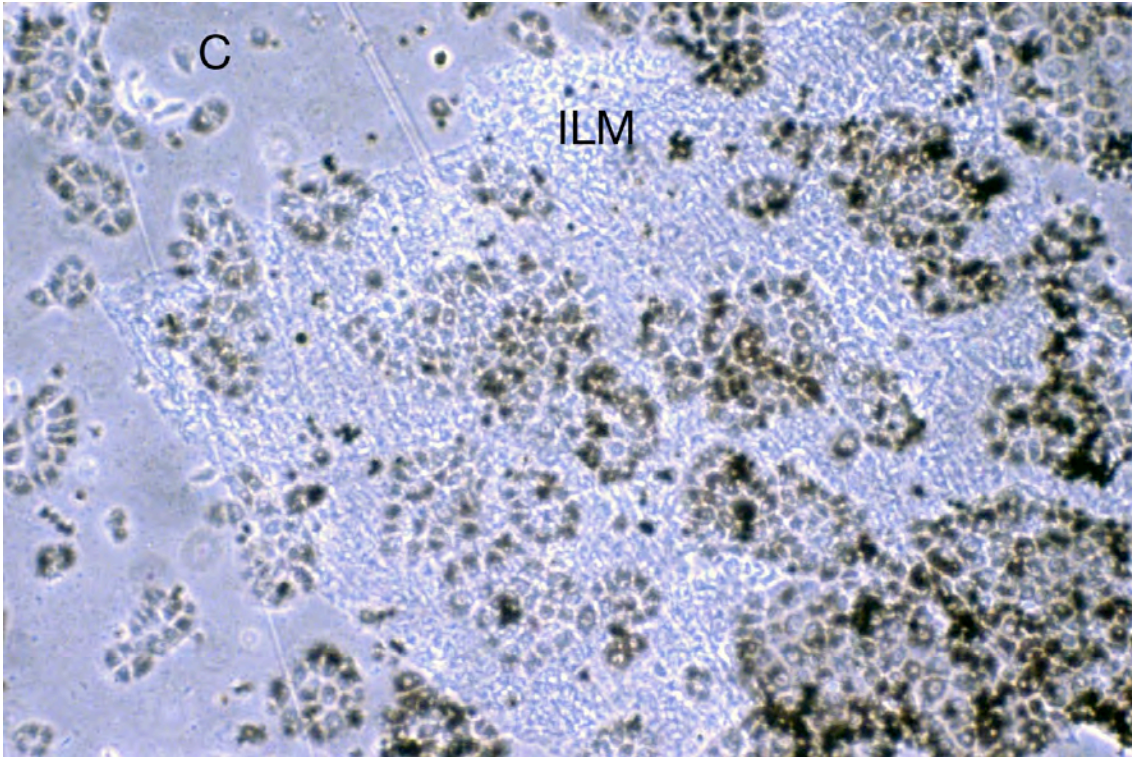


Abbildung 1: sRPE auf hILM am zweiten Tag nach der Präparation
(C= Coverslip, ILM= Membrana limitans interna)

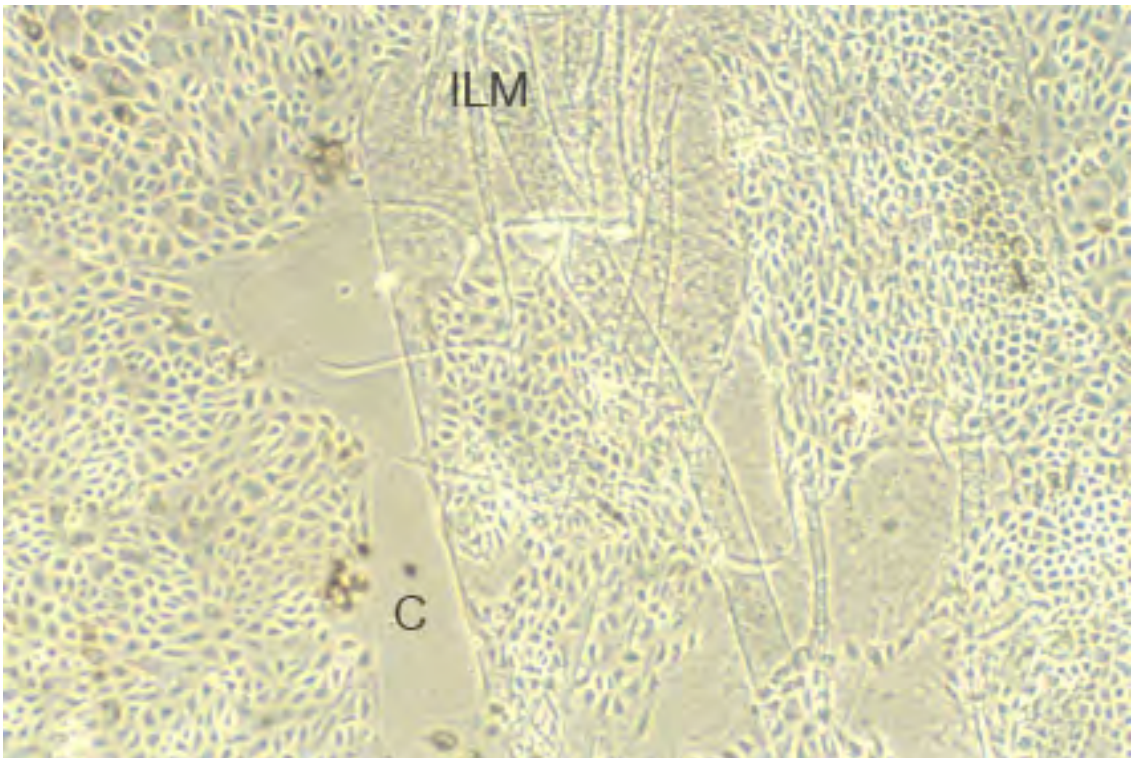


Abbildung 2: sRPE auf hILM am siebten Tag nach der Präparation

3.1.2 Semidünnschnitt

Auf diesem Schnitt ist ein einschichtiger Zellrasen pigmentierter Zellen erkennbar. Es zeigt sich ein nahtloser Übergang des Zellrasens vom Coverslip auf die ILM (**Abb.3**).

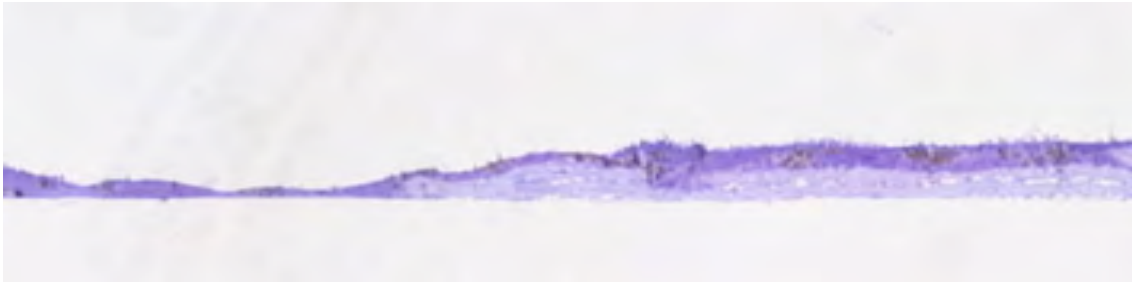


Abbildung 3: Semidünnschnitt (sRPE auf hILM, fixiert am siebten Tag nach der Präparation)

3.1.3 Elektronenmikroskopie

Membrana limitans interna

In der Elektronenmikroskopie zeigte sich, dass es nicht gelungen ist, die ILM allein von der Retina abzuziehen. Ihrer retinalen Seite haftet amorphes Material an (**Abb.4**). Bei ILM- Peeling in vivo mit Verwendung von Indocyanin- Grün zur selektiven Färbung der ILM wurde der ILM anhaftendes zelluläres Material beschrieben und elektronenmikroskopisch dargestellt (36, 37).

