

Aus dem Medizinischen Zentrum für Augenheilkunde  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Peter Kroll

**Immunhistologische Untersuchung von  
Fibronectin und Galektin-3 an humanen  
fetalen und adulten Augen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin Philipps-Universität  
Marburg vorgelegt von

Ulrike Löhr  
aus Vechta

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-  
Universität Marburg am 21. Oktober 2004.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. Lutz Hesse

Korreferent: PD Dr. Udo Herz

2. Korreferent: Prof. Dr. Peter Kroll

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
0. Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Die Lamina limitans interna	8
1.1.1 Entwicklung und Aufbau	8
1.1.2 Zusammensetzung	9
1.1.3 Funktion	10
1.1.3.1 Angrenzende anatomische Strukturen	10
1.1.3.2 Verbindung dieser Strukturen durch die LLI	12
1.1.4 Klinische Bedeutung	13
1.1.4.1 Hintere Glaskörperabhebung	13
1.1.4.2 Proliferative vitreoretinale Erkrankungen	13
1.1.4.3 Therapieansätze	19
1.2 Fragestellung	20
2. Material und Methoden	23
2.1 Untersuchungsgut	23
2.1.1 Adulte Augen	23
2.1.2 Fetale Augen	24
2.1.3 Augen mit Melanom der Uvea	24
2.2 Material	24
2.2.1 Geräte	24
2.2.2 Antikörper	25
2.2.3 Plasmin	25
2.2.4 Lösungen und Chemikalien	26
2.3 Methodik	27
2.3.1 Herstellung der Silanobjektträger	27
2.3.2 Vorbehandlung mit Plasmin	28
2.3.3 Entfernung des Nervus opticus vor der Galektin-3-Färbung	29
2.3.4 Fixierung, Entwässerung und Einbettung	29

	Seite
2.3.5 Herstellung der Schnitte	30
2.3.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	30
2.3.7 Immunfluoreszenzfärbung (Fibronectin)	30
2.3.8 Immunperoxidasefärbung (Galektin-3)	31
2.4 Auswertung	32
3. Ergebnisse	34
3.1 Fibronectin	34
3.1.1 Adulte Augen	34
3.1.2 Plasmin-behandelte Augen	40
3.1.2.1 Gruppe A	40
3.1.2.2 Gruppe B	42
3.1.3 Fetale Augen	44
3.1.4 Augen mit uvealem Melanom	48
3.2 Galektin-3	51
4. Diskussion	55
5. Zusammenfassung	77
6. Literaturverzeichnis	79
7. Anhang	104
8. Tabellarischer Lebenslauf	111
9. Verzeichnis der akademischen Lehrer	113
10. Danksagung	114

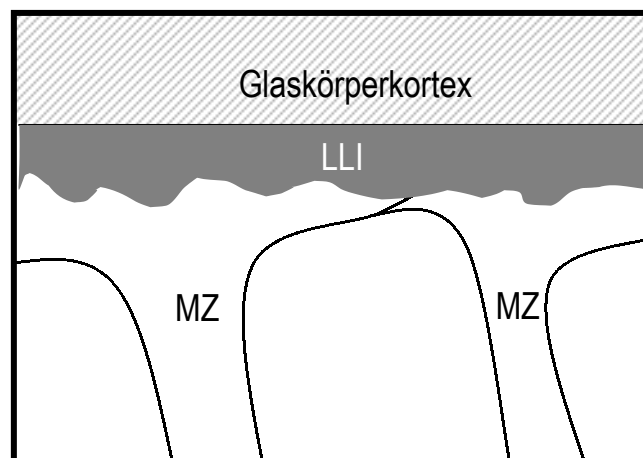
## 0. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
anl.	(überwiegend) anliegend
AS	Aminosäuren
bzw.	beziehungsweise
CRD	Carbohydrate-recognition domain
Da	Dalton
d.h.	das heißt
ECM	Extra-cellular matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
engl.	englisch
et al.	et alii
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FN	Fibronectin
GAG	Glukosaminoglykane
Gal	Galektin-3
GK	Glaskörper
HA	Hyaluronsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGA	Hintere Glaskörperabhebung
Hrsg.	Herausgeber
Ig	Immunglobulin
IGF-I	Insulin-like growth factor I
LEZ	Linsenepithelzellen
LLI	Lamina limitans interna
M	Männlich
min	Minute
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule

mmol/l	Millimol pro Liter
MMP	Matrixmetalloproteasen
MZ	Müllerzellen
µm	Mikrometer
n	Anzahl
nm	Nanometer
NVD	Neovascularisation at the disc
NVE	Neovascularisation elsewhere
PBS	Phosphate buffered saline
PDVR	Proliferative diabetische Vitreoretinopathie
RNA	Ribonucleinacid.
ROP	Retinopathy of prematurity
RT	Raumtemperatur
SF <sub>6</sub>	Sulfurhexafluorid
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TPA	Tissue plasminogen activator
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate
U	Units
VEGF	Vasoendothelial Growth Factor
W	Weiblich
z.B.	zum Beispiel
ZS	Ziegenserum

# 1. Einleitung

Glaskörper und Netzhaut sind über die Lamina limitans interna (LLI), auch als vitreoretinale Grenzschicht bezeichnet (*engl.*: vitreoretinal interface), verbunden. Als Kittsubstanz füllt sie den Raum zwischen dem glattbegrenzten Glaskörperkortex und der unregelmäßigen Oberfläche der Müllerzellen, die der Neuroglia angehören und in der Retina sowohl eine Stütz- als auch eine Stoffwechselfunktion erfüllen. Die Bezeichnung Lamina limitans interna betont ihre Zugehörigkeit zu den Müllerzellen bzw. zur Retina. Untersuchungen an Kaninchen zeigen, dass die LLI von den Endfüßen der Müllerzellen produziert und geformt wird [Uga et al. 1973, Seiler et al. 1995].



**Abb. 1** Schema der vitreoretinalen Grenzregion am hinteren Pol

LLI = Lamina limitans interna, MZ = Müllerzelle

Diese Schicht hat einerseits physiologische Funktionen und spielt andererseits in pathologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Aus diesen Gründen hat sie das Interesse der Forschung auf sich gezogen, denn um therapeutische Ansätze zu entwickeln, müssen zunächst einmal die Pathomechanismen geklärt



sein. Hierfür wiederum sind detaillierte Kenntnisse sowohl über die einzelnen Komponenten als auch über deren Zusammenspiel von grundlegender Bedeutung.

## **1.1 Die Lamina limitans interna**

### **1.1.1 Entwicklung und Aufbau**

Im fetalen Auge ist die LLI verglichen mit der in Augen älterer Individuen sehr dünn. Sie verdickt sich in den ersten Monaten bzw. Jahren des Lebens, besonders am hinteren Pol der Netzhaut. Für die Dicke der LLI im erwachsenen Auge findet man Angaben von 51 nm an der Glaskörperbasis, 306 nm in der Äquator- und 1887 nm in der hinteren Region [Green 1994]. Wegen der unregelmäßigen Begrenzung, besonders in der zentralen Netzhaut, sind diese Daten als Richtwerte anzusehen. Nach der zweiten Lebensdekade ändert sich die Dicke nicht mehr. Die Makula verbleibt als dickste Stelle [Heegaard 1994], während die LLI über den großen Netzhautgefäßen gegenüber der Umgebung verdünnt [Foos 1977] und an der Papille besonders dünn ist (bei Untersuchungen am Affen bis zu 20 nm) [Heegaard et al. 1988].

Am hinteren Pol der Netzhaut ist die innere, also dem Glaskörper zugewandte Grenze der LLI immer glatt, während sich die äußere Oberfläche unregelmäßig darstellt, weil sie dem Verlauf der Müllerzellen folgt [Anderson 1970]. In der Peripherie zeigt die LLI sowohl nach innen als auch nach außen eine glatte Begrenzung [Sebag 1989].

Es besteht eine enge Beziehung zwischen den Kollagenfibrillen des Glaskörpers und der LLI. Manche Fasern durchdringen sie, so dass der Glaskörperkortex punktuell mit den großen Netzhautgefäßen verknüpft ist [Kuwabara et al. 1960]. Hier, aber auch an Papille, Makula und Glaskörperbasis, besteht zwischen Netzhaut und Glaskörper eine besonders feste Anheftung [Sebag 1989]. Diese ist an der Glaskörperbasis am stärksten [Green 1994], denn hier inserieren die Kollagenfasern senkrecht in die

Neuroglia der Netzhaut [Gloor et al. 1975] bzw. in die nichtpigmentierten Epithelzellen des Ziliarkörpers [Gärtner 1986].

Heegard unterschied in der Lamina limitans interna nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen drei Strukturen: die Verbindungspunkte der inserierenden Glaskörperfasern, eine elektronenmikroskopisch dichte (Lamina densa) und eine transparente (Lamina lucida) Schicht [Heegard 1997]. Lichtmikroskopisch zu erkennen ist nur die Lamina densa.

### **1.1.2 Zusammensetzung**

Besonders in den vergangenen Jahren hat mit der Entwicklung immunhistochemischer Techniken das Interesse an der LLI und den Proteinen, die hier vorkommen, zugenommen.

