

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANANATOMIE UND EMBRYOLOGIE
PROF. DR. ERNST RUDOLF TAMM
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
-BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN-
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

IDENTIFIZIERUNG BRDU POSITIVER ZELLEN IM TRABEKELWERK DES AFFEN
HINWEIS AUF MÖGLICHE TRABEKELWERKSSTAMMZELLEN?

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und Vorklinische Medizin-
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Bahar Ademoglu-Chamza

aus Nürnberg

im Jahr

2015

Dekan:

Prof. Dr. Ernst Rudolf Tamm

1. Berichterstatter:

PD. Dr. Dr. Barbara Braunger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Frank Schweda

meiner Familie und meinem Ehemann gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glaukom	1
1.2	Ziliarkörper- Aufbau und Funktion	2
1.3	Kammerwinkel und Schlemm-Kanal	5
1.4	Trabekelwerk des Auges	7
1.4.1	Aufbau und Gliederung des Trabekelwerks in Areale	8
1.4.1.1	Uveosklerales Trabekelwerk	9
1.4.1.2	Corneosklerales Trabekelwerk	9
1.4.1.3	Juxtakanalikuläres/cribriformes Gewebe	9
1.4.2	Funktion des Trabekelwerks	10
1.5	Corneaendothel- Schwalbe`sche Linie	11
1.6	Stammzellen	12
1.6.1	Eigenschaften von Stammzellen	12
1.6.2	Historische Entdeckung von potentiellen Stammzellen im Trabekelwerk	13
1.6.3	Stammzellmarker Oct4	14
1.6.4	Stammzellnischen	15
1.6.5	Stammzellen als möglicher Therapieansatz in der Glaukomforschung	16
1.7	BrdU- 5-Brom-2-desoxyuridin	16
1.8	Zielsetzung der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Materialliste	18
2.1.1	Reagenzienliste	18
2.1.2	Enzyme	18
2.1.3	Verbrauchsmaterialien und Geräte	19
2.1.3.1	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3.2	Geräte	20
2.1.4	Puffer und Lösungen	21
2.1.5	Antikörper	22
2.2	Versuchsaufbau	23
2.3	Versuchstiere	23
2.4	Vorbehandlung der Tiere	24
2.4.1	Implantation der BrdU-Pumpen	24
2.4.2	Tötungsprotokoll	27
2.5	Bearbeitung der Affen Augen	28
2.5.1	Präparation der Augen in Quadranten	28
2.5.2	Immunhistochemie	29

2.5.2.1	Paraffineinbettung	29
2.5.2.2	Herstellung von Paraffinschnitten	29
2.5.2.3	Immunhistochemische Färbungen	30
2.5.2.4	BrdU-Färbung	30
2.5.2.5	Oct4-Färbung	32
2.5.2.6	CD31-Färbung	33
2.5.2.7	Eindeckeln von Gewebeschnitten	33
2.6	Bildbearbeitung – Aufnahmen und Auswertungen des Kammerwinkels	34
2.7	Transmissionselektronenmikroskopie	35
2.7.1	Vorpräparation für die Elektronenmikroskopie	35
2.7.2	Methodik der Elektronenmikroskopie	35
2.7.3	Eponeinbettung und Anfertigen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen	37
2.7.4	Anfärben der Semidünnschnitte und Kontrastierung der Ultradünnschnitte ..	38
2.8	Auswertung und Statistik	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Verteilung BrdU-positiver Zellen im Kammerwinkel in den 4 Quadranten des Auges	41
3.2	BrdU-positive Zellen in den verschiedenen Subarealen des Trabekelwerks, JCT's Skleralsporn, Operculum und Schlemm-Kanalendothels	42
3.3	BrdU-positive Zellen im Bereich der Schwalbe`schen Linie	45
3.4	Morphologische Charakterisierung der Stammzellnische an der Schwalbe`sche Linie.	49
3.5	Ultrastrukturelle Charakterisierung der potentiellen Stammzellnische an der Schwalbe`schen Linie	50
4	Diskussion	53
5	Zusammenfassung	62
6	Anhang	64
6.1	Abbildungsverzeichnis	64
6.2	Tabellenverzeichnis	67
6.3	Literaturverzeichnis	68
6.4	Abkürzungsverzeichnis	76
6.5	Curriculum vitae	78
6.6	Danksagung	80
6.7	Erklärung	81

1 Einleitung

1 Einleitung

1.1 Glaukom

Das Glaukom ist eine neurodegenerative Erkrankung, die im Krankheitsverlauf zu einer Optikusatrophie führt, welches mit Gesichtsfeldausfällen einhergeht. Prädisponierende Risikofaktoren zur Entstehung des Glaukoms sind hohes Lebensalter, familiäre Belastung, genetische Faktoren (1) und ein erhöhter intraokularer Druck (IOP). Dieser wird bestimmt durch das Gleichgewicht zwischen der Neubildung des Kammerwassers und der Abflussbehinderung am Trabekelwerk (2). Der physiologische Augeninnendruck liegt zwischen 10 und 21 mmHg um den Mittelwert von 15 mmHg (3). Er steigt mit dem Lebensalter und unterliegt circadianen Tagesschwankungen bis zu 4 mmHg mit morgendlichen Höchstwerten (3). Neben den verschiedenen Glaukomformen, stellen Offenwinkelglaukome mit 90% der primären Glaukome (POWG) die häufigste Form bei den Erwachsenen dar (4). Unter physiologischer Kammerwinkelweite liegt hier ein Abflusswiderstand des Kammerwassers am Trabekelwerk vor. Kennzeichnend für dieses Glaukom ist der überdurchschnittlich hohe intraokuläre Druck, der in der Anfangsphase asymptomatisch bleibt (5), langsam progredient ansteigt und mit raschem Fortschreiten des Gesichtsfeldausfalls und schließlich mit einer Erblindung einhergeht. Schätzungsweise erblinden in den Industrieländern jährlich ca. 6,5 Millionen Menschen an den Folgen des Glaukoms (4). Umso wichtiger stellt sich für Patienten die Bedeutung der intraokularen Druckmessung dar, um mit entsprechender Therapie einem schleichenden Progress der Erkrankung entgegen zu wirken. Eine niedrig-normale Einstellung des Augeninnendrucks beugt dabei einem Verlust des Gesichtsfeldes vor (1). Nur einen kleinen Teil der Offenwinkelglaukome stellt das Normaldruckglaukom dar. Bei dieser Form, mit intraokulären Druckwerten unter 21 mmHg, wird eine vaskuläre Störung mit einer Mangeldurchblutung der Papille diskutiert, die eine Atrophie des Optikusnerven verursacht (3).

Als mögliche Ursache für die erhöhte Widerstandsbildung beim primären Offenwinkelglaukom wurden Ablagerungen extrazellulärer Matrix vermutet (4), die vor allem im juxtakanalikulären Trabekelwerk (JCT) beobachtet wurden (6). Neue Erkenntnisse zu den Ursachen der Widerstandsbildung beim primären Offenwinkelglaukom brachten verschiedene Arbeitsgruppen: Bei Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom wurde im Kammerwasser eine erhöhte Konzentration von TGF- β -2 festgestellt (7,8). TGF- β (*Transforming growth factor*) ist ein Zytokin, das in den drei Isoformen TGF- β 1-3 vorliegt (9,10). Es wird in nahezu allen Körperstrukturen sowohl von embryologischen, als auch adulten Zellen *in vitro* exprimiert (11). Die Aktivität der TGF- β -Signalkaskade bewirkt zahlreiche Funktionen, an dieser Stelle seien nur einige davon erwähnt: Wirkung auf die Zellproliferation und Differenzierung, Stimulieren der Wundheilung und Einfluss auf den Knochenstoffwechsel (12), Funktion in der Hämatopoese und Angiogenese, als auch die

1 Einleitung

Bildung von extrazellulär Matrix (13).

Bei Untersuchungen an Trabekelwerkzellen *in vitro* wurde beobachtet, dass eine erhöhte Konzentration von TGF- β -2 zu einer vermehrten Bildung extrazellulärer Matrix am Abflussgebiet des Trabekelwerks führt (7). Neben Ablagerungen extrazellulärer Substanz wurden auch eine gesteigerte Ausbildung des Aktinzytoskeletts der Trabekelwerkzellen verzeichnet (7). Dem Aktin-Myosin-Zytoskelett verdanken Trabekelwerkzellen ihre kontraktile Eigenschaft (14).

Die Strukturveränderungen des Zytoskeletts der Trabekelwerkzellen unter dem Einfluss der TGF- β -Signalkaskade gehen mit dem Verlust ihrer kontraktilen Eigenschaften und einer Verhärtung des Gewebes einher (7). Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Modulierung dazu beiträgt den Abflusswiderstand zu erhöhen. Untersuchungen an humanen Trabekelwerkzellen haben ergeben, dass dieser Mechanismus durch die TGF- β -Signalkaskade über die Expression von CTGF eine direkte Wirkung auf Trabekelwerkzellen bewirkt (15). CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) ist ein Mediator des TGF- β Signalwegs dessen Expression vom TGF- β -Signalweg reguliert wird (109). Es wurde bereits beschrieben, dass die fibrosierende Aktivität von TGF- β über CTGF vermittelt wird (16). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass bei transgenen CTGF Überexpressionsmäusen eine hohe CTGF-Konzentration im Kammerwasser, in einem CTGF-bedingten Umbau des trabekulären Aktinzytoskeletts resultiert. Dies führt zur Hypothese, dass dieser molekularer Pathomechanismus auch beim Patienten *in vivo* über das gleiche Prinzip zum POWG führen könnte (17).

1.2 Ziliarkörper- Aufbau und Funktion

Das *Corpus ciliare* erstreckt sich von der *Ora serrata* bis zur Iriswurzel an der Innenseite des *Bulbus oculi*. Zur Akkommodation durch Kontraktionsvorgänge dient der Ziliarmuskel *M.ciliaris*, der seinen Ursprung am Skleralsporn und der Desçemet Membran des Corneaendothels hat.

Das *Corpus ciliare* breitet sich von der Iriswurzel zum Anfang der Retina aus, während es drei unterschiedliche morphologische und funktionelle Regionen bildet: Die *Pars plicata (corporis ciliaris)*, die *Pars plana (corporis ciliaris)* und die *Ora serrata* (18–21).

1 Einleitung

Dabei lässt sich der ebene Anteil als Pars plana unterscheiden, der von der Ora serrata bis zum Ende der Ziliarzotten verläuft, wohingegen die Pars plicata mit ihrem gewölbten Relief aus ihren ca. 70 Ziliarfortsätzen besteht (22).



Abbildung 1: Dargestellt ist der Ziliarkörper eines Rhesusaaffen in Hämatoxylin-Eosin-Färbung in 45-facher Vergrößerung mit (1) Sklera, (2) vordere Augenkammer, (3) Iris, (4) Ziliarmuskel mit seinen Ziliarzotten (5) die in die hintere Augenkammer (6) hinein ragen. Es ist auch ein kleiner Teil der Linse mit dem vorderen Linsenepithel (7) angeschnitten. Der Pfeil zeigt auf den Schlemm-Kanal. (aus (24))

Die Bildung des Kammerwassers und das Aufrechterhalten des intraokulären Drucks erfolgt durch das Epithel der Ziliarzotten *Processus ciliares*, die in die hintere Augenkammer hineinragen (23,24). Das Ziliarepithel weist eine Zweischichtung mit einem äußeren pigmentierten und innerem nicht pigmentierten Epithel auf.

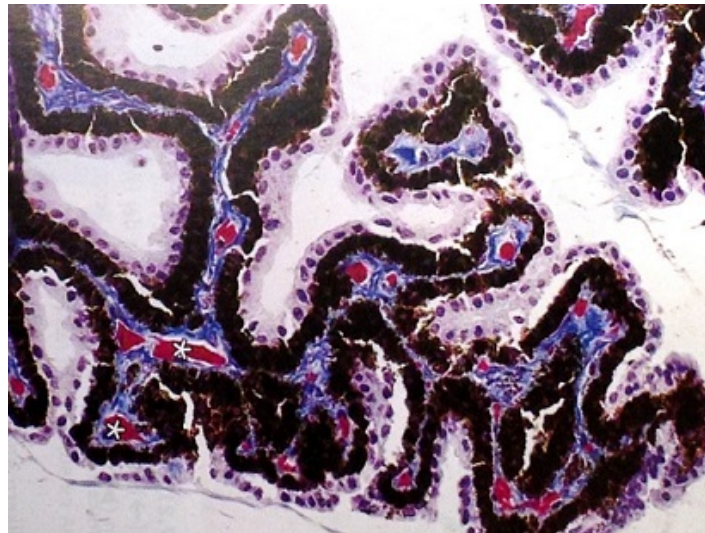


Abbildung 2: Ziliarzotten des Ziliarkörpers einer Weddel-Robbe in Masson-Trichrom-Färbung in 450-facher Vergrößerung. Zweischichtung des Epithels mit äußeren pigmentierten und inneren nicht-pigmentierten Epithel. (aus (24))

Das Kammerwasser wird vom unpigmentierten Epithel des Ziliarkörpers gebildet und über Sekretionsvorgänge in die hintere Augenkammer abgegeben. Diese liegt zwischen Linse, Iris und Glaskörper. 90% des Kammerwassers verlassen über den sogenannten trabekulären Abflussweg das Auge. Hierbei handelt es sich um einen druckabhängigen Prozess (23). Dieser physiologische und konventionelle Hauptabflussweg des Kammerwassers liegt im sogenannten Kammerwinkel, ein Bereich zwischen Iriswurzel und Cornea, in der vorderen Augenkammer. Der Passageweg durch das Trabekelwerk erfolgt durch die ein bis drei netzartig erweiterten Zellschichten des uvealen, über die Zellschichten des corneoskleralen Trabekelwerks, durch die interzellulären Sammelkanälchen „*collector channels*“ hindurch in die intra- und episkleralen Venen (3). Nur ein kleiner Anteil, der weniger als 10% ausmacht, verlässt das Auge über einen unkonventionellen uveoskleralen Abflussweg. Dabei folgt das Kammerwasser dem Weg in den Ziliarmuskel, um in die Sklera zu gelangen und uveoskleral im venösen Gefäßsystem gesammelt zu werden (3).

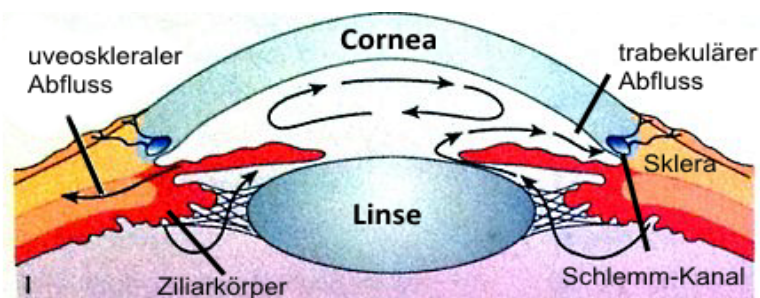


Abbildung 3: Flussrichtung des Kammerwassers von der hinteren in die vordere Augenkammer (Pfeile) und anschließend uveoskleralem (links) oder trabekulärem (rechts) Abflussweg. (modifiziert nach (3))

1 Einleitung

1.3 Kammerwinkel und Schlemm-Kanal

Der Kammerwinkel setzt sich zusammen aus dem Schwalbe'schen Grenzring, dem peripheren Ende der Desçemet'schen Membran, dem Trabekelwerk mit dem Schlemm-Kanal, dem Skleralsporn, Ziliarkörper und der Iriswurzel (3). (Siehe *Abbildung 4*).

Ein Großteil des Kammerwassers durchfließt die Kammerwinkel, gelangt durch das Trabekelwerk-Gerüst und wird im ringförmigen Schlemm-Kanal aufgefangen. (Siehe *Abbildung 5*).

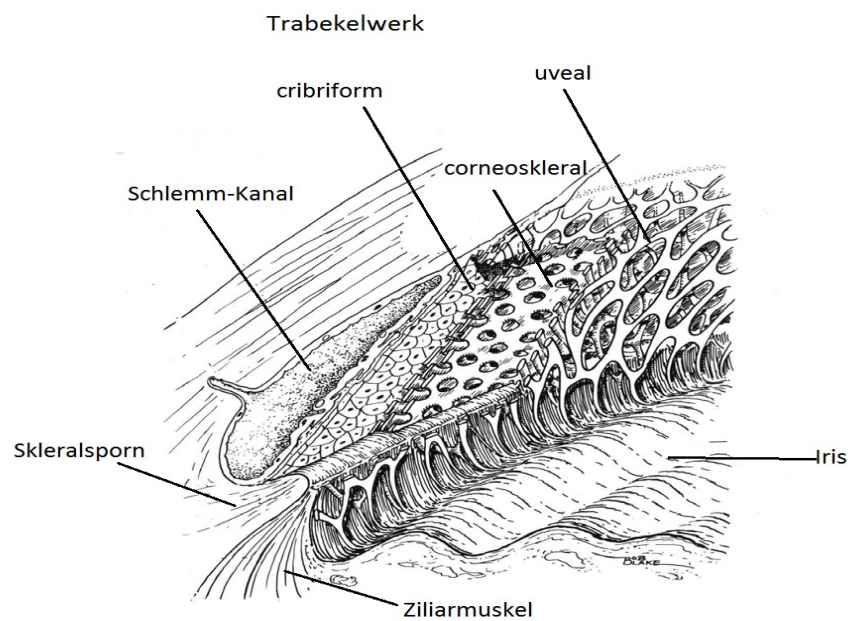


Abbildung 4: Blick auf den Kammerwinkel mit den Strukturen des Trabekelwerks, Schlemm Kanal, Ziliarmuskel und Skleralsporn. (modifiziert aus (2))

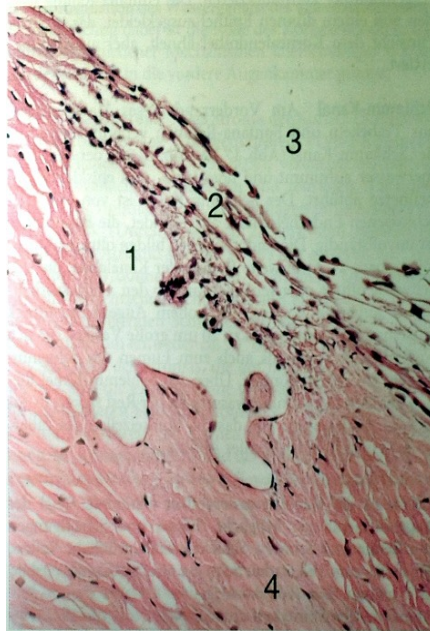


Abbildung 5: Vergrößerte Darstellung (250-fach) des Schlemm-Kanals (1) aus Abbildung 1 mit dem Trabekelwerk und seinen Fontana-Räumen (2) angrenzend zur vorderen Augenkammer (3). (aus (24))

Der Flüssigkeitsfluss des Schlemm-Kanals läuft von außen nach innen (25). Durch die Inkongruenz der Länge des Schlemm-Kanals zum anterior-posterioren Anteil des Trabekelwerks lässt sich eine anteriore nicht filtrierende von einer posterioren filtrierenden Portion abgrenzen (26,27). Die Endothelzellen der inneren Wand des Schlemm-Kanals stellen die letzte Abflussbarriere für das Kammerwasser dar (28). Die Besonderheit der Innenwand des Schlemm-Kanals zeichnet sich durch spezielle „druckabhängige Erweiterungen“ bzw. Aussackungen sogenannten „*giant vacuoles*“ und „transendothelialen Öffnungen“, *Poren* aus (25). Diese Ausstülpungen des Endothels entstehen durch das Druckgefälle des Kammerwassers von basal Richtung apikal, dadurch werden die Endothelzellen durch den Druck von der Membran abgehoben (29). Es wurde festgestellt, dass diese „*giant vacuoles*“ gehäuft in Nähe der Sammelkanäle des Schlemm-Kanals auftreten (30). Sie stellen sehr druck-sensitive Strukturen dar und nehmen entsprechend steigendem intraokulären Druck mit reaktiver Geschwindigkeit an Dichte und Größe zu (31). Daneben wurde auch über intra- und interzelluläre Poren diskutiert, deren Existenz umstritten war, und in einigen Fällen hierbei eher zerreißungsbedingt entstandene Artefakte vermutet wurden (32). Johnson konnte 2006 diese These mit der Identifizierung von 0,1-0,12 μm weiten intra- und interzellulären Poren (*I- und B-Poren*), die dem hohen Druck am trabekulären Endothel angepasst sind, widerlegen (33).

1 Einleitung

Als Besonderheit des Schlemm-Kanal-Endothels bei *Cynomolgus*-Affen entdeckte Inomata mit Diaphragma bedeckte „Miniporen“ von 0,06 μm Größe (34), die auch an humanen Augen beschrieben wurden (35). Diese zeigten strukturelle Ähnlichkeiten zu fenestriertem Kapillarendothel. Jüngste Untersuchungen stellten fest, dass in den Diaphragmen dieser Miniporen in Menschen-, Mäuse- und Schweine-Augen, das Protein Plasmalemma-Vesicle-Associated-Protein (*PLVAP*) lokalisiert ist (36). Das Vorkommen dieses Proteins ist notwendig für die Diaphragma-Bildung in den Endothelien der Gefäße des Kammerwasserabflusses sowie die Bildung der transendothelialen Poren (36).

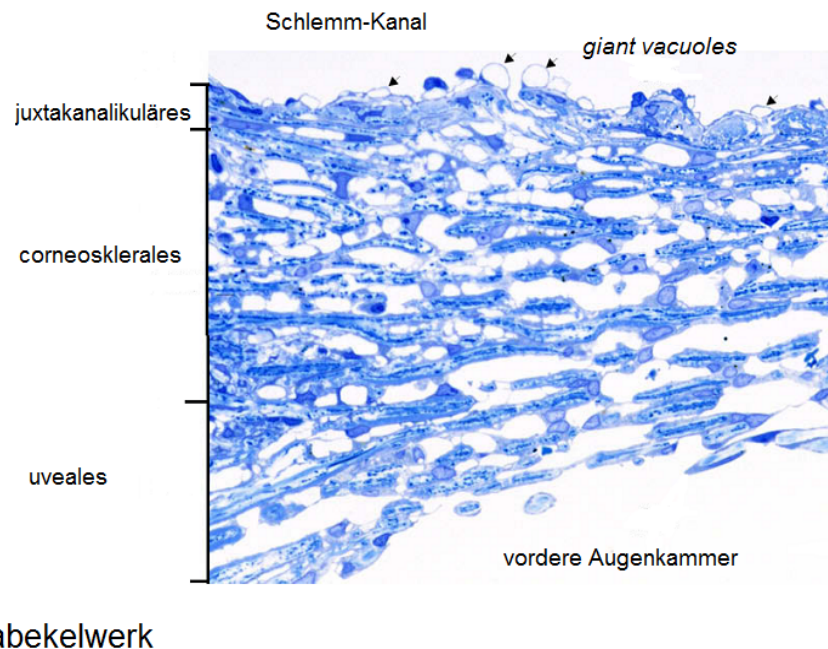


Abbildung 6: Dargestellt sind die verschiedenen Anteile des Trabekelwerks, das juxtakanalikuläre Gewebe und die innere Wand des Schlemm-Kanals mit seinen Endothelausstülpungen, sogenannten „giant vacuoles“ (Pfeile). (aus (111))

1 Einleitung

1.4 Trabekelwerk des Auges

1.4.1 Aufbau und Gliederung des Trabekelwerks in Areale

Das Trabekelwerk ist ein Maschenwerk aus bindegewebiger Struktur, das aus zahlreichen Fontana-Räumen besteht (24). Es erstreckt sich von der Schwalbe'schen Linie, dem Ende der Desçemet'schen Membran des peripheren Hornhautendothels, über den Ziliarmuskel zur Iris. Zusammen mit dem Schlemm-Kanal liegt das Trabekelwerk im *Sulcus sclerae*, einer Furche die durch die unterschiedlichen Krümmungsverhältnisse von Cornea und Sklera entsteht (37).

Die anatomischen Grenzstrukturen des Sulcus sclerae stellen die Schwalbe'sche Linie und der Skeralsporn, als muskuläre Übergangsstruktur zum Ziliarmuskel dar. Hier befindet sich auch der ziliare Anteil des Trabekelwerks, das zwischen dem Ziliarmuskel und der Iriswurzel eingespannt ist und aus lockerem Bindegewebe besteht. Dieser ziliare Anteil gehört nicht zum Hauptabflussgebiet des Kammerwassers. Ebenso abzugrenzen ist ein nicht von Kammerwasser durchspülter Abschnitt: der Übergang des Trabekelwerks vom Schlemm-Kanal zur Cornea zeigt einen nicht filtrierenden Bereich, der sich von einem filtrierenden Bereich vor dem Schlemm-Kanal abgrenzt. Der größere Teil des Trabekelwerks stellt den filtrierenden Anteil dar, der von innen nach außen aus folgenden Anteilen besteht: uveoskleral, corneoskleral und juxtakanalikulär/ cribriform.