Das amorphe Material könnte während der Kultivierung zerfallenem, zellulärem Material entsprechen. Eine eindeutige Zuordnung ist jedoch nicht möglich, da keine Strukturen wie Zellmembranen oder Zellorganellen mehr erkennbar sind.

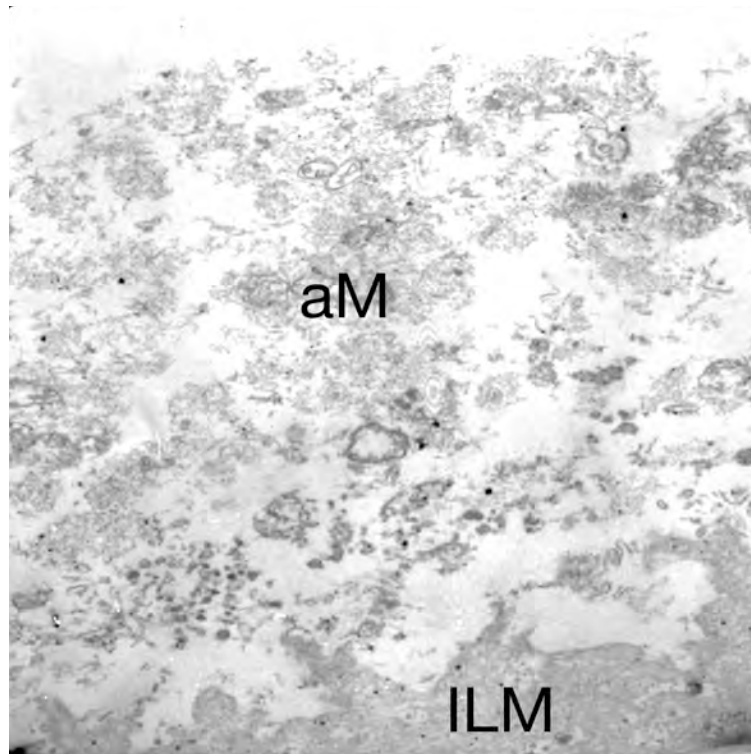


Abbildung 4: amorphes Material (= aM) auf humaner ILM

Porkine RPE- Zellen

In der Elektronenmikroskopie zeigte sich ebenfalls ein einschichtiger Zellrasen sowohl auf als auch neben der ILM. Die Zellen sind durch apikale tight-junctions verbunden. Zellorganellen, Melanosomen im apikalen Teil der Zelle und Mikrovillie an der apikalen Oberfläche sind deutlich erkennbar. Die Zellen haften der unregelmäßigen (retinalen) Seite der ILM an (**Abb.5, Abb.6**).

Das auf Abbildung 6 (**Abb.6**) sichtbare Präparat zeigt eine ILM, die sich wahrscheinlich vor dem Aufbringen auf das Coverslip gefaltet hat. Es haben sich die beiden glatten, vitrealen Oberseiten (Lamina rara externa) aufeinander gelegt. Dies ist in der Elektronenmikroskopie als schmaler Streifen (Lre(d)) erkennbar. Die RPE- Zellen liegen der retinalen, gewellten Seite der ILM an.

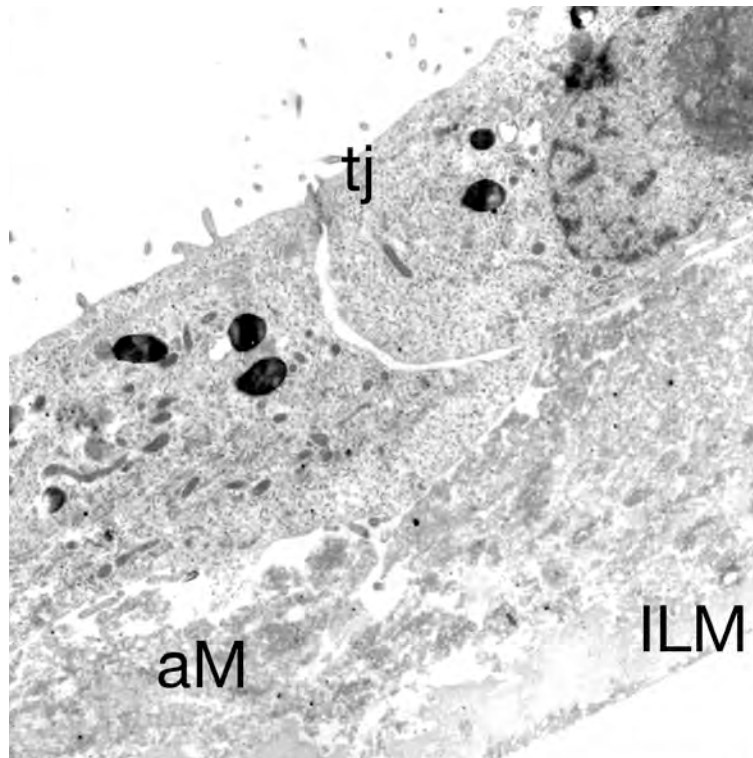


Abbildung 5: sRPE auf hILM, fixiert am dritten Tag nach der Präparation (aM= amorphes Material, tj= tight- junctions)

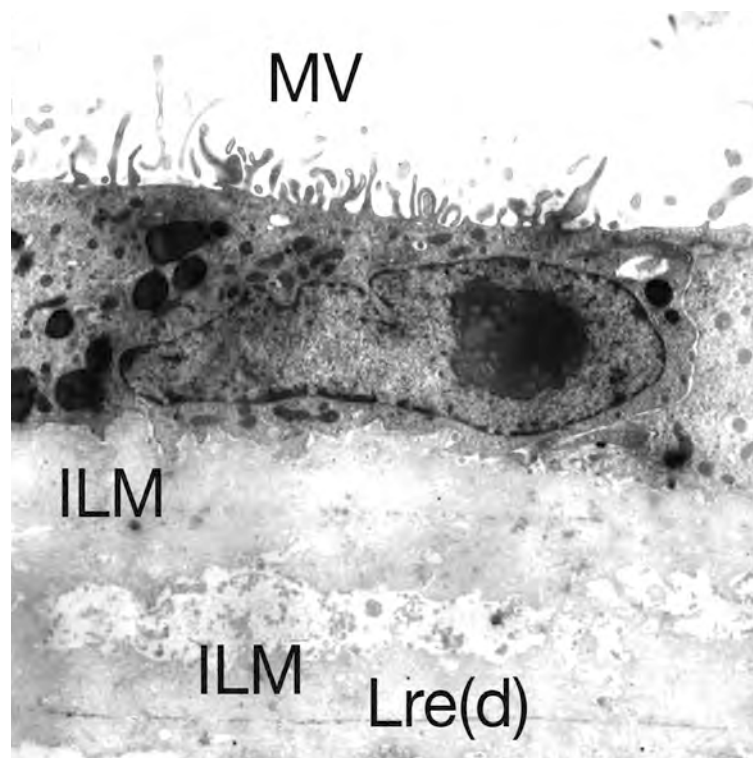


Abbildung 6: sRPE auf hILM, fixiert am siebten Tag nach der Präparation (MV= Mikrovillie, Lre(d)= doppelt liegende Lamina rara externa)

3.2 Humane RPE- Zellen

Es entstanden insgesamt elf sheet- Transplantate humaner RPE- Zellen auf humaner ILM. In allen Fällen konnten aus den Augen der Verstorbenen im Vergleich zu den Schweineaugen nur kleine Mengen von RPE- Zellen gewonnen werden. Die Kultivierung und Beobachtung der Zellen erfolgte in gleicher Weise wie oben bei den porkinen Zellen beschrieben.