Es sind Veränderungen in der Zusammensetzung während der fetalen Entwicklung und im Verlauf des Lebens festgestellt worden [Russell et al. 1991]. Laut Jerdan et al. besteht die vitreoretinale Grenzschicht beim erwachsenen Menschen aus extrazellulären Matrixproteinen (Fibronektin und Laminin), die daneben noch Kollagen I und IV sowie Proteoglykane enthält [Jerdan et al. 1986b]. Insbesondere in Bezug auf Fibronektin gibt es jedoch widersprüchliche Angaben in der Literatur. Aufgrund seines Aufbaus wäre dieses Strukturprotein hervorragend dafür geeignet, eine Rolle in der Anheftung des Glaskörpers an die LLI und der LLI an die Müllerzellen zu spielen. Während ältere Untersuchungen Fibronektin als Bestandteil der vitreoretinalen Grenzschicht identifiziert haben [Jerdan et al. 1986b, Kohno et al. 1987a], geben Autoren neuerer Studien an, es in der normalen LLI überhaupt nicht gefunden zu haben [Hiscott et al. 1992, Ljubimov et al. 1996]. Kürzlich zeigten Li et al. mittels einer elektronenmikroskopischen immunzytochemischen Technik das Vorkommen von Fibronektin und Laminin in der normalen LLI [Li et al. 2002]. Die Autoren untersuchten dabei allerdings die Quantität der Proteine und beschrieben nicht die morphologische Verteilung.

### 1.1.3 Funktion

Die Lamina limitans interna hat ähnliche Funktionen wie andere Basalmembranen. Sie dient als Filtrationsbarriere für Makromoleküle und als eine strukturelle Grenzregion, die zur Stabilität der Retina beiträgt [Heegaard 1997].

#### 1.1.3.1 Angrenzende anatomische Strukturen

Um die Funktion einer Grenzregion verstehen zu können, müssen auch der Aufbau und die Zusammensetzung der angrenzenden Strukturen bekannt sein.

##### *Glaskörper*

Der Glaskörper ist die größte okuläre Struktur und besteht zu 99% aus Wasser. Seine gelartige Konsistenz resultiert aus einer besonderen Anordnung seiner beiden Hauptbestandteile, Kollagen und Hyaluronsäure (HA). Die 100 µm dicke Schicht des Glaskörpers, die der Netzhaut unmittelbar aufliegt, wird als Glaskörperkortex bezeichnet [Balazs 1961] und besteht aus dicht gepackten, parallel angeordneten Kollagenfibrillen [Theopold et al. 1979]. Nur wenige Zellen kommen im Glaskörper vor. Neben vereinzelt Fibroblasten [Balazs et al. 1980] handelt es sich hauptsächlich um Hyalozyten, die in den Glaskörperkortex eingebettet sind. Sie liegen verstreut, ca. 20-50 µm von der LLI entfernt [Sebag 1992]. Da sie diverse Proteine synthetisieren, wird der Glaskörperkortex auch als „metabolische Zentrum“ des Glaskörpers bezeichnet.

Das wichtigste Strukturprotein des Glaskörpers ist das Kollagen. Es besteht aus drei Polypeptid-Strängen, die räumlich in einer stabilen Tripelhelix angeordnet sind. Kollagen neigt zur Selbstorganisation in größeren Strukturen. Es bildet unlösliche Fasern, die überall im Organismus in der Matrix und im Bindegewebe vorkommen. Das Glaskörperkollagen gehört dem Typ II an und sein höchster

Anteil wurde an der Glaskörperbasis und im Glaskörperkortex gefunden [Gloor 1975].

Die HA gehört zu den Glukosaminoglykanen (GAG), die die Grundsubstanz der extrazellulären Matrix bilden. GAGs bestehen aus repetitiven Disaccharid-Einheiten, im Falle der HA aus Glukuronsäure und N-Acetylglukosamin. Die höchsten Mengen an HA werden im Glaskörperkortex gefunden. Die HA kann einige tausend Monosaccharid-Reste enthalten und hat ein Molekulargewicht von  $3-4,5 \times 10^6$ D. Die unverzweigten Ketten des Moleküls sind helixartig gewunden mit nach außen gerichteten Carboxylat-Gruppen. Die starke Hydratisierung dieser Gruppen befähigt HA Wasser bis zum 10000-fachen ihres Eigenvolumens gelartig zu fixieren. Durch Glykoproteine werden HA und Kollagen verbunden [Baker et al. 1978]. Außerdem können HA-Moleküle sowohl untereinander als auch mit anderen Proteinen, z.B. Fibronektin, interagieren [Ueno et al. 1991].

Der Glaskörper enthält noch weitere GAGs, z.B. Chondroitin-4-Sulfat (13%) und Heparansulfat (0,5%) [Kamei et al. 1982].

### *Netzhaut*

Wird die LLI von der Netzhaut abgetrennt, zeigt sich darunter eine mosaikartige Anordnung von Fußplatten der Müllerzellen und an der äußeren Oberfläche der abgelösten LLI ein Abdruck dieses Musters [Hara 1994]. Die Müllerzellen durchspannen die gesamte Netzhaut und verbreitern sich zu kegelförmigen Ausläufern unterhalb der LLI. Diese Fortsätze liegen dicht an dicht, so dass sich in der Aufsicht eine polygonale Anordnung ergibt [Heegaard 1997]. In der Seitenansicht ist die Oberfläche in den hinteren Netzhautregionen unregelmäßig und in der Peripherie glatt begrenzt.

Die von den Müllerzellen produzierte und geformte LLI wird auch als deren Basalmembran angesehen [Sebag 1992, Heegaard 1997].

### 1.1.3.2 Verbindung dieser Strukturen durch die LLI

Die LLI vermittelt die Anheftung des Glaskörpers an die Netzhaut. Diese Adhäsion ist laut Sebag nicht an bestimmte Punkte gebunden, sondern diffus über den hinteren Pol verteilt. Die Verbindung zwischen Glaskörperkortex und LLI ist hier in der Jugend sogar stärker als die Müllerzellen selber [Sebag 1991], doch sie wird im Verlauf des Lebens schwächer. Welche Moleküle hierfür verantwortlich sind, ist bisher unklar, weil man die genaue Zusammensetzung der LLI noch nicht kennt (siehe 1.1.2). Auch der Mechanismus, über den diese Moleküle dann mit den Proteinen des Glaskörpers verbunden werden, ist unbekannt.

Gerade die besonders feste Anheftung der Glaskörperbasis an die vorderen Abschnitte der Retina lässt spezifische Adhäsionsmoleküle erwarten. In diesem Zusammenhang sind Galektine ( $\beta$ -Galaktose bindende Proteine) interessant, die über spezifische Oligosaccharidstrukturen sowohl an Proteine der extrazellulären Matrix als auch an Zelloberflächenproteine binden können [Barondes et al. 1994]. Von den zehn bisher bekannten Mitgliedern der Galektin-Familie ist in den letzten Jahren insbesondere Galektin-3 Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Als multifunktionales Signalmolekül wirkt es mit in Entwicklung, Onkogenese und Entzündungsprozessen [Kaltner et al. 1998, Perillo et al. 1998]. Unter den Galektinen zeichnet es sich durch die besondere Fähigkeit zur Selbstaggregation aus [Hsu et al. 1992, Massa et al. 1993]. Dadurch wird Galektin-3 zu einem multivalenten Oligomer, das Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln kann. So könnte es eine Brückenfunktion zwischen Glaskörper und LLI sowie zwischen LLI und Müllerzellen einnehmen.

Der Nachweis von Galektin-3 wurde bisher in der Linse des Schafauges [Gonen et al. 2000] sowie in der Netzhaut von Ratten und Rindern geführt, wobei sich das Lektin vorwiegend in den Müllerzellen fand [Uehara et al. 2001]. Das Vorkommen von Galektin-3 im menschlichen Auge wurde bisher nicht untersucht.

### **1.1.4 Klinische Bedeutung**

An der vitreoretinalen Grenzschicht spielen sich pathologische Prozesse ab, wie z.B. die Abhebung des Glaskörpers oder die Proliferation von Netzhautgefäßen in den Glaskörper.

#### **1.1.4.1 Hintere Glaskörperabhebung**

Die Trennung von Glaskörperkortex und Netzhautoberfläche wird als hintere Glaskörperabhebung (HGA) bezeichnet und ist eine Altersveränderung. Von klinischer Relevanz ist die Unterscheidung zwischen partieller und vollständiger HGA, wobei von vollständiger HGA auch dann gesprochen wird, wenn der Glaskörper weiterhin an der Papille hängt.

Die Vorstellung des Pathomechanismus ist folgende: Die initiale Veränderung ist eine Verflüssigung des Glaskörpers [Foos et al. 1982, Larsson et al. 1985] und wird Syneresis genannt. Durch zwei präformierte Löcher (präpapillär und prämakulär) im Glaskörperkortex gelangt die Flüssigkeit zwischen Glaskörperrinde und Netzhaut, wo sie durch Augenbewegungen verschoben wird. Diese führt allmählich zu einer vollständigen HGA [Lindner 1966, Eisner 1973, Sebag 1987].

Eine Sonderform der HGA ist die Vitreoschisis [Balazs 1973], bei der sich der Glaskörperkortex parallel zur Netzhautoberfläche spaltet.