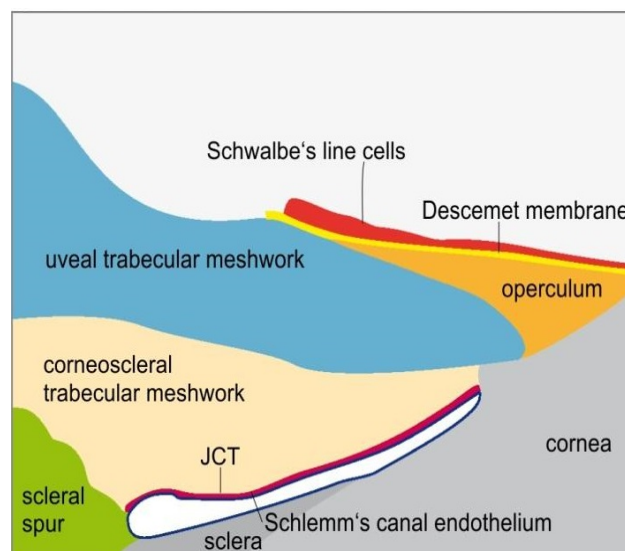


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Kammerwinkels des Affen Auges mit der Schwalbe'schen Linie als peripheres Ende der Descemet Membran. Angrenzende Strukturen des Trabekelwerks und Überblick über die strukturelle Einteilung wird aufgezeigt. (mit freundlicher Genehmigung von Antje Zenker aus (110))

Die Struktur des Trabekelwerks setzt sich aus bindegewebigen Strängen und Lamellen zusammen, deren zentraler Aufbau kollagene und elastische Fasern aufweist (27). Die

1 Einleitung

schwamm-ähnliche Konsistenz des Trabekelwerks entsteht auch z.T. dadurch dass die Lamellen gemeinsame Verbindungen über ihren Bindegewebskern oder ihre Zell-Fortsätze zeigen (27). Die Lamellen werden von Trabekelwerkszellen umgeben, die epithelialen Charakter aufweisen und einer Basallamina aufliegen (27).

1.4.1.1 Uveosklerales Trabekelwerk

Das uveosklerale Areal ist aus locker angeordneten großmaschigen Lamellen zusammengesetzt, die aus 1 bis 3 Lamellenschichten bestehen (27). Durch diesen Aufbau mit breiten Interzellularräumen entsteht für das Kammerwasser ein abgeschwächter Widerstand (28). Zusammen mit dem corneoskleralen Gerüst wird hier die geringste Abflussbarriere gebildet. Selbst operative Exzisionen dieser inneren Bereiche wirken sich nicht auf den Abfluss aus (38). Die Verbindung zwischen dem ziliaren Trabekelwerk bzw. Ziliarkörper und der peripheren Cornea lässt sich durch dieses Areal darstellen. Zur Außenseite hin erfolgt hier der direkte Übergang zum corneoskleralen Anteil.

1.4.1.2 Corneosklerales Trabekelwerk

Den Großteil des trabekulären Bindegewebsnetzes macht der engmaschige corneosklerale Anteil aus. Es besteht aus Lamellen und Trabekel, wobei hier die Lamellen kräftiger sind und 8 bis 15 Etagen bilden (27). Das Areal ist zwischen der Cornea und dem Skleralsporn ausgespannt.

1.4.1.3 Juxtakanalikuläres/cribriformes Gewebe

Das juxtakanalikuläre bzw. cribriforme Gewebe (JCT) liegt zwischen dem corneoskleralen TW und dem Endothel des Schlemm-Kanals dem Trabekelwerk am äußersten an. Anders als der uveosklerale und corneosklerale Teil liegt hier sowohl die strukturelle als auch funktionelle Unterscheidung im Fehlen von Trabekellamellen und dem unregelmäßigen netzartigen Aufbau. Die cribriformen Zellen ordnen sich locker mit Fortsätzen und Fibroblasten-ähnlicher Gestalt in 2 bis 5 Zellschichten (27). Diese Eigenschaft entsteht dadurch dass hier die Trabekelwerkszellen von Fibrillen der Extrazellulärmatrix umgeben sind (35) was dazu führt, dass einige Autoren diesem Bereich des Trabekelwerks die eigenständige Bezeichnung „Cribriformes Maschenwerk“ zugeschrieben haben (39). Dieses fibrilläre und faserreiche Netzwerk hat durch seine Struktur die Funktion, das Kammerwasser über die Zwischenräume und Sammelkanäle mit der extrazellulären Substanz in unmittelbaren Kontakt zu bringen. Die elastischen Fasern sind mit dem Endothel des Schlemm-Kanals über Fibrillen oder Hüllstrukturen der Fasern verankert (27,40). Das cribriforme Trabekelwerk, zusammen mit der Innenwand des Schlemm-Kanal-Endothels, bildet den Hauptabflusswiderstand des Kammerwassers (35,41–43).

1.4.2 Funktion des Trabekelwerks

Das Trabekelwerk als bälkchenartige Struktur liegt im Winkel zwischen Cornea und Iris und stellt den größten Passageweg des Kammerwassers dar. Es passt sich dem Abflusswiderstand des Kammerwasserflusses an und beteiligt sich an der Regulation des intraokulären Drucks. Die Regulierung des konventionellen Abflussweges geschieht über das Zusammenwirken des Ziliarmuskels, dessen anteriorer Muskelanteil mit dem posterioren Trabekelwerk in Verbindung steht und den kontraktilen Eigenschaften des Trabekelwerks (35,44,45). Bei Anspannung des Trabekelwerks verringert sich der Abfluss des Kammerwassers was zu einem Anstieg des Augeninnendrucks führt. Antagonistisch dazu führen Kontraktionsvorgänge des Ziliarmuskels über die strukturelle Nähe zum Trabekelwerk und Skleralsporn dazu dass die Fontana-Räume der Trabekel sich erweitern und zu einem Sinken des IOP's führen (39,45). Trabekelwerkszellen zeigen außerdem unter dem Einfluss von Metalloproteasen die besondere Eigenschaft ihre extrazelluläre Matrix auf- und abzubauen, was sich auch wieder direkt auf das Gleichgewicht des Kammerwasserabflusses auswirkt (23).

Altersbedingt verändert sich die Morphologie der trabekulären Strukturen, wie Ablagerungen hyalinen Materials (40) an der cribriformen Region und der dortige Umbau der extrazellulären Matrix sowie ein Verlust an Trabekelwerkszellen. Gehäuft wird dies bei glaukomatös erkrankten Augen beobachtet (28). Auch die Einschränkungen der Kontraktilität des Ziliarmuskels sind ein Teil dieser Abnutzungserscheinung (28).

Obwohl der Skleralsporn nicht ein struktureller Teil des trabekelulären Maschenwerks ist, wurde er bei den Auszählungen und Auswertungen zu Vergleichszwecken mit berücksichtigt.

1.5 Corneaendothel- Schwalbe`sche Linie

Als Teil der vorderen Augenkammer, stellt die Cornea zusammen mit der Sklera die äußere Augenhaut dar. Sie ist von außen nach innen in die fünf Schichten Corneaepithel, Bowman`sche Membran, Stroma, Desçemet Membran und Corneaendothel gegliedert (24).

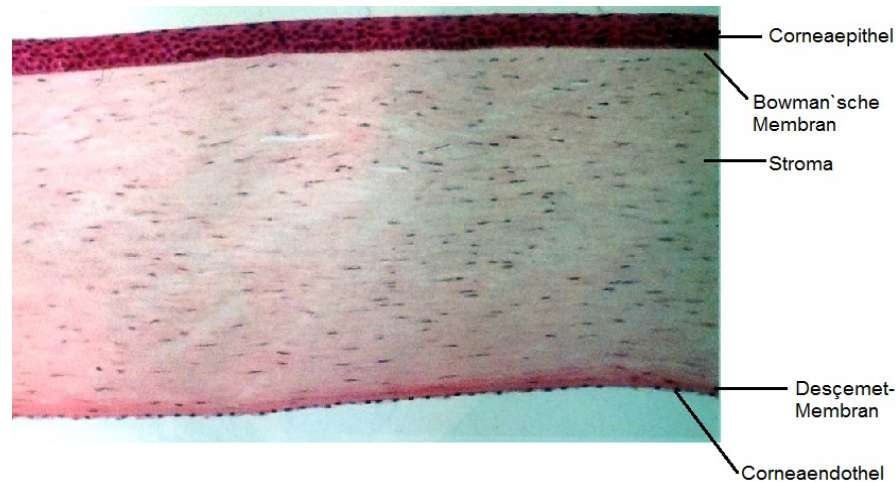


Abbildung 8: Hornhaut des menschlichen Auges in Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit 80-facher Vergrößerung. Schichten der gefäßfreien Cornea von außen nach innen (24).

Während man beim Epithel der Cornea ein mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel vorfindet, zeigt sich das Endothel als feines einschichtiges Plattenepithel. Es ist auf einer 5-10 µm dicken, besonderen Basalmembran, der Desçemet Membran verankert, die aus nicht fibrillärem Kollagen Typ VIII besteht (24). Zu den Hauptaufgaben des Corneaendothels gehören, das Sicherstellen des Hydratationszustandes und das Aufrechterhalten der Transparenz der Cornea. Da die Hornhaut frei von Blutgefäßen ist muss eine Permeabilität für Nährstoffe und weitere Moleküle aus dem Kammerwasser gewährleistet werden (46).

Als zusätzliche Aufgabe tragen die Zellen des Corneaendothels der Synthese der Desçemet-Membran (47) und dessen speziellen Komponenten, der Kollagensynthese Typ VIII (48) bei. Es wird vermutet, dass dieser besondere Kollagenaufbau der Desçemet-Membran zu seiner einzigartigen Zusammensetzung beiträgt und die Stabilität der Hornhaut sicherstellt (49). Das periphere Ende der Desçemet Membran, die sogenannte Schwalbe`sche Linie, erstreckt sich bis zum anterioren nicht filtrierenden Teil des Trabekelwerks. Der Schwalbe`schen Linie wird eine besondere Bedeutung zugeordnet, da hier Zellen mit speziellen Eigenschaften beobachtet wurden, die seit langer Zeit als potenzielle Stammzellen erforscht werden. Schon 1982 entdeckte Raviola in Rhesusaffen sogenannte „Unique cells“ die er als neuartige Zellen im Bereich der Schwalbe`schen Linie bezeichnete (50).

1.6 Stammzellen

Stammzellen sind unreife, nicht determinierte Zellen, die sich sowohl in die verschiedenen Zelltypen differenzieren können als auch zu Geweben und Organen entwickeln können. Diese Zellen mit niedriger Teilungsaktivität kann man neben verschiedenen Einteilungen grundsätzlich in zwei Typen unterteilen: embryonale und adulte Stammzellen. Während sich embryonale Stammzellen in jedes Gewebe entwickeln können, sind adulte Stammzellen in ihrem Ausreifen auf spezifische Gewebetypen beschränkt. Je nach Differenzierungsgrad unterscheidet man totipotente, pluripotente, multipotente und oligopotente Stammzellen.

1.6.1 Eigenschaften von Stammzellen

Embryonale Stammzellen sind am Anfang ihrer Entwicklung totipotent d.h. sie können *in vivo* und *in vitro* in jeden Zelltyp der drei Keimblätter Ektoderm, Entoderm, Mesoderm und Zellen der Keimbahn differenzieren. Außerdem können sie auch zu einem eigenständigen Organismus heranreifen. Diese Zellen verlieren mit steigender Differenzierung ihr Entwicklungspotential und werden zu determinierten Zellen (51). Die Fähigkeit der embryonalen Stammzellen sich nicht mehr in vollständige Organismen, aber in sämtliche Gewebetypen des Körpers differenzieren zu können, wird als Pluripotenz bezeichnet. Reife Stammzellen zeigen multipotenten Charakter mit der Potenz in geeignetem Milieu sich innerhalb eines Gewebes zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren (52,53). Zum Nachweis der multipotenten Eigenschaft von potentiellen Trabekelwerk-Stammzellen in geeignetem Milieu wurden von Yiqin Du, FACS-isolierte potentielle Stammzellen im Trabekelwerk herangezogen (54). Anstatt in ihrem eigenen Stammzellmedium wurden die Zellen mit einem Adipozytenmedium (ADM/AMM) behandelt (54). In diesem Medium zeigten die Zellen in der Färbung mit dem „Oil Red O“ Farbstoff, das zur Darstellung von Triglyceriden und Lipiden dient, eine Reaktion, was auf eine Induktion des Adipozytenphänotyps hindeutet (54). Auf RNA-Ebene wurde eine Expression der Adipozytenmarker ap2 und Leptin beobachtet (54).

Bei höher differenzierten adulten Stammzellen liegt eine Oligopotenz vor, bei der Zellen sich nur noch in wenige verschiedene Zelltypen innerhalb eines Gewebes entwickeln können.

Als gemeinsame Eigenschaft sowohl von embryonalen als auch adulten Stammzellen gelten eine hohe Kapazität an Regeneration/Selbsterneuerung (55).

Sie zeigen sowohl eine symmetrische als auch eine asymmetrische Teilungsaktivität (55). Bei der symmetrischen Teilung entstehen zwei identische Kopien der Elternzelle. Vorläuferzellen (Progenitorzellen) resultieren neben einer Kopie der Elternzelle aus einer asymmetrischen Teilung. Sie besitzen teilweise die Fähigkeit von Stammzellen zu proliferieren und regenerieren, jedoch sind sie in ihrer Entwicklung unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren determiniert und können nur noch in spezifische Zelllinien

1 Einleitung

differenzieren.

Die asymmetrische Zellteilung dient dem Erhalt undifferenzierter Stammzellen bei gleichzeitiger Bildung differenzierender Vorläuferzellen (*Progenitorzellen*). Dadurch können Stammzellen im Körper beschädigte bzw. ischiämische Zellen ersetzen und eine Gewebemöostase aufrechterhalten (52,56). Dabei befinden sich adulte Stammzellen, anders als die restlichen Stammzelltypen, vermehrt in unmittelbarer Nachbarschaft zu ihrem Zielgewebe um bei Verletzungen möglichst schnell und effektiv an den Verletzungsort zu gelangen (57). Reife Stammzellen haben als Gemeinsamkeit eine „geringe Zellzahl, eine hohe Kern-Plasma-Relation, eine hohe Proliferationsrate, einen langsamen Zellzyklus und einen niedrigen Differenzierungsgrad mit primitivem Zytoplasma“ (58).

An diesen Ansätzen orientierte sich die weitere Klassifizierung und Beurteilung potentieller Stammzellen. In den letzten Jahren wurden immer mehr potentielle Stammzellen in verschiedenen Gewebestrukturen gefunden, wie zuletzt auch im Gehirn (112,113) und in der Retina (114). Hier wird im Vergleich zu anderen Strukturen die Zellteilung als besonders selten beschrieben, ähnlich wie es auch im Trabekelwerk zu erwarten ist.

1.6.2 Historische Entdeckung von potentiellen Stammzellen im Trabekelwerk

Seit langer Zeit sind potentielle Stammzellen in verschiedenen Arealen des Trabekelwerks ein wichtiger Forschungsansatz. Schon 1982 entdeckte Raviola in Rhesusaffen sogenannte „Unique cells“ die er als neuartige Zellen im Bereich der Schwalbe'schen Linie bezeichnete (50). Neuere Erkenntnisse in diesem Bereich wies Challa 2003 mit sog. „novel cells“ im menschlichen Trabekelwerk nach, die er mit normalen Zellen, TW-Zellen, SC-Endothelzellen und Fibroblasten verglich und eine unterschiedliche Genexpression feststellte (59). Kelley beschrieb 2009 unter dem Namen „Trabecular meshwork insert cells“ eine Zellart, die eine Expression von den TW-Markern HMFG (*human milk fat globule*) und Stammzellmarkern (pluripotenter Zellen) wie Oct 3/4 (*Octamer-binding transcription factor 3/4*) zeigten und diese neuen Zellen somit als Vorläuferzellen galten (53). Eine der ersten Besonderheiten von Trabekelwerkszellen, nämlich eine Phagozytoseaktivität stellten Rohen und Van der Zypen bereits 1968 fest (60). In jüngster Vergangenheit wurde entdeckt dass diese phagozytierenden und somit vermutlich dem regulierten Kammerwasserfluss beitragenden Trabekelwerkszellen gleichzeitig Stammzelleigenschaft aufweisen (54). Die Zelldichte von Zellen im trabekulärem Balkengerüst lässt mit steigendem Alter eine Abnahme erkennen, die für einen intakten intraokulären Zustand ausreichend kompensiert werden sollte. Es lässt sich jedoch kein suffizienter Ausgleich nachweisen. Vermutlich verfügt unser Auge im Alter von ca. 20 Jahren über ungefähr 750.000 Zellen im Maschenwerk, während wir um das 80. Lebensjahr nur noch 400.000 trabekuläre Zellen besitzen (61), was jährlich einen konstanten Verlust an Trabekelwerkszellen um die 0,56% bedeutet (62). Bei Patienten mit primärem

1 Einleitung

Offenwinkelglaukom, und damit einhergehender Erhöhung des intraokulären Drucks wurde ein höherer Zellverlust im Trabekelwerk registriert (62).

Trotz der Schwierigkeit reife Stammzellen aufgrund fehlender Expression von Stammzellmarkern *in vivo* ausreichend darzustellen, wurden an der Schwalbe'schen Linie Marker wie Nestin, alkalischer Phosphatase und Telomerase nachgewiesen (93). Unterschiedliche Marker wie Oct 3/4 und Pax 6 wurden nach Verletzung der Cornea festgestellt (26).

1.6.3 Stammzellmarker Oct4

Zum ersten Mal wurde der *Octamer-binding transcription factor 4* als spezifischer Transkriptionsfaktor für embryonale Stammzellen und Keimbahn-Stammzellen bei Mäusen entdeckt (63–65). Inzwischen sind die 3 Isoformen Oct4A, Oct4B und Oct4B1 dieses Transkriptionsfaktors bekannt, wobei von diesen nur Oct4A die pluripotente Eigenschaft von embryonalen Stammzellen bewirkt (66). Bereits 2002 wurde festgestellt dass die Oct4-Expression die Pluripotenz sowohl mesenchymaler als auch embryonaler Stammzellen und deren Regenerationspotential bestimmt (67). Neueste Erkenntnisse über Oct4 stärken die Annahme, dass Oct4 eine Schlüsselfunktion in der embryonalen Entwicklung einnimmt hinsichtlich der Bildung als auch dem Aufrechterhalten pluripotenter Zellen (65). Entscheidend ist der Konzentrationspiegel von Oct4, der das Schicksal der embryologischen Zellen in deren Pluripotenz maßgeblich bestimmt (68):

Eine Erhöhung der Oct4-Expression nahezu auf das Doppelte führt in den Untersuchungen zu einer Differenzierung in die primitive Form des Entoderm und Mesoderm (68). Bei geringen Oct4-Spiegeln hingegen kann die Pluripotenz nicht gewährleistet werden und es kommt nur zu einer Differenzierung in die Form des Trophoblasten (68). Somit lässt sich vermuten, dass der exakte Spiegel der Oct4-Expression eine entscheidende Rolle im Aufrechterhalten der Pluripotenz embryologischer Zellen darstellt und auch deren Differenzierung bestimmen könnte.

1.6.4 Stammzellnischen

So wie nach potentiellen Stammzellen in speziellen Bereichen des Auges jahrelang gesucht wurde, forschte man auch nach sogenannten Stammzellnischen, also Gewebsregionen, in denen sich Stammzellen in geeignetem Milieu in größerer Anzahl aufhielten. Diese „Mikro-Umwelt“ besteht aus wachstumsfördernden bzw. wachstumshemmenden Faktoren sowie zellulären bzw. extrazellulären Komponenten (69) und stellt eine funktionelle Einheit zur Regulation der Stammzellen dar (70). Als einer der Erstbeschreiber charakterisierte Scholfield Stammzellnischen als anatomische Bereiche, die sowohl das Verhalten als auch die Zellzahl sowie deren Zelltod bestimmen (71). Sie sollen auch Stammzellen dazu dirigieren gewebespezifische Zellen an Strukturen in unmittelbarer Nähe zur Regeneration anzuregen oder wenn notwendig bei Geweben weiterer Entfernung, sich in die gewünschten Zellen zu differenzieren (71). Es wird vermutet, dass bei der Differenzierung Stammzellen in ihren Nischen zu einer asymmetrischen Teilung angeregt werden (72). Nach der Zellteilung teilen sich Tochterzellen auf, wobei eine Tochterzelle in der Nische bleibt, und die andere die Nische verlässt und sich für den jeweilig gewünschten Gebrauch weiter differenziert (72). Über das Kontrollsystem der Zellnischen ist wenig bekannt. Es wird vermutet, dass positive und negative Regelkreis-Mechanismen von Vorläuferzellen und reifen Zellen ähnlich dem menschlichen Hormonkreislauf eine Rolle spielen, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Nische selbst den Mechanismus ebenfalls dirigieren kann (70). Die Arbeitsgruppe von Ema beschäftigte sich mit verschiedenen Zellnischen in unterschiedlichen Gewebetypen vor allem aber hämatopoetischen Strukturen (70). Sie fanden dabei eine neuartige Unterscheidung in den Nischenstrukturen: spezialisierte und nicht spezialisierte Nischen, die sich in der Regulation der Stammzellteilung unterscheiden (70). Dieser Hypothese zufolge sollen die meisten Stammzellen unter dem Einfluss von beiden Nischentypen stehen. Während die spezialisierte Nische innerhalb eines einfacheren System mit einer ganz geringen Anzahl an Stammzelltypen sich in der Nähe der Stammzelle platziert um direkt Einfluss nehmen zu können, fungieren nicht spezialisierte Nischen, die auch häufiger vertreten sind, in komplizierterer Form über direkte und indirekte Einflussmechanismen (70). Es wurden Stammzellnischen an der Schwalbe'schen Linie entdeckt, mit Vorläuferzellen die sich in neue Trabekelwerkzellen, Cornealendothel-Zellen oder Zellen beider Strukturen entwickeln könnten (73). Die Zellen des TW und des Hornhautendothels entstammen beide Neuralleistenzellen und *in vivo* wurden auch Ähnlichkeiten im Proliferationsprozess beider Zelltypen beobachtet (38).

1.6.5 Stammzellen als möglicher Therapieansatz in der Glaukomforschung

Die Stammzelltherapie wird aus verschiedenen Ansatzpunkten als erfolgversprechende Entwicklung in nächster Zukunft betrachtet. Allerdings ist sie noch mit Schwierigkeiten in der Umsetzung *in vivo* behaftet. Ziele der Stammzelltherapie liegen in der Erneuerung von irreversiblen Gewebeschädigungen durch Steuerung von Differenzierungsvorgängen in Stammzellnischen und im Ersatz des Zellverlustes durch Aktivität der Zellteilung. Bisher wurde die Stammzelltherapie in klinischen Studien bei der Regeneration des Hornhautepithels durch die epithelialen Stammzellen des Limbus erfolgreich eingesetzt (74). Unter homöostatischen *in vivo* Bedingungen, wird vermutet dass die meisten Stammzelltypen eine seltene Teilungsaktivität zeigen und einen langen Zellzyklus haben (76). So wurde beispielsweise bei hämatopoetischen Stammzellen von Mäusen ein langsamer Zellteilungsvorgang über einen Zeitraum von 1,5 bis 3 Monaten beobachtet (76). Die Schwierigkeit in der Bestimmung von reifen Stammzellen *in vivo* liegt unter anderem darin, dass immer noch nur wenige Stammzellmarker bekannt sind. In den letzten Jahren hat sich somit zur Bestimmung von Stammzellen die Methode der DNA Markierung während des Zellzyklus mit dem Nukelotidanalogen 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) etabliert.

1.7 BrdU- 5-Brom-2-desoxyuridin

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde zur Darstellung mitotisch aktiver Zellen die BrdU-Färbung herangezogen. Das 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidinanalogon, das sich während der Synthesephase des Zellzyklus in die DNA sich teilender Zellen einlagert. Die kurze Bioverfügbarkeit des BrdU ermöglicht die Darstellung ausschließlich der DNA der Zellen, die sich in der S-Phase befinden.

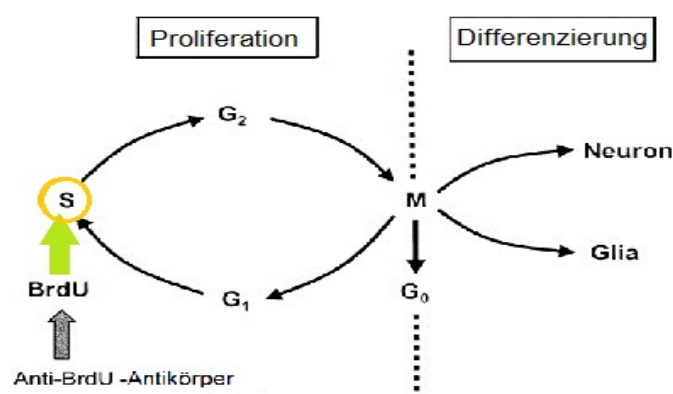


Abbildung 9: BrdU- Markierung in der neu synthetisierten DNA: Beispielhaft am Zellzyklus von reifen neuronalen Vorläuferzellen bei Säugetieren. Einlagern von BrdU in der Synthesephase des Proliferationszyklus und immunhistochemischer Nachweis durch Verwendung von Anti-BrdU-Antikörper (aus (90)).