3.2.1 Kultur und Lichtmikroskopie

Gruppe 1 (n=6)

In sechs der elf Fälle hafteten die RPE- Zellen weder der ILM noch dem Coverslip an. Es ließ sich daher beim Wechsel des Mediums nicht vermeiden, dass die Zellen mit aufgesaugt wurden. Es war daher keine weitere Beobachtung dieser Zellen möglich.

Gruppe 2 (n=5)

In fünf Fällen hafteten einige der Zellen sowohl der ILM als auch dem Coverslip an.

Bei drei der Proben hafteten die Zellen zwar an, behielten jedoch über die gesamte Kulturzeit (3 Tage, 12 Tage, vier Wochen) ihre abgerundete Form. Sie bildeten kein Pflastersteinrelief und proliferierten nicht.

Die Pigmentierung blieb erhalten (**Abb.7**).

Bei zwei weiteren Proben bildeten die Zellen nach fünf Tagen ein typisches Pflastersteinrelief pigmentierter Zellen aus. Während der Zeit der Kultivierung (7 Tage, 12 Tage) zeigte sich jedoch keine Proliferation oder sonstige Veränderung der Zellen (**Abb.8**).

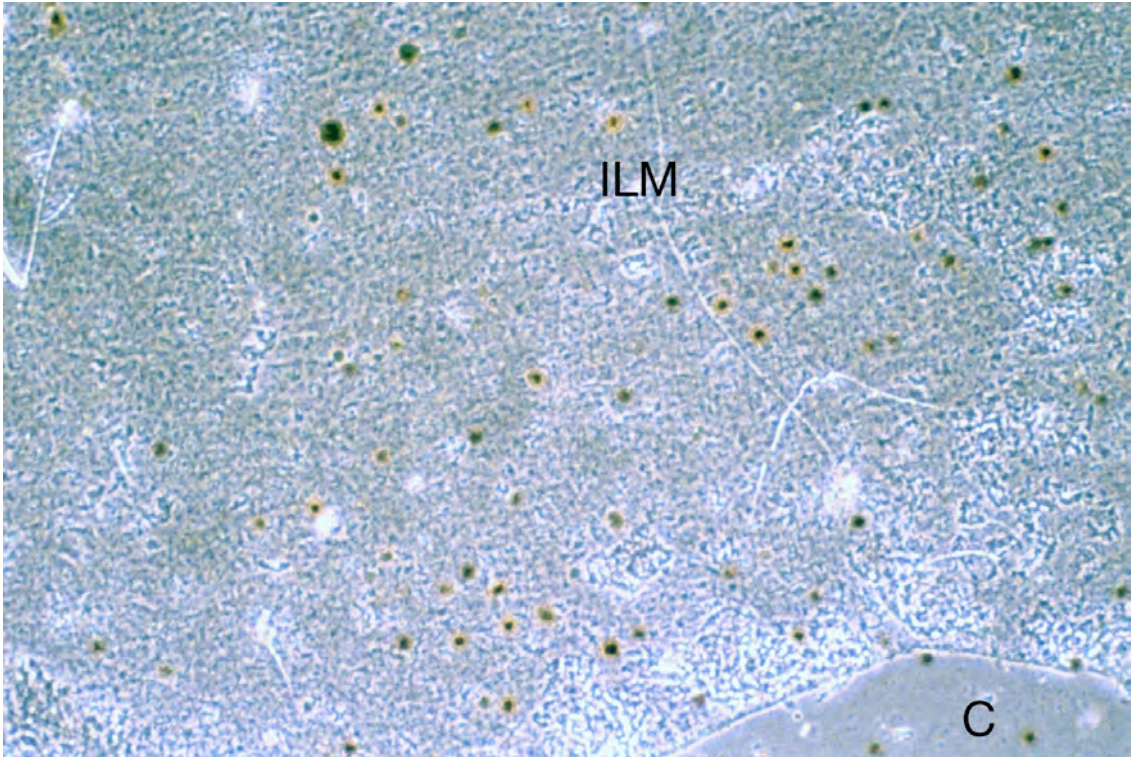


Abbildung 7: hRPE auf hILM, am zwölften Tag nach der Präparation

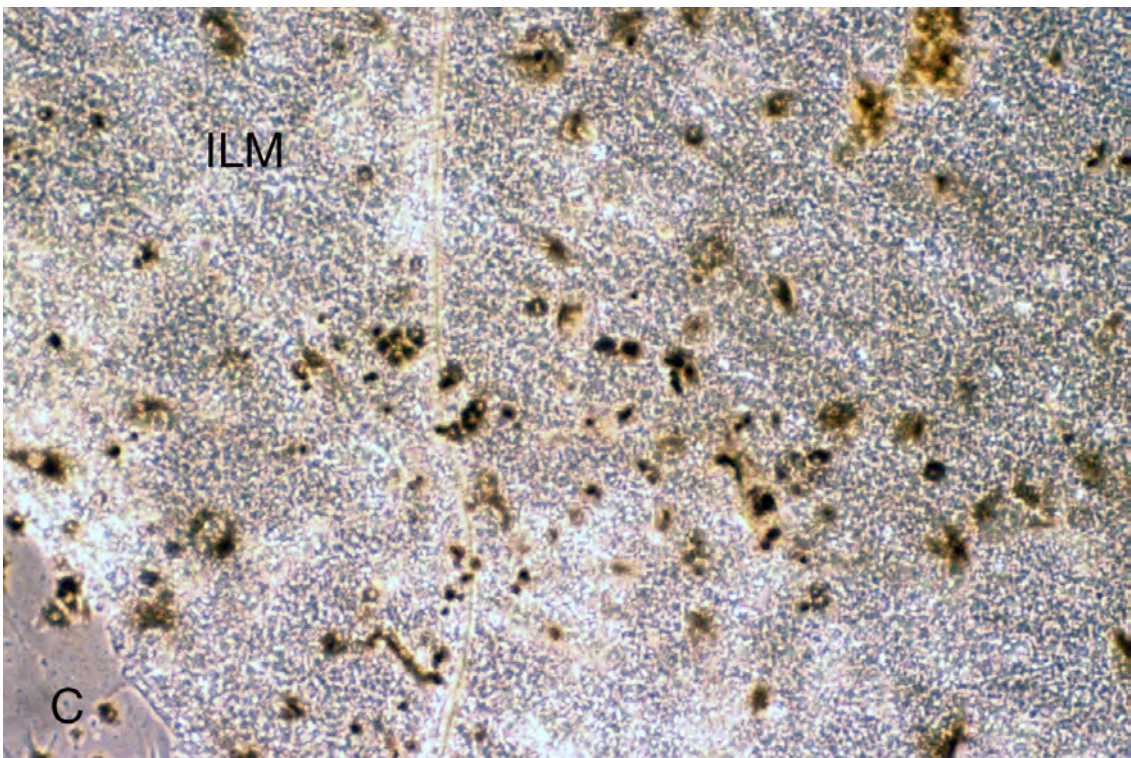


Abbildung 8: hRPE auf hILM, am siebten Tag nach der Präparation

3.2.2 Semidünnschnitt

Es sind vereinzelte pigmentierte Zellen auf der ILM erkennbar (**Abb.9**).