#### **1.1.4.2 Proliferative vitreoretinale Erkrankungen**

Bei der Proliferation von Netzhautgefäßen handelt es sich um eine unspezifische Reaktion, die bei verschiedenen systemischen und okulären Erkrankungen auftritt. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist ein morphologischer Unterschied im Krankheitsbild von jungen und alten Augen.

*Frühgeborenenretinopathie (engl. Retinopathy of prematurity - ROP)*

Die Frühgeborenenretinopathie – Hauptursache der Erblindung von Kindern in der entwickelten Welt – ist eine Erkrankung mit Proliferation von Gefäßen der unreifen Netzhaut von Frühgeborenen [Quinn et al. 1991].

Zum Zeitpunkt der Geburt ist die Netzhaut der Frühgeborenen noch nicht vollständig vaskularisiert. Bei den Kindern, die eine ROP entwickeln, verlangsamt sich nach der Geburt das Gefäßwachstum oder es hört sogar auf [Flynn et al. 1977]. Die heranreifende periphere Retina bleibt nicht-vaskularisiert und wird hypoxisch. Daraufhin kommt es nach einigen Wochen zu überschießenden und unkontrollierten Neovaskularisationen.

Als Ursache nahm man bis vor einigen Jahren die aggressive Beatmung der Frühgeborenen mit hohen Sauerstoffkonzentrationen an. Diese sollte eine toxische Wirkung auf die Endothelzellen der unreifen Netzhautkapillaren haben. Heutzutage ist man eher zurückhaltend mit dem Sauerstoffeinsatz. Trotzdem existiert die Krankheit weiterhin und so zeigte sich, dass der Sauerstoffgehalt des Patienten kein signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung einer ROP ist [Simons et al. 1999].

Heute geht man davon aus, dass der größte Risikofaktor der Grad der „Unreife“ des Säuglings selbst ist. Die Inzidenz der ROP (65,8% bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von 1250 g und weniger) und die Schwere der Erkrankung korrelieren mit geringem Geburtsgewicht und niedrigem Gestationsalter [Palmer et al. 1991]. Interessanterweise korreliert ebenso der Wachstumsfaktor IGF-I (insulin-like growth factor I) mit den beiden Faktoren Geburtsgewicht [Giudice et al. 1995] und Gestationsalter [Smith et al. 1997]. In aktuellen Modellen zur Pathogenese der ROP wird IGF-I eine entscheidende Rolle zugeordnet (siehe unten).

Ophthalmoskopisch werden fünf Stadien der Erkrankung unterschieden: Zunächst sieht man zwischen avaskulärer und zentral vaskularisierter Netzhaut eine dünne, scharf begrenzte Demarkationslinie (Stadium I), die zu einer prominenten Leiste wird (Stadium II). An dieser Stelle wachsen fibrovaskuläre Proliferationen in den Glaskörper ein (Stadium III), durch die es zu einer Abhebung der peripheren Netzhaut kommen kann (Stadium IV). Bei vollständiger Netzhautablösung bildet sich ein zentraler Netzhauttrichter aus

(Stadium V) [The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity 1984].

### *Proliferative diabetische Vitreoretinopathie (PDVR)*

Eine Erkrankung des erwachsenen Auges, bei der es zu Gefäßproliferationen in den Glaskörper kommt, ist die proliferative diabetische Vitreoretinopathie (PDVR). Sie tritt bei insulinpflichtigen Diabetikern mit Diabetesbeginn vor dem 30. Lebensjahr mit einer Prävalenz von 1,2% nach zehn Jahren und 67% nach mehr als 35 Jahren Diabetesdauer auf [Klein et al. 1984]. Während man diese Erkrankung früher ausschließlich der Netzhaut zugeordnet und deshalb von der proliferativen Form einer diabetischen Retinopathie gesprochen hat, wird heute die Glaskörpergrenzschicht in das Krankheitsbild einbezogen. Folgerichtig verwendet man nun den Begriff der proliferativen diabetischen Vitreoretinopathie [Faulborn et al. 1986, Kroll et al. 1987, Hendrikse et al. 1993]. Hierbei kommt es zu Neovaskularisationen, die in den meisten Fällen zuerst auf der Papille (*engl.* neovascularisation at the disc = NVD), aber auch im Bereich der übrigen Netzhaut entstehen (*engl.* neovascularisation elsewhere = NVE). Da die LLI von den neugebildeten Gefäßen durchbrochen wird, spielt sie in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. Sie ist durch Anreicherung von Fibronektin, Laminin und Kollagen IV verdickt [Kohno et al. 1987b, Ljubimov et al. 1996, Roy et al. 1996]. Nicht nur in der vitreoretinalen Grenzschicht, sondern auch im Glaskörper selbst, lässt sich vermehrt Fibronektin nachweisen. Schon bevor es zu proliferativen Veränderungen kommt, besteht laut Dunker et al. für Fibronektin eine inhomogene vermehrte Anfärbarkeit im Bereich des Glaskörperkortex, insbesondere in Netzhautnähe [Dunker et al. 1998]. Im weiteren Verlauf korreliert die Fibronektinmenge mit der Schwere der Erkrankung [Weller et al. 1988]. Für die Herkunft des Fibronektins gibt es zwei Möglichkeiten: Erstens wird die – auch in der normalen erwachsenen Netzhaut stattfindende – Produktion dieses Proteins im diabetischen Auge hochreguliert [Roy et al. 1996] und zweitens kommt es zum Zusammenbruch der Blut-



Retinaschranke [Cunha-Vaz et al. 1975], wodurch Fibronektin aus dem Serum ins Auge gelangen könnte.

Die neugebildeten Gefäße durchbrechen die Netzhaut und nutzen die veränderte Glaskörpergrenzschicht als Leitstruktur für ihr Wachstum [Faulborn et al. 1985]. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kontrahiert sich der Glaskörper, vermutlich verursacht durch Serumproteine (z.B. Faktor XIIIa) [Akiba et al. 1995], die durch die permanente Störung der Blut-Retinaschranke in den Glaskörper gelangen. Treten nun Traktionen auf, kommt es zu verschiedenen Pathologien im Auge, wie z.B. zu einer Glaskörperblutung, zu Netzhautabhebungen oder -löchern, und – bei Zug an der Papille – zu einer Optikusneuropathie [Kroll et al. 1999].

Die Blutungen entstehen durch Zugkräfte an den Gefäßen, die so stark sind, dass Gefäße rupturieren können. Sie sind zwischen Netzhaut und Glaskörperkortex (subhyaloidal) lokalisiert oder verteilen sich diffus im Glaskörper, was eine plötzliche Sehverschlechterung verursacht. Zwar erfolgt die Resorption oft im Verlauf von Wochen bis Monaten, doch blutet es meist rezidivierend infolge fortschreitender Glaskörperschrumpfungen.

Die traktiven Netzhautablösungen treten in späten Stadien der Erkrankung auf. Sie entstehen durch Schrumpfung des Glaskörpers und fibrovaskuläre Proliferationen, die fest an der Netzhaut anhaften. Bei einem partiell abgehobenen Glaskörper ist mit einer raschen Progredienz des proliferativen Prozesses zu rechnen [Jalkh et al. 1982], während umgekehrt bei vollständig abgehobenen Glaskörper sogar eine Rückbildung von proliferierenden Gefäßen und Membranen beobachtet wurde [Davies 1965]. Kontrahieren sich fibrovaskuläre Membranen entlang der temporalen Gefäßstraßen, so entwickelt sich eine ringförmige Netzhautablösung am hinteren Pol, die die Makula mit einbezieht. Eine umschriebene Ablösung kann auch an peripher gelegenen Netzhautanteilen entstehen und sich langsam nach zentral ausdehnen. Das Risiko, dass hierbei innerhalb eines Jahres die Makula betroffen wird, liegt bei etwa 14% [Charles et al. 1981].

Schließlich kann sich eine vollständige Netzhautablösung entwickeln, wobei häufig eine deletäre Rubeosis iridis beobachtet wird. Das Endstadium der unbehandelten PDVR ist das blinde schmerzende Auge.

### *Pathogenese der Neovaskularisation*

Die Angiogenese ist durch vier Phasen charakterisiert [Folkman et al. 1992]. Voraussetzung für ein Auswachsen von Endothelzellen ist die Destruktion der Basalmembran (1). Es folgt die Proliferation und Migration von Endothelzellen (2). Schließlich formt sich ein Gefäßlumen (3), und Perizyten umhüllen das neugeformte Gefäß (4).

Die Proliferation von Endothelzellen, die unter physiologischen Bedingungen in einer vollständig vaskularisierten Netzhaut ruhen [Engerman et al. 1967], ist die zelluläre Antwort auf eine Minderperfusion der Netzhaut. Folge der Minderperfusion ist eine Ischämie, die gegenwärtig als notwendige Voraussetzung einer Gefäßneubildung (Angiogenese) angesehen wird.