1 Einleitung

Da BrdU mittels spezifischer Antikörper im Zellkern nachgewiesen werden kann, ist es möglich, die Teilungsaktivität der Zellen retrospektiv zu beurteilen (77). Bei jeder Mitose wird die Markierung der Zelle an deren Tochterzellen weiter gegeben, somit ist BrdU auch nach abgeschlossener Differenzierung der Zelle darstellbar. Dabei wird die Eigenschaft von Stammzellen, der langsamen und unregelmäßigen bzw. zufälligen Teilung genutzt (69). Bis zu 8 Wochen nach der BrdU-Behandlung kann dieses in den sich die langsam teilenden potentiellen Stammzellen nachgewiesen werden (79). Im Verlauf der Mitosen wird die BrdU-Markierung an die Tochterzellen übertragen und können nach vollständiger Zelldifferenzierung in dieser noch bis zu 11 Monate lang nachgewiesen werden (79). Bei sich schnell teilenden Zellen verdünnt und schwächt sich das BrdU Signal ab. BrdU zeigte sich in sämtlichen *in vivo* und *in vitro* Studien als geeigneter Marker für teilungsaktive Zellen (80,81).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Identifizierung potentieller adulter Stammzellen und deren Stammzellnische im Kammerwinkel des Auges bei Rhesusaffen.

Hierfür werden wir die Augen von 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) behandelten Rhesusaffen immunhistochemisch untersuchen. Durch den Nachweis von Langzeit gespeicherten BrdU werden wir einen ersten Hinweis auf potentielle Stammzellen erhalten. Wir werden die Verteilung BrdU-positiver Zellen in den 4 Quadranten des Auges untersuchen. Anschließend werden wir ein potentielles Akkumulieren von BrdU-positiven Zellen in den verschiedenen Subarealen des Trabekelwerks untersuchen. Neben den Subarealen des Trabekelwerks, wie das corneosklerale und uveosklerale Trabekelwerk, werden wir zusätzlich das juxtakanalikuläre Gewebe, das Schlemm-Kanalendothel, den Skleralsporn, das Operculum und die Schwalbe'sche Linie mit in die Analysen einbeziehen. Dann soll die Frage geklärt werden, ob diese BrdU-positiven Zellen mögliche Trabekelwerksstammzellen darstellen. Um dies nachzuweisen wird eine immunhistochemische Doppelfärbung mit BrdU und Oct4, einem Stammzellmarker, durchgeführt werden. Mittels Elektronenmikroskopie werden die ermittelten Areale ultrastrukturell analysiert und auf Stammzellcharakteristika untersucht.

2 Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

2.1.1 Reagenzienliste

Bleicitrat	Leica, Bensheim
DDSA (Dodecenybersteinsäureanhydrid)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycidether	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
HCl 37% (1N)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe oder Merck KgaA, Darmstadt
MNA (Methylnadic Anhydride)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumcacodylat	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg
OsO ₄	Science Service München
Paraffin Paraplast Plus	R Langenbrinck Emmendingen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Tris Ultrapure, MB Grade	Usb Corporation, Cleveland, USA
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Xylol	Merck KgaA, Darmstadt

Tabelle 1 Reagenzienliste

2.1.2 Enzyme

Proteinase K	Fermentas Inc. Hanover MD, USA
--------------	--------------------------------

Tabelle 2 Enzyme

2 Material und Methoden

2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

2.1.3.1 Verbrauchsmaterialien

„Falcon“ Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnbergrecht
Deckgläser, 24 x 60 mm	Menzel - Gläser, Braunschweig
Deckgläser, 24 x 50/40mm	Menzel - Gläser, Braunschweig
Deckgläser, 18 x 18 mm	Menzel - Gläser, Braunschweig
Glaswaren	Schott AG, Mainz/ Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe/ VWR
Liquid Blocker PAP-Pen	SCI Science Services, München
Multi-Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, VWR International GmbH, Darmstadt
Personna Rasierklingen	SCI Science Services, München
Pipettenspitzen 20µl, 40µl 200µl, 1000µl, 5000µl	Sarstedt, Nürnbergrecht
Rotiprotect Latex Handschuhe	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Powderfree Sempercure Handschuhe	Sempermed, Wien, AUS
SuperFrost® Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien

2 Material und Methoden

2.1.3.2 Geräte

Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
Einbettautomat EM-TP	Leica, Nussloch, Deutschland
Gewebeinfiltrationsautomat Microm HMP 110	Microm International, Walldorf
IDA Gel Documentation System	raytest GmbH, Straubenhardt
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
Kern PJJ 2100-2M Analysenwaage	Kern & Sohn GmbH, Albstadt
Medax Wasserbad und Strecktisch	Nagel GbmH, Kiel
Memmert Wärme (Brut-) schrank	Memmert GmbH, Schwabach
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Gießen
Microm HM 500 OM Kryostats	Microm International, Walldorf
Mikroskop Axio Imager Z1	Zeiss, Göttingen
Mikrotom Reichert Jung Supercut 2050	Cambridge Instruments GmbH, Nussloch
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Paraffin Ausgießstation MPS/P2	SLEE Medical, Mainz
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Zeiss EM 10	Zeiss, Oberkochen
Ultramikrotom Supercut	Reichert-Jung, Wien, Österreich
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA

Tabelle 4 Geräte

2 Material und Methoden

2.1.4 Puffer und Lösungen

Blotto 5%	Sucofin Magermilchpulver in 0,1 M Phosphatpuffer
Blotto 0,5%	1:10 Verdünnung von Blotto 5% mit 0,1 M Phosphatpuffer
BSA 2%	Bovine Serum Albumin
BSA 0,2%	Bovine Serum Albumin in 0,1 M Phosphatpuffer
Natriumcacodylatpuffer 0,2 M	42,8 g Na-Cacodylat in 1.000 ml dH ₂ O, mit 0,2 M HCl pH 7,4 einstellen
Glutaraldehyd 2,5%	1:10 Verdünnung aus 25 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacopuffer
Paraformaldehyd 2,5%	1:10 Verdünnung aus 25% Paraformaldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer
Paraformaldehyd 25%	12,5 g PFA + 40ml dH ₂ O mit 1,0 M NaOH klären, mit A.bid auf 50ml auffüllen
Phosphatpuffer, 0,2 M pH 7,4	0,2 M Na ₂ HPO ₄ + 2 H ₂ O mit 0,2 M NaH ₂ PO ₄ + H ₂ O auf pH 7,4 einstellen
Phosphatpuffer, 0,1 M pH 7,4	1000ml 0,2 M Phosphatpuffer mit 1000ml dH ₂ O auf 0,1 M Phosphatpuffer verdünnen
TRIS/HCl, 0,2 M, pH 7,3-7,4	12 g Tris base in 500 ml dH ₂ O lösen; auf pH 7,3 -7,4 einstellen
TRIS/HCl, 0,05 M, pH 7,3 - 7,4	50ml 0,2M TRIS HCl mit 150ml dH ₂ O auf pH 7,3 -7,4 einstellen

Tabelle 5 Puffer und Lösungen

2 Material und Methoden

2.1.5 Antikörper

Die verwendeten Primär- und Sekundär- AK sind in Tabelle 6 und 7 aufgelistet.

Protein	Primärer Antikörper	Bezugsquelle
BrdU	mouse IgG monoclonal PRB-1 α BrdU (1:50 Verdünnung in Blotto 0,5%)	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
CD31	α CD31 (1:100 Verdünnung in BSA 0,2%)	DAKO Denmark Produktionsvej 42 DK 2600 Denmark
Oct4	α Oct4 (1:50 Verdünnung in BSA 0,2%)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Bergheimer Straße 89-2 69115 Heidelberg (Europäische Niederlassung)

Tabelle 6 Primärantikörper

Sekundärer Antikörper	Bezugsquelle
Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L) (1: 500 Verdünnung in Blotto 0,5%)	Vector Laboratories, California, USA
Streptavidin Alexa 488 (1:1000 Verdünnung in Blotto 0,5%)	Invitrogen Molecular Probes 29851 Willow Creek Road Eugene OR 97402 - 9132 USA
Anti-mouse, Alexa 546 (1:1000 Verdünnung in BSA 0,2%)	Invitrogen Molecular Probes 29851 Willow Creek Road Eugene OR 97402 - 9132 USA
Anti-rabbit Alexa 546 (1:1000 Verdünnung in BSA 0,2%)	Invitrogen Molecular Probes 29851 Willow Creek Road Eugene OR 97402 - 9132 USA

Tabelle 7 Sekundärantikörper

2 Material und Methoden

2.2 Versuchsaufbau

Es sind 5 Versuchsabschnitte zu unterscheiden:

1. Präparation der Augen
2. Erstellen von Paraffinschnitten
3. Immunhistochemische Färbung (BrdU-, CD31- und Oct4- Färbungen)
4. Fluoreszenzmikroskopisches Aufnehmen und Bearbeiten der Bilder
5. Beurteilung und quantitative Analyse der Bilder unter verschiedenen Aspekten
6. Immunhistochemische Doppelfärbungen zum Nachweis möglicher Stammzellen
7. Transelektronenmikroskopie- Eponeinbettung und Anfertigen von Semidünnschnitten

2.3 Versuchstiere

Die Makakkenaffen (*Macaca fascicularis*) stammen aus dem Wisconsin National Primate Research Center (USA). Die ganzen Experimente wurden in Übereinstimmung mit "ARVO Statement on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and institutional guidelines", der Stellungnahme zur Verwendung von Tieren zu Forschungszwecken im ophthalmologischen Bereich und den Richtlinien des Wisconsin National Primate Research Center, durchgeführt.

Zur Versuchsdurchführung wurden acht Affenaugen in 4% PFA Fixierung aus Wisconsin (USA) eingeflogen. Dabei wurden die Makakkenaffen unterschiedlichen Vorbehandlungen unterzogen. Alle Affen erhielten vier Wochen lang eine tägliche Dosis von 8 mg BrdU pro kg Körpergewicht über subkutan angelegte BrdU-Pumpen: 1 Pumpe/ 0,75 kg Körpergewicht bei einer mittleren Pumprate von 2,65 µl/ h. Zwei Affen wurden direkt nach dieser Behandlung getötet. Die anderen zwei Affen hatten nach der vierwöchigen BrdU-Gabe eine BrdU-freie Phase von weiteren vier Wochen bis sie getötet wurden.

Nach den Protokollen zu entnehmen, wurden die Affenaugen mit Nummern und Buchstaben kodiert:

Tier Nummer K 657	→	AN 63 OD und OS (Oculus dextra und oculus sinistra)
Tier Nummer K 658	→	AN 55 OD und OS
Tier Nummer K 678	→	AM 78 OD und OS
Tier Nummer 623	→	5 OD und 4 OS

2 Material und Methoden

2.4 Vorbehandlung der Tiere

Die im Folgenden protokollierte Vorbehandlung der Tiere, die Tierhaltung, und die Präparation der Augen bis zum Übersenden an das Institut für Humananatomie und Embryologie erfolgte im Wisconsin National Primate Research Center durch die Arbeitsgruppe von Prof. Paul Kaufman. Der Vollständigkeit halber werden die BrdU-Behandlungsschritte kurz aufgeführt. Aus diesem Grund sind die Materialien des folgenden Kapitels nicht unter den von uns verwendeten Materialien (Materialliste 2.1) aufgelistet.

2.4.1 Implantation der BrdU-Pumpen

Anwendung subkutan implantierter osmotisch wirksamer Pumpen:

Gruppe 1: 2 Affen: 4 Wochen lang BrdU, dann Tötung

Gruppe 2: 2 Affen: 4 Wochen lang BrdU, 4 Wochen kein BrdU, dann Tötung

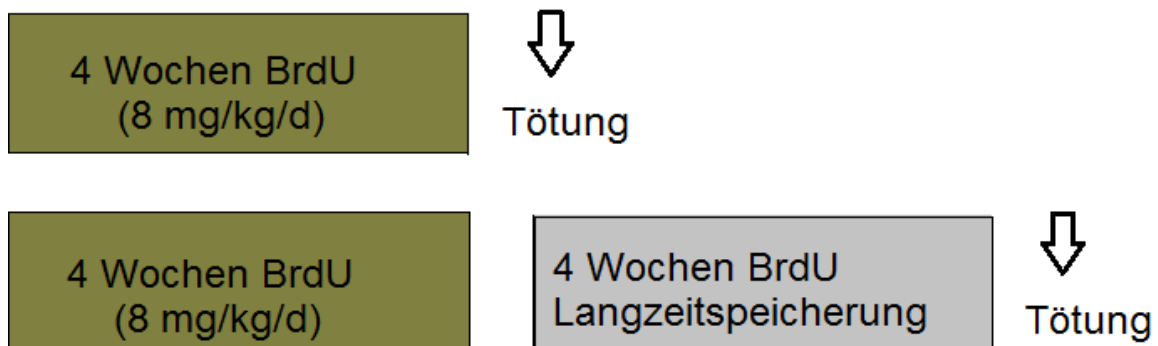


Abbildung 10: Schema zur Vorbehandlung der Tiere in beiden Gruppen 1 und 2. Die Affen in Gruppe 1 wurden nach 4-wöchiger BrdU-Gabe getötet, wobei die Affen in Gruppe 2 nach der 4-wöchigen BrdU-Phase eine weitere 4-wöchige BrdU-freie Phase erhalten haben. Das Vorgehen in Gruppe 2 dient zum Nachweis einer BrdU-Langzeitspeicherung.

Zu beachten ist, dass sich die Tiere nach Implantation der Pumpe in einzelnen Käfigen aufhielten. Genaue Gewichts Anpassung im Idealfall 1 Pumpe/ 0,75 kg Körpergewicht.

2 Material und Methoden

Vorgehen der Implantation

Strikte Nahrungskarenz über Nacht vor dem Eingriff

1. Narkoseeinleitung mit Ketamin (10-15 mg/ kg i.m.) und Medetomidin (30 -75µg/ kg i.m.)
2. Rasieren des Rückens und Desinfektion mit 70% Ethanol oder Chlorhexidin und 70% Isopropanol mindestens 3 min vor dem Schnitt. Auflegen einer warmen Kompresse
3. Kalkulierte Antibiotikagabe von Bicillin (Benzathin-Benzylpenicillin G und Procain-Benzylpenicillin G 30.000 U/kg i.m.)
4. Injektion von Lidocain 2 % s.c. an die Schnittstelle bei Bedarf
5. Mit Hilfe eines Skalpells wird ein oberflächlicher Schnitt von ca. 2 cm Länge horizontal am Rücken zwischen den Schulterblättern gesetzt und mit stumpfer Präparierung wird eine Hauttasche geformt um hier die osmotische Pumpe zu platzieren. Lokale Blutungen werden durch Druck auf die Stelle mit sterilen Mullbinden oder durch Anwendung selbstauflösender Nähte gestoppt.

Die Implantate sind in den Taschen so platziert, dass der (BrdU-) Ausfluss von der Schnittstelle weg fließt. Es wird ein ausgedehnter Raum gewährleistet um an der Einstichstelle einen Druckaufbau zu vermeiden. Hautnähte werden mit selbstauflösender Intrakutannaht (3-0 Vicryl) gesetzt oder die Haut wird durch einen, für Labortiere anerkannten, Veterinär mit anderen Methoden verschlossen. Nach Ermessen des chirurgischen Veterinärs werden ein oder zwei Schnitte gesetzt um die Implantate adäquat zu verteilen. Falls ein zweiter Schnitt nötig ist, wird dieser ungefähr 10-12 cm unterhalb des ersten Schnittes oder in ausreichend geeignetem Abstand durch den chirurgischen Veterinär gesetzt

6. Nach Abschluss des chirurgischen Eingriffs, wird zur Hemmung der Medetominwirkung je nach Notwendigkeit der Alpha-2-Antagonist (0,15-0,25 mg/ kg i.v. oder i.m) Atipemazol injiziert
7. Die post-operative Analgesie kann in Absprache mit den Laborveterinär-Mitarbeitern oder in Übereinstimmung mit den prä-, intra-oder post-operativen Protokollen mit folgenden Analgetika ausgeführt werden: Flunixinmeglumin (i.m. 1-2mg/kg, 1-2x/Tag bis zu 3 Tagen), Butorphanol (i.m. 0.05-0.2mg/kg in 2-4 Stundenintervallen), Buprenorphin (i.m. 0.005- 0.03mg/kg in 6- 12 Stundenintervallen zusammen mit Carprofenq ≤ 20Stunden),der Carprofen (oral 2-4mg/kg in Form von 25mg Tabletten;i.m.2-4mg/kg einer 50mg/ml Lösung) oder Ketoprofen (2-5mg/kg i.m. in 6-12 Stundenintervallen)
8. Behandlung mit Bicillin (Benzathin-Benzylpenicillin G und Procain-Benzylpenicillin G 30.000 U/kg i.m., täglich über 5-10 Tage)

2 Material und Methoden

9. Die BrdU erhaltenden Tiere werden mit Käfiganhängern gekennzeichnet und die Tür wird mit dem Zeichen Bio (-logische) Gefährdung beschriftet. Die Tierpfleger werden ebenfalls per e-Mail benachrichtigt
10. Nach 4 Wochen werden die Pumpen von den zwei Affen entfernt und diese kehren in die Käfige zurück; der anderen zwei Affen werden getötet
11. 4 Wochen nachdem die Pumpe heraus genommen wird werden die zwei Affen ebenfalls getötet

Materialien: Op-Besteck, 70% Ethanol, sterile Mullbinden, Skalpell Griff/ und- Messer, mit BrdU gefüllte Pumpen, Nähfäden 3-0 Vicryl, Arterienklemmen, Pinzetten, spezielle Haltegriffe zum Unterspülen

Aufgrund der Kürze des Eingriffs ist eine reguläre Dokumentation des Monitorings nicht notwendig. Das Tier ist unter ständiger Überwachung, um eine regelrechte Atmung zu kontrollieren. Wenn sich jedoch die Anästhesie über 45 Minuten hinaus erstreckt, wird ein Pulsoxymeter angewendet um die Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung in 15-minütigen Intervallen zu beobachten. Während der Ausleitung wird das Tier gedreht, der Muskeltonus und die Reflexe durch Zehenkneifen oder Strecken der Extremitäten getestet. Da die Dauer des Eingriffs unter einer Stunde liegt, und die Implantate subkutan eingesetzt werden, werden keine zusätzlichen Flüssigkeiten verabreicht.

Vorbereitung und Füllung der Pumpen

1. Erhitzen von destilliertem Wasser in einem Becher
2. Unter der Abzugshaube F4/327 mit "Expert System Handschuhen": 1 g BrdU mit 5 ml Dimethylsulfoxid (5x1ml Aliquots) in einen kleinen Becher geben und einen Magnetührstab hinzufügen
3. Auf die Magnetührplatte bei mäßiger Hitze geben
4. Langsam 5 ml warmes Wasser beim Umrühren hinzufügen
5. Auf Raumtemperatur abkühlen
6. Unter einer Sterilbank durch einen 0,2 µm Filter in einen sterilen Behälter geben
7. Platzieren einer osmotischen "Alzet" Pumpe und Flussregler in ein steriles kegelförmiges Röhrchen und Abwiegen
8. Aufziehen von > 2 ml BrdU Lösung in einer 3 ml Spritze, Einführen eines für die „Alzet“ Pumpen spezifisches Füllröhrchens sogenannten „25 G filling tube“, dabei ist sicher zustellen, dass keine Luftbläschen vorhanden sind
9. Pumpe senkrecht halten und das Füllröhrchen durch die obere Öffnung der Pumpe einfügen, bis es sich nicht weiter vorschieben lässt

2 Material und Methoden

10. Langsames Drücken des Druckkolbens/Druckstempels der Spritze in senkrechter Haltung, wenn die Lösung anfängt aus der Öffnung heraus zu kommen, beenden und das Füllröhrchen entfernen
11. Einführen eines Flussreglers bis die weiße Kante mit der Pumpe gefüllt ist. Wegwischen von der heraus getropfter Flüssigkeit mit einer sterilen Mullbinde
12. Gefüllte Pumpe in das kegelförmige Röhrchen zurück stellen und erneut wiegen
13. Die Gewichtsschwankung als Hinweis für das Flüssigkeitsvolumen sollte innerhalb der 90% des Reservoir Volumens liegen und als Mengenangabe dienen. Falls das nicht der Fall ist, könnte Luft aufgesaugt sein und die Pumpe sollte erneut gefüllt werden.

Osmotische Pumpe: Modell Alzet 2ML4

Lot 10151-06

Mittlere Pumprate: 2,65 µl/Stunde

Mittleres Fülllungsvolumen: 2061,5 µl

BrdU: Sigma B9285

2.4.2 Tötungsprotokoll

Tötung 28 Tage nach der Implantation bzw. 28 Tage nachdem die Pumpe entfernt wurde (oder früher bei Erkranken des Tieres):

Tiefe Anästhesie (Ketamin i.m. danach Pentobarbital Natriumsalz 25 mg/ kg i.v.)

1. Tiefe Anästhesie (Ketamin i.m. danach Pentobarbital Natriumsalz 25 mg/ kg i.v.)
2. Fixierung der Durchblutung durch das Herz mit 1 Liter PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) für die ganze Körperdurchblutung und Fixierung mit 4% Paraformaldehyd/ PBS)
3. Markierung des Limbus bei 12:00 Uhr durch eine Naht oder mit einem heißen Brenneisen
4. E nukleieren der Augen, Fixierung in 4% PFA (Paraformaldehyd) Weitere Fixierung der Augenlider und Nieren
5. Die Augen werden zur weiteren Aufarbeitung ans Institut für Humananatomie und Embryologie, Universität Regensburg (Deutschland) geschickt.

2 Material und Methoden

2.5 Bearbeitung der Affen Augen

2.5.1 Präparation der Augen in Quadranten

Die Affen Augen wurden in Formaldehyd gelagert bis sie zur Untersuchung verwendet wurden. Zur Versuchsdurchführung wurden die Augen in vier Quadranten unterteilt.

- a** =superior
- b** =inferior
- c** =temporal
- d** =nasal

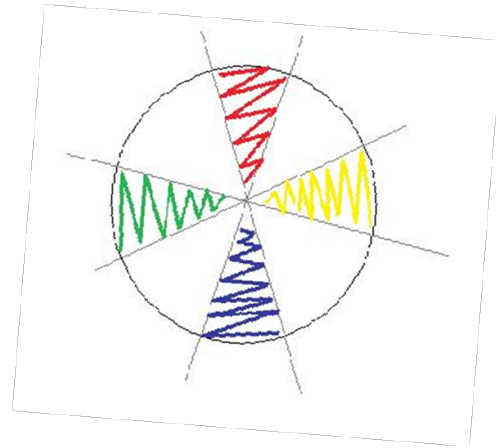


Abbildung 11: Von den Quadranten wurden 5-6 mm dicke Stücke präpariert. Es wurde darauf geachtet, dass alle Gewebestrukturen von Cornea, Trabekelwerk, Ziliarkörper, Iris bis zur Ora serrata erhalten blieben.

Beschriftung der Augen vor der Paraffinierung gemäß dem Einbettbuch:

AN 63 OD	T 117 / 12
AN 63 OS	T 260 / 12
AN 55 OD	T 261 / 12
AN 55 OS	T 262 / 12
AM 78 OD	T 460 / 11
AM 78 OS	T 72 / 12
45 OD	T 58 / 07
45 OS	T 58 / 07

2 Material und Methoden

2.5.2 Immunhistochemie

2.5.2.1 Paraffineinbettung

Zur Paraffineinbettung wurden die ca. 5-6 mm breiten Quadranten der Affenaugen für ca. 4 Stunden in PFA-Lösung fixiert und zweifach in 0,1 M Phosphatpuffer für 10 min gewaschen, und in 50% Isopropanol für eine Stunde und 70% Isopropanol für 30-45 min gespült. Zur Aufbewahrung wurde das 70%-ige Isopropanol nochmal gewechselt.

Die Paraffineinbettung lief nach folgendem Programm in einem Gewebe-Infiltrationsautomat HMP 110 (Microm International, Walldorf) ab:

Einbettprogramm:

1)	70 %	Isopropanol	1h
2)	80 %	Isopropanol	1h
3)	96 %	Isopropanol I	1h
4)	96 %	Isopropanol II	2h
5)	100 %	Isopropanol I	1h
6)	100 %	Isopropanol II	1h
7)	100 %	Isopropanol III	2h
8)		Xylol I	1h
9)		Xylol II	1,5h
10)		Paraffin I	2h
11)		Paraffin II	8h

Anschließend wurden die Präparate mit Hilfe einer Paraffin Ausgießstation MPS/P2 ausgebettet (SLEE Medical, Mainz) und in spezielle Haltevorrichtungen eingebracht.