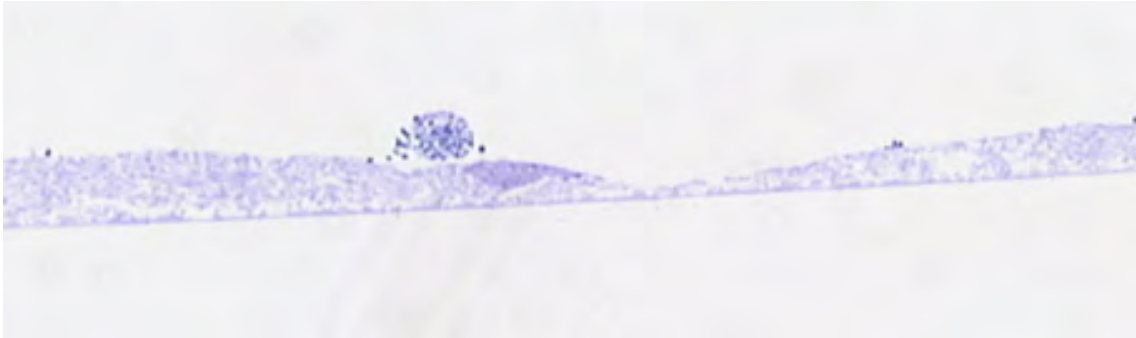


Abbildung 9: Semidünnschnitt (hRPE auf hILM, fixiert am dritten Tag nach der Präparation)

3.2.3 Elektronenmikroskopie

Hier zeigten sich vereinzelte Zellen auf der ILM, die ihrer retinalen Seite anhafteten. Die vitreale Seite liegt auf dem Coverslip. Melanosomen sind noch erkennbar. Alle weiteren Organellen und die Zellwände sind nicht mehr sichtbar. Vermutlich wurden sie während der Fixation destruiert (**Abb.10**).

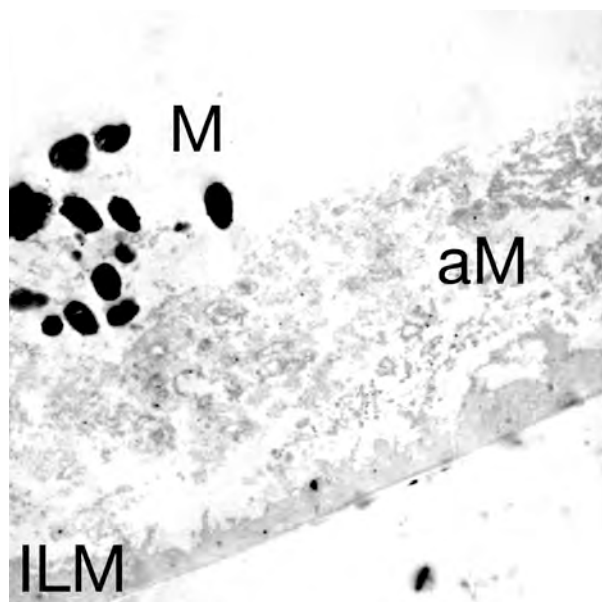


Abbildung 10: hRPE auf hILM, fixiert am dritten Tag nach der Präparation (M= Melanosomen)

3.3 Humane ARPE19 Zellen

Um trotz der geringen Ausbeute an humanen Zellen aus den Augen Verstorbener das Verhalten humaner Zellen auf der ILM beobachten zu können, wurden fünf weitere sheet- Transplantate mit humanen ARPE19 Zellen auf humaner ILM angefertigt. Hier wurden Verhalten und Aussehen der Zellen ausschließlich lichtmikroskopisch untersucht.

3.3.1 Kultur und Lichtmikroskopie

Am Tag der Präparation sah man einzeln liegende, abgerundete, nicht- pigmentierte Zellen auf und neben der ILM liegen (**Abb.11**).

Am Tag danach hatten sich die Zellen angehaftet und bildeten ein Pflastersteinrelief aus. (**Abb.12**).

Bis zum nächsten Tag hatten die Zellen aufgrund der großen Anzahl an Zellen eine nahezu hundertprozentige Konfluenz auf der ILM und dem Coverslip erreicht (**Abb.13**).