Es wird angenommen, dass nach Abschluss der retinalen Vaskularisation ein Gleichgewicht zwischen angiogenesefördernden und -hemmenden Faktoren besteht. Der primäre Stimulus einer Gefäßneubildung ist eine Hypoxie, die unter anderem zur Freisetzung von VEGF (*engl.* Vasoendothelial Growth Factor) aus Astrozyten und/oder Müllerzellen der Netzhaut führt [Pe'er et al. 1995, Pierce et al. 1995, Stone et al. 1995]. Dieser Faktor, dessen Konzentration im Auge sowohl bei der PDVR [Spirin et al. 1999] als auch bei der Frühgeborenenretinopathie [Donahue et al. 1996] erhöht ist, steigert die Permeabilität der Gefäßwände und hat eine angiogene Wirkung [Aiello 1997].

Zellbiologisch konnte außerdem eine entscheidende Rolle des Wachstumsfaktors IGF-I für die Gefäßentwicklung gezeigt werden [King 1985]. Die normale Vaskularisation beginnt im vierten Schwangerschaftsmonat von der Papille aus und ist zwischen der 38. und der 40. Schwangerschaftswoche abgeschlossen. IGF-I ist entscheidend für die normale Ausdifferenzierung der Netzhautgefäße [Hellstrom et al. 2001] und fällt nach der Geburt auf ein Minimum ab, u.a. weil die Aufnahme aus dem Fruchtwasser dann fehlt

[Lineham et al. 1986]. Bei Frühgeborenen, selten auch bei Reifgeborenen, ist die periphere Netzhaut zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht vollständig vaskularisiert. Nach der Geburt kommt es auch bei ihnen zu einem Abfall des IGF-I-Spiegels und deshalb zum Stillstand des Gefäßwachstums. Mit der weiteren Entwicklung wird die wachsende, aber nicht-vaskularisierte Netzhaut hypoxisch. Daraufhin kommt es zur Ausschüttung von VEGF, einem angiogenen Faktor, das sich im Glaskörper anreichert [Aiello et al. 1994, Miller et al. 1997]. Für die maximale Wirkung von VEGF ist eine Mindestkonzentration von IGF-I notwendig [Hellström et al. 2001]. Im Rahmen des weiteren Wachstums steigt IGF-I langsam an und erreicht schließlich diesen Schwellenwert. Da hohe VEGF-Spiegel vorliegen, kommt es nun ein zu einer überschießenden Vaskularisation und damit zur Ausbildung von Proliferationen von der Demarkationsleiste in den Glaskörper hinein.

Ähnliche Zusammenhänge vermutet man bei der PDVR: Häufig verschlechtert sich diese mit Beginn der Insulin-Therapie zunächst und es kommt zur Zunahme der Neovaskularisationen. Der IGF-I-Spiegel – beim unbehandelten Diabetes niedrig – erhöht sich durch die Insulin-Therapie und ermöglicht dann die VEGF-induzierten Pathologien [Smith et al. 1999]. Der Schwellenwert von IGF-I wird überschritten, sodass VEGF seine Schlüsselrolle bei der Neubildung der Gefäße erfüllen kann.

Man geht außerdem davon aus, dass das multifunktionelle Protein Fibronectin eine wichtige Rolle in der Ausbildung der VEGF-induzierten proliferativen Veränderungen darstellt. Ein Hinweis hierauf ist das Auftreten von Fibronectin im Tiermodell in der Zone der Vaskulogenese der Netzhaut, und zwar kurz bevor sich das Gefäß formt [Jiang et al. 1994]. Fibronectin heftet Zellen an extrazelluläre Matrices, hat aber andererseits aufgrund seiner chemotaktischen Wirkung [Campochiaro et al. 1984] eine wichtige Funktion in der Zellwanderung. Eine veränderte Fibronectinkonzentration kann deshalb die Interaktionen zwischen Zellen und ihrer Umgebung beeinflussen [DiMilla et al. 1993].

### 1.1.4.3 Therapieansätze

Besteht eine vollständige hintere Glaskörperabhebung bereits im nichtproliferativen Stadium der diabetischen Vitreoretinopathie, so kann sich an diesem Auge keine traktive Netzhautablösung entwickeln [Foos et al. 1980; Akiba et al. 1990a]. Des Weiteren ist die Prognose der proliferativen diabetischen Vitreoretinopathie bei nur partiell abgehobenem Glaskörper wesentlich schlechter als bei einer kompletten HGA [Jalkh et al. 1982].

Aus diesen Feststellungen leitet sich das entscheidende therapeutische Ziel bei proliferativen Erkrankungen ab: die vollständige Trennung der Netzhaut von diesen pathologischen Veränderungen. Bisher steht dazu das mechanische Verfahren der Pars-plana-Vitrektomie zur Verfügung, das in den vergangenen Jahrzehnten entwickelt und verfeinert wurde, jedoch immer noch das Risiko der Beschädigung der Netzhaut birgt.

Neue Ansätze beinhalten die enzymatische Trennung von Glaskörper und Netzhaut, die mit geringerer Belastung des Patienten möglichst gewebeschonend eine hintere Glaskörperabhebung induzieren soll. Seit mehreren Jahren ist in der Augenheilkunde tissue plasminogen activator (TPA) gebräuchlich [Hesse 1997, Hesse 2001]. Die intravitreale Injektion von TPA erleichtert die vollständige Entfernung des Glaskörpers bei PDVR und ergänzt dadurch die chirurgische Behandlung [Hesse et al. 1999a].

TPA hat zwar selbst nur eine vernachlässigbare proteolytische Wirkung, doch aus der Vorstufe Plasminogen aktiviert es die Serinprotease Plasmin. Dieses Enzym ist in der Lage, die Glykoproteinkomponente (Laminin und Fibronectin) von Basalmembranen zu spalten [Liotta et al. 1981]. Im Tiermodell (Schwein und Kaninchen) ist die Abhebung des Glaskörpers nach Injektion sowohl von Plasmin [Verstraeten et al. 1993, Hikichi et al. 1999, Gandorfer et al. 2001] als auch von TPA [Hesse et al. 2000b] nachgewiesen worden. Es bestehen jedoch erhebliche Unterschiede zwischen den vitreoretinalen Grenzschichten von verschiedenen Spezies. So hat beispielsweise die LLI des Kaninchens im Gegensatz zu der des Menschen eine konstante Dicke in allen Bereichen des hinteren Fundus. Außerdem existiert eine strenge Trennung zwischen

Glaskörper und LLI, weil die Kollagenfibrillen des Glaskörpers nicht bis in die LLI reichen [Matsumoto et al. 1984]. Beim Schwein ist die Verbindung zwischen Glaskörper und Netzhaut besonders stark und der Glaskörper löst sich nicht – wie beim älteren Menschen – spontan ab [Gandorfer et al. 2001]. Zu den Effekten von Plasmin auf die menschliche vitreoretinale Grenzschicht existieren bisher zwei Untersuchungen: Gandorfer et al. zeigten elektronenmikroskopisch eine Spaltung zwischen LLI und Glaskörperkortex [Gandorfer et al. 2002]. Li et al. bestätigten dies [Li et al. 2002]. Weiterhin unbekannt bleibt bei dieser morphologischen Untersuchung allerdings, welche molekularen Strukturen vom Plasmin angegriffen wurden. Li et al. untersuchten zwar auch den Effekt auf Laminin und Fibronectin, doch erstens betrachteten sie lediglich den hintern Pol des Auges und zweitens beschrieben sie die Abnahme der Konzentration der Proteine in der LLI quantitativ. Eine morphologische Betrachtung der Anordnung des Fibronectins – beispielsweise als Doppelschicht oder diffus in der LLI – fehlt.

## **1.2 Fragestellung**

Bei den beiden vorgestellten Krankheitsbildern (ROP und PDVR) liegt der gleiche Pathomechanismus zugrunde, nämlich eine ischämieinduzierte Ausschüttung von VEGF, die bei Anwesenheit von IGF-I oberhalb eines Schwellenwertes zu Neovaskularisationen führt. Bei der Erkrankung am alten Auge, der PDVR, entstehen die Proliferationen in den meisten Fällen auf der Papille, während bei der Frühgeborenenretinopathie ausschließlich die Peripherie betroffen ist.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die strukturellen Voraussetzungen beim Neugeborenen und beim Erwachsenen unterschiedlich sind und dadurch die jeweilige Lokalisation der Entstehung solcher Gefäßneubildungen begünstigt.

Da sich diese Vorgänge an der Grenzschicht zwischen Glaskörper und Netzhaut abspielen, liegt die Basis zum Verständnis dieser Vorgänge zunächst in einer genauen Kenntnis der Zusammensetzung und der Entwicklung sowie

der Veränderungen durch einen krankhaften Zustand. Dadurch sind Rückschlüsse auf die Pathogenese möglich und Möglichkeiten zum therapeutischen Eingreifen ableitbar. Besonders von Interesse sind hier einerseits das bei Zelladhäsion und -migration mitwirkende Glykoprotein Fibronectin und andererseits das Adhäsionsprotein Galektin-3, das eine Brückenfunktion in der Verbindung zwischen LLI und den Müllerzellen einnehmen könnte.

Im Auge gibt es natürlich noch andere Verbindungen zwischen Strukturen der extrazellulären Matrix und Zellen. Ein Beispiel von klinischem Interesse stellt die besonders feste Anheftung der Linsenkapsel an die Epithelzellen dar. Diese in der Kataraktchirurgie relevante Struktur soll mitbetrachtet werden, um eventuelle Parallelen zum Adhäsionsmechanismus der LLI aufzudecken.

Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Wie ist die vitreoretinale Grenzschicht zusammengesetzt bzw. welche Rolle spielen dabei Fibronectin und Galektin-3?

Hierzu wurden Augen von Erwachsenen mit Hilfe der Immunfluoreszenz bzw. Immunhistochemie untersucht.

2. Wann entwickelt sich die LLI?

Um diese Frage zu beantworten, wurde das Auftreten von Fibronectin und Galektin-3 in verschiedenen Stadien der Entwicklung des Auges untersucht. Dieses ist für Fibronectin zwar schon an diversen Tiermodellen geschehen [Peterson et al. 1995, Hilfer 1993], doch noch nie zuvor am menschlichen Auge.

3. Wie verändert sich die LLI aufgrund einer Störung der Blut-Retinaschranke und der Ausschüttung von VEGF?

Ebenso wie beim diabetischen Auge ist bei Augen mit einem malignen Melanom das Auftreten dieser beiden Phänomene bekannt [Kincaid et al.

1994]. Deshalb wurde die LLI bei Augen betrachtet, die aufgrund eines solchen Tumors enukleiert worden waren.

4. Gibt es Parallelen zwischen der Adhäsion zwischen LLI und Netzhaut einerseits und Linsenkapsel und Linsenepithelzellen andererseits?

5. Was bewirkt das Enzym Plasmin?

Um den therapeutischen Effekt des TPA-Einsatzes zu erklären, muss zunächst die Wirkung von Plasmin an der menschlichen LLI bekannt sein.

Mit Plasmin vorbehandelte Augen wurden mit dem unbehandelten Partnerauge verglichen, insbesondere bezüglich des Vorkommens von Fibronectin in der LLI.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungsgut

#### 2.1.1 Adulte Augen

Mit Genehmigung der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg wurden morphologisch unauffällige Spenderaugen untersucht, die sofort nach Entnahme gekühlt und innerhalb von 16 Stunden postmortem fixiert oder eingefroren wurden. Der größte Anteil der Bulbi wurde uns freundlicherweise von der Hornhautbank der Medizinischen Hochschule Hannover überlassen. Vier Augenpaare stammten von Hornhaut-Explantationen, die in der Augenklinik Marburg durchgeführt wurden.

#### *Fibronektin-Untersuchung* (siehe Tab. 7, Anhang)

Insgesamt wurden 19 Augen von 17 Patienten untersucht. Von den 19 waren 13 Augen vorher eingefroren. Das Alter der Augen lag zwischen 37 und 76 Jahren (mittleres Alter 57 Jahre). Es handelte sich um zwei weibliche Spenderinnen und 15 männliche Spender.

#### *Plasmin-Untersuchung* (siehe Tab. 8, Anhang)

Untersucht wurden elf Augenpaare, von denen sechs vorher eingefroren waren. Von den elf Paaren waren drei von weiblichen und acht von männlichen Hornhaut-Spendern. Das Alter der Augen lag zwischen 37 und 76 Jahren (mittleres Alter 53 Jahre).

#### *Galektin-Untersuchung* (siehe Tab. 9, Anhang)

Wir untersuchten sechs Augen von sechs Patienten (vier weiblich und zwei männlich), wobei das jüngste Auge 41 Jahre und das älteste 65 Jahre alt war (mittleres Alter 55 Jahre).



### **2.1.2 Fetale Augen**

*Fibronektin-Untersuchung* (siehe Tab. 10, Anhang)

Von 18 Feten (13. bis 32. Schwangerschaftswoche) wurde jeweils ein Auge untersucht. Hierbei stammten 11 aus dem Institut für Humangenetik und sieben aus dem Medizinischen Zentrum für Pathologie der Philipps-Universität Marburg.

Ausschlusskriterium war ein nach der Färbeprozedur auf den Präparaten nicht mehr nachweisbarer Glaskörper.

*Galektin-Untersuchung* (siehe Tab. 11, Anhang)

Von den oben beschriebenen fetalen Augen wurden sechs auf das Vorkommen von Galektin-3 untersucht. Das Gestationsalter lag zwischen der 13. und 22. Schwangerschaftswoche.

### **2.1.3 Augen mit Melanom der Uvea** (siehe Tab. 12, Anhang)

Es wurden zehn Augen untersucht, die aufgrund eines malignen Melanoms der Aderhaut enukleiert worden waren. Diese stammten aus dem Funktionsbereich Ophthalmopathologie des Medizinischen Zentrums für Augenheilkunde (Philipps-Universität Marburg).

Das Alter der enukleierten Augen lag zwischen 51 und 85 Jahren (mittleres Alter 71 Jahre).

## **2.2 Material**

### **2.2.1 Geräte**

Leitz Diaplan Fluoreszenzmikroskop (Fa. Leitz, Wetzlar)

Fotoautomat WILD MPS 46 (Fa. Wild Leitz, Wetzlar)

Schlittenmikrotom (Fa. Jung, Heidelberg)

Magnetrührer Modell IKA-Combimag RCH (Fa. IKA Labortechnik, Staufen)

Pipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Wasserbad (Fa. GFL, Burgwedel)

Wärmeschrank (Fa. Memmert, Schwabach)

Mikrowelle (Fa. Bauknecht, Schorndorf)

Fettstift (PAP-Pen, Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich)

Objektträger (Fa. Menzel, Braunschweig)

Deckgläser (Fa. Menzel, Braunschweig)

### 2.2.2 Antikörper

Fibronektin:

Primärantikörper: Rabbit Anti-Human Plasma Fibronectin

Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark

Sekundärantikörper: Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate (TRITC)-  
conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG

Fa. dianova, Hamburg

Galektin-3:

Primärantikörper: Mouse Anti-Human Galectin-3

Fa. Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA

Sekundärantikörper: Biotinyliert, Anti-Maus

Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark

### 2.2.3 Plasmin

Bei Plasmin handelt es sich um ein Enzym, das den Serinproteasen zugeordnet wird. Das aus zwei Ketten bestehende Molekül wird durch Aktivatoren, z.B. TPA (tissue plasminogen activator) und UPA (urokinase plasminogen activator), aus dem Proenzym Plasminogen freigesetzt. Mit einer Spezifität, die dem Trypsin

ähnelt, spaltet die Protease Lys- und Arg-Bindungen [Castellino 1998]. Eine wichtige Funktion des Plasmins ist die Fähigkeit, Proteine der extrazellulären Matrix abzubauen [Mullin et al. 1983].

Plasmin: Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

## 2.2.4 Lösungen und Chemikalien

PBS (phosphate buffered saline): 140 mM NaCl, 2,5mM KCl, 6,5 mM NaHPO<sub>4</sub>,  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,25

aqua dest.: Deionisiertes, sterifiltriertes Wasser, das über eine spezielle Anlage (Typ UV-plus Fa. SG Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH, Hamburg) gereinigt wurde.

Tissuewax: Fa. Medite, Burgdorf

Histo-Comp: Fa. Vogel, Giessen

Ziegenserum: Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark  
Portionsweise Aufbewahrung bei -20°C

Silan: 3-(Triethoxysilyl)-propylamin  
Fa. MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn

Hämalaun (nach Mayer): 1 g Hämatoxylin (Fa. Merck, Darmstadt) wurde in 1 L aqua dest. gegeben, dann 0,2 g Natriumjodat (NaJO<sub>3</sub>) und 50 g chem. Kalialaun über Nacht gelöst. Es wurden 50 g Chloralhydrat und 1 g kristallisierte Zitronensäure hinzugefügt.  
Die Lösung wurde jeweils vor Anwendung filtriert.

Eosinlösung: 1 g Eosin (Fa. Merck, Darmstadt) in 1 L aqua dest.

Avidin-Biotin-Komplex:	StreptABComplex/HRP Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark
AEC:	AEC Substrate System Fa. DAKO, Carpinteria, CA, USA
Vector NovaRed:	Fa. Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Tris-HCl-puffer:	2,42 g Tris (Trishydroxymethylamino-methan)- Base wurden in 90 ml aqua dest. gegeben, die Lösung mit 1 N HCl auf pH 8,5 eingestellt und mit aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.
Mowiol:	12 g Mowiol Typ 88-4 (Fa. Hoechst, Frankfurt) wurden in 30 ml aqua dest. eingerührt. 60 ml Tris-HCl-puffer (pH 8,5) wurden dazugeben und die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am nächsten Tag wurde die Lösung für 45 min auf 90°C erhitzt und nach langsamer Abkühlung auf 50°C wurden 30 g Glycerin (Fa. ICN Aurora, Ohio) eingerührt. Das Gemisch wurde portionsweise bei -20°C aufbewahrt und zum Gebrauch auf RT aufgetaut.
Entellan:	Fa. Merck, Darmstadt

## 2.3 Methodik

### 2.3.1 Herstellung der Silan-Objektträger

Damit die sehr feinen Strukturen, wie z.B. die des Glaskörpers, besser am Objektträger haften und während der FärbeprozEDUREN erhalten blieben,

wurde die Oberfläche des Objektträgers silanisert. Hierzu wurden sie für 5 min in eine Mischung aus 1 ml 3-Triethoxysilyl-propolamin und 50 ml Aceton gebracht. Nach jeweils zweimaligem Spülen für 5 min in Aceton und aqua dest. wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet.