2.5.2.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Die 6 µm dicken Paraffinschnitte wurden am Microtom Reichert Jung Supercut 2050 (Cambridge Instruments, Nußloch) hergestellt, in ein optimal temperiertes Wasserbad von 35°C, überführt und auf Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgenommen. Die Gewebeschnitte wurden entparaffiniert und nach dem Abklopfen der Flüssigkeit mit einem hydrophoben PAP-Stift (Liquid Blocker PAP-Pen, SCI Science Services, München) umrahmt, um später eine gezielte immunhistochemische Färbung zu ermöglichen. Beachtet wurde dabei für die Auswertung dass zwei nicht aufeinanderfolgende Schnitte auf einen Objektträger gebracht wurden. Die Zwischenschnitte wurden ebenfalls gesammelt und für andere eventuelle Färbungen verwertet. Von großer Wichtigkeit waren ebenfalls „faltenlose“ Schnitte, die vor allem nicht am Trabekelwerk aufgefaltet waren. In diesem Falle wurden einige dieser Paraffinblöcke erneut aus-/ und eingebettet. Von jedem Block wurden jeweils 25 Schnitte zur weiteren immunhistochemischen Färbung und nachfolgender Analyse erstellt.

2.5.2.3 Immunhistochemische Färbungen

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung besteht darin, Proteine in Geweben mit Hilfe von Antikörpern zu markieren, indem Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet werden. Der primäre Antikörper wird durch den sekundären Antikörper erkannt, der entweder direkt mit einem Fluorochrom gekoppelt ist, oder – zur weiteren Signalverstärkung – mit Biotin gekoppelt, das dann in einem weiteren Inkubationsschritt von einem mit Fluoreszenz gekoppelten Streptavidin erkannt wird.

Zur Markierung der DNA in den Zellkernen wurde DAPI verwendet, ein Fluoreszenzfarbstoff, der direkt in die DNA interkaliert. Bei entsprechender Wellenlänge lassen sich die Antigen-Antikörper-Komplexe bzw. der interkalierende Farbstoff durch Anregung der Fluorochrome darstellen (488 nm, 546 nm, DAPI: 381 nm). Unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.Z1, Zeiss Göttingen) wurden die angefertigten Schnitte beurteilt. Für die Herstellung von immunhistochemischen Färbungen wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

2.5.2.4 BrdU-Färbung

Zum Nachweis proliferierender Zellen wurde die BrdU-Färbung angewandt. Das Thymidinanalogon 5-Brom-2-desoxyuridin lagert sich dabei in der Synthesephase des Zellzyklus in die DNA mitotisch aktiver Zellen ein. Aufgrund der kurzen Bioverfügbarkeit gelangt das BrdU nur in die DNA dieser aktiv proliferierenden Zellen, und kann retrospektiv mittels spezifischer Antikörper immunhistochemisch im Zellkern nachgewiesen werden.

Zur Durchführung der BrdU Färbung werden die Schnitte zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert:

Schema der Entparaffinierung:

1)	Xylol I	10min
2)	Xylol II	10min
3)	100% Isopropanol I	10min
4)	100% Isopropanol II	10min
5)	96% Isopropanol I	5min
6)	96% Isopropanol II	5min
7)	80% Isopropanol I	5min
8)	80% Isopropanol II	5min
9)	70% Isopropanol I	5min

Anschließend wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser 1-2 min gespült und nach einem zweitägigen Protokoll folgend weiter behandelt:

2 Material und Methoden

Schritt	Reagenz	Zeit	
1	Tris-HCl 0,05 M	5min	} Tag 1
2	Proteinase K (100µl Proteinase K + 57 ml 0,05 M Tris-HCl)	5min	
3	destilliertes H ₂ O	kurz	
4	HCl, 1N	30min	
5	destilliertes H ₂ O	kurz	
6	Phosphatpuffer 0,1 M	3x 5min	
7	Blotto 5%	45min	
8	AK I, α BrdU bei 4°C (1:50 in 0,5% Blotto)	ü.N.	
9,10,11	Phosphatpuffer 0,1 M	3x 5min	} Tag 2
12	AK II, αM+B (1:500 in 0,5% Blotto)	1 h	
13,14,15	Phosphatpuffer 0,1 M	3x 5min	
16	Fluoreszenzfarbstoff des AK II, Streptavidin Alexa 488 (1:1000 in 0,5% Blotto)	1h dunkel	
17,18,19	Phosphatpuffer 0,1 M	3x 5min	

Erklärung:

Es folgte ein Waschdurchgang mit 0,05 M Tris HCl für 5 Minuten. Danach wurde 5 min lang mit Proteinase K (Fermentas Inc. Hanover. MD ,USA) 100 µl pro 57 ml und 0,05 M Tris HCl inkubiert. Es wurde kurz mit destilliertem Wasser gespült. Weiter erfolgte ein Blockierungsschritt für 30 min mit unverdünntem 1N HCl, mit dem Ziel der Blockierung von unspezifischen Proteinen für eine bessere spezifische Bindung des Antikörpers an das gesuchte Antigen um so eine geringere Hintergrundfärbung zu erreichen. Die Reaktion wurde mit einem 1-2 minütigen Spülvorgang mit destilliertem Wasser beendet. Zur Neutralisierung des pH-Wertes wurden die Schnitte im Anschluss drei Mal mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden nach dem Abklopfen der Flüssigkeit mit einem hydrophoben PAP-Stift (Liquid Blocker PAP-Pen, SCI Science Services, München) abgegrenzt, um später eine gezielte immunhistochemische Färbung zu ermöglichen. Weiter wurde mit Blotto 5% für 45 min auf einer Wippe inkubiert. Über Nacht (bei 4°C) erfolgte dann die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen BrdU (mouse IgG monoclonal PRB-1 α BrdU, 1:50 Verdünnung in Blotto 0,5% in 0,1 M Phosphatpuffer). Am nächsten Tag wurde der Färbungsvorgang mit der dreimaligen Spülung der Schnitte mit

2 Material und Methoden

dem Waschpuffer (0,1 M Phosphatpuffer) für je 5 min fortgesetzt, um nicht gebundene Antikörper auszuwaschen, bevor mit dem zweiten Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Es wurde mit dem Sekundärantikörper (Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L), 1:500 Verdünnung in Blotto 0,5%) für 60 min auf der Wippe inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Spülvorgang mit dem Waschpuffer für je 5 min, wurde zur Signalverstärkung das Fluorochrom des sekundären Antikörpers, Alexa Streptavidin 488, zugegeben und die Objektträger wurden für eine Stunde dunkel abgedeckt auf die Wippe gestellt. Vor dem Eindeckeln der Schnitte wurde der Waschdurchgang mit 3x 5min abgeschlossen. Um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen, wurde als Antikörperkontrolle pro Färbevorgang jeweils ein Schnitt nur mit den Sekundärantikörpern (Biotin-Streptavidin) inkubiert.

2.5.2.5 Oct4-Färbung

Der Transkriptionsfaktor Oct4 wurde verwendet, um potentielle adulte Stammzellen zu markieren. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Doppelfärbung mit Oct4 Färbung nach abgeschlossener BrdU Färbung genutzt, um adulte Stammzellen zu detektieren.

Nach dem oben bereits beschriebenen Entparaffinieren, folgen diese Schritte:

Schritt	Reagenz	Zeit	
1	Phosphatpuffer 0,1 M	5min	} Tag 1
2	BSA 2%/ 0,1 M Php	45min	
3	AK I, α Oct4 bei 4°C (1:50 in 0,2% BSA)	ü.N.	
4,5,6	Phosphatpuffer 0,1 M	3x 5min	} Tag 2
7	AK II, Anti-rabbit Alexa 546 (1:1000 in 0,2% BSA)	1 h dunkel	
8	Phosphatpuffer 0,1 M	3x 5min	

Der erste Tag der Färbung beginnt mit dem Spülen durch den 0.1 M Phosphatpuffer (Php) für 5 Minuten. Es folgt die Inkubation mit dem Gemisch aus dem Bovinen Serum Albumin (BSA) 2% und dem 0,1 M Phosphatpuffer für 45 Minuten. Der Blockierungspuffer soll unspezifische Bindungen blockieren und somit die Hintergrundfärbung möglichst gering halten. Die Reaktion am ersten Tag endet mit der Inkubation mit dem primären Antikörper (AK I) Oct4 in einer Verdünnung von 1:50 in 0,2% BSA bei 4°C über Nacht. Am Tag 2 wird zunächst ein dreimaliger Waschvorgang mit dem 0,1 M Php durchgeführt. Es folgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (AK II), Anti-rabbit Alexa 546 (1:1000 in 0,2% BSA) auf der Wippe in Dunkelheit. Nach dem letzten Waschvorgang mit dem Phosphatpuffer für drei Mal folgte das Eindeckeln mit DAPI-haltigem Eindeckmedium.

2 Material und Methoden

2.5.2.6 CD31-Färbung

In der vorliegenden Arbeit wurde CD31 als endothelialer Marker verwendet. Wieder nutzen wir eine Doppelfärbung von CD31 nach abgeschlossener BrdU Färbung, um zu klären, ob die BrdU-positiven Zellen endothelialen Ursprungs sind.

Nach erfolgter Entparaffinierung wurden im Anschluss diese Reaktionen durchgeführt:

Schritt	Reagenz	Zeit	
1	Phosphatpuffer 0,1 M	5min	} Tag 1
2	BSA 2%/ 0,1 M Php	45min	
3	AK I, α CD31 bei 4°C (1:100 in 0,2% BSA)	ü.N.	
4,5,6	Phosphatpuffer 0,1 M	3x 5min	} Tag 2
7	AK II, Anti-mouse Alexa 546 (1:1000 in 0,2% BSA)	1 h dunkel	
8	Phosphatpuffer 0,1 M	3x 5min	

Nach der Spülung durch den Phosphatpuffer (Php) für 5 Minuten erfolgt am ersten Tag die Inkubation mit der BSA 2%/ 0,1 M Php – Lösung für 45 Minuten. Für die neue Reaktion wird der primäre Antikörper (AK I) CD31 (1:100 verdünnt in 0,2% BSA) auf die Schnitte pipettiert und bei 4°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wird nach dem dreimaligen Waschen mit Php 0,1 M, mit dem sekundären Antikörper (AK II), anti-mouse Alexa 546 in 1:1000 Verdünnung in 0,2% BSA inkubiert. Die Reaktion wird vor dem Eindeckeln mit einem letzten Waschen (drei Mal) beendet

2.5.2.7 Eindeckeln von Gewebeschnitten

Die Schritte vom Auftragen des Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörper bzw. des Streptavidin bis zum Eindeckeln erfolgten in Dunkelheit. Danach wurde erneut dreimal mit dem Waschpuffer (0,1 M Phosphatpuffer) gewaschen. Zum Schluss wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit DAPI-haltigem Medium (10% (v/v) Vectashield DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, USA) in Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation, Hamburg) eingedeckelt und bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung bei 4°C gelagert. Zur Lagerung wurden fest verschließende und undurchsichtige Plastikobjektträgerkästen verwendet, um jegliches Eindringen von Licht zu vermeiden.

2.6 Bildbearbeitung – Aufnahmen und Auswertungen des Kammerwinkels

Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager.Z1, Zeiss, Göttingen) wurden die Bilder der Färbungen über die „Mehrdimensionale Bildaufnahme“ des Bildbearbeitungs- und Analysesystem Axiovision 3.0 (Carl Zeiss, Göttingen), mit zwei Farbkanälen aufgenommen. Die Belichtungszeit betrug dabei für den blauen DAPI Kanal 20 ms und für den grünen GFP Kanal 300 ms. Über die Programmeigenschaft „MOSAIX“ (Unterfunktion der „Mehrdimensionale Bildaufnahme“) wurden die Bilder in 20-facher Vergrößerung über Mosaik-Aufnahmen zu einem Gesamtbild mit verschiedenen Bildausschnitten zusammengefügt und so eine Panoramaaufnahme des Kammerwinkels erstellt. Nach sorgfältigem Mikroskopieren wurden von jedem Quadranten (Paraffinblock) 25 Schnitte zur weiteren Auswertung herangezogen. Zur Auszählung der mit BrdU-positiv angefärbten Zellen (GFP, grün) und der DAPI (blau) positiven Zellkernen wurde das Bildbearbeitungsprogramm *Image J* (entwickelt von Wayne Rasband, National Institutes of Health) verwendet. Dabei wurden alle Bilder immer unter denselben Bedingungen im Dunklen bearbeitet und ausgewertet.

Bei den Aufnahmen am Bildbearbeitungs- und Analysesystem Axiovision 3.0 (Carl Zeiss, Göttingen) wurde darauf geachtet dass das Trabekelwerk und die Schwalbe'sche Linie vollständig, in genauer Schärfe und ohne Falten fotografiert wurde.

Für die quantitative Analyse sowohl der DAPI aufgenommenen Zellkerne, als auch der BrdU positiven Zellen wurde das Bildbearbeitungsprogramm *Image J* angewandt.

Nach der Einteilung des Kammerwinkels in seine Areale (siehe Einleitung) wurden sowohl die BrdU leuchtenden Zellen in den einzelnen Arealen als auch die DAPI aufgenommenen Zellkerne in den einzelnen Arealen mit dem Zahlenmarker des Zählprogramms *Image J* gezählt.

2.7 Transmissionselektronenmikroskopie

2.7.1 Vorpräparation für die Elektronenmikroskopie

Die folgenden Vorbehandlungsschritte wurden bis zum Übersenden der Affenaugen durch die Arbeitsgruppe von Prof. Paul Kaufmann in Wisconsin National Primate Research Center durchgeführt. Sie werden hier der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden unbehandelte Augen von zwei Rhesus Affen (*Macaca mulatta*) im Alter von 19-20 Jahren untersucht. Es handelte sich dabei um unbehandelte Kontrollaugen von Affen, deren kontralaterales Auge durch eine Viskokanalostomie chirurgisch vorbehandelt wurde (82). Die vorderen Augenkammern der Affenaugen wurden jeweils mit 5 nm kationisierter und 10 nm nicht-kationisierter Goldlösung bei einem intraokularen Druck von 15 mmHg ausgetauscht, dann mit EM-Fixans modifiziert nach *Ito* und *Karnovsky*, bei 25 mmHg perfundiert (83). Nach tiefer Allgemeinanästhesie mit intravenösem Pentobarbital Natriumsalz 15 mg/kg, folgte die Perfusion über das Herz mit 1 Liter PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) 0.1 mol/L (pH 7.4) und anschließende Fixierung mit EM-Fixans modifiziert nach *Ito* und *Karnovsky* (83). Weitere Schritte:

Die Augen wurden enukleiert, die Cornea und Sklera gefenstert und die Augen gleicher Lösung fixiert, und ans Institut für Humananatomie und Embryologie, Universität Regensburg, zur weiteren Aufarbeitung gesendet.

2.7.2 Methodik der Elektronenmikroskopie

- 1) Fixierung: für 24 h in EM-Fixans; (2,5% Paraformaldehyd, 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer) modifiziert nach *Ito* und *Karnovsky* (83)
9,0 ml Stammlösung + 1,0 ml GAH (Glutaraldehyd) 25 %
Stammlösung: 10,0 ml Paraformaldehyd 25%
50,0 ml 0,2 M Natriumcacodylatpuffer, pH 7,4
30,0 ml A.bid auf 7,4 einstellen
- 2) Spülen: Auswaschen der Fixierung mit 0,1 M Natriumcacodylatpuffer bei pH 7,4
mindestens 4 x 30 Min., am Besten über Nacht
- 3) Nachfixation/Osmierung mit Osmiumferrocyanid:
für 2h 30 Min. bei 4°C
Lösung A: 2% wässriges OsO₄ (Science Service, München)
Lösung B: 1,6% Kaliumhexacyanoferrat II (Merck, Darmstadt)
(96 mg/ 6ml), gelöst in 0,2 M Cacodylatpuffer
beide Lösungen werden 1:1 gemischt (84)
- 4) Spülen: in A.bid, mindestens 4x 30 Min, am Besten über Nacht,
- 5) Entwässerung und Einbettung in Epoxid Harz:

2 Material und Methoden

- Entwässerung der Präparate:

Stufenweise Entwässerung von Standardpräparaten in aufsteigender Ethanolreihe

Schema der Entwässerung:

1) 50% Ethanol	2x 15min	bei 4°C
2) 70% Ethanol	2x 15min	bei 4°C
3) 80% Ethanol	2x 15min	bei 4°C
4) 90% Ethanol	2x 15min	bei 20°C
5) Abs. Ethanol	2x 15min	bei 20°C
6) Ethanol/Aceton 1:1	1x 20min	
7) Aceton	2x 15min	bei 20°C

- Einbettung in Epon nach Standardprotokoll:

Mischung Aceton (Serva, Heidelberg) - EPON (Serva, Heidelberg)

3:1	1h	20 °C
2:1	1h	20 °C
1:3	1h	20 °C

- Polymerisation:

2h bei 30°C (Orientierungskontrolle), 2 Tage bei 60°C im Brutschrank zur Infiltration in 100% EPON

Ansatz EPON H

Menge	90,0 g	135,0g	180,0 g
Glycid Ether Serva 21045	43,2 g	64,8 g	86,40g
DDSA Härter Serva 20755	+ 16,8 g	+ 25,2g	+ 33,6g
	60,0g	90,0g	120,0g
MNA Härter Serva 29452	+ 30,0 g	+ 45,0g	+ 60,0g
	90,0 g	135,0g	180,0 g
DMP - 30 Beschleuniger Serva 36975	+ 1,5 ml	+ 2,25ml	+ 3,0 ml

2.7.3 Eponeinbettung und Anfertigen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Folgende Schritte wurden in unseren Laboren von Prof. Tamm freundlicherweise von Frau Margit Schimmel weiter durchgeführt:

Nach Ankunft wurden die Augen für 24 Stunden im EM-Fixans (2,5% Paraformaldehyd, 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer, pH 7.4) modifiziert nach *Ito* und *Karnovsky* immersionsfixiert. Es folgte eine mehrfache Spülung in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) für mindestens 4 x 30 Minuten, um das Fixans auszuwaschen. Jedes Auge wurde halbiert, und die anteriore Hälfte wurde durch Achsenschnittbildung in Quadranten geteilt. Weiter wurde jeder Quadrant in keilförmige Stücke mit 1- 1.2 mm Breite unterteilt, die das Trabekelwerk, den Ziliarmuskel, die Iris und die angrenzende Cornea und Sklera enthielten. Es folgte eine Nachfixierung/Osmierung mit Osmiumferrocyanid für 2h 30 Min. bei 4°C. Nach einem gründlichen Spülvorgang, mindestens für 4x 30 Minuten wurden die Keilstücke in aufsteigender Alkoholreihe nach Schema entwässert. Mit Hilfe des Einbettautomaten (EM-TP, Leica, Nussloch, Deutschland) wurden die Gewebestücke gemäß Standardprotokoll (Aceton/Epon 3:1; Aceton/Epon 2:1; Aceton/Epon 1:3;) in Epon (Araldite 502, Ted Pella, Redding, USA) eingebettet. Nach einer Orientierungskontrolle von 2 h bei 30°C erfolgte das Aushärten bzw. die Polymerisation im Brutschrank für 48 h bei 60°C zur Infiltration in 100% Epon.

Das Eponharz besteht aus folgenden Komponenten: Glycidether als Grundharz, den Härtern DDSA und MNA, und dem Beschleuniger DMP-30 (Serva, Heidelberg, Deutschland). Die Einbettung erfolgte in dieser Mischung.

2.7.4 Anfärben der Semidünnschnitte und Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Semidünnschnitte (1 µm):

Färbelösung nach Richardson (85)

Stammlösung I: 1% Azur II (Merck, Darmstadt)

5 g lösen in 500 ml A.bid

Stammlösung II: 1% Methylenblau (Merck, Darmstadt)

5 g Methylenblau in 500 ml 1% Natriumtetraboratlösung (Borax)

Beide Lösungen müssen filtriert werden

Gebrauchslösung :

1 Teil Stammlösung I + 1 Teil Stammlösung II

+ 2 Teile d H₂O in eine dunkle Glasflasche filtrieren

gut getrocknete Semidünnschnitte (90°C) bei 60°C 15 – 30 Sek. färben, gut

abspülen

Ultradünnschnitte: (50 – 70 nm):

Kontrastierung

- 3% wässriges Uranylacetat (Serva, Heidelberg)
- 30 – 45 Min.
- vorsichtig, aber gründlich spülen mit d H₂O, kurz trocknen lassen. Bleicitrat „Ultrastain“ Leica 1 Minute gründlich spülen, trocknen

Schließlich wurden drei Proben von jedem Quadranten untersucht. Die Semi-Dünnschnitte wurden am Reichert Ultramikrotom angefertigt, mit der Richardson-Färbung gefärbt (85) und lichtmikroskopisch untersucht. Die Richardson-Färbung setzt sich aus den beiden Stammlösungen I (1% Azur II, Merck, Darmstadt) und II (1% Methylenblau, Merck, Darmstadt) im Verhältnis 1:1 zusammen. Beide Lösungen werden zusammen mit d H₂O in eine dunkle Glasflasche filtriert.

Anschließend wurden von jeder Probe Äquatorial- und Achsen-Ultradünnschnitte angefertigt, mit Uranylacetat (3%, Serva, Heidelberg) und Bleicitrat („Ultrastain“ Leica) kontrastiert und anschließend im Elektronenmikroskop untersucht.

2.8 Auswertung und Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. R 3.0.332 und lme4 1.1.733 wurden verwendet um mittels eines gemischten linearen Regressionsmodells (Linear Mixed Model) den Zusammenhang zwischen der Zahl BrdU-positiven Zellen (normalisiert auf die Gesamtzahl aller DAPI-gefärbten Zellen) und der jeweiligen Quadrantenlokalisierung (oben, unten, nasal, temporal) zu analysieren. Die Quadrantenlokalisierung wurde innerhalb des Regressionsmodells als Fixed Effect verwendet. Ordinatenabschnitte für die einzelnen Augen und Geradensteigungen für die einzelnen Quadrantenlokalisationen innerhalb jedes Auges wurden als Random Effects angegeben. Die Varianzhomogenität und Normalverteilung von Residuals der verschiedenen Gruppen wurden mittels Residualplots und Quantilenplots überprüft. Statistische P-Werte für den Haupteffekt der Quadrantenlokalisierung wurden ermittelt, indem das voll spezifizierte Modell mittels eines Maximum-Likelihood-Quotienten-Tests mit einem reduzierten Modell ohne den Fixed Effect der Quadrantenlokalisierung verglichen wurde. Diese statistischen Untersuchungen wurden für Gruppe 1 und Gruppe 2 jeweils getrennt durchgeführt.

Der Zusammenhang zwischen der Zahl BrdU-positiver Zellen (normalisiert auf die Gesamtzahl aller DAPI-gefärbten Zellen) und der Region des Trabekelwerks bzw. Kammerwinkelabflussweges wurde mittels eines ähnlichen gemischten linearen Regressionsmodells untersucht. Dies wurde wieder jeweils getrennt für Gruppe 1 und Gruppe 2 durchgeführt. Die Lokalisation innerhalb des Kammerwinkelabflussweges wurde als Fixed Effect verwendet und Ordinatenabschnitte für die Lokalisation innerhalb des Kammerwinkelabflussweges und geschachtelt ("nested") innerhalb einzelner Augen wurden als Random Effects spezifiziert. Es war aufgrund von Nichtkonvergenz nicht möglich, ein erweitertes Random Effects-Modell mit zufälligen Geradensteigungen für die einzelnen Lokalisationen innerhalb des Kammerwinkelabflussweges zu verwenden. Statistische P-Werte für den Haupteffekt der Lokalisation innerhalb des Kammerwinkelabflussweges wurden ermittelt, indem das voll spezifizierte Modell mittels eines Maximum-Likelihood-Quotienten-Tests mit einem reduzierten Modell ohne den Fixed Effect der Lokalisation innerhalb des Kammerwinkelabflussweges verglichen wurde. Das Kenward-Roger-Näherungsverfahren wurde verwendet, um approximative Freiheitsgrade zu berechnen. P-Werte für alle paarweisen Vergleiche wurden mittels der t-Verteilung mit dem jeweiligen (angenäherten) Freiheitsgrad bestimmt. Bonferronis post-hoc-Korrekturverfahren wurde angewendet, um die Alphafehler-Kumulierung aufgrund der multiplen Paarvergleiche zu kontrollieren. P-Werte ≤ 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

Die Statistik wurde in Zusammenarbeit mit Sebastian Koschade durchgeführt.

3 Ergebnisse

3 Ergebnisse

Um proliferierende Zellen zu markieren wurden vier Cynomolgusaffen (*Macaca fascicularis*) für 4 Wochen mittels subcutan implantierter Pumpe mit BrdU behandelt. Zwei Affen wurden direkt nach der BrdU Behandlung getötet (Gruppe 1) während die beiden anderen erst 4 Wochen nach abgeschlossener BrdU Behandlung getötet wurden (Gruppe 2). In Gruppe 1 werden folglich alle proliferierende Zellen detektiert, während die BrdU-positiven Zellen der Gruppe 2 auch potentielle Stammzellen enthalten können, da sich diese selten teilen und somit auch nach der Karrenzzeit noch für BrdU positiv sein werden.

3.1 Verteilung BrdU-positiver Zellen im Kammerwinkel in den 4 Quadranten des Auges

Mittels Immunhistochemie wurden BrdU-positive Zellen im Bereich des Kammerwinkels dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert (Abb.12.).