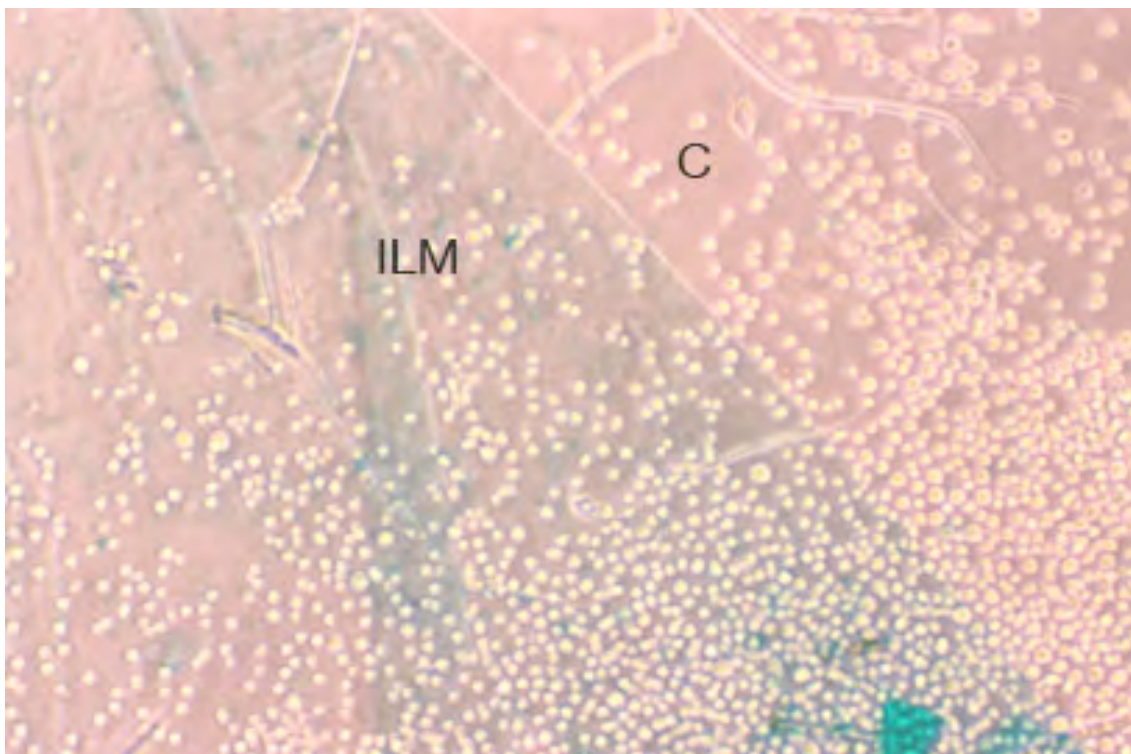


Abbildung 11: ARPE19 auf hILM am Tag der Präparation

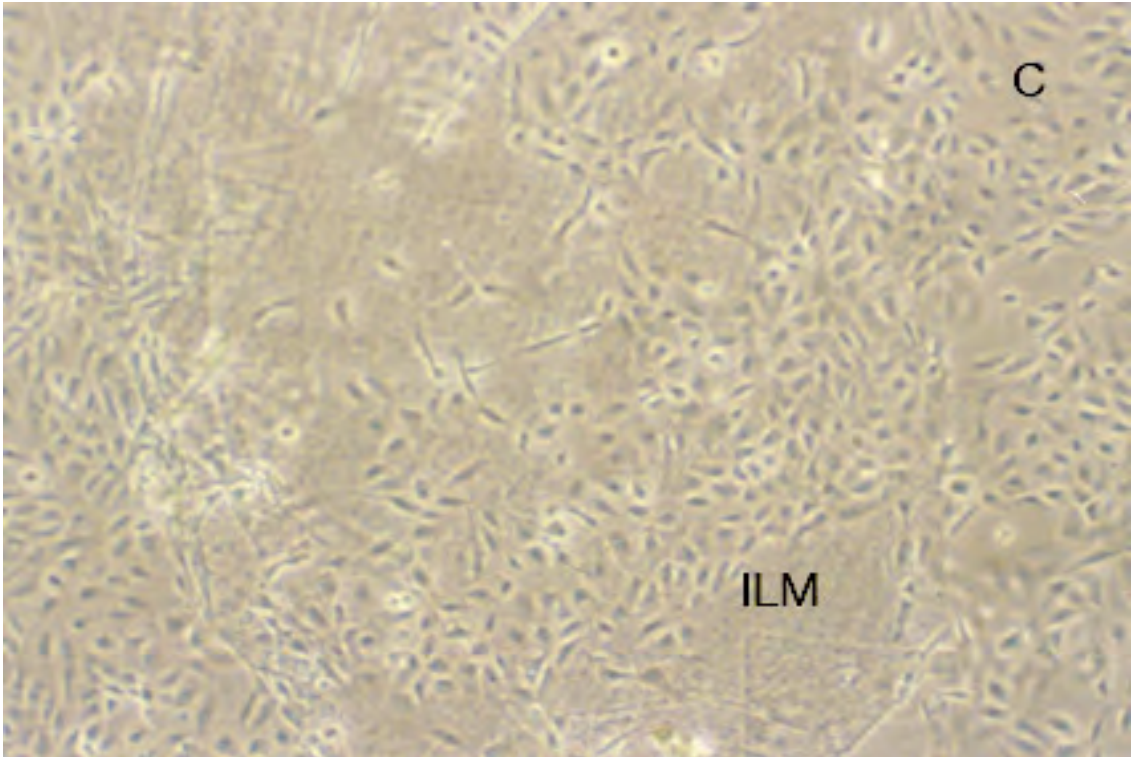


Abbildung 12: ARPE19 auf hILM, am ersten Tag nach der Präparation

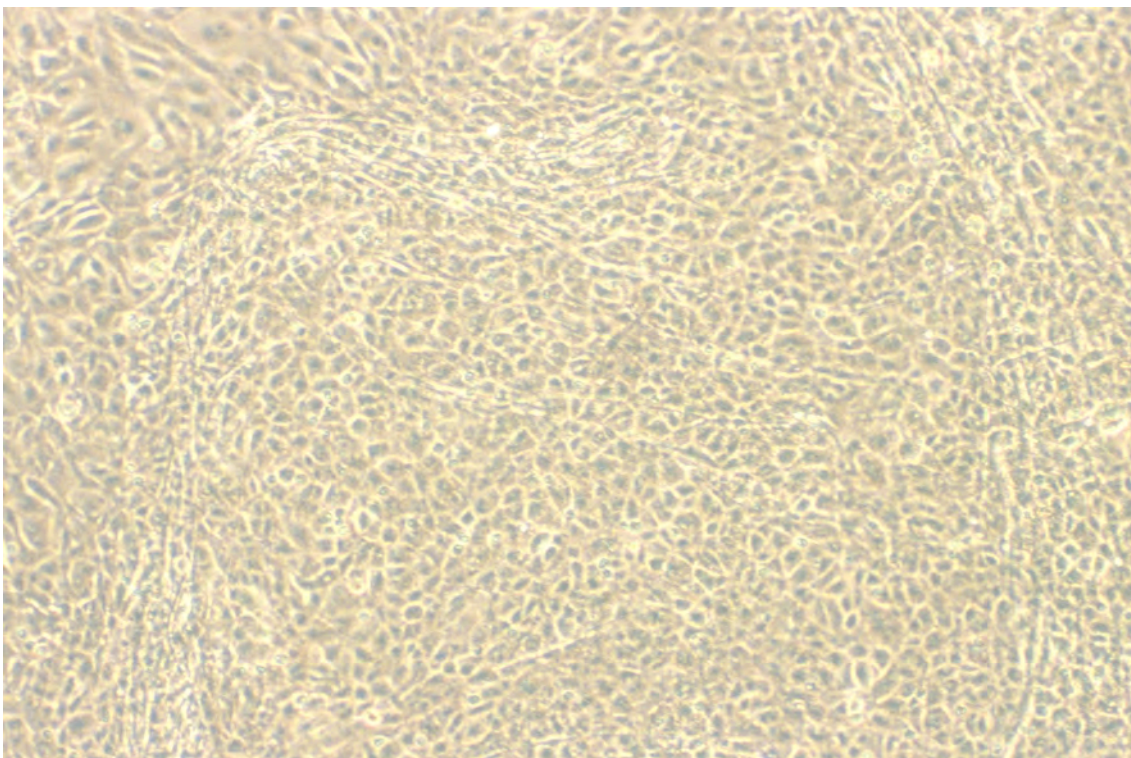


Abbildung 13: ARPE19 auf hILM, am zweiten Tag nach der Präparation

4. Diskussion

Die Zellen des retinalen Pigmentepithels sind hochdifferenzierte Zellen mit vielfältigen Funktionen. Sie sind Bestandteil der Blut- Retina- Schranke, sorgen für die Erneuerung der Außenglieder der Photorezeptoren und bilden eine funktionelle Einheit mit ihnen. Der Transport von Nähr- und Abfallstoffen zwischen den Photorezeptoren und der Aderhaut sowie die Speicherung und Konversion von Vitamin A-Estern wird durch die RPE- Zellen ermöglicht.

Ein Funktionsverlust der RPE- Zellen führt direkt und indirekt zu retinalen Degenerationen und in deren Folge zu einem irreversiblen Sehverlust (10).

Die Netzhautdegeneration der RCS- Ratte, bei der die Phagozytose der Außenglieder durch die RPE- Zellen gestört ist, scheint durch die Transplantation von Pigmentepithelzellen grundsätzlich heilbar (12, 26).

Diese Erfolge im Tiermodell führten zu der Hoffnung, dass auch Erkrankungen des Menschen, denen ein Defekt des RPE zugrunde liegt, durch die Transplantation gesunder Zellen therapiert werden können.

Potentielle Erkrankungen des Menschen, die dabei in Frage kommen sind Degenerationen der Makula, Morbus Stargardt, dominante Drusen, vitelliforme Makuladystrophien und einige Formen der Retinopathia pigmentosa . Es ist jedoch nicht sicher, ob ein Ersatz der RPE- Zellen tatsächlich eine Heilung erbringen würde, da die Pathomechanismen der humanen retinalen Degenerationen bisher nicht vollständig verstanden sind(10).

Im Falle der AMD wird angenommen, dass oxidativer Stress zu einer Schädigung der RPE- Zellen und diese wiederum zu entzündlichen Reaktionen der Bruchschen Membran und der Aderhaut führt. Es resultiert eine veränderte Extrazellulärmatrix, welche eventuell eine weiteren Schädigung des RPE, der Retina und der Aderhaut nach sich zieht (38)

Auch wenn die Pathogenese der AMD bis heute nicht vollständig verstanden ist, geht man davon aus, dass die Entwicklung der AMD mit einem zunehmenden Funktionsverlust der RPE- Zellen zusammenhängt.

Man nimmt daher an, dass im Rahmen einer Therapie der AMD die RPE- Zellen den Angriffspunkt für eine Verbesserung der Sehfunktion darstellen.

Der Erfolg der RPE- Transplantation im Tiermodell konnte jedoch bisher noch nicht auf die Anwendung beim Menschen übertragen werden.