### 2.3.2 Vorbehandlung mit Plasmin

#### *Gruppe A*

Bei sechs Augenpaaren, die nach der Entnahme der Hornhaut eingefroren worden waren, wurde anhand eines Protokolls nach dem Auftauen 0,5 U Plasmin in 0,25 ml PBS in den Glaskörper des einen Auges bei Raumtemperatur injiziert. Das Partnerauge erhielt als Kontrolle 0,25 ml PBS. Nach sechs Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden beide Augen in 3,8%igem Formaldehyd fixiert, wodurch dann die enzymatische Aktivität des Plasmins gestoppt wurde. Das weitere Verfahren erfolgte wie bei allen anderen Augen.

#### *Gruppe B*

Bei fünf Augenpaaren wurde direkt nach der Hornhautentnahme in das eine Auge Plasmin und in das andere PBS injiziert (Verfahren siehe oben, Protokoll siehe Abb. 28, Anhang). Die Inkubation erfolgte allerdings für nur eine Stunde bei Raumtemperatur. Beide Augen wurden dann in 3,8%igem Formaldehyd fixiert und wie gewohnt weiter behandelt.

**Tab. 1** Plasmin-Vorbehandlungen

	<b>Anzahl der Augenpaare</b>	<b>Eingefroren (Ja/Nein)</b>	<b>Inkubationszeit</b>
<b>Gruppe A</b>	6	Ja	6 Std
<b>Gruppe B</b>	5	Nein	1 Std

### 2.3.3 Entfernung des Nervus opticus vor der Galektin-3-Färbung

Um Fixationsartefakte auszuschließen, wurde bei drei der sechs untersuchten adulten Spenderaugen zunächst mit einem Skalpell der Nervus opticus mit umgebendem Skleragewebe entfernt (Protokoll siehe Abb. 29, Anhang).

### 2.3.4 Fixierung, Entwässerung und Einbettung

Die Fixierung der Augen erfolgte in 3,8% PBS-gepufferten Formalin über mindestens 24 Stunden bei 4°C. Über Nacht wurden sie dann in fließendes Wasser und anschließend in 70%igen Alkohol gebracht.

Nun wurden die Augen folgendermaßen aufgeschnitten: Zunächst wurde die Linse vorsichtig herausgelöst und anschließend der Bulbus auf der Höhe des Sehnervs halbiert. Die entstandenen drei Gewebeteile wurden getrennt eingebettet. Sehr kleine fetale Augen wurden nicht aufgeschnitten, um die feinen Strukturen nicht zu beschädigen.

Die Präparate wurden in den Gewebereinbettautomaten gegeben, der nach folgendem Programm arbeitete:

70% Alkohol	¼ Stunde
80% Alkohol	½ Stunde
90% Alkohol I	½ Stunde
90% Alkohol II	1 Stunde
100% Alkohol I	1 Stunde
100% Alkohol II	1 Stunde
100% Alkohol III	1 Stunde
n-Butylacetat I	1 Stunde
n-Butylacetat II	1 Stunde
n-Butylacetat III	2 Stunden
Paraffin I	2 Stunden
Paraffin II	2 Stunden

Alle Präparate wurden in Tissuewax® eingebettet, mit Ausnahme der Linsen, für die Histo-Comp® verwendet wurde.

### **2.3.5 Herstellung der Schnitte**

Auf einem Schlittenmikrotom wurden die durch Paraffin-Einbettung erhaltenen Gewebeblöcke mit einer Schichtdicke von 4 µm bzw. 8 µm geschnitten. Es wurden Serien mit jeweils drei Schnitten angefertigt, denn zwei Präparate wurden für die Immun- und eins für die HE-Färbung benötigt. Die Schnitte wurden bei 40°C auf einem Wasserbad gestreckt, auf silanisierte Glasobjektträger aufgezogen und über Nacht bei 40°C im Wärmeschrank getrocknet. Um das Paraffin vom Schnitt zu lösen, wurden die Objektträger für zweimal 5 min in Rotihistol gegeben und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (je 5 min in Isopropanol, 96%, 80% und 70% Ethanol, 2-3 min in aqua dest.).

### **2.3.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)**

Um Gewebestrukturen histologisch eindeutig zuordnen zu können, färbt man die zu untersuchenden Schnitte in der HE-Färbung mit unterschiedlichen Farbstoffen (Hämatoxylin: blau, Eosin: rot) an. Diese Routinefärbung erfolgte an jeweils einem Schnitt pro Serie nach folgendem Schema:

Die rehydrierten Schnitte wurden für 3 min in Hämalaun und für 10 min in fließendes Leitungswasser gebracht. Es folgten 15 min in 0,1 % wässrigem, gelblichen Eosin. Zur Dehydrierung wurden die Schnitte kurz in 80%igen und dann in 90%igen Alkohol getaucht, um dann für 5 min in Isopropanol und zweimal 5 min in Xylol gegeben zu werden. Zuletzt wurden die Schnitte in Entellan eingedeckt.

### **2.3.7 Immunfluoreszenz-Färbung (Fibronectin)**

Der Nachweis von Fibronectin erfolgte durch eine Immunfluoreszenz-Färbung. Pro Dreier-Serie wurden zwei der entparaffinierten Schnitte in PBS gewaschen (Waschen bzw. Spülen immer dreimal 5 min bei Raumtemperatur). Um das

Volumen an zur Abdeckung des Schnitts benötigten Lösungen möglichst gering zu halten, wurden die Schnitte mit einem Fettstift (PAP-Pen) umrandet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde für 45 min mit 10%igem Ziegenserum in PBS (10% ZS/PBS) bei Raumtemperatur vorbehandelt. Einer der beiden Schnitte wurde nun mit dem Primärantikörper (Rabbit Anti-Human Fibronectin) in der Verdünnung 1:300 in 10% ZS/PBS und der andere als Negativkontrolle nur mit 10% ZS/PBS über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen und mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten, fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (TRITC-Goat-Anti-Rabbit IgG) in der Verdünnung 1:400 in 10% ZS/PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses geschah im Dunkeln, um ein Verblässen der Fluoreszenz zu verhindern. Nach erneutem Waschen in PBS unter einer lichtdichten Abdeckung wurden die Präparate mit Mowiol (Herstellung siehe 2.2.4) eingedeckt und bis zur Auswertung am Fluoreszenz-Mikroskop bei 4°C im Dunkeln verwahrt.

### **2.3.8 Immunperoxidase-Färbung (Galektin-3)**

Mittels einer Avidin-Biotin-Peroxidase-Technik erfolgte der immunhistochemische Nachweis von Galektin-3.

Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst für 20 min bei Raumtemperatur in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gegeben, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Nach Spülen in Aqua dest. (Spülen bzw. Waschen immer dreimal 5 min bei Raumtemperatur) erfolgte in Citratpuffer (pH 6,0) eine Mikrowellenbehandlung für dreimal 5 min bei 600 W. Die abgekühlten und in PBS gespülten Schnitte wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen bei Raumtemperatur für 30 min mit 10% ZS/PBS bedeckt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Mouse Anti-Human Galectin 3) in der Verdünnung 1:100 in 10% ZS/PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach Waschen in PBS wurden die Schnitte für 30 min mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Anti-Maus) in der Verdünnung 1:500 in 10% ZS/PBS 30 min bei



Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurden die Schnitte in PBS gespült und nun für 30 min bei Raumtemperatur mit dem Avidin-Biotin-Komplex bedeckt. Letzterer war mindestens ein halbe Stunde vor Gebrauch angesetzt worden. Nach Spülen in PBS wurde das Reaktionsprodukt durch Zugabe von AEC visualisiert und anschließend in Aqua dest. gewaschen. Bei einigen Schnitten erfolgte eine Gegenfärbung durch Hämatoxylin. Eingedeckt wurde mit Mowiol. Statt des AEC wurde bei den fetalen Augen Vector NovaRed verwendet und mit Entellan eingedeckt.

Als Kontrolle wurde der primäre Antikörper ausgelassen, um das Ausmaß der unspezifischen Bindung zu bestimmen.

## **2.4 Auswertung**

Bei der Fibronektin-Färbung wurden zunächst anhand der HE-Färbung die histologischen Strukturen identifiziert, um dann die Fluoreszenzen am Fluoreszenzmikroskop auszuwerten. Die Galektin-3-Färbung wurde am Lichtmikroskop ausgewertet. Die Protokollierung erfolgte jeweils mittels eines standardisierten Bogens (siehe Anhang Abb. 26 und 27, Anhang).

Die Anfärbung histologischer Schnitte mittels Immunhistochemie stellt eine semiquantitative Methode dar. Eine starke Anfärbung spricht für eine hohe Konzentration der untersuchten Substanz, doch eine genaue Aussage über die tatsächliche Menge ist nicht möglich. Zum Ausschluss unspezifischer Färbungen, also als negative Kontrolle, diente derjenige Schnitt, bei dem beim Färbevorgang der primäre Antikörper weggelassen worden war.

Als Positiv-Kontrolle zur Überprüfung der Färbung dienten bei der Fibronektin-Untersuchung die retinalen Gefäße, weil das Vorkommen von Fibronektin in den Gefäßwänden in der Literatur eindeutig belegt ist [Jerdan et al. 1986a, Kohno et al. 1987a, Essner et al. 1988].