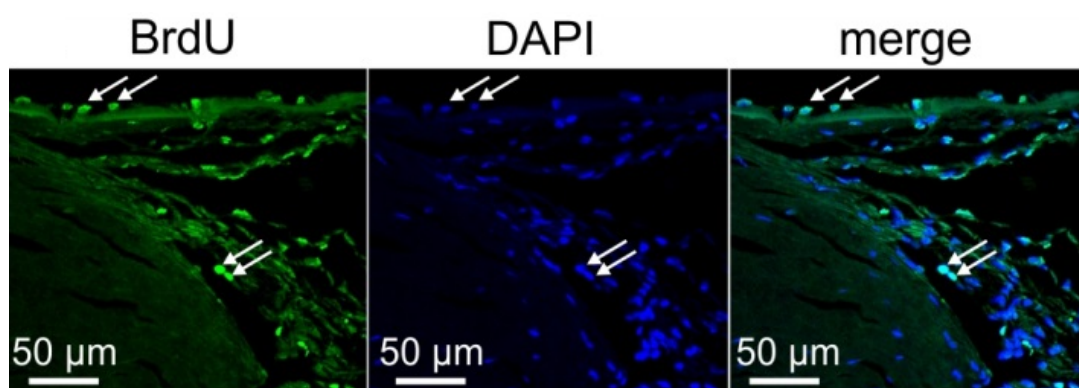


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung für BrdU (grün) in den Zellen des trabekulären Abflussweges. Zellkerne sind angefärbt mit DAPI (blau). Pfeile zeigen BrdU-positive Zellen im SC-Endothel und in der Region der Schwalbe'schen Linie.

Nach morphometrischer Auswertung zeigten sich zahlreiche BrdU-positive Zellen in den unterschiedlichen Quadranten (superior, inferior, temporal und nasal) des Auges. Es zeigte sich eine quantitativ gleichmäßige Verteilung BrdU-positiver Zellen sowohl in der Gruppe 1 (4 Wochen BrdU) als auch in der Gruppe 2 (4 Wochen BrdU, 4 Wochen Karrenz) (Abb. 13).

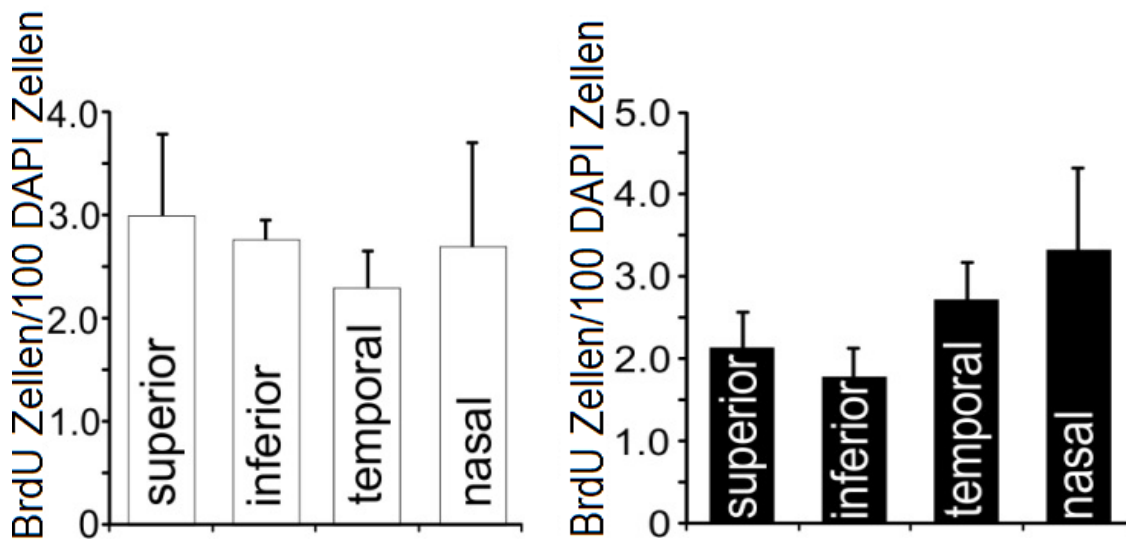


Abbildung 13: Quantifizierung und statistische Analyse der BrdU-positiven Zellen in den verschiedenen Quadranten der Augen in Gruppe 1 (4 Wochen BrdU) und Gruppe 2 (4 Wochen BrdU, 4 Wochen Karrenz). Mittelwerte \pm SEM werden gezeigt.

3.2 BrdU-positive Zellen in den verschiedenen Subarealen des Trabekelwerks, JCT's Skleralsporn, Operculum und Schlemm-Kanalendothels

Daraufhin erfolgte die differenzierte Analyse BrdU-positiver Zellen in den unterschiedlichen Arealen des Trabekelwerks, sowohl uveal als auch corneoskleral, des juxtakanalikulären Gewebes, des Schlemm-Kanal Endothels, des Skleralsporns und Operculums. Wieder zeigten sich zahlreiche aufleuchtende Zellen in den unterschiedlichen Bereichen (Abb.14.).

Der morphometrische Vergleich BrdU-positiver Zellen in den unterschiedlichen Arealen der Affen der Gruppe 1, zeigte tendenziell eine erhöhte Anzahl proliferierender, BrdU-positiver Zellen im Bereich des Schlemmkanalendothels im Vergleich zu den anderen untersuchten Bereichen.

3 Ergebnisse

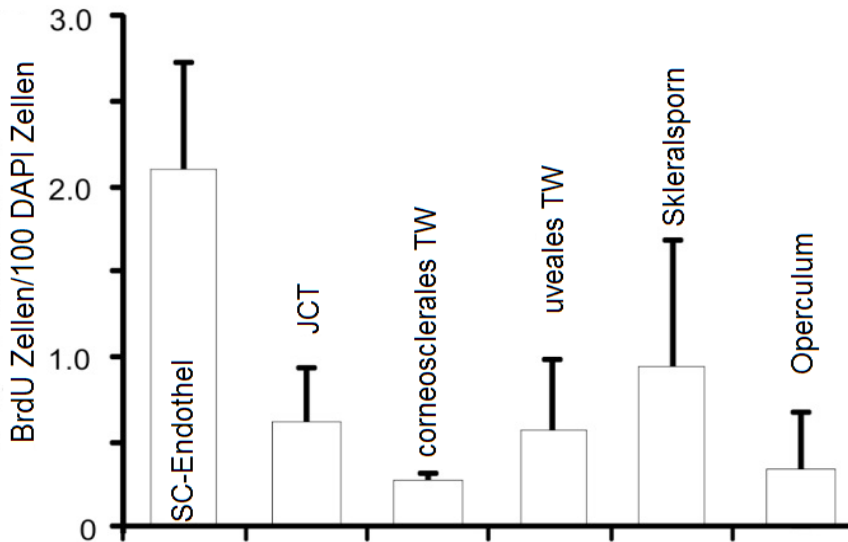


Abbildung 14: Relative Anzahl BrdU-positiver Zellen in den verschiedenen Regionen des trabekulären Abflussweges der Augen in Gruppe 1. Mittelwerte und SEM werden gezeigt.

Der Vergleich BrdU-aufleuchtender Zellen in den verschiedenen Arealen der Gruppe 2 Affen zeigte eine signifikante Anreicherung BrdU-positiver Zellen im Bereich des Schlemm-Kanal Endothels im Vergleich zu den restlichen Arealen des Kammerwinkels. Zudem zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl BrdU-positiver Zellen im corneoskleralen Trabekelwerk im Vergleich zum JCT, Operculum und Skleralsporn. Insgesamt zeigte sich die höchste Anzahl BrdU-positiver Zellen in Gruppe 2 im SC-Endothel, wohingegen im Skleralsporn und dem Operculum keine BrdU-positiven Zellen verzeichnet wurden (Abb.15).

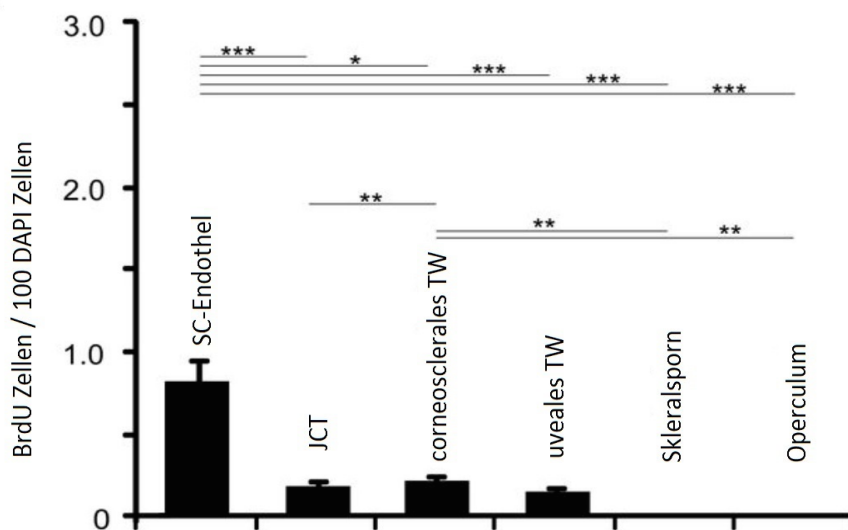


Abbildung 15: Relative Anzahl BrdU-positiver Zellen in den verschiedenen Regionen des trabekulären Abflussweges der Augen in Gruppe 2. Mittelwerte und SEM werden gezeigt, * $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. *** $P < 0,001$.

3 Ergebnisse

Vergleicht man die Anzahl BrdU-positiver Zellen der Gruppe 1 im Vergleich zu Gruppe 2 so zeigt sich ein deutlicher Verlust an BrdU-positiven Zellen in allen verglichenen Subarealen des Kammerwinkels.

Im nächsten Schritt wurde versucht, die BrdU positiven Zellen näher zu charakterisieren. Um potentiellen Stammzellen zu detektieren wurden immunhistochemische Doppelfärbungen mit BrdU und dem Stammzellmarker Oct4 durchgeführt. Es zeigte sich keine Ko-Lokalisation von Oct4 positiven Zellen mit dem Proliferationsmarker BrdU im Bereich der genannten verschiedenen Subareale des Kammerwinkels. Auffallend war hierbei jedoch eine Anreicherung von Oct4 im Bereich der extrazellulären Matrix des JCTs. (Abb.16) Die fehlende Lokalisation der Doppelfärbung zeigt, dass es sich bei den BrdU positiven Zellen in diesem Bereich zwar um langsam proliferierende Zellen, jedoch nicht um potentielle Stammzellen handelt.

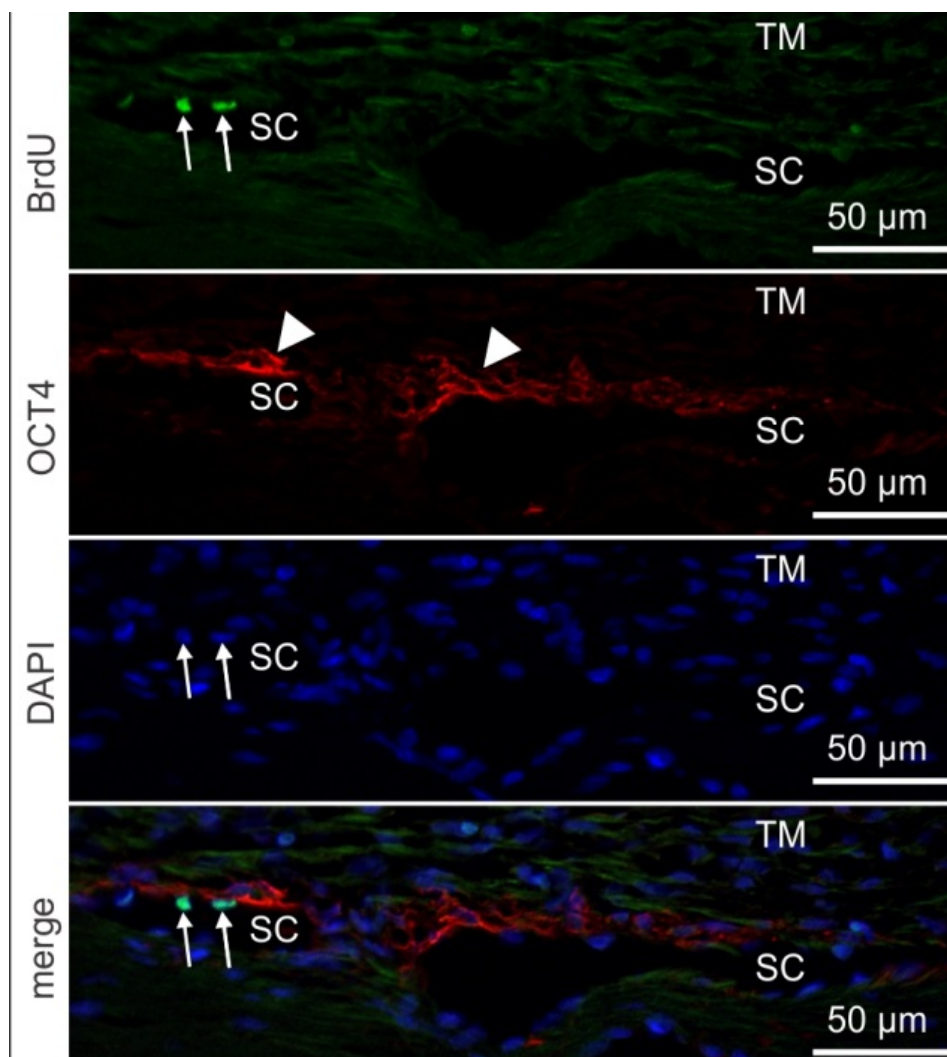


Abbildung 16: Immunhistochemische Darstellung des Kammerwinkels in einem Auge der Gruppe 2: einzelne Zellen des Schlemm-Kanal-Endothels sind positiv für BrdU (grün, Pfeil). Potentielle Stammzellen sollten mittels Oct4 (rot) detektiert werden. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Der Pfeil zeigt auf eine BrdU-positive Zelle im Schlemm-Kanal Endothel. Die Pfeilspitze markiert ein Aufleuchten in der extrazellulären Matrix des JCT.

3 Ergebnisse

Um zu klären, ob es sich bei den BrdU-positiven Zellen im Bereich des Schlemm-Kanals um differenzierte Endothelzellen handelt, wurde der Endothelzellmarker CD31 verwendet. Hier zeigte sich eine deutliche Ko-Lokalisation von den BrdU-positiven Zellen im Bereich des Schlemmkanalendothels mit dem Endothelzellmarker CD31 (Abb.17). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den BrdU-positiven Zellen im Bereich des Schlemmkanalendothels tatsächlich um ausdifferenzierte Endothelzellen handelt.

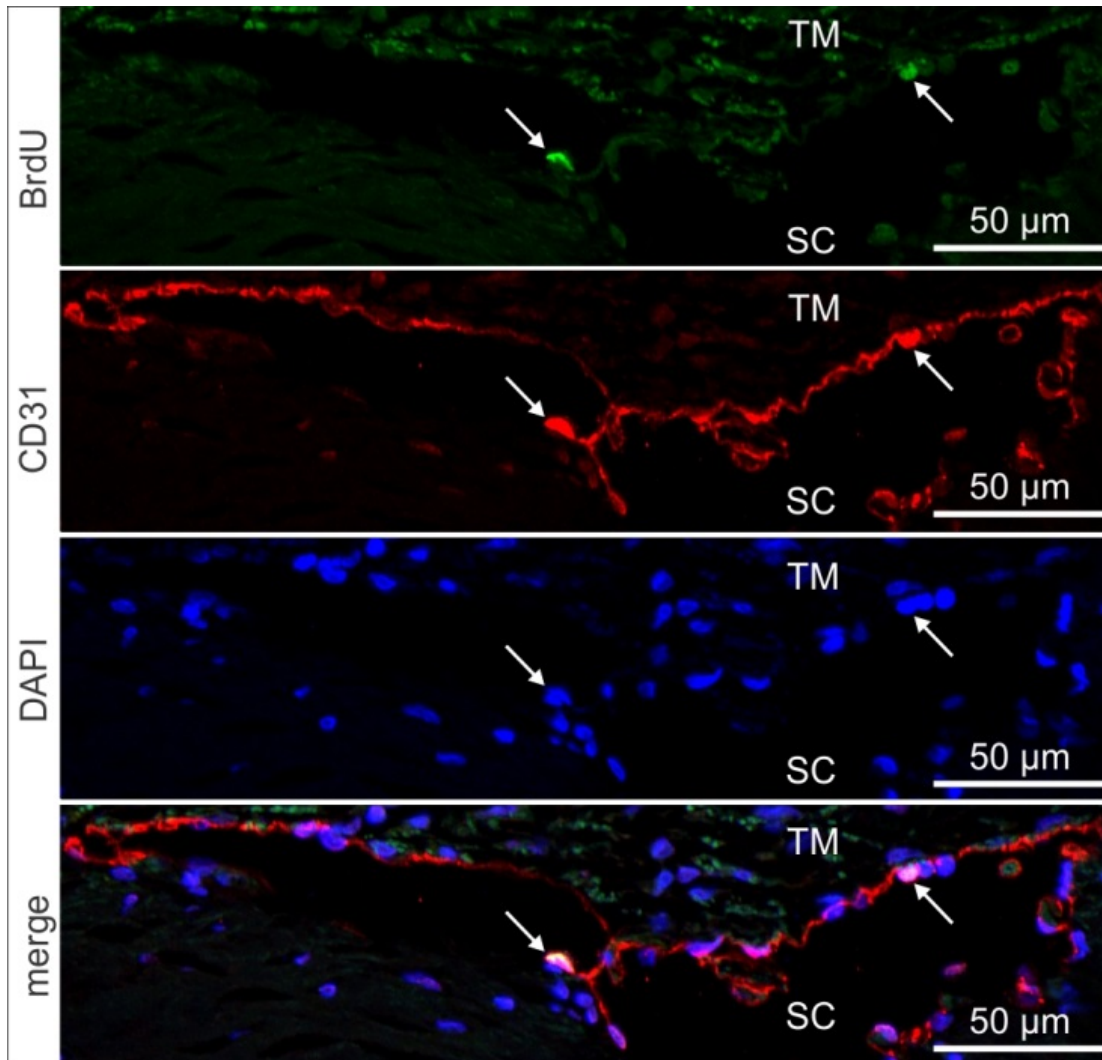


Abbildung 17: Immunhistochemische Doppelfärbung des Schlemm-Kanal-Endothels in einem Auge der Gruppe 2 für CD31 (rot) und BrdU (grün) und Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt dargestellt. Die Pfeile deuten auf ein BrdU/CD31-positive Zellen im Schlemm-Kanal Endothel.

3.3 BrdU-positive Zellen im Bereich der Schwalbe'schen Linie

Nach intensiver Analyse des trabekulären Abflussweges wurde das Augenmerk auf angrenzende Bereiche, die außerhalb dieses Weges, wie dem Corneaendothel und der Schwalbe'schen Linie gelegt. Im Vergleich zu den bisher untersuchten oben erwähnten Bereichen, fand sich an der Schwalbe'schen Linie, dem peripheren Ende der Desçemet'schen Membran, eine signifikant höhere Anzahl an BrdU-positiven Zellen für

3 Ergebnisse

beide Analysegruppen (Abb. 18 und Abb.19)

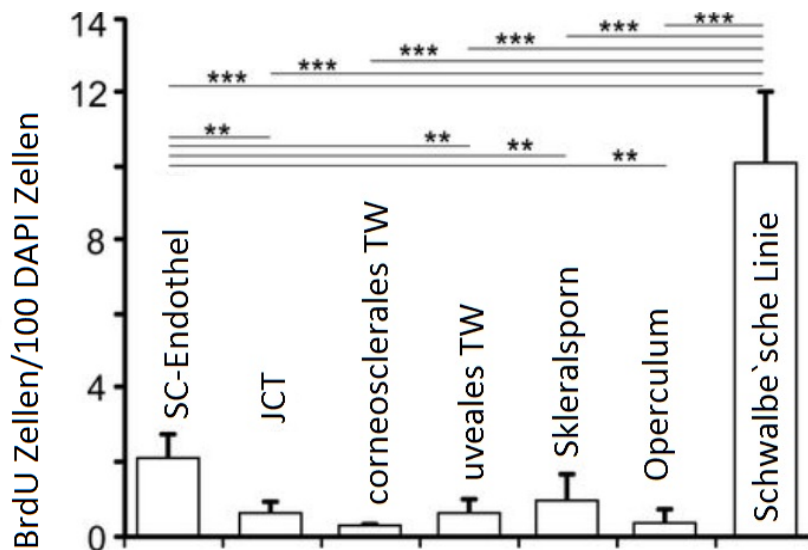


Abbildung 18: Relative Anzahl BrdU-positiver Zellen an der Schwalbe'schen Linie im Vergleich zu den verschiedenen Regionen des trabekulären Abflussweges an den Augen in Gruppe 1. Mittelwerte und \pm SEM werden gezeigt, ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$.

Eine weitere, wichtige Beobachtung war, dass sich in den beiden Gruppen (Gruppe 1 versus 2) die relative Anzahl an BrdU-positiven Zellen an der Schwalbe'schen Linie nicht änderte. Diese Beobachtung deutet auf eine BrdU Langzeit-Speicherung hin (Abb.18.A und 18.B), also auf eine Zellpopulation, die sich nur sehr selten teilt. Dies ist ein bekanntes Charakteristikum von Stammzellen.

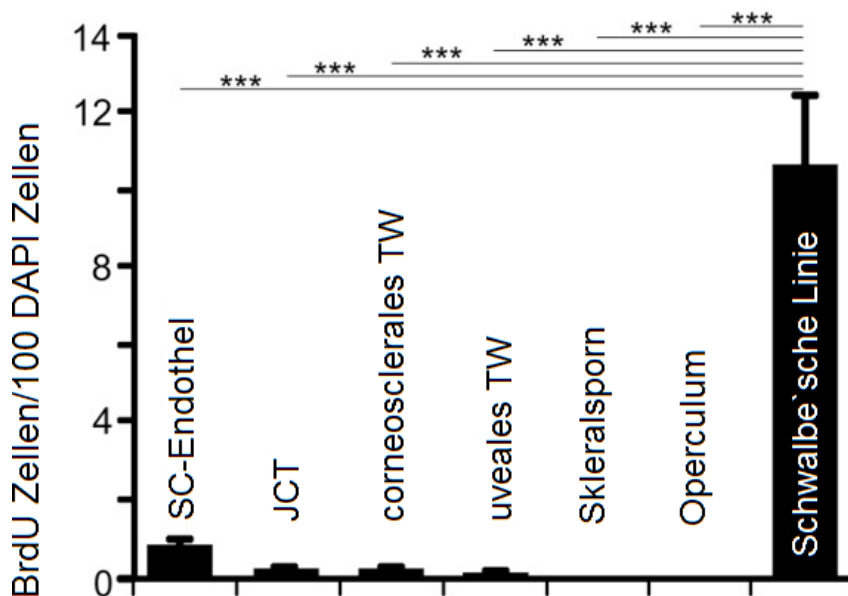


Abbildung 19: Relative Anzahl BrdU-positiver Zellen an der Schwalbe'schen Linie im Vergleich zu den verschiedenen Regionen des trabekulären Abflussweges an den Augen in Gruppe 2. Mittelwerte und \pm SEM werden gezeigt, ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$.

3 Ergebnisse

Zusätzlich fiel auf, dass die BrdU positiven Zellen im Bereich der Schwalbe'schen Linie häufig in Clustern von 2-3 Zellen auftraten (Abb.20).

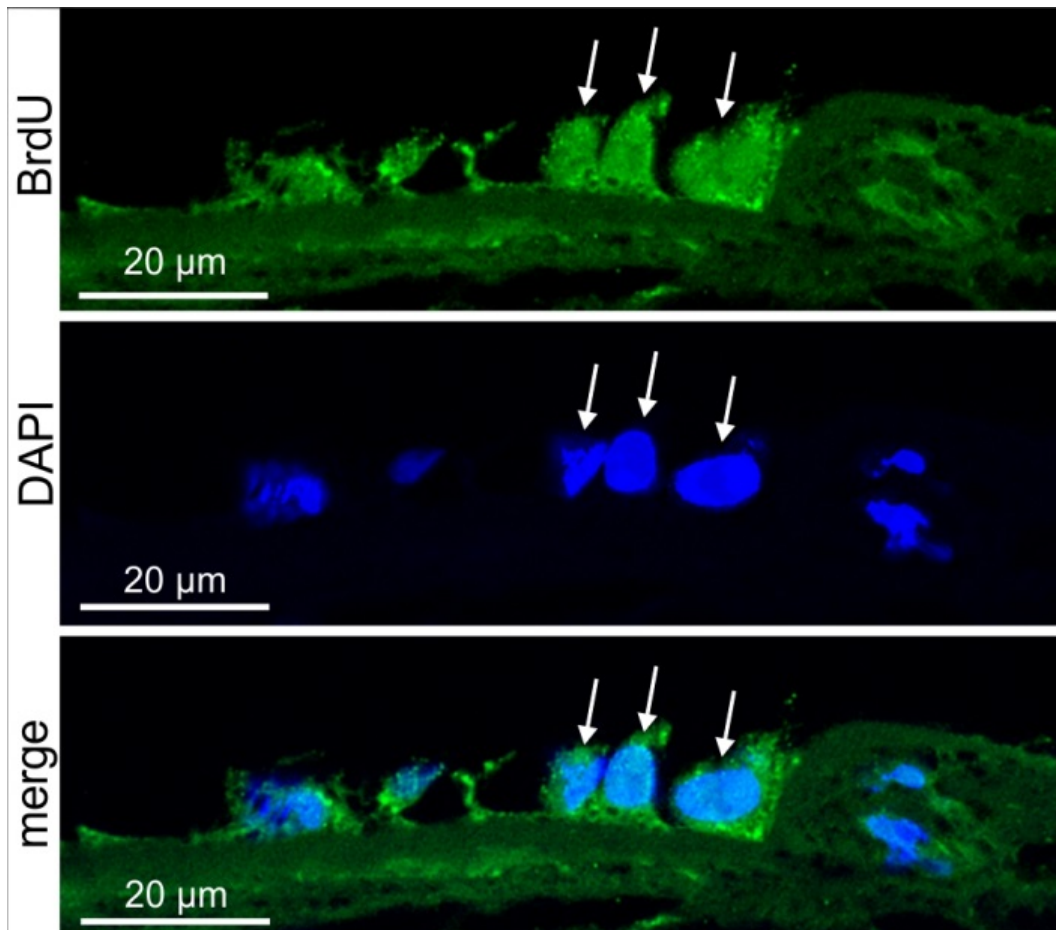


Abbildung 20: Charakterisierung der Stammzellnischen an der Schwalbe'sche Linie. Das Akkulieren von BrdU (grün) positiven Zellen in der Schwalbe'schen Linie wird durch immunhistochemische Färbung dargestellt. Zellkerne sind mit DAPI (blau) aufgezeigt.