Die Schädigungen der Bruchschen Membran und/ oder choroidale Neovaskularisationen im Falle der AMD führen dazu, dass es, obwohl der Subretinalraum als „immunprivilegierter“ Bereich angesehen wird, zur Abstoßung nicht-autologer Transplantate kommt (39)

Die Transplantation autologer RPE- Zellen als Zellsuspension in den Subretinalraum zeigte, dass diese gut toleriert wurden. Bis zu einem Zeitraum von 24 Monaten traten keine Rezidive der vor der Transplantation extrahierten CNV auf; es kam jedoch auch zu keiner signifikanten Verbesserung der Sehfunktion (27).

Hierbei könnte die Synthese von antiangiogenen Faktoren durch die transplantierten Zellen zu einer Verhinderung der Neubildung von CNV geführt haben.

Das Wissen, dass für die normale Funktion des retinalen Pigmentepithels seine Organisation als Monoschicht mit definierten apikalen und basalen Domänen von Bedeutung ist, führte zu der Hoffnung, dass die Transplantation als sheet eine zusätzliche Verbesserung der Sehfunktion erbringen kann (40)

Wenn auch die Präparation und Transplantation gegenüber einer Zellsuspension deutlich erschwert ist, bietet die Transplantation als sheet die Möglichkeit, die Zellen bereits als Monoschicht mit polarisierter Ausrichtung in den Subretinalraum einzubringen.

Darüber hinaus könnte die sheet- Unterlage eine vorübergehende Abdeckung der beschädigten Bruchmembran bewirken (40).

Es sollen nun einige der bisherigen Erfahrungen mit verschiedenen Materialien, die als Unterlage für solche sheet- Transplantate verwendeten wurden, und die Möglichkeiten der Membrana limitans interna, als Grundlage eines autologen Transplantates zu dienen, diskutiert werden.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass porkine RPE- Zellen gut auf der ILM anhaften konnten. Innerhalb von drei Tagen bildeten sie ein typisches Pflastersteinrelief aus, begannen an den folgenden Tagen zu konfluieren und erhielten weiterhin eine normale Morphologie über mindestens sieben Tagen. Dies zeigte sich sowohl in der Lichtmikroskopie als auch in der Elektronenmikroskopie.

Humane RPE- Zellen aus Spenderaugen hafteten der ILM in wenigen Fällen an und proliferierten nach der Adhäsion nicht. Ein Grund hierfür könnte die lange Zeit zwischen Tod des Spenders und Entnahmezeit der Zellen sein. Im Mittel wurden die Augen 10,72 Stunden nach dem Tode enukleiert, dann wurde die Kornea als Spenderorgan präpariert, bevor die RPE- Zellen entnommen werden konnten. Die Präparation der Kornea dauert im Mittel zwei Stunden. Vermutlich hatten die humanen Zellen so schon zu viel Schaden genommen, um anzuhafte und konfluieren zu können. Dies wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass humane RPE- Zellen von Spenderaugen auch in entsprechend vorbereiteten Zellkulturschalen schlecht wachsen.

Humane Zellen der ARPE19- Linie hafteten sehr gut auf der ILM und bildeten innerhalb von 24 Stunden intakte Zellschichten aus.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich die retinale Seite der ILM gut als Trägerschicht für porkine und humane RPE- Zellen eignet, der Erfolg der Adhäsion und Proliferation jedoch von der Vitalität der Zellen abhängt.

Weitere Studien untersuchten Kollagen Typ I als Trägersubstanz für fetale, humane RPE-Zellen, die anschließend als sheet- Transplantat in den Subretinalraum von Hasen transplantiert wurden.

Das Kollagen ermöglichte es den RPE- Zellen, eine Epithelschicht auszubilden, und die Netzhaut stellte sich lichtmikroskopisch über dem Transplantat intakt dar. Da die Kollagenmembranen sehr weich und flexibel waren, ließen sie sich jedoch schlecht verarbeiten.

Durch UV-Bestrahlung konnte eine Quervernetzung der Polymere (cross-linked) erreicht werden, was das Kollagen steifer macht und die Transplantation der Membranen erleichterte. Dies führte aber zu einer Schädigung der Retina über dem Transplantat, es kam hier auch zu keiner Resorption des Kollagens.

Auch bei Transplantation des cross- linked Kollagens ohne RPE-Zellen kam es zu einer Degeneration der Photorezeptoren über der Kollagenmembran. Die Autoren vermuten, dass das verdickte Kollagen eine physikalische Barriere für den Transport von Metaboliten zwischen der Aderhaut und den RPE-Zellen sowie der Retina darstellt (29).

Castellarin et al. (41) beschreiben den Versuch, die Bruch-Membran Verstorbener als Grundlage für fetale RPE- Zellen zu nutzen.

Die Basalmembran Verstorbener böte eine gute Grundlage für die RPE- Zellen, ist jedoch sehr schwer zu präparieren und kann nicht wie die ILM beim Patienten selber entnommen werden.

Die Transplantation allogener vorderer Linsenkapsel böte Vorteile in der Hinsicht auf die Schwierigkeit der Präparation.

Kiilgaard et al. (30) verpflanzten die vordere Linsenkapsel von Schweinen in den Subretinalraum von Schweinen der gleichen Art (Danish landrace pigs).

Sie prüften die Toleranz des Transplantates und prüften, ob eine Reepithelialisierung der Linsenkapsel durch Empfänger- RPE stattfindet.

Sie wählten hierfür den Zugang über eine pars plana- Vitrektomie.

Blieb die Bruch-Membran dabei unbeschädigt, wurde das Transplantat gut toleriert und durch RPE- Zellen und Gliazellen des Transplantatempfängers reepithelialisiert. Bei beschädigter Bruch-Membran kam es aber zu einer entzündlichen Reaktion und der Bildung choroidaler Neovaskularisationen.

Zwei Studien konnten gute Adhäsion und Proliferation humaner RPE- Zellen und derer von Hasen auf humanen Amnionmembranen zeigen (31, 42).

Die Amnionmembran der Plazenta besteht aus einem gefäßlosen Stroma, einer relativ dicken Basalmembran, die aus Kollagen Typ IV und Laminin aufgebaut ist, und einem einschichtigen Epithel.

Sie kann während eines Kaiserschnittes leicht gewonnen werden und stellt sich als elastisches und transparentes Gewebe dar.

Vor dem Aufbringen der RPE- Zellen wurde das Epithel mittels Dispase entfernt, damit die RPE- Zellen direkt auf der Basalmembran zu liegen kamen. Es wurden ebenfalls humane RPE- Zellen von Corneaspendern verwendet. Diese waren im Alter von 30 und 45 Jahren verstorben. Die humanen RPE- Zellen hafteten der Basalmembran der Amnionmembran innerhalb von 24 Stunden an. Bis zum fünften Tag bildeten sie Kolonien aus. Die Zellen wurden über 30 Tage kultiviert und bildeten bis dahin ein einschichtiges Epithel aus (31).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sich Amnionmembranen gut als Unterlage für RPE- sheet- Transplantate eignen.

Ihr Nachteil besteht jedoch darin, dass sie als Fremdmaterial zu einer Abstoßungsreaktion führen können. Dies ist vor allem bei Patienten mit fortgeschrittener AMD zu befürchten, da durch eine Schädigung der Bruch-Membran der ansonsten immunprivilegierte Subretinalraum für Immunzellen zugänglich wird.

Die vordere Linsenkapsel mit einer Dicke von 10-20 μm (43) als auch die Amnionmembran, die mit einer Dicke von 90-190 μm (31) angegeben ist, sind um das zehn bis hundertfache dicker als die Bruch-Membran mit einer Dicke von 2 μm (43).

Dies könnte neben einer Distorsion der retinalen Lage auch einen erschwerten Stoffaustausch zwischen Choroidea, Pigmentepithel und Retina bedeuten.