Für die fotografische Dokumentation wurde ein Tageslicht-Farb-Umkehrfilm der Firma Fujifilm mit 400 ASA bei den Fluoreszenz- und mit 100 ASA bei den Peroxidasepräparaten eingesetzt. Zunächst wurde das Präparat, das mit dem

Primärantikörper inkubiert worden war, fotografiert. Die Belichtungsdauer wurde mit Hilfe des Fotoautomaten berechnet und gespeichert, um anschließend das Kontrollpräparat exakt mit der gleichen Dauer zu belichten. Zur Vereinfachung der späteren Identifizierung der histologischen Strukturen, wurde dann noch eine Aufnahme von der HE-Färbung gemacht.

## 3. Ergebnisse

Eine Struktur wurde als positiv gewertet, wenn im Vergleich des Kontroll- und des mit Primärantikörper behandelten Präparates eine eindeutige Unterscheidung zwischen unspezifischer Hintergrund- und spezifischer Färbung möglich war. Die Kontrollpräparate bei der Fluoreszenzfärbung zeigten eine ausgeprägte Eigenfluoreszenz des retinalen Pigmentepithels und der Erythrozyten. Bei der Immunperoxidase-Färbung fand sich besonders bei den fetalen Augen eine ausgeprägte Hintergrundfärbung.

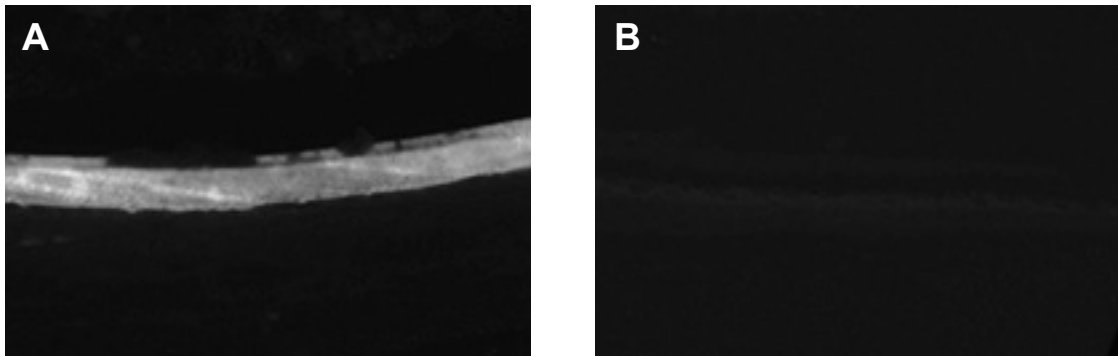
### 3.1 Fibronektin

#### 3.1.1 Adulte Augen

Von den normalen Augen waren diejenigen, die vor der Fixierung eingefroren worden waren, insgesamt schlechter erhalten. Durch das Einfrieren und Auftauen wurden die Gewebestrukturen geschädigt.

##### *Linsenkapsel*

Bei einigen Augen ging während des Schneide- und Färbvorgangs ein Teil von Linsenkern und -rinde verloren, doch die Kapsel war immer intakt. Hier war in allen Augen eine intensive Fluoreszenz zu erkennen (siehe Abb. 2), die an der vorderen Linsenkapsel noch deutlicher war als an der hinteren.



**Abb. 2** Vordere Linsenkapsel eines adulten Auges (Alter: 49 Jahre). **A** Die Linsenkapsel zeigt eine starke Färbung durch den Fibronectin-Antikörper. **B** Negativkontrolle zu A.

### *Glaskörper*

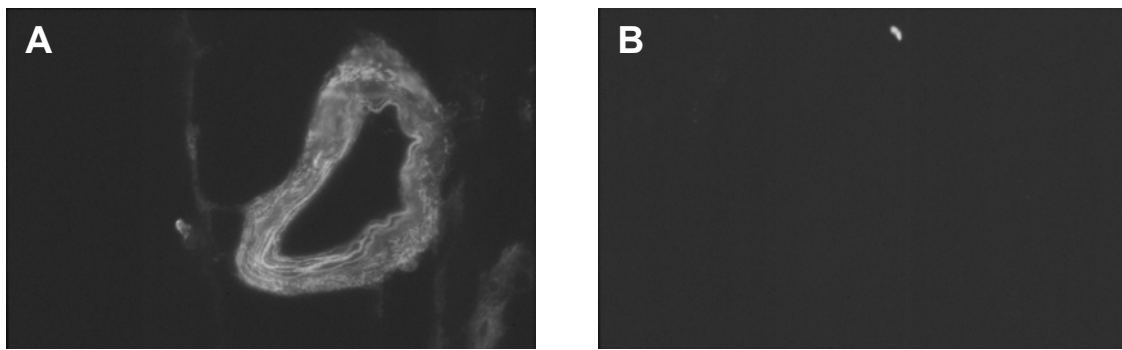
Der Glaskörper war selten vollständig erhalten. In allen Augen war er teilweise von der Netzhaut abgelöst, im Bereich der Papille immer. An der Glaskörperbasis lag er immer der Netzhaut an.

In der Immunfärbung zeigte der Glaskörper eine schwache Anfärbung von Fibronectin mit einer Verdichtung in Netzhautnähe, also im Glaskörperkortex. Die Intensität dieser Fluoreszenz war jedoch sehr viel geringer als die der LLI.

Im Glaskörper gab es einzelne gefärbte Punkte, bei denen es sich um Hyalozyten handelte.

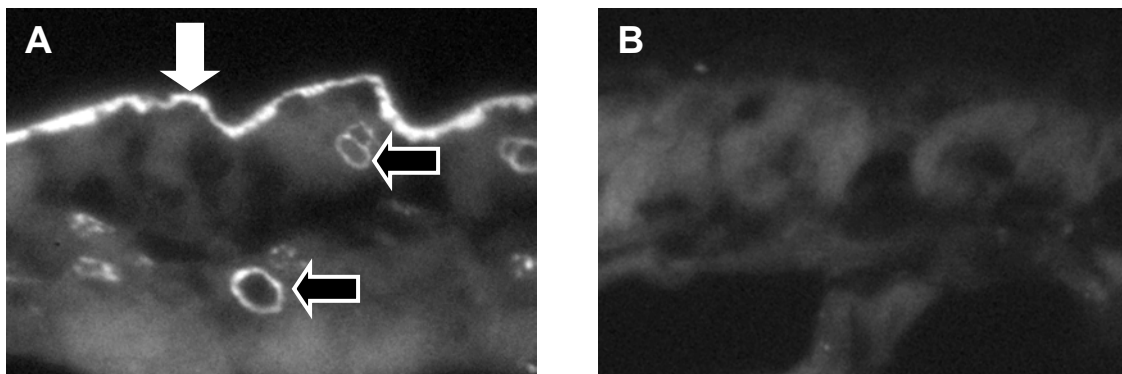
### *Netzhaut*

Die Wände sowohl der großen als auch der kleinen Netzhautgefäße zeigten eine deutliche Färbung. Bei den großen Gefäßen, z. B. den Vasa centrales retinae (siehe Abb. 3), waren mehrere Fibronectin-Schichten konzentrisch angeordnet, während die Wände sehr kleiner Gefäße nur einen einzelnen, dünnen Ring aufwiesen (siehe Abb. 4). Waren Erythrozyten im Gefäßlumen vorhanden, zeigten sie eine Eigenfluoreszenz (siehe Abb. 11), die aber schwächer war als die des Pigmentepithels.



**Abb. 3** Gefäß an der Papille eines adulten Auges (Alter: 42 Jahre). **A** Die Gefäßwand zeigt ringförmige Fibronectin-Schichten. **B** Negativkontrolle zu A.

Mit Ausnahme eines Auges, das nur partiell und sehr schwach positiv war, gab es immer an der innersten Schicht der Netzhaut eine intensive bandförmige Anfärbung, die der LLI zugeordnet wurde. Dieses Band war nach innen, also zum Glaskörper hin, glatt und nach außen unregelmäßig begrenzt.



**Abb. 4** Netzhaut am hinteren Pol eines adulten Auges (Alter: 37 Jahre). **A** Die LLI (weißer Pfeil) ist zum Glaskörper hin (im Bild nach oben) glatt und zur Netzhaut hin (im Bild nach unten) unregelmäßig begrenzt. Auch die Gefäße (schwarze Pfeile) zeigen sich Fibronectin-positiv. **B** Negativkontrolle zu A. Nur unspezifische Hintergrundfärbung ist zu erkennen.

Die Dicke der LLI variierte in den verschiedenen Abschnitten der Retina. An der Papille war sie lichtmikroskopisch nicht mehr zu erkennen. Von der Papille aus

nahm die Dicke zu und erreichte noch im Bereich des hinteren Pols der Netzhaut ihr Maximum. Zur Äquatorregion hin wurde sie dann wieder dünner und war in der Peripherie meistens gar nicht mehr zu sehen.