Auch die BrdU-aufleuchtenden Zellen im Bereich der Schwalbe'schen Linie wurden mit dem Stammzellmarker Oct4 immunhistochemisch charakterisiert. Hierbei zeigte sich eine Ko-Lokalisation der BrdU-positiven Zellen mit Oct4 (Abb.21). Dies deutet auf eine Stammzellpopulation im Bereich der Schwalbe Linie hin.

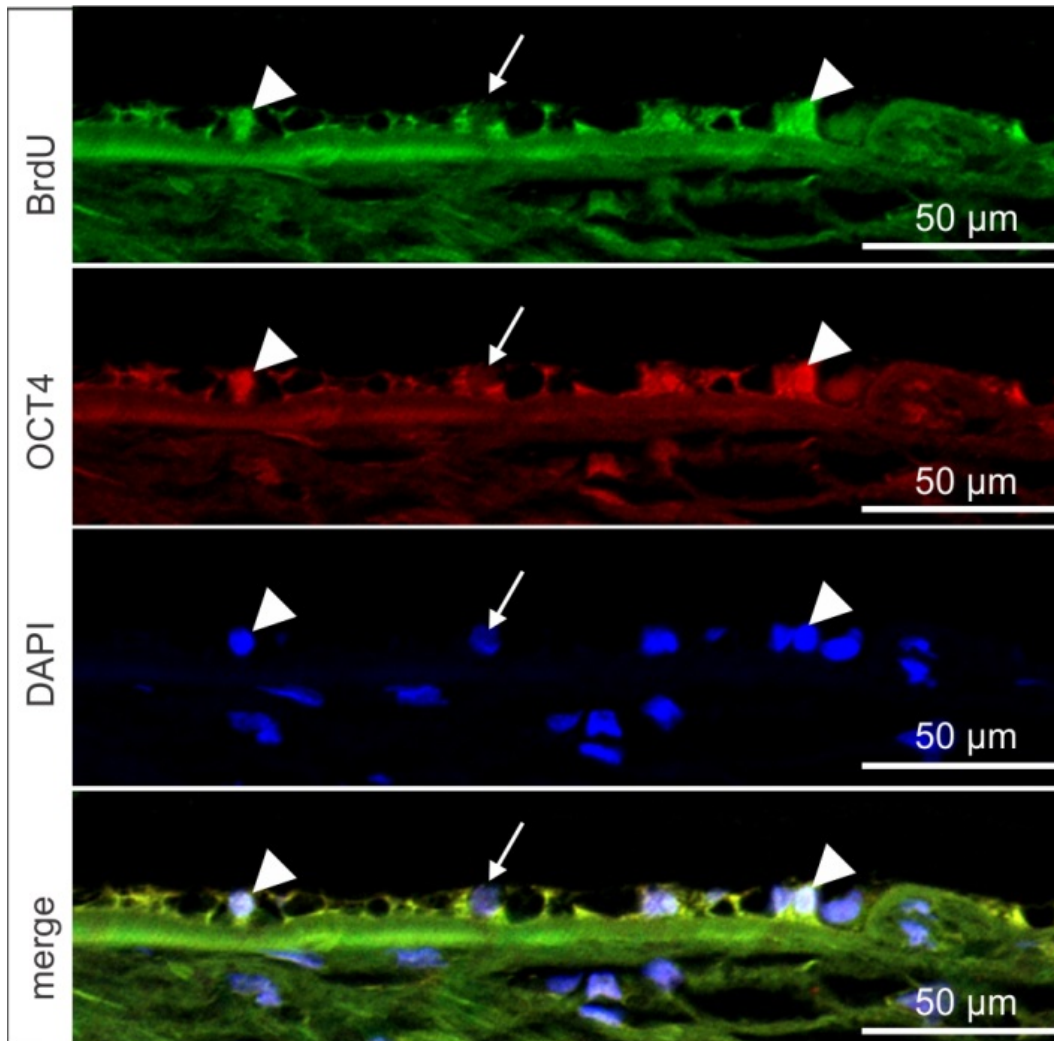


Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung der Schwalbe'schen Linie Zellen in einem Auge der Gruppe 2 für BrdU (grün) und Oct4 (rot). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. BrdU/Oct4-positive Zellen werden mit der Pfeilspitze markiert, während der Pfeil auf einen BrdU/Oct4 negativen Zellkern, der mit DAPI gefärbt ist, zeigt.

Embryologisch betrachtet stammen sowohl die Trabekelwerkzellen als auch das Corneaendothel aus Zellen der Neuralleiste (26,86,87). Während das Stroma der Cornea aus dem Mesoderm abstammt (88). Somit liegt die Vermutung nahe, dass die von uns entdeckten adulten Stammzellen im Bereich der Schwalbe'schen Linie eine Zellpopulation von pluripotenten Stammzellen darstellt, die vermutlich über die Fähigkeit verfügt, einerseits in Trabekelwerkzellen und andererseits in Hornhautendothelzellen zu differenzieren (Abb.22).

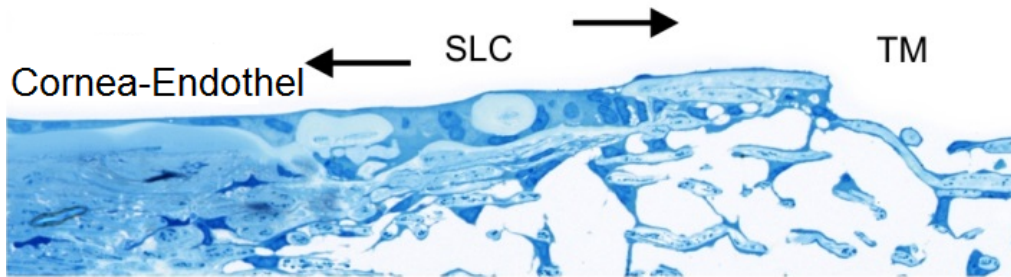


Abbildung 22: Differenzierungsmöglichkeiten der Schwalbe'schen Linie Zellen durch ihre Pluripotenz entweder in Trabekelwerkszellen oder in Hornhautendothelzellen.

3.4 Morphologische Charakterisierung der Stammzellnische an der Schwalbe'sche Linie

Da wir bei der immunhistologischen Analyse häufig eine Akkumulation mehrerer BrdU-positiver Zellen in dem Bereich der Schwalbe Linie detektierten (Abb. 20) stellten wir uns nun die Frage, ob es sich in diesem Bereich um die Lokalisation einer Stammzellnische handeln könnte. Zunächst analysierten wir die Morphologie dieses Bereichs genauer. Wir verwendeten hierfür Augen von zwei unbehandelten Rhesusaffen, die speziell für die detaillierte Morphologieanalyse mittels Semidünnschnitt und Transmissionselektronenmikroskopie fixiert wurden. Dies war erforderlich, da die zuvor für die BrdU-Analyse verwendeten Affenaugen mittels 4% PFA fixiert wurden und diese Fixierung das Gewebe für eine feine ultrastrukturelle Analyse nicht ausreichend erhält. Die genauere Beobachtung der Region der BrdU/Oct4-positiven Zellen mit Sitz am peripheren Endes des Desçemet'schen Membran zeigte am Semidünnschnitt regelmäßige kuboidale Zellen, die sich in ihrer Form von den angrenzenden cornealen Endothelzellen unterschieden. Häufig bilden diese Zellen kleine Anhäufungen, die in der Desçemet'schen Membran in Furchen eingebettet sind. Diese Beobachtung war bei der Analyse äquatorialer (frontaler) Schnitte am deutlichsten (Abb.23) und spricht für das Vorhandensein einer möglichen Stammzellnische.

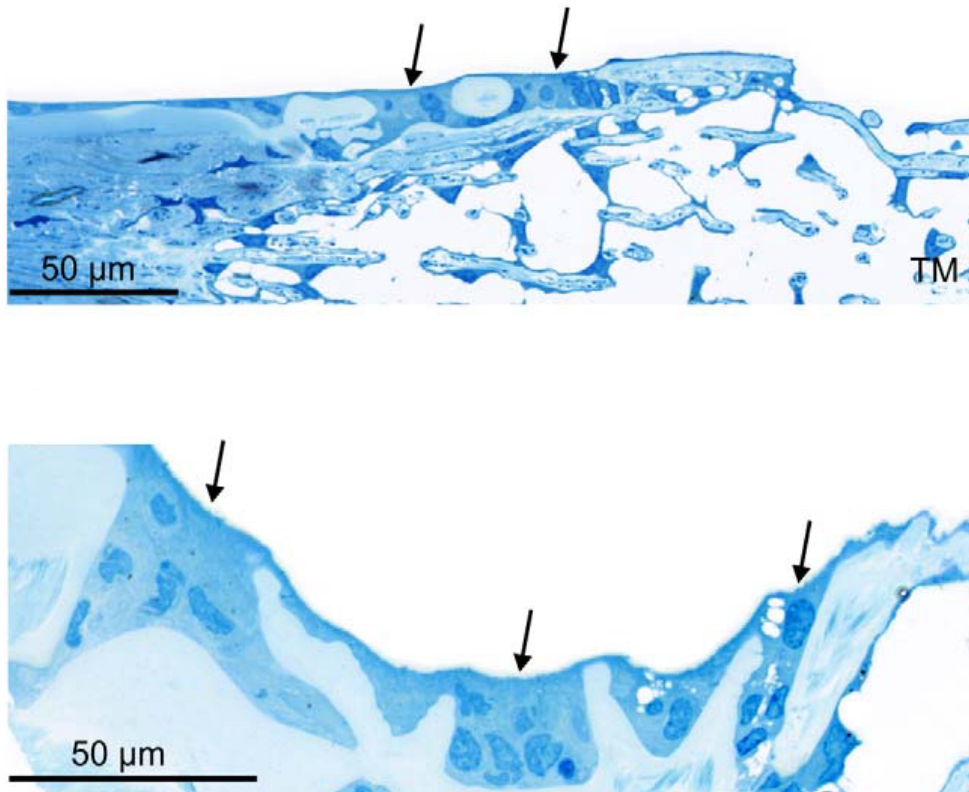


Abbildung 23: Morphologische Charakterisierung der Stammzellnische an der Schwalbe`schen Linie
Oben: Sagittale Schnittführung: Die Pfeilspitzen fokussieren eine klar definierte Nische der Schwalbe`schen Linie in Semidünnschnitten in sagittaler Richtung. Unten: Frontale Schnittführung: An Semidünnschnitten in frontaler Richtung der Schwalbe`schen Linie markiert die Pfeilspitze eine klar definierte Nische, die rundliche kuboidale Zellen beherbergt.

3.5 Ultrastrukturelle Charakterisierung der potentiellen Stammzellnische an der Schwalbe`schen Linie

Mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie charakterisierten wir die Ultrastruktur der Zellen im Bereich der potentiellen Stammzellnische. Stellenweise füllten die Zellen vollständig die Lücken der Desçemet`schen Membran und waren an ihrer basalen Seite in direktem Kontakt mit den Trabekelwerkszellen der nicht filtrierenden Region des Trabekelwerks, nämlich des Operculums (Abb.24A und 24B). Bereits 1974 wurden im Transmissionselektronenmikroskop beobachtet, dass humane Zellen des Hornhautendothels durch das Fehlen eines Zell-Verbindungs-Komplexes an der anterioren Zellmembran, in direktem Kontakt zur Desçemet`schen Membran stehen und somit bei mechanischer Beanspruchung einfacher abgeschürft werden (89).

Zur Einschätzung der Stoffwechselaktivität der Zellen wurden die Zellen bezüglich dem Besitz an Zellorganellen unter dem Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht. Die meisten Zellen in der Region der Schwalbe`schen Linie sind gekennzeichnet durch das Vorkommen von zahlreichen Mitochondrien vom tubulären Typ (Abb.24C). Des Weiteren wurden aber auch häufig kleinere Zellen mit beträchtlich weniger Zytoplasma als der Zelltyp

3 Ergebnisse

mit hohem Anteil an Mitochondrien beobachtet. Die kleineren Zellen waren typischerweise von den mitochondrien-reichen Zellen umgeben (Abb.24D). Adulte, ruhende Stammzellen zeichnen sich durch eine geringe Stoffwechselaktivität aus. Ihr Stammzellpotential wird durch umgebende Nischenzellen aufrechterhalten. Diese wiederum sind stoffwechselaktiv. Es liegt nahe, dass die beobachteten Zytoplasma-armen Zellen die gesuchten Stammzellen darstellen, welche von stoffwechselaktiven Nischenzellen umgeben sind.

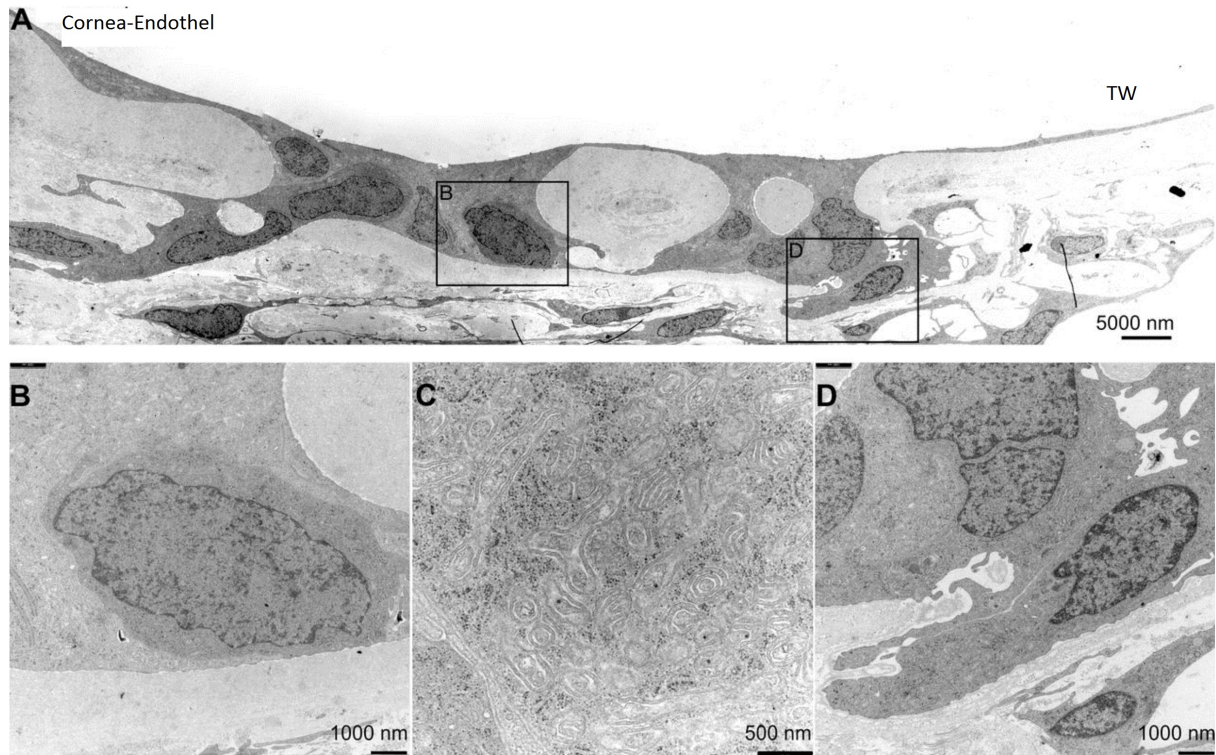


Abbildung 24: (A) Transelektronenmikroskopische Panorama-Aufnahme der Schwalbe'schen Linie desselben Affen aus Abb. 23 (A) Die Ausschnittsvergrößerung der Kästchen in B und D. Die Schwalbe'sche Linie Zellen füllen die Lücken der Desçemet Membran und sind auf ihrer Basalseite in direktem Kontakt mit TW-Zellen der nicht filtrierenden Operculum-Region (A und D). Die meisten Zellen der Schwalbe'schen Region zeichnen sich durch ein Vorkommen von zahlreichen Mitochondrien tubulären Typ aus (C). Es wurden kleinere Zellen mit weniger Zytoplasma als die Zellen mit Mitochondrien-reichem Zelltyp beobachtet (B). Die kleineren Zellen sind typischerweise von Mitochondrien-reichen Zellen umgeben.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Augen von Cynomolgusaffen adulte Stammzellen in einer spezifischen Nische am peripheren Ende der Desçemet'schen Membran, der sogenannten Schwalbe'schen Linie lokalisiert sind. Diese Schlussfolgerung, beruht auf der Identifikation von Langzeit-BrdU positiven Zellen in dieser Region, deren Co-Expression mit dem Stammzellmarker Oct4 und dem Nachweis struktureller und ultrastruktureller Charakteristika einer Stammzellnische im Bereich der Schwalbe'schen Linie.

Die als Schwalbe'sche Linie bezeichnete Region ist am peripheren Ende der Desçemet'schen Membran gelegen. Sie stand lange Jahre im Verdacht Zellen mit besonderen Eigenschaften zu enthalten. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind die in der vorliegenden Arbeit identifizierten adulte Stammzellen identisch zu denen von Guiseppina Raviola in Rhesus Affen bereits vor 30 Jahren entdeckten und als "Schwalbe'sche Linie Zellen" bezeichneten Zellen (50). Schon Raviola beschrieb ihre Lokalisation als diskontinuierlich ringsum um das periphere Ende der Cornea gelegen. Das clusterförmige Verteilungsmuster der von Raviola beschriebenen Zellen, als auch deren Mitochondrienreiche Eigenschaft konnte in unseren Untersuchungen in ähnlicher Form bestätigt werden. Raviola beschrieb weiterhin das Auftreten von Sekretionsgranula und osmophilen lamellenartigen Einschlusskörperchen in den Schwalbe'sche Linie Zellen (50). Raviola stellte die Hypothese, dass diese Zellen Phospholipide produzieren, welche sie in das Kammerwasser sezernieren und dadurch das Abfließen des Kammerwassers durch die Strukturen des corneoskleralen Winkels erleichtern (50). In unserer ultrastrukturellen morphologischen Betrachtung im Transmissionselektronenmikroskop konnten wir keine Sekretionsgranula oder osmophilen lamellenartige Einschlusskörperchen in den Zellen der Schwalbe'schen Linie identifizieren.

Einer der Hauptdatenpunkte der vorliegenden Arbeit bestand in der morphometrischen Bestimmung von BrdU-positiven Zellen in beiden Behandlungsgruppen im Bereich des Kammerwinkels und der Schwalbe'schen Linie. Durch die relativ gleichbleibende Anzahl BrdU-positiver Zellen an der Schwalbe'schen Linie zwischen der Gruppe 1, welche direkt nach der abgeschlossenen BrdU Behandlung getötet wurde und Gruppe 2, welche nach abgeschlossener BrdU Behandlung erst nach einem BrdU freien Intervall von 4 Wochen getötet wurde, kann hier von einer Zellart ausgegangen werden, die sich selten teilt. Dies ist ein typisches Verhalten für Stammzellen (76). Das sich während der Synthesephase in die Zellen einlagernde BrdU diente dem Nachweis proliferierender Zellen (90). Unser gewähltes Behandlungsregime beruhte auf der Erwartung, dass BrdU welches sich in dem Behandlungsintervall von 4 Wochen in alle proliferierende Zellen, inklusive Stammzellen, einlagerte, während der behandlungsfreien Phase von 4 Wochen in den bekanntlich

4 Diskussion

teilungsarmen adulten Stammzellen weniger verdünnt würde und somit immunhistochemisch auch nach dem BrdU-freien Intervall noch nachweisbar sein würde. Diese Annahme wurde erfüllt. Die zusätzlich durchgeführten immunhistochemischen Doppelfärbungen von BrdU-positiven Zellen mit dem Stammzellmarker Oct4 zum Nachweis der Stammzeleigenschaft waren im Bereich der Schwalbe'schen Linie positiv. Zusammengefasst sind dies starke Hinweise auf das Vorkommen einer Stammzellpopulation im Bereich der Schwalbe'schen Linie.

Unsere Beobachtungen legen auch nahe, dass im Schlemm-Kanal Endothel mehr BrdU- positive Zellen vorhanden sind als in den Endothelzellen der angrenzenden Ziliarkörperkapillaren. Es scheint, als ob die Schlemm-Kanal Zellen durch differenzierte Gefäßendothelzellen mit Mitosefähigkeit ersetzt werden können. Möglich ist auch eine höhere Regenerationskapazität an den Schlemm-Kanal Endothelzellen im Vergleich zu anderen Gefäßen aufgrund der besonderen Umgebung der Zellen der SC-Innenwand, die nicht auf einer kompletten Basallamina aufliegen und einem ständigen Zug und Dehnung durch den Kammerwasserfluss ausgesetzt sind.

In der näheren Charakterisierung der Stammzellen stellt sich immer wieder die Schwierigkeit dass spezifische molekulare Marker im diesem Bereich fehlen. Das von uns verwendete BrdU hat sich als Zellteilungsmarker für zahlreiche Strukturen, in unserem Beispiel das TW und dem posterioren Cornealrand als auch der Cornea nach mechanischer Narbensetzung etabliert (26). Neben der Darstellung der Zellen der Schwalbe'schen Linie mit dem Proliferationsmarker BrdU zeigten diese Zellen immunhistochemisch auch eine Expression von Oct4, einem Marker für Stammzellen, der in Zellen während der Embryonalentwicklung und in Stammzellen exprimiert wird.

Die Arbeitsgruppe von Mc Gowan, stellte die Vermutung von zwei potentiellen Wanderwegen von Oct4 exprimierenden Zellen im Trabekelwerk nach Verletzung des Hornhautendothels an. Sie postulieren, dass Tochterzellen der Oct4 positiven, potentiellen Stammzellen im Trabekelwerk über verschiedene Wege vom ursprünglichen Ort des TW zum Corneaendothel gelangen (93). Zum einen wandern die Tochterzellen zum äußeren Anteil des Trabekelwerks über die Übergangszone der Schwalbe'schen Region zum Corneaendothel (93). Zum anderen erfolgt der vermutliche zweite Wanderweg der Zellen durch die Trabekelwerkszellschichten über die Peripherie des Schlemm-Kanal-Endothels zur Übergangszone um schließlich ihr Zielort zu erreichen (93). Dieser Wanderweg der Zellen kann durch die Feststellung des morphologischen Aufbaus der Desçemet'schen Membran an Affenaugen besser nachvollzogen werden: Die Desçemet'sche Membran bildet am peripheren Ende Unterbrechungen (82) und es wird behauptet dass die Zellen der

4 Diskussion

Schwalbe'schen Linie über diese Unterbrechungen mit den Zellen des Trabekelwerks des nicht filtrierenden Anteils direkt in Kontakt stehen.

Nicht nur nach chirurgisch induzierten Verletzungen lässt sich ein gesteigerter Zellzyklus verzeichnen. Medikamentös induzierte Gewebstraumen beispielsweise die Langzeit-Behandlungen von Affen Augen mit Echthiophate (94) oder Timolol (95), Substanzen, die nachweislich zu einer Schädigung des TW und zu einem Zellverlust führen, lassen auch hier eine reaktiv erhöhte Zellteilung beobachten. Bei diesen Augen werden große Anhäufungen von länglichen Zellen im nicht-filtrierenden Teil des Operculums festgestellt, passend zur Annahme dass Stammzellen nach Verletzungen ihre Zellteilung beschleunigen (94, 95).