Abschließend kann man sagen, dass das Gewebe, welches als Grundlage für ein sheet- Transplantat dienen soll, gute Möglichkeiten der Adhäsion und Reepithelialisierung durch die RPE- Zellen bieten und einen normalen Transfer von Nähr- und Abfallstoffen zwischen der Choroidea und den Zellen, die sie versorgt, gewährleisten muss. Des Weiteren muss es die Gefahr einer Immunantwort so gering wie möglich machen.

Die Verlagerung der sheets in den Subretinalraum kann Schwierigkeiten bereiten, indem die Transplantate Faltenbildung zeigen oder sogar unabsichtlich invertiert appliziert werden(23). Um dies zu vermeiden, ist eine möglichst geringe Flexibilität des Gewebes notwendig.

Unsere Versuche zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen die ILM eine exzellente Grundlage für das Überleben und die Proliferation bei gleichzeitiger Differenzierung der RPE- Zellen bietet.

Die Präparation der ILM ist heute ein Routineeingriff. Daher könnte die ILM als Homograft in einem zweizeitigen Vorgehen dienen. Da sie biologisch verträglich ist, würde man keine Abstoßungsreaktion erwarten. Die Membran ist mit einer Dicke von 25 000 Å (=2,5 µm) am posterioren Pol (6) sehr dünn, hat eine feine, dreidimensionalen Netzstruktur und viele Poren mit einem Durchmesser von 10 bis 25nm (44), die eine gute Durchlässigkeit von Nährstoffen ermöglichen.

Wie durch Bhatt et al. (29) bei der kollagenen Trägersubstanz beschrieben stellt sich jedoch auch bei der ILM das Problem der Ambivalenz zwischen möglichst geringer Dicke der Trägersubstanz für eine ungestörte Diffusion bei gleichzeitig möglichst geringer Flexibilität, um eine gute intraoperative Handhabung der sheets zu gewährleisten.

5. Zusammenfassung

Im Tiermodell der RCS- Ratte konnte gezeigt werden, dass die Transplantation von retinalen Pigmentepithelzellen in den subretinalen Raum sowohl die Degeneration von Photorezeptoren als auch die Ausbildung von Neovaskularisationen aufhalten kann. Dies führte zur Hoffnung, degenerative Erkrankungen der Retina beim Menschen, denen ein RPE- Zelldefekt zugrunde liegt, therapieren zu können.

Neben der Transplantation von RPE- Zellen als Suspension oder RPE/Bruch-Membran/Aderhaut-Blöcken wurde in zahlreichen Studien die Herstellung von sheet- Transplantaten untersucht. Man erhoffte sich, durch eine geeignete Unterlage den RPE- Zellen den Erhalt ihrer Differenzierung und Polarität sowie die Ausbildung eines einschichtigen Zellrasens zu erleichtern und somit ideale Voraussetzungen für eine Funktionalität des Transplantates zu erreichen.

Die Entnahme der ILM ist heute ein Routineeingriff. Sie bietet dadurch und aufgrund ihrer typischen Eigenschaften einer Basalmembran beste Voraussetzungen, als Unterlage eines autologen RPE- Transplantates eingesetzt werden zu können.

In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass RPE- Zellen aus Schweineaugen auf der ILM adhären und proliferieren können. Über einen Zeitraum von sieben Tagen erhalten sie dabei typische morphologische Merkmale, was anhand von Licht- und Elektronenmikroskopie untersucht wurde.

Humane Zellen Verstorbener adhärten nur in wenigen Fällen, es kam im beobachteten Zeitraum zu keiner Konfluenz der RPE- Zellen.

Zellen der humanen ARPE19- Zelllinie bildeten innerhalb von 24 Stunden einen intakten Zellrasen auf der ILM aus.

Die Ergebnisse legen nahe, dass sich die ILM gut als Trägerschicht für RPE- Zellen eignet, der Erfolg der Adhäsion und Proliferation jedoch von der Vitalität der Zellen abhängt.

6. Literaturverzeichnis

1. Schmidt, R.F., Lang, F., Thews, G. (2005): Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 29. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
2. Francois, J., Hollwich, F. (1977): Augenheilkunde in Klinik und Praxis Band 1 Georg Thieme Verlag Stuttgart
3. Heegaard, S., Jensen, O.A., Prause, J.U. (1986): Structure and composition of the inner limiting membrane of the retina. SEM on frozen resin-cracked and enzyme-digested retinas of Macacca mulatta. Graefes Arch Clin Ophthalmol 224:355-360
4. Russel, S., Shepherd, J.D., Hageman, G.S. (1991): Distribution of Glycoconjugates in the human retinal internal limiting membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 32(7):1986-1995
5. Fine, B. S. (1961): Limiting membranes of the sensory retina and pigment epithelium. An Electron Microscopic Study. Arch Ophthalmol 66:847-860
6. Foos, R.Y. (1972): Vitroretinal juncture; topographic variations. Invest Ophthalmol Vis Sci 11:801-808
7. Matsumoto, B., Blanks, J.C., Ryan, S.J. (1984): Topographic variations in the Rabbit and Primate internal limiting membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 25:71-82
8. Kohno, T., Sorgente, N., Ishibashi, T., Goodnight, R., Ryan, S.J. (1987): Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 28:506-514
9. Marmor, M.F., Wolfensberger, T.J. (1998): The Retinal Pigment Epithelium. Cambridge: Harvard University Press
10. Devjani, L. (1995): Retinal Pigment Epithelial Transplantation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
11. Richard, G., Weckerle, P. (1995): Transplantation von Netzhaut-Bestandteilen. Klin. Monatsbl. Augenheilkd. 206:71-77
12. Wiedemann, P., Heimann, K. (1990): „Netzhauttransplantation- eine Therapie der Zukunft?“. Z. prakt. Augenheilkunde 11:329-332

13. Herron, W., Riegel, B., Myers, O., Rubin, M., et al. (1969): Retinal Dystrophy in the rat-A pigment epithelial disease.
Invest Ophthalmol Vis Sci 8:595-604
14. Mullen, R., La Vail, M. (1976): Inherited retinal dystrophy: Primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimeras.
Science 192:799-801
15. Li, L., Turner, J.E. (1988): Inherited retinal dystrophy in the RCS rat: Prevention of photoreceptor degeneration by pigment epithelial cell transplantation.
Exp Eye Res 47:911-917
16. Li, L., Turner J.E. (1988): Transplantation of Retinal Pigment Epithelial Cells to Immature and Adult Rat Hosts:Short-and Long-term Survival Characteristics.
Exp Eye Res 47:771-785
17. Sheeldo, H. J., Li, L., Turner J.E. (1989): Functional and Structural Characteristics of Photoreceptor Cells Rescued in RPE-cell Grafted Retinas of RCS Dystrophic Rats.
Exp Eye Res 48:841-845
18. Gaur, V., Agarwal , N., Li, L., Turner, J.E. (1992): Maintenance of Opsin and S-antigen Gene Expression in RCS Dystrophic Rats following RPE Transplantation.
Exp Eye Res 54:91-101
19. Matthew, M., Lavail, L., Li, L., Turner, J.E., Yasumara D. (1992): Retinal Pigment Epithelial Cell Transplantation in RCS Rats: Normal Metabolism in Rescued Photoreceptors.
Exp Eye Res 55:555-562
20. Li, L., Turner, J.E. (1991): Optimal Conditions for Long-term Photoreceptor Cell Rescue in RCS Rats: The Necessity for Healthy RPE Transplants.
Exp Eye Res 52:669-679
21. Sheeldo, H. J., Li, L., Turner, J.E. (1993): Effects of RPE Age and Culture Conditions on Support of Photoreceptor Cell Survival in Transplanted RCS Dystrophic Rats.
Exp Eye Res 57:753-761
22. Seaton, A.D., Sheeldo, H.J., Turner, J.E. (1994): A Primary Role for RPE Transplants in the Inhibition and Regression of Neovascularization in the RCS Rat.
Invest Ophthalmol Vis Sci 35(1):162-169

23. Boulton, M.E. (2004): Pigmentepithel-Transplantation:Grundlagen und Voraussetzungen.
Ophthalmologe 101:877-881
24. Grehn, F. (2006): Augenheilkunde. 29. Auflage.
Springer-Verlag Berlin Heidelberg
25. Bindewald, A., Roth, F., van Meurs, J., Holz, F.G. (2004):
Transplantation von retinalem Pigmentepithel (RPE) nach CNV-Exzision
bei altersabhängiger Makuladegeneration.
Ophthalmologe 101:886-894
26. Algere, P.V., Berglin, L., Gouras, P., Sheng, Y., Dafgard Kopp, E.
(1997): Transplantation of RPE in age-related macular
degeneration:observations in disciform lesions and dry atrophy.
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 235:149-158
27. Binder, S., Stolba, U., Krebs, I. et al. (2002): Transplantation of
autologous retinal pigment epithelium in eyes with foveal
neovascularization resulting from age-related macular degeneration:a
pilot study.
Am J Ophthalmol 133:215-225
28. Stanga, P.E., Kychenthal, A., Fitzke, F.W., Halfyard, A.S., Chan, R., Bird,
A.C., Aylward G.W. (2002): Retinal pigment epithelium translocation after
choroideal neovascular membrane removal in age-related macular
degeneration.
Ophthalmology 109:1492-1498
29. Bhatt, N.S., Newsome, D., Fenech, T., Hessburg, T.P., Diamond, J.G.,
Miceli, M.V., Kratz, K.E., Oliver, P.D. (1994): Experimental
Transplantation of Human Pigment Epithelial Cells on Collagen
Substrates.
Am J Ophthalmol 117:214-221
30. Kiilgaard, J.F., Wiencke, A.K., Scherfig, E., Prause, J.U., La Cour, M.
(2002): Transplantation of allogenic anterior lens capsule to the
subretinal space in pigs.
Acta Ophthalmol Scand 80:76-81
31. Capeans, C., Pineiro, A., Pardo, M., Sueiro-Lopez, C., Blanco, M.J.,
Dominguez, F., Sanchez-Salorio M. (2003): Amniotic membrane as
support for human retinal pigment epithelium (RPE) cell growth.
Acta Ophthalmol Scand 81:271-277

32. Miceli, M.V., Newsome, D.A. (1994): Insulin stimulation of retinal outer segment uptake by cultured human pigment epithelial cells determined by flow cytometric method.
Exp Eye Res 59:271-281
33. Ho, T.C., Del Priore, L.V. (1997): Reattachment of cultured human retinal pigment epithelium to extracellular matrix and human Bruch's membrane.
Invest Ophthalmol Vis Sci 38:1110-1118
34. Haritoglou, C., Schuhmann, R., Reiniger, I., Rohleder, M., Priglinger, S.G., Kampik, A., Gandorfer, A. (2006): Evaluation of the internal limiting membrane after conventional peeling during macular hole surgery.
Retina 26:21-24
35. Dunn, K.C., Aotaki-Keen, A.E., Putkey, F.R., Hjelmeland, L.M. (1996): ARPE-19, a human retinal cell line with differentiated properties.
Exp Eye Res 62:155-169
36. Haritoglou, C., Gandorfer, A., Gass, C.A., et al. (2002): Indocyanine green-assisted peeling of the internal limiting membrane in macular hole surgery affects visual outcome: a clinicopathologic correlation.
Am J Ophthalmol 134:836-841
37. Gandorfer A., Haritoglou, C., Gass, C.A., et al. (2001): Indocyanine green-assisted peeling of the internal limiting membrane may cause retinal damage.
Am J Ophthalmol 132:432-433
38. Zarbin, MA. (2004): Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration.
Arch Ophthalmol 122(4):598-614
39. Thumann, G. (2002): Potential of pigment epithelium transplantation in the treatment of AMD.
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 240(9):695-697
40. Thumann, G., Hueber, A., Dinslage, S., Schaefer, F., Yasukawa, T., Kirchhof, B., Yafai, Y., Eichler, W., Bringmann, A., Wiedemann, P. (2006): Characteristics of iris and retinal pigment epithelial cells cultured on collagen type I membranes.
Curr Eye Res 31(3):241-249.
41. Castellari, A.A., Sugino, I.K., Vargas, J.A., Parolini, B., Lui, G.M., Zarbin, M.A. (1998): In vitro transplantation of fetal human retinal pigment epithelial cells onto human cadaver Bruch's membrane.
Exp Eye Res 66:49-67

42. Stanzel, B.V., Espana, E.M., Grueterich, M., Kawakita, T., Parel, J.M., Tseng, S.C.G., Binder, S. (2005): Amniotic membrane maintains the phenotype of rabbit retinal pigment epithelial cells in culture. *Exp Eye Res* 80:103-112
43. Schiebler, T.H., Schmidt, W., Zilles, K.(1999): *Anatomie*. 8. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
44. Nishihara H. (1989): Studies on the ultrastructure of the inner limiting membrane of the retina. (Surface replication study on the inner limiting membrane of the retina). *Nippon Ganka Gakkai Zhassi* 93:429-438

Für die außerordentlich gute Betreuung möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Professor Dr. Salvatore Grisanti bedanken.

Bei Sigrid Schultheiss bedanke ich mich ganz herzlich für die tatkräftige Unterstützung und die Motivation.

Des Weiteren möchte ich mich für die große Hilfe ganz herzlich bedanken bei:

Dr. Barbara Wallenfels- Thilo

Dr. Julia Beutel

Dr. Efdal Yörük

Dr. Olcay Tatar

Dr. Ana Sierra

Lebenslauf

Lena Greulich, Freischützstrasse 6, 70597 Stuttgart

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 10. 7. 1981 | geboren als Tochter der Ärztin Dr. Heide Greulich und des Arztes Prof. Dr. Michael Greulich, Geschwister: Jonas und Valentin Greulich |
| 1987- 1991 | Besuch der Grundschule in Stuttgart- Degerloch |
| September 1991
- Juli 2000 | Besuch des Königin- Charlotte- Gymnasium in Stuttgart
Abschluss: Abitur |
| September 2000
-Novemembr 2000 | Krankenpflegepraktikum im Deutschen Herzzentrum München |
| April 2001 | Beginn des Medizinstudiums an der Universität Tübingen |
| März 2003 | Ärztliche Vorprüfung, |
| August 2003 | Famulatur am Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie in Tübingen |
| März 2004 | Famulatur im Krankenhaus St. Josephstift Dresden in der Abteilung für Allgemeinchirurgie |
| August 2004 | Famulatur in der augenärztlichen Praxis von Dr. Zevallos- Möll in Tübingen |
| März 2005 | Famulatur in der Klinik für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde Tübingen |
| August 2005 | Famulatur im Bethesdakrankenhaus Stuttgart in der Abteilung für Viszeral- und Unfallchirurgie |
| März 2006 | Annahme als Doktorandin durch Prof. Dr. Salvatore Grisanti
Transplantation retinaler Pigmentepithelzellen auf die Membrana limitans interna in vitro |
| Februar 2006
- Januar 2007 | Praktisches Jahr: Universitätsklinikum Tübingen,
Kings College London, Kantonsspital Basel |
| 30. 10. 2007 | Abschluss des Medizinstudiums mit der Ärztlichen Prüfung |