Im Gegensatz zur induzierten Zellteilung in besonderen Situationen, führt der physiologische Verlauf zu einem erhöhten Zellverlust in diesem Bereich. Mit steigendem Alter geht ein erhöhter intraokulärer Druck einher und es lässt sich ein vermehrter Zellverlust verzeichnen, vor allem beim POWG (62,96). Dies führt zu erschwerten Abflussverhältnissen, aufgrund vermutlicher Verdickung und Adhäsion der trabekulären Struktur, v.a. auch durch die pathologische Zunahme der Extrazellulärmatrix (ECM) (91). Umso mehr gewinnen seit geraumer Zeit potentielle Stammzellen als Quelle zur Zellregeneration an Bedeutung. Was die in unserem Fall an der Übergangszone des Trabekelwerks zum Corneaendothel festgestellten adulten Stammzellen besonders interessant macht. Ähnlich zu der von uns postulierten Differenzierungsmöglichkeiten der Schwalbe'sche Linie-Zellen in TW-Zellen oder Hornhaut-Endothelzellen, formulierte auch die Arbeitsgruppe von Yu die Hypothese, dass vermutliche Stammzellen in der Transitionszone zwischen peripherer Cornea und anteriorem Teil des Trabekelwerks die Fähigkeit haben könnten sowohl die periphere Cornea im Bereich der Schwalbe'schen Linie, als auch das TW nach vorangegangenem Zellverlust je nach Notwendigkeit erneut mit Zellen zu „besiedeln“ (26). Sie bezeichneten somit diese potentiellen Zellen als “Progenitors for Endothelium and Trabeculum” also Vorläuferzellen für Endothel der Cornea und das Trabekelwerk (26). Diese Stammzellen könnten als Quelle sowohl für den Ersatz beschädigter Hornhautendothelzellen als auch der verringerten Zellzahl bei glaukomatös veränderten Augen dienen (26).

In den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurde das Vorkommen verschiedener Stammzellmarker im Bereich des Trabekelwerks beobachtet. Es wurden chirurgisch unbehandelte und behandelte humane Augen aus Augenbanken auf Stammzellmarker untersucht. Sowohl BrdU als auch die Stammzellmarker Oct4 und Wnt-1 wurden bei chirurgisch vorbehandelten, Verletzungen hinzugefügten Augen, im Trabekelwerk und in deren unmittelbaren Umkreis, im Übergang zum peripheren Corneaendothel, beschrieben. (92,93).

4 Diskussion

Oct4 zeigte sich im Aufrechterhalten der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen als Schlüsselmarker, der mit seinem präzisen Konzentrationsspiegel die Differenzierung der Stammzellen beeinflusst. Der genaue Mechanismus, über die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationsspiegel von Oct4, stellt einen zukünftigen Forschungsansatz dar. Interessanter Ansatzpunkt ist wie die unterschiedlichen Konzentrationsspiegel das Zusammenwirken von Oct4 mit seinen Zielproteinen und/oder weiteren Interaktionsmolekülen von Signalwegen steuert. Der Transkriptionsfaktor Oct4 ist in zahlreichen Signalkaskaden involviert (97) und hat die Fähigkeit entweder Zielproteine zu aktivieren oder sie zu unterdrücken (65).

Die elektronenmikroskopische Charakterisierung erlaubte sowohl eine Einschätzung der Stoffwechselaktivität als auch die besondere Form der potentiellen Stammzellen. Um die potentiellen Stammzellen in diesem Bereich und deren mögliche Stammzellnische genauer zu charakterisieren wurden morphologische Analysen unter dem Transmissions-elektronenmikroskop durchgeführt.

Metabolisch aktive Zellen die sowohl verschiedene Transport- und Sekretionsprozesse als auch eine hohe Proteinbiosynthese betreiben, verfügen bekanntlich über ausgeprägte gut differenzierte Zellorganellen. So besitzen metabolisch aktive Endothelzellen, bei elektronenmikroskopischer Betrachtung einen großen Zellkern, zahlreiche Mitochondrien, einen gut ausgebildeten Golgi Apparat und endoplasmatisches Retikulum (75). Stammzellen hingegen zeichnen sich durch eine geringe Stoffwechselaktivität aus. Unsere elektronenmikroskopischen Beobachtungen der Zellen im Bereich der Schwalbe'schen Linie zeigen zwei unterschiedliche Zelltypen: Zum einen Zellen, die eine hohe Zellkern-Plasma Relation zeigen, über einen heterochromatin-reichen Zellkernen verfügen und ein spärliches Zytoplasma aufweisen. Diese Zellen wiederum liegen in enger Nachbarschaft zur Desçemet'schen Membran und werden von einer zweiten Zellpopulation eingehüllt, die deutlich größer und mitochondrienreicher sind. Ähnliche ultrastrukturelle Eigenschaften sind auch für andere Stammzellpopulationen innerhalb oder außerhalb des Auges beschrieben (78,98,99). So wurden beispielsweise die potentiellen Stammzellen in der Stammzellnische von Cardiomyozyten ähnlich zu unseren kuboidalen Zellen, als kleine rund ovale-Zellen beschrieben. Sie wiesen ebenfalls einen Zellkern mit unregelmäßig verteiltem Chromatin, einen geringen Mitochondriengehalt und wenige endoplasmatischen Retikulumzisternen auf (99). Die Stammzellnische der Cardiomyozten lokalisierte sich um die Koronararterien (99). Auch die limbalen Stammzellen am corneoskleralen Übergang präsentieren ultrastrukturelle Eigenschaften von adulten Stammzellen wie zum Beispiel eine hohe Kern-Plasma-Relation (100).

4 Diskussion

Die sogenannte Nische wird als eine Mikroumgebung reifer Stammzellen verstanden, wodurch die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen gesteuert wird (78). Der genaue molekulare Mechanismus der Stammzellnischenbildung bzw. deren Zusammensetzung und ihres molekularen Milieus ist noch nicht abschließend geklärt. (78). Seit geraumer Zeit werden Signalwegen, wie zum Beispiel dem Wnt/ β -catenin-, TGF- β - und Notch- Signalweg eine wichtige Funktion in der für Kontrolle von Stammzellnischen zugeschrieben (101).

Die Funktion der Stammzellnische besteht nach neuesten Erkenntnissen in der Regulation der Zellzahl und des Zellzyklus sowie der endständigen Differenzierung und der Motilität der Stammzellen (70). Von Stammzellnischen wie der am Limbus weiß man, dass sie reichlich innerviert und vaskularisiert sind, was eine Versorgung der Nische mit den notwendigen Nährstoffen und Wachstumsfaktoren sicherstellt (102). Generell wird vermutet, dass die Stammzellpopulation in der Nische unter physiologischen Umständen gleich bleibt und nur unter bestimmten Stresssituationen eine Aktivierung der Zellteilung erfolgt (70).

Untersuchungen stützen die Hypothese dass die Regulation des Stammzellcharakters reifer Stammzellen über intrinsische und extrinsische Faktoren ihrer Nische erfolgt (103). Notwendige Faktoren für eine solche Nische sind Komponenten der Extrazellulärmatrix und Zell-Zell-Kontakte. Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten ultrastrukturellen Besonderheiten der Zellen der Schwalbe Linie, welche in der Peripherie der Descemet'schen Membran liegt und mit Mitochondrien-reichem Zelltyp besiedelt ist, erfüllt somit ganz entscheidende Kriterien von Stammzellnischen.

Aktuell werden bei Patienten mit glaukomatös veränderten Augen unterschiedliche Therapiemöglichkeiten eingesetzt, von medikamentösen Optionen, über invasive Methoden, deren Therapieerfolg sich auf längere Sicht als unzureichend verzeichnen lässt. Meist sind weitere und oft auch invasivere therapeutische Schritte die Folge. Eine häufige und minimal-invasive Variante ist die Laser Trabekuloplastik, bei der inzwischen immer feinere Laser Behandlungsformen Anwendung finden. Bei der Methode der Laser Trabekuloplastik kommt es zum Sinken des IOP, jedoch ist das Wirkprinzip nicht eindeutig geklärt. Es bestehen verschiedene Erklärungsansätze: Das mechanische Modell besagt dass es durch Laser Energie und daraus folgenden Vernarbung des TW es zu Gewebekontraktion kommt, mit einem Schrumpfen und dadurch gebildeten Spannung am TW und SC-Kanal, der somit den Abfluss erleichtert (104). Dieses Modell wird meist als theoretisch angesehen, es kann auch nicht mit den verschiedenen Energiestärken der Lasermethoden erklärt werden (104). Dem biologischen Modell zufolge lösen Laserstrahlung im TW eine Entzündungsreaktion hervor, wodurch Monozyten aktiviert werden und einen Umbau der Extrazellulärmatrix am TW bewirken (105). Nach einer selektiven Lasertrabekuloplastik an Affen und humanen Augen konnte die Arbeitsgruppe von Alvarado einen Anstieg der Monozytenanzahl auf das 4-5-

4 Diskussion

fache verzeichnen und beobachtete einen erleichterten Abfluss des Kammerwassers (105). Die wahrscheinlichste Erklärung ist das Zellteilungsmodell, dem zufolge durch den Laser „Lücken“ in die Struktur des Trabekelwerks hinzugefügt werden, und eine Zellteilung angeregt wird. Bei der Argon Laser-Therapie ist eine erhöhte Zellteilung der Trabekelwerkszellen in den folgenden 24-48 h ein oftmals beobachtetes Geschehen (106,107). So untersuchte die Arbeitsgruppe von Acott die Zellteilungsaktivität an entnommenem menschlichen corneoskleralen Gewebe nach Laser Trabekuloplastik mittels Einbringen von ³H-Thymidin in die zelluläre DNA innerhalb von 48 Stunden postoperativ (107). Sie konnten eine vierfach höhere Zellteilung der mit Laser behandelten Gewebe, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollstrukturen feststellen. 60% der Zellteilung war im anterioren nicht filtrierenden Teil des Trabekelwerks also am Übergang zur Cornea unter der Schwalbe'schen Linie lokalisiert. Innerhalb der nächsten 2 Wochen nach dem Lasern wanderten ein Großteil dieser Zellen aus der Schwalbe'sche Region in die Laser behandelte Region um die dem Trabekelwerk verloren gegangenen Zellen zu ersetzen (107).

In manchen Fällen folgt jedoch der Laser-Therapie ein unkoordinierter Reparaturvorgang mit Bildung unerwünschter Strukturen, ähnlich einer Zellplatte (*Cell sheet*) mit einer Art Fortsätzen als Erweiterung des Corneaendothels oder dem Trabekelwerkszellen (108). Die Forschergruppe von Alexander war einer der ersten die diese Beobachtung anormaler Strukturbildung des Endothels im TW humaner Augen im Anschluss an einen Laser-Eingriff machte (108). Es wurden 34 Trabekulektomie-Proben von chronischen POWG-Patienten nach einem Argon-Laser-Eingriff untersucht. Beim Platzieren des Lasers unmittelbar in die Nähe der Schwalbe'sche Linie konnte eine Erweiterung/Verlängerung des Corneaendothels mit Bildung dieser oben beschriebenen Zellplatte festgestellt werden (108). Im Elektronenmikroskop wurde eine „Zellplatte“ identifiziert, die sich von der Region der Schwalbe'schen Linie über die anteriore Portion des uvealen TW ausbreitete (108). Es wurde angenommen dass nach dem Argon-Lasern der Wiederausgleich verloren gegangener Zellen dadurch geschieht, dass eine „spezialisierte Population an Zellen“ von der Schwalbe'schen Linie an den Ort des Lasern hinwandern (108).

Die strukturellen und anatomischen Ähnlichkeiten zwischen den Augen von Mensch und Affe, bestärken die Annahme, dass auch beim Menschen Zellen mit Stammzeleigenschaften in der Region der Schwalbe'schen Linie ruhen könnten, ähnlich wie wir sie in der vorliegenden Arbeit beim Affen identifizieren konnten. Angesichts der besonderen Eigenschaften der Schwalbe'sche Linie Zellen (50) und der hier in diesem Bereich beschriebenen auffallende Zellteilungsaktivität lässt sich die Vermutung äußern, dass es sich hier um Zellen mit pluripotenter Eigenschaft handeln könnte. Die von uns durchgeführten Untersuchungen bestätigen diese Hypothese durch den Nachweis der BrdU/ Oct4 positiven Zellen in der Region der Schwalbe'schen Linie.

Zukünftige Untersuchungsansätze zielen auf die Erforschung dieser Zellpopulation an der

4 Diskussion

Schwalbe'schen Linie und deren Regulierung ab. Die Möglichkeit das Teilungsverhalten der Stammzellen zu beeinflussen und sie zu einer Differenzierung in eine erwünschte Zelllinie zu bewegen, wären erstrebenswerte Langzeitziele dieses Forschungsbereichs. Es stellt sich die Frage nach Mechanismen, Faktoren und anderen Struktursystemen, die die Zellteilung in Gang setzen, und unter welchen Umständen sich diese ereignen. Wobei sich die Umsetzung sicherlich als schwierig erweist. Sei es in der Isolierung dieser Zelltypen, als auch in deren Anreicherung. Ein erster Schritt könnte hierbei das Identifizieren und Etablieren eines geeigneten spezifischen strukturellen oder molekularen Markers für diese Stammzellen der Schwalbe'schen Linie darstellen. Dies würde ein späteres Isolieren natürlich deutlich erleichtern. Eine innovative Stammzell-basierte Therapie wäre für Patienten mit glaukomatös erkrankten Augen, aber auch mit Hornhautendothel-Schädigungen eine große Hoffnung. Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse beschreiben zum ersten Mal detailliert die Lokalisation einer spezifischen Nische für adulte Stammzellen, welche von der Neuralleiste abstammen, im Bereich der Schwalbe'schen Linie. Wir sind überzeugt, dass durch unsere Ergebnisse die Isolierung dieser Zellen erleichtert wird und die genaue molekulare Charakterisierung in zukünftigen Studien ermöglicht wird. Die Forschungsdynamik auf diesem Gebiet erlaubt eine optimistische Erwartung in nächster Zukunft.

5 Zusammenfassung

Ein erhöhter Abflusswiderstand im Trabekelwerk (TW) stellt eine mögliche Ursache für einen erhöhten intraokularen Druck dar. Die Abflussbehinderung im Bereich des Trabekelwerks kann unter anderem durch einen altersbedingten Verlust von Trabekelwerkszellen entstehen. Als Zukunftsperspektive könnte die Regeneration dieses Zellverlustes durch eine Stimulation adulter Stammzellen einen zell-basierten Therapieansatz zur Glaukombehandlung darstellen. So war das Ziel der vorliegenden Arbeit, potentielle adulte Stammzellen und ihre Nische im Kammerwinkel von Affenaugen zu identifizieren.

Hierfür wurden vier Makakkenaffen über vier Wochen mit 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU 30 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Die Augen zweier Tiere wurden sofort nach der Behandlung zur Analyse aufgearbeitet (Gruppe 1), während die beiden anderen Tieren nach der BrdU Behandlung für weitere 4 Wochen in einem BrdU freien Intervall gehalten wurden (Gruppe 2). Da BrdU während der Synthesephase in die DNA eingebaut wird, wurden in der Gruppe 1 alle proliferierende Zellen BrdU markiert, wohingegen in Gruppe 2 nur noch die Zellen BrdU enthielten, die sich in dem BrdU freien Intervall selten teilten – ein klassisches Charaktermerkmal adulter Stammzellen.

Die Anzahl BrdU-positiver Zellen wurde in beiden Gruppen unter Berücksichtigung der verschiedenen Subareale des Kammerwinkels (corneosklerale und uveosklerale Trabekelwerk, juxtakanalikuläres Gewebe, Schlemm-Kanalendothel, Skleralsporn, Operculum und die Schwalbe'sche Linie) quantitativ bestimmt und statistisch ausgewertet. Bei beiden Gruppen zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl BrdU-positiver Zellen im Bereich der Schwalbe'schen Linie im Vergleich zu den anderen Bereichen. Auch blieb hier die Intensität und Anzahl BrdU positiver Zellen zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 unverändert. Dies deutet auf eine Zellpopulation mit geringer Teilungsaktivität hin. Immunhistochemische Doppelfärbungen der BrdU positiven Zellen mit dem Stammzellmarker Oct4 zeigten eine Kolo-kalisation von BrdU und Oct4 im Bereich der Schwalbe'schen Linie. Zusammengefasst deuten diese Beobachtungen auf eine Population adulter Stammzellen im Bereich der Schwalbe'schen Linie hin.

Die detaillierte Morphologie-Analyse des Kammerwinkels am Semidünnschnitt zeigte regelmäßig im Bereich der Schwalbe'schen Linie kuboidale Zellen, die häufig in Clustern in die Desçemet'sche Membran eingebettet waren. Ultrastrukturell stellten sich dort kleinere Zellen mit wenig Zytoplasma dar, die von Mitochondrien-reichen Zellen umgeben waren. Die strukturellen Analysen zeigten das charakteristische, morphologische Bild einer spezifischen Nische in der Region der Schwalbe'schen Linie. Zusammengefasst zeigen unsere Befunde eine spezifische Oct4 positive Zellpopulation im Bereich der Schwalbe'schen Linie, die in

5 Zusammenfassung

einer strukturell abgrenzbaren Nische angesiedelt ist. Diese Zellpopulation bildet daher höchst wahrscheinlich einen Verband an adulten Stammzellen, die die potentielle Fähigkeit besitzen den Verlust an TW-Zellen und / oder Endothelzellen der Cornea zu ersetzen.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Dargestellt ist der Ziliarkörper eines Rhesusaaffen in Hämatoxylin-Eosin-Färbung in 45-facher Vergrößerung mit (1) Sklera, (2) vordere Augenkammer, (3) Iris, (4) Ziliarmuskel mit seinen Ziliarzotten (5) die in die hintere Augenkammer (6) hinein ragen. Es ist auch ein kleiner Teil der Linse mit dem vorderen Linsenepithel (7) angeschnitten. Der Pfeil zeigt auf den Schlemm-Kanal (aus (24)). 3
- Abbildung 2:** Ziliarzotten des Ziliarkörpers einer Weddel-Robbe in Masson-Trichrom-Färbung in 450-facher Vergrößerung. Zweischichtung des Epithels mit äußeren pigmentierten und inneren nicht-pigmentierten Epithel (aus (24))..... 4
- Abbildung 3:** Flussrichtung des Kammerwassers von der hinteren in die vordere Augenkammer (Pfeile) und anschließendem uveoskleralem (links) oder trabekulärem (rechts) Abflussweg (modifiziert nach (3)). 4
- Abbildung 4:** Blick auf den Kammerwinkel mit den Strukturen des Trabekelwerks, Schlemm Kanal, Ziliarmuskel und Skleralsporn. (modifiziert aus (2)). 5
- Abbildung 5:** Vergrößerte Darstellung (250-fach) des Schlemm-Kanals (1) aus Abbildung 1 mit dem Trabekelwerk und seinen Fontana-Räumen (2) angrenzend zur vorderen Augenkammer (3) aus (24). 6
- Abbildung 6:** Dargestellt sind die verschiedenen Anteile des Trabekelwerks, das juxtakanalikuläre Gewebe und die innere Wand des Schlemm-Kanals mit seinen Endothelausstülpungen, sogenannten „giant vacuoles“ (Pfeile) (aus (111)). 7
- Abbildung 7:** Schematische Darstellung des Kammerwinkels des Affenauges mit der Schwalbe'schen Linie als peripheres Ende der Descemet Membran. Angrenzende Strukturen des Trabekelwerks und Überblick über die strukturelle Einteilung wird aufgezeigt. (mit freundlicher Genehmigung von Antje Zenker aus (110)). 8
- Abbildung 8:** Hornhaut des menschlichen Auges in Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit 80-facher Vergrößerung. Schichten der gefäßfreien Cornea von außen nach innen (24). 11
- Abbildung 9:** BrdU- Markierung in der neu synthetisierten DNA: Beispielhaft am Zellzyklus von reifen neuronalen Vorläuferzellen bei Säugetieren. Einlagern von BrdU in der Synthesephase des Proliferationszyklus und immunhistochemischer Nachweis durch Verwendung von Anti-BrdU-Antikörper (aus (90)). 16
- Abbildung 10:** Schema zur Vorbehandlung der Tiere in beiden Gruppen 1 und 2. Die Affen in Gruppe 1 wurden nach 4-wöchiger BrdU-Gabe getötet, wobei die Affen in Gruppe 2 nach der 4-wöchigen BrdU-Phase eine weitere 4-wöchige BrdU-freie Phase erhalten haben. Das Vorgehen in Gruppe 2 dient zum Nachweis einer BrdU-Langzeitspeicherung. 24
- Abbildung 11:** Von den Quadranten wurden 5-6 mm dicke Stücke präpariert. Es wurde darauf geachtet, dass alle Gewebestrukturen von Cornea, Trabekelwerk, Ziliarkörper, Iris bis zur Ora serrata erhalten blieben. 28

Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung für BrdU (grün) in den Zellen des trabekulären Abflussweges. Zellkerne sind angefärbt mit DAPI (blau). Pfeile zeigen BrdU-positive Zellen im SC-Endothel und in der Region der Schwalbe'schen Linie. 41

Abbildung 13: Quantifizierung und statistische Analyse der BrdU-positiven Zellen in den verschiedenen Quadranten der Augen in Gruppe 1 (4 Wochen BrdU) und Gruppe 2 (4 Wochen BrdU, 4 Wochen Karrenz). Mittelwerte \pm SEM werden gezeigt. 42

Abbildung 14: Relative Anzahl BrdU-positiver Zellen in den verschiedenen Regionen des trabekulären Abflussweges der Augen in Gruppe 1. Mittelwerte und SEM werden gezeigt. 43

Abbildung 15: Relative Anzahl BrdU-positiver Zellen in den verschiedenen Regionen des trabekulären Abflussweges der Augen in Gruppe 2. Mittelwerte und SEM werden gezeigt, * $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. *** $P < 0,001$ 43

Abbildung 16: Immunhistochemische Darstellung des Kammerwinkels in einem Auge der Gruppe 2: einzelne Zellen des Schlemm-Kanal-Endothels sind positiv für BrdU (grün, Pfeil). Potentielle Stammzellen sollten mittels Oct4 (rot) detektiert werden. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Der Pfeil zeigt auf eine BrdU-positive Zelle im Schlemm-Kanal Endothel. Die Pfeilspitze markiert ein Aufleuchten in der extrazellulären Matrix des JCT. 44

Abbildung 17: Immunhistochemische Doppelfärbung des Schlemm-Kanal-Endothels in einem Auge der Gruppe 2 für CD31 (rot) und BrdU (grün) und. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt dargestellt. Die Pfeile deuten auf ein BrdU/CD31-positive Zellen im Schlemm-Kanal Endothel. 45

Abbildung 18: Relative Anzahl BrdU-positiver Zellen an der Schwalbe'schen Linie im Vergleich zu den verschiedenen Regionen des trabekulären Abflussweges an den Augen in Gruppe 1. Mittelwerte und \pm SEM werden gezeigt, ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$ 46

Abbildung 19: Relative Anzahl BrdU-positiver Zellen an der Schwalbe'schen Linie im Vergleich zu den verschiedenen Regionen des trabekulären Abflussweges an den Augen in Gruppe 2. Mittelwerte und \pm SEM werden gezeigt, ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$ 46

Abbildung 20: Charakterisierung der Stammzellnischen an der Schwalbe'sche Linie. Das Akkumulieren von BrdU (grün) positiven Zellen in der Schwalbe'schen Linie wird durch immunhistochemische Färbung dargestellt. Zellkerne sind mit DAPI (blau) aufgezeigt. 47

Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung der Schwalbe'sche Linie Zellen in einem Auge der Gruppe 2 für BrdU (grün) und Oct4 (rot). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. BrdU/Oct4-positive Zellen werden mit der Pfeilspitze markiert, während der Pfeil auf einen BrdU/Oct4 negativen Zellkern, der mit DAPI gefärbt ist, zeigt. 48

Abbildung 22: Differenzierungsmöglichkeiten der Schwalbe'schen Linie Zellen durch ihre Pluripotenz entweder in Trabekelwerkszellen oder in Hornhautendothelzellen. 49

Abbildung 23: Morphologische Charakterisierung der Stammzellnische an der Schwalbe'schen Linie. Oben: Sagittale Schnitfführung: Die Pfeilspitzen fokussieren eine klar definierte Nische der Schwalbe'schen Linie in Semidünnschnitten in sagittaler Richtung. Unten: Frontale Schnitfführung: An Semidünnschnitten in frontaler Richtung der Schwalbe'schen Linie markiert die Pfeilspitze eine klar definierte Nische, die rundliche kuboidale Zellen beherbergt. 50

Abbildung 24: (A) Transelektronenmikroskopische Panorama-Aufnahme der Schwalbe'schen Linie desselben Affen aus Abb. 23 (A). Die Ausschnittsvergrößerung der Kästchen in B und D. Die Schwalbe'sche Linie Zellen füllen die Lücken der Desçemet Membran und sind auf ihrer Basalseite in direktem Kontakt mit TW-Zellen der nicht filtrierenden Operculum-Region (A und D). Die meisten Zellen der Schwalbe'schen Region zeichnen sich durch ein Vorkommen von zahlreichen Mitochondrien tubulären Typ aus (C). Es wurden kleinere Zellen mit weniger Zytoplasma als die Zellen mit Mitochondrienreichem Zelltyp beobachtet (B). Die kleineren Zellen sind typischerweise von Mitochondrienreichen Zellen umgeben. 51

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzienliste	18
Tabelle 2: Enzyme	18
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 4: Geräte	20
Tabelle 5: Puffer und Lösungen.....	21
Tabelle 6: Primärantikörper	22
Tabelle 7: Sekundärantikörper.....	22

6.3 Literaturverzeichnis

1. Whitson JT. Travoprost – a new prostaglandin analogue for the treatment of glaucoma. *Expert Opin Pharmacother.* 2002 Jul 1;3(7):965–77.
2. Shields MB, Krieglstein GK. *Glaukom: Grundlagen, Differentialdiagnose, Therapie ; mit 20 Tabellen.* Springer; 1993. 638 p.
3. Sachsenweger M, Klauß V, Nasemann J. *Duale Reihe Augenheilkunde.* Georg Thieme Verlag; 2002. 459 p.
4. Grehn F. *Augenheilkunde.* Springer-Verlag; 2011. 573 p.
5. Krieglstein GK. *Glaukom 2006: Eine Konsensus-Konferenz.* Springer Science & Business Media; 2006. 215 p.
6. Fuchshofer R, Tamm ER. Modulation of extracellular matrix turnover in the trabecular meshwork. *Exp Eye Res.* 2009 Apr;88(4):683–8.
7. Fuchshofer R, Tamm ER. The role of TGF- β in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Cell Tissue Res.* 2011 Nov 19;347(1):279–90.
8. Picht G, Welge-Luessen U, Grehn F, Lütjen-Drecoll E. Transforming growth factor beta 2 levels in the aqueous humor in different types of glaucoma and the relation to filtering bleb development. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001 Mar;239(3):199–207.
9. Ohta M, Greenberger JS, Anklesaria P, Bassols A, Massagué J. Two forms of transforming growth factor- β distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature.* 1987;329(6139):539–41.
10. Ten Dijke P, Iwata KK, Goddard C, Pieler C, Canalis E, McCarthy TL, et al. Recombinant transforming growth factor type beta 3: biological activities and receptor-binding properties in isolated bone cells. *Mol Cell Biol.* 1990 Sep;10(9):4473–9.
11. Sporn MB, Roberts AB. TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul.* 1990 Nov;1(12):875–82.
12. Habenicht A, Pfeilschifter J. *Growth Factors, Differentiation Factors, and Cytokines, Chapter Transforming growth Factor- β .* Springer Science & Business Media; 2012. 484 p.
13. Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K. The Transforming Growth Factor- β s. *Journal of Neurochemistry.* 2000 Dezember;75(6):2227–40.
14. Tian B, Gabelt BT, Geiger B, Kaufman PL. The role of the actomyosin system in regulating trabecular fluid outflow. *Exp Eye Res.* 2009 Apr;88(4):713–7.
15. Junglas B, Yu AHL, Welge-Lüssen U, Tamm ER, Fuchshofer R. Connective tissue growth factor induces extracellular matrix deposition in human trabecular meshwork cells. *Experimental Eye Research.* 2009 Jun 1;88(6):1065–75.

16. Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci.* 2006 Dec 1;119(23):4803–10.
17. Junglas B, Kuespert S, Seleem AA, Struller T, Ullmann S, Bösl M, et al. Connective Tissue Growth Factor Causes Glaucoma by Modifying the Actin Cytoskeleton of the Trabecular Meshwork. *The American Journal of Pathology.* 2012 Jun 1;180(6):2386–403.
18. Flügel C, Lütjen-Drecoll E. Presence and distribution of Na⁺/K⁺-ATPase in the ciliary epithelium of the rabbit. *Histochemistry.* 1988;88(3-6):613–21.
19. Ghosh S, Freitag AC, Martin-Vasallo P, Coca-Prados M. Cellular distribution and differential gene expression of the three alpha subunit isoforms of the Na,K-ATPase in the ocular ciliary epithelium. *J Biol Chem.* 1990 Feb 15;265(5):2935–40.
20. Ghosh S, Hernando N, Martín-Alonso JM, Martin-Vasallo P, Coca-Prados M. Expression of multiple Na⁺,K⁺-ATPase genes reveals a gradient of isoforms along the nonpigmented ciliary epithelium: Functional implications in aqueous humor secretion. *J Cell Physiol.* 1991 Nov 1;149(2):184–94.
21. McLaughlin CW, Zellhuber-McMillan S, Macknight ADC, Civan MM. Electron microprobe analysis of ouabain-exposed ciliary epithelium: PE-NPE cell couplets form the functional units. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* 2004 Jun 1;286(6):C1376–89.
22. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. Auflage: 2., kompl. überarb. Aufl. Stuttgart u.a.: Thieme/KNO VA; 2006. 637 p.
23. Lütjen-Drecoll E, Kruse FE. Primäres Offenwinkelglaukom: Morphologische Grundlagen zum Verständnis der Pathogenese und der Wirkung antiglaukomatöser Substanzen. *Der Ophthalmologe.* 2007 Feb;104(2):167–79.
24. Welsch U, Deller T. Lehrbuch Histologie. Elsevier, Urban&FischerVerlag; 2010. 610 p.
25. Ross Ethier C. The Inner Wall of Schlemm's Canal. *Experimental Eye Research.* 2002 Feb;74(2):161–72.
26. Yu WY, Sheridan C, Grierson I, Mason S, Kearns V, Lo ACY, et al. Progenitors for the corneal endothelium and trabecular meshwork: a potential source for personalized stem cell therapy in corneal endothelial diseases and glaucoma. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:412743.
27. Tamm ER. [Functional morphology of the outflow pathways of aqueous humor and their changes in open angle glaucoma]. *Ophthalmologe.* 2013 Nov;110(11):1026–35.
28. Llobet A, Gasull X, Gual A. Understanding Trabecular Meshwork Physiology: A Key to the Control of Intraocular Pressure? *Physiology.* 2003 Oct 1;18(5):205–9.
29. Johnstone MA, Grant WM. Pressure-Dependent Changes in Structures of the Aqueous Outflow System of Human and Monkey Eyes. *American Journal of Ophthalmology.* 1973 März;75(3):365–83.

30. Parc CE, Johnson DH, Brilakis HS. Giant Vacuoles Are Found Preferentially near Collector Channels. *IOVS*. 2000 Sep 1;41(10):2984–90.
31. Brilakis HS, Johnson DH. Giant vacuole survival time and implications for aqueous humor outflow. *Journal of glaucoma*. 2001;10(4):277–83.
32. Mäepea O, Bill A. The pressures in the episcleral veins, Schlemm's canal and the trabecular meshwork in monkeys: effects of changes in intraocular pressure. *Exp Eye Res*. 1989 Oct;49(4):645–63.
33. Johnson M. "What controls aqueous humour outflow resistance?." *Exp Eye Res*. 2006 Apr;82(4):545–57.
34. Inomata H, Bill A, Smelser GK. Aqueous Humor Pathways Through The Trabecular Meshwork and Into Schlemm'S Canal in the Cynomolgus Monkey (*Macaca Irus*): An Electron Microscopic Study. *American Journal of Ophthalmology*. 1972 Mai;73(5):760–89.
35. Tamm ER. The trabecular meshwork outflow pathways: structural and functional aspects. *Exp Eye Res*. 2009 Apr;88(4):648–55.
36. Herrnberger L, Ebner K, Junglas B, Tamm ER. The role of plasmalemma vesicle-associated protein (PLVAP) in endothelial cells of Schlemm's canal and ocular capillaries. *Exp Eye Res*. 2012 Dec;105:27–33.
37. Aumüller G, editor. *Anatomie: 208 Tabellen ; [mit CD-ROM zum Präp-Kurs]*. Stuttgart: Thieme; 2007. 1344 p.
38. Grant WM. Experimental aqueous perfusion in enucleated human eyes. *Arch Ophthalmol*. 1963 Jun;69:783–801.
39. Lütjen-Drecoll E, Rohen JW. Functional morphology of the trabecular meshwork. *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology*. 2001;1.
40. Lütjen-Drecoll E. Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes. *Progress in Retinal and Eye Research*. 1999 Jan;18(1):91–119.
41. Lütjen-Drecoll E. Importance of trabecular meshwork changes in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma*. 2000 Dec;9(6):417–8.
42. Johnson DH, Johnson M. How Does Nonpenetrating Glaucoma Surgery Work? Aqueous Outflow Resistance and Glaucoma Surgery. *Journal of Glaucoma*. 2001;10(1):55–67.
43. Bill A, Maepea O. Mechanisms and routes of aqueous humor drainage. *Principles and Practices of Ophthalmology*. 1994;1:206–26.
44. Krieglstein GK, Langham ME. Influence of Body Position on the Intraocular Pressure of Normal and Glaucomatous Eyes. *Ophthalmologica*. 1975;171(2):132–45.

45. Tamm ER, Besharse J, Dana R, Dartt D. The role of the ciliary body in aqueous humor dynamics: structural aspects. *Encyclopedia of the eye* Academic Press, Oxford. 2009;179–86.
46. Zavala J, López Jaime GR, Rodríguez Barrientos CA, Valdez-Garcia J. Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. *Eye (Lond)*. 2013 May;27(5):579–88.
47. Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. *The Corneal Endothelium*. *Ophthalmology*. 1982 Jun;89(6):531–90.
48. Biswas S, Munier FL, Yardley J, Hart-Holden N, Perveen R, Cousin P, et al. Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the $\alpha 2$ chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2001 Oct 2;10(21):2415–23.
49. Puk O, Dalke C, Calzada-Wack J, Ahmad N, Klawns M, Wagner S, et al. Reduced Corneal Thickness and Enlarged Anterior Chamber in a Novel ColVIIIa2G257D Mutant Mouse. *IOVS*. 2009 Dec 1;50(12):5653–61.
50. Raviola G. Schwalbe line's cells: a new cell type in the trabecular meshwork of *Macaca mulatta*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1982 Jan;22(1):45–56.
51. Becker M-B, Zülch A, Gruss P. Von der undifferenzierten Zelle zum komplexen Organismus: Konzepte der Ontogenie. *Biologie in unserer Zeit*. 2001 März;31(2):88–97.
52. Yu D, Silva GA. Stem cell sources and therapeutic approaches for central nervous system and neural retinal disorders. *Neurosurgical Focus*. 2008 März;24(3-4):E11.
53. Kelley MJ, Rose AY, Keller KE, Hessle H, Samples JR, Acott TS. Stem cells in the trabecular meshwork: present and future promises. *Experimental eye research*. 2009;88(4):747–51.
54. Du Y, Roh DS, Mann MM, Funderburgh ML, Funderburgh JL, Schuman JS. Multipotent stem cells from trabecular meshwork become phagocytic TM cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Mar;53(3):1566–75.
55. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. *Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology*. *Cell*. 1997 Jul 2;88(3):287–98.
56. Daley GQ, Scadden DT. Prospects for Stem Cell-Based Therapy. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):544–8.
57. Mimeault M, Batra SK. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev*. 2008;4(1):27–49.
58. Boulton M, Albon J. Stem cells in the eye. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004 Apr;36(4):643–57.
59. Challa P, Gonzalez P, Liton P b., Caballero M, Epstein D I. Gene Expression Profile in a Novel Cell Type in Primary Cultures of Human Trabecular Meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Mai;44(5):3164.

60. Rohen PDJW, Zypen E van der. The phagocytic activity of the trabecular meshwork endothelium. *Albrecht von Graefes Arch Klin Ophthalmol*. 1968 Jun 1;175(2):143–60.
61. Grierson I. The outflow system in health and disease. *Bull Soc Belge Ophthalmol*. 1987;225 Pt 2:1–43.
62. Alvarado J, Murphy C, Polansky J, Juster R. Age-related changes in trabecular meshwork cellularity. *IOVS*. 1981 Nov 1;21(5):714–27.
63. Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, et al. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 1990 Jun 21;345(6277):686–92.
64. Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell*. 1990 Feb 9;60(3):461–72.
65. Shi G, Jin Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Research & Therapy*. 2010 Dec 14;1(5):39.
66. Wang X, Dai J. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells*. 2010 May;28(5):885–93.
67. Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res*. 2002;12(5):321–9.
68. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000 Apr;24(4):372–6.
69. Bickenbach JR. Identification and Behavior of Label-retaining Cells in Oral Mucosa and Skin. *J DENT RES*. 1981 Mar 1;60(3 suppl):1611–20.
70. Ema H, Suda T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood*. 2012 Sep 13;120(11):2174–81.
71. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7–25.
72. Xie T, Spradling AC. A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science*. 2000 Oct 13;290(5490):328–30.
73. Limb GA, Daniels JT. Ocular regeneration by stem cells: present status and future prospects. *Br Med Bull*. 2008;85:47–61.
74. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *The Lancet*. 1997 Apr 5;349(9057):990–3.
75. Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye*. 1990 May;4(3):389–424.
76. Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle

- kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *PNAS*. 1999 Mar 16;96(6):3120–5.
77. Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol*. 1989 Jun 1;18(3):311–8.
78. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the Neighbors. *Cell*. 2004 Mar 19;116(6):769–78.
79. Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*. 2003 Jan 15;130(2):391–9.
80. Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews*. 2007 Jan;53(1):198–214.
81. Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, et al. Persistent Production of Neurons from Adult Brain Stem Cells During Recovery after Stroke. *STEM CELLS*. 2006 März;24(3):739–47.
82. Tamm ER, Carassa RG, Albert DM, Gabelt BT, Patel S, Rasmussen CA, et al. Viscocanalostomy in rhesus monkeys. *Arch Ophthalmol*. 2004 Dec;122(12):1826–38.
83. Ito S, Karnovsky MJ. Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds. *J Cell Biol*. (39):168–9.
84. Moses RL, Claycomb WC. Ultrastructure of terminally differentiated adult rat cardiac muscle cells in culture. *Am J Anat*. 1982 Jun;164(2):113–31.
85. Richardson KC, Jarett L, Finke EH. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol*. 1960 Nov;35:313–23.
86. Tamm ER. Genetic changes and their influence on structure and function of the eye in glaucoma. *Glaucoma* [Internet]. Springer; 2004 [cited 2015 May 26]. p. 1–27. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-18633-2_1
87. Cvekl A, Tamm ER. Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases. *Bioessays*. 2004 Apr 1;26(4):374–86.
88. Ozanics V, Jakobiec FA. Prenatal development of the eye and its adnexa. *Ocular Anatomy, Embryology and Teratology*. 1982;11–96.
89. Waring GO, Laibson PR, Rodrigues M. Clinical and pathologic alterations of Descemet's membrane: with emphasis on endothelial metaplasia. *Surv Ophthalmol*. 1974;18(325-368):20–64.
90. Mao L, Wang JQ. Adult neural stem/progenitor cells in neurodegenerative repair. *Sheng Li Xue Bao*. 2003 Jun 25;55(3):233–44.
91. Grierson I, Howes RC. Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye*. 1987 März;1(2):204–10.

92. Whikehart DR, Parikh CH, Vaughn AV, Mishler K, Edelhauser HF. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. *Mol Vis.* 2005;11:816–24.
93. McGowan SL, Edelhauser HF, Pfister RR, Whikehart DR. Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas. *Mol Vis.* 2007;13:1984–2000.
94. Lütjen-Drecoll E, Kaufman PL. Echothiophate-induced structural alterations in the anterior chamber angle of the cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1979 Sep 1;18(9):918–29.
95. E Lütjen-Drecoll PLK. Long-term timolol and epinephrine in monkeys. I. Functional morphology of the ciliary processes. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom.* 1986;105 (Pt 2):180–95.
96. Alvarado J, Murphy C, Juster R. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology.* 1984 Jun;91(6):564–79.
97. Tan F, Qian C, Tang K, Abd-Allah SM, Jing N. Inhibition of TGF- β Signaling can Substitute for Oct4 in Reprogramming and Maintain Pluripotency. *J Biol Chem.* 2014 Dec 29; jbc.M114.609016.
98. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res.* 2005 Sep;81(3):247–64.
99. Gherghiceanu M, Popescu LM. Cardiomyocyte precursors and telocytes in epicardial stem cell niche: electron microscope images. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2010 Apr 1;14(4):871–7.
100. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *PNAS.* 1987 Apr 1;84(8):2302–6.
101. Secker GA, Daniels JT. Limbal epithelial stem cells of the cornea. *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008 [cited 2015 Mar 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27054/>
102. J G Lawrenson GLR. The structure of corpuscular nerve endings in the limbal conjunctiva of the human eye. *Journal of anatomy.* 1991;177:75–84.
103. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* 2000 Feb 25;287(5457):1427–30.
104. SooHoo JR, Seibold LK, Ammar DA, Kahook MY. Ultrastructural Changes in Human Trabecular Meshwork Tissue after Laser Trabeculoplasty. *Journal of Ophthalmology.* 2015 May 12;2015:e476138.
105. Alvarado JA, Katz LJ, Trivedi S, Shifera AS. Monocyte modulation of aqueous outflow and recruitment to the trabecular meshwork following selective laser trabeculoplasty. *Arch Ophthalmol.* 2010 Jun;128(6):731–7.

106. Bylsma SS, Samples JR, Acott TS, Van Buskirk EM. Trabecular cell division after argon laser trabeculoplasty. *Arch Ophthalmol*. 1988 Apr;106(4):544–7.
107. Acott TS, Samples JR, Bradley JM, Bacon DR, Bylsma SS, Van Buskirk EM. Trabecular repopulation by anterior trabecular meshwork cells after laser trabeculoplasty. *Am J Ophthalmol*. 1989 Jan 15;107(1):1–6.
108. Alexander RA, Grierson I. Morphological effects of argon laser trabeculoplasty upon the glaucomatous human meshwork. *Eye*. 1989 Nov;3(6):719–26.
109. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell*. 1993 Jun;4(6):637–45.
110. Braunger BM, Ademoglu B, Koschade SE, Fuchshofer R, Gabelt BT, Kiland JA, et al. Identification of Adult Stem Cells in Schwalbe’s Line Region of the Primate Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014 Nov 21;55(11):7499–507.
111. Tamm ER. The trabecular meshwork outflow pathways: Structural and functional aspects. *Experimental Eye Research*. 2009 Apr 30;88(4):648–5
112. Temple S. The development of neural stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):112–7.
113. Gritti A, Vescovi AL, Galli R. Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. *Journal of Physiology-Paris*. 2002 Jan;96(1–2):81–90.
114. Reh TA, Fischer AJ. Stem cells in the vertebrate retina. *Brain Behav Evol*. 2001;58(5):296–305.

6.4 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha oder anti
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ARVO	The association for research in vision and ophthalmology
β	beta
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CD 31	cluster of differentiation 31
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
EM	Elektronenmikroskop
et al.	und andere (et alia)
g	Gramm
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
i.m.	Intramuskulär („in einen Muskel hinein“)
<i>In vitro</i>	Außerhalb des lebenden Organismus
<i>In vivo</i>	Im lebenden Organismus
IOP	Intraocular pressure, Augeninnendruck
i.v.	Intravenös („In die Vene hinein“)
JCT	Juxtacanalikuläres/ cribriformes Trabekelwerk
l	Liter
m	milli (10 ⁻³), Meter
ms	Milli-Sekunden
M	molar
min	Minute
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	mouse, Maus
n	nano (10 ⁻⁹)
nm	nanometer

6 Anhang

Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
Php	Phosphatpuffer
PLVAP	Plasmalemma- Vesicle- Associated-Protein
POWG	primäres Offenwinkelglaukom
rt	rat , Ratte
s	Sekunde
s.c.	Subcutan („unter die Haut“)
SC	Schlemm-Kanal
SS	Skeralsporn
sog.	sogenannte(r/s)
TGF	Transforming Growth Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
Vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

6.5 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Bahar Ademoglu-Chamza
Geburtsdatum/-ort	07.05.1986 / Nürnberg
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schul- und Berufsbildung

Oktober 2008 – November 2014	Humanmedizin Studium an der Universität Regensburg
September 1998 – Juni 2006	Willstätter Gymnasium Nürnberg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
September 1993 – August 1998	Grundschule und Hauptschule Altenfurt

Berufserfahrung

Praktisches Jahr

April 2014 – Juli 2014	Abteilung für Chirurgie Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Regensburg Lehrkrankenhaus der Universität Regensburg
Dezember 2013 – April 2014	Abteilung für Kinder-und Jugendmedizin Universitätsklinikum Regensburg
August 2013 – Dezember 2013	Abteilung für Innere Medizin St.Theresien-Krankenhaus Nürnberg Lehrkrankenhaus der Universität Erlangen

Famulaturen

März 2013 – April 2013	Viszeralchirurgie Isar Klinik München
August 2012 – September 2012	Innere Medizin St.Theresien-Krankenhaus Nürnberg
Februar 2012 – März 2012	Allgemeinmedizinische Praxis Nürnberg Dr. med. Wolfgang Graser
Februar 2011 – März 2011	Pädiatrische Gastroenterologie Hacettepe University Ihsan Dogramaci Children`s Hospital Universitätsklinik Ankara

Mai 2011 – Mai 2013	Ehrenamtliche Betreuung von Patienten im Verein Migrantenmedizin Regensburg e.V.
Wintersemester 2009/2010	Studentische Hilfskraft im Kursus der makroskopischen Anatomie Teil I für Studierende der Humanmedizin
Januar 2008 – Juli 2008	Aushilfskraft Sana-Klinik Nürnberg
Februar 2007 – Mai 2008	Ehrenamtliche Tätigkeit als freie Journalistin bei der türkischen Tageszeitung „Hürriyet“
<u>Pflegepraktika</u>	
November 2006 – Dezember 2006	Klinik für Kinder und Jugendmedizin Klinikum Nürnberg Süd
September 2006 – Oktober 2006	Medizinische Klinik Kardiologie Klinikum Nürnberg Süd
Oktober 2006 – November 2006	Klinik für Kinderchirurgie Klinikum Nürnberg Süd
<u>Publikation</u>	„Identification of adult stem cells in Schwalbe's line region of the primate eye“ als Zweitautorin
<u>Zusatzqualifikationen</u>	Sonographie Kurs Nahtkurs Englisch für Naturwissenschaftler
<u>Vereinsmitgliedschaften</u>	DTFC Deutsch-türkischer Frauenclub Nordbayern e.V. Migrantenmedizin Regensburg e.V.
<u>Interessen</u>	Singen Joggen Lesen

Nürnberg, den 24.06.2015

6.6 Danksagung

Für das Zustandekommen dieser Arbeit haben mir zahlreiche Personen immer zur Seite gestanden, denen ich an dieser Stelle meinen Dank verpflichtet bin.

Prof. Dr. Ernst R. Tamm danke ich für die Vergabe dieses interessanten Dissertationsthemas aus dem Bereich seines Forschungsschwerpunktes. Die Leidenschaft mit der Sie uns im ersten Unterricht die Anatomie vermittelt haben, kann ich nicht vergessen. Vielen Dank für die hervorragende anatomische Ausbildung an Ihrem Institut.

Bei Frau **Dr. Dr. Barbara Maria Braunger** bedanke ich mich für ihre exzellente Betreuung, der ausgezeichneten Kontakt und Kommunikationsmöglichkeiten zu jedem Zeitpunkt. Für ihre Geduld, ihre motivierenden Worte und Hilfestellungen von Beginn bis zum Ende dieser Arbeit. Unendlichen Dank für all die Unterstützung liebe „Doktor Mutter“.

Herrn Prof. Dr. Schweda danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für den lehrreichen Physiologie-Unterricht mit dem Verständnis vereinfachenden Lehrmethoden

Frau Elke Stauber danke ich für ihre große Hilfe in allen Laborarbeiten. Deiner grenzenlosen Geduld im Umgang mit meinen nervenaufreibenden Fragen, angenehmen Unterhaltung im Labor, deiner positiven Energie, die mir das Arbeiten sehr angenehm gestaltet hat, danke ich Dir unendlich Elke! Ohne deine Hilfestellungen und Unterstützung hätte ich diese Laborarbeit nicht in dieser Form meistern können!

Frau Margit Schimmel, Angelika Pach und Silvia Babl danke ich für all die Hilfestellungen sowohl beim Mikroskopieren, als auch dem Herstellen von Präparaten und bei vielen weiteren Unterstützungspunkten. Die stets humorvollen Unterhaltungen und euer freundliches Entgegenkommen im Labor hat mir das Arbeiten sehr angenehm gestaltet.

Frau Köberlein, die mich seit der ersten Begegnung in der Anatomie am Anfang meines Studiums immer motiviert und mit ihren Worten aufgebaut hat. Ich danke Ihnen herzlichst für Ihre Unterstützung, dass Sie immer ein offenes Ohr und eine Problemlösung für mich hatten.

Dr. Markus Koch danke ich für das amüsante Arbeitsklima und den Hilfestellungen.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich herzlich für die grenzenlose Unterstützung durch mein ganzes Studium und all meinen Lebensabschnitten, den Erfolg im meinem Leben habe ich euch zu verdanken! **Meinem Bruder** danke ich für seine jederzeit angebotene Hilfestellung und seinen lebensfrohen Charakter. **Meinem Mann Erman**, danke ich für seine Geduld, seiner verständnisvollen, motivierenden, aufmunternden Unterstützung während der ganzen Dr. Arbeit und in allen Bereichen unserer Ehe. Danke für deine wundervolle Liebe.

6.7 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Nürnberg, den 24.06.2015

Bahar Ademoglu-Chamza