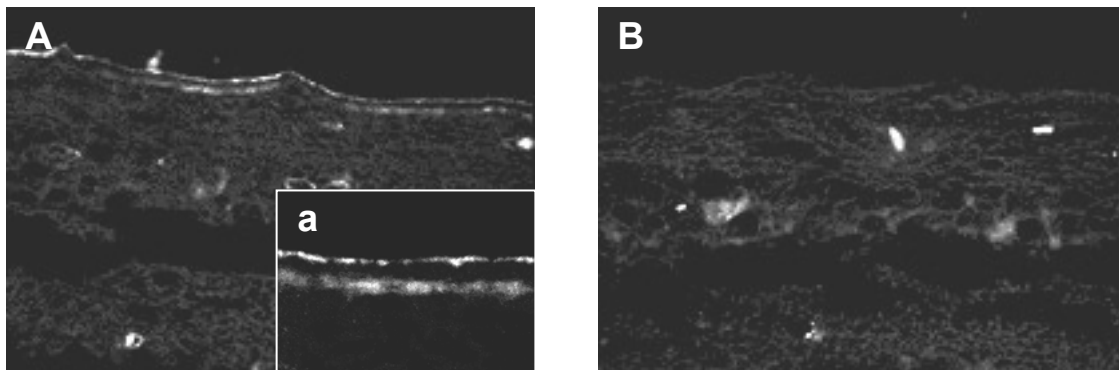
In 13 Augen (siehe Tab. 2) war ein doppelschichtiges Verteilungsmuster zu erkennen. Hier verliefen dann zwei fluoreszierende Linien parallel.

**Tab. 2** Auftreten der Fibronektin-Doppelschicht in der LLI der adulten Augen

<b>Auge</b>	<b>Eingefroren: Ja/Nein</b>	<b>Doppelschicht: Ja/Nein</b>
<b>A</b>	Ja	Ja
<b>B</b>	Nein	Ja
<b>C</b>	Ja	Ja
<b>D</b>	Ja	Ja
<b>E</b>	Ja	Nein
<b>F</b>	Ja	Ja
<b>G</b>	Ja	Nein
<b>H</b>	Ja	Ja
<b>I</b>	Ja	Nein
<b>J</b>	Ja	Ja
<b>K</b>	Ja	Ja
<b>L</b>	Ja	Ja
<b>M1</b>	Nein	Nein
<b>M2</b>	Nein	Nein
<b>N1</b>	Nein	Ja
<b>N2</b>	Nein	Ja
<b>O</b>	Nein	Ja
<b>P</b>	Ja	Ja
<b>Q</b>	Ja	Nein
	Ja: n=13/19	Ja: n=13/19 (Eingefroren: n=9/13, Nicht eingefroren: n=4/6)

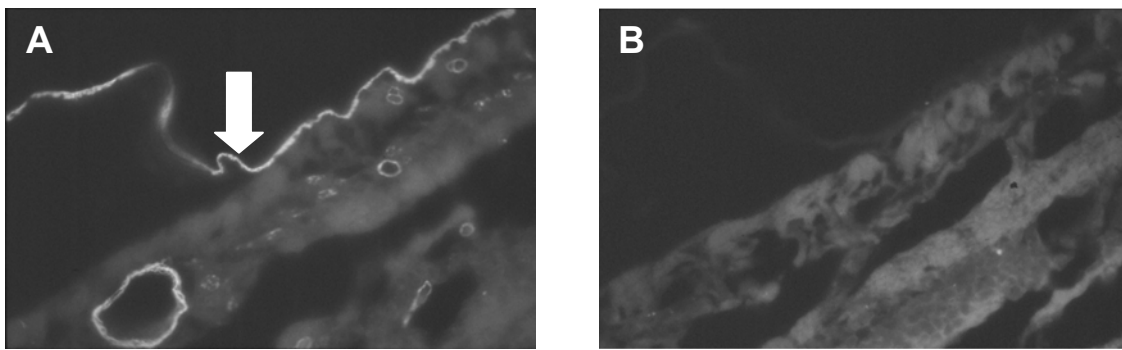
Die Doppelschicht befand sich immer in besonders dicken Bereichen der LLI, also in den posterioren Netzhautabschnitten (siehe Abb. 5). Im Bereich der Papille und zur Peripherie hin näherten sich die beiden Linien, bis schließlich

nur noch eine zu erkennen war. Die äußere, also tiefer in der Retina liegende Schicht, war breiter als die innere. Beide Schichten waren durchgehend, was jedoch nur auf den Originalpräparaten unter dem Mikroskop zu sehen war. Beim Fotografieren war es manchmal nicht zu vermeiden, dass die LLI für kurze Abschnitte etwas ober- oder unterhalb der fokussierten Ebene verlief, weil die Schnitte nicht völlig plan waren. An dieser Stelle erscheint es deshalb so, als wäre die fluoreszierenden Linie hier unterbrochen. Auf den Fotos ist eine solche Lücke als Artefakt anzusehen.



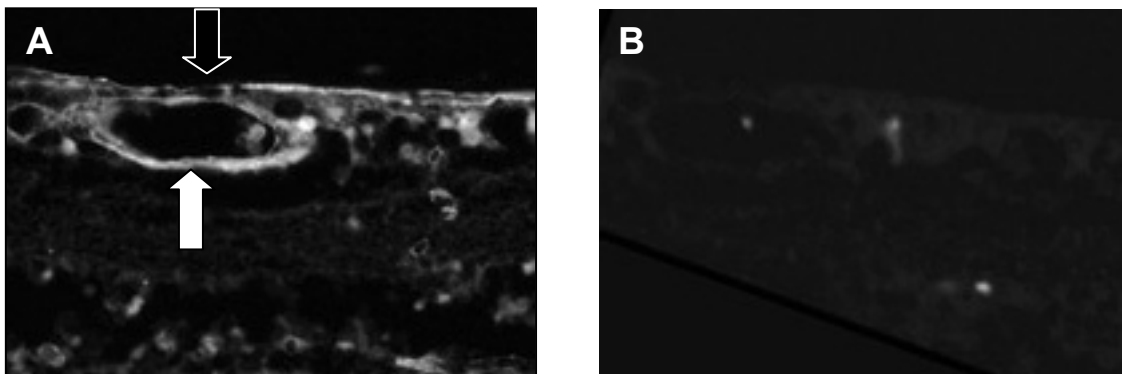
**Abb. 5** Hinterer Pol eines adulten Auges (Alter: 65 Jahre). **A** Die Fibronectin-Färbung der LLI zeigt hier ein doppelschichtiges Verteilungsmuster. Unter dem Mikroskop waren durchgängige Linien zu erkennen, die jedoch aufgrund von Unebenheiten im Präparat nicht immer in der fokussierten Ebene verliefen. Hierdurch kommen die scheinbaren Unterbrechungen zustande. **a** Vergrößerung aus A. **B** Negativkontrolle zu A. Es ist keine spezifische Färbung zu sehen.

Bei 10 der 13 vorher eingefrorenen Augen wurde folgendes beobachtet: An Stellen, an denen der Glaskörper abgehoben war, verblieb die fluoreszierende LLI am Glaskörper, während an der Netzhaut keine spezifische Färbung mehr zu erkennen war (siehe Abb. 6).



**Abb. 6** LLI in einem adulten Auge (Alter: 37 Jahre), das vor der Untersuchung eingefroren war. **A** Die LLI löst sich von der Netzhaut ab (Pfeil). **B** Unspezifische Hintergrundfärbung der Negativkontrolle zu A.

Dieses Phänomen war in nicht eingefrorenen Augen nicht zu beobachten. Eine weitere Besonderheit war an der LLI im Bereich der großen Netzhautgefäße zu sehen. Bestand an dieser Stelle eine Glaskörperabhebung, war die fluoreszierende Linie unregelmäßig verdünnt. Auch in der HE-Färbung war die Oberfläche der ansonsten sehr gut erhaltenen und glatt begrenzten Netzhaut „ausgefranst“.



**Abb. 7** LLI über einem Netzhautgefäß eines adulten Auges (Alter: 42 Jahre). **A** Der Glaskörper ist abgehoben und die LLI (schwarzer Pfeil) ist über dem großen Netzhautgefäß (weißer Pfeil) ausgedünnt. **B** Negativkontrolle zu A.



In den beiden Körnerschichten und in der Ganglienzellschicht gab es gelegentlich Anfärbungen von Zellkernen. In einigen Augen wurden Fluoreszenzanreicherungen direkt unter der Lamina limitans interna beobachtet (siehe Abb. 7).

Ansonsten wurde in der Netzhaut keine spezifische Fluoreszenz gefunden.

### **3.1.2 Plasmin-behandelte Augen**

#### **3.1.2.1 Gruppe A**

##### *Linsenkapsel*

Die Linsenkapsel war immer Fibronektin-positiv. Die Intensität der Färbung war bei den Plasmin-behandelten und den Kontroll-Augen vergleichbar.

##### *Glaskörper*

Bei fünf der sechs Plasmin-behandelten Augen bestand eine vollständige Ablösung des Glaskörpers. Nur in einem Auge (PK, ältestes Augenpaar der Serie) gab es Stellen in der Peripherie, an denen der Glaskörper noch mit der Netzhaut in Verbindung stand, doch ansonsten war auch hier der weitaus größte Teil abgelöst. Bei den jeweiligen Partneraugen war der Glaskörper nur partiell abgelöst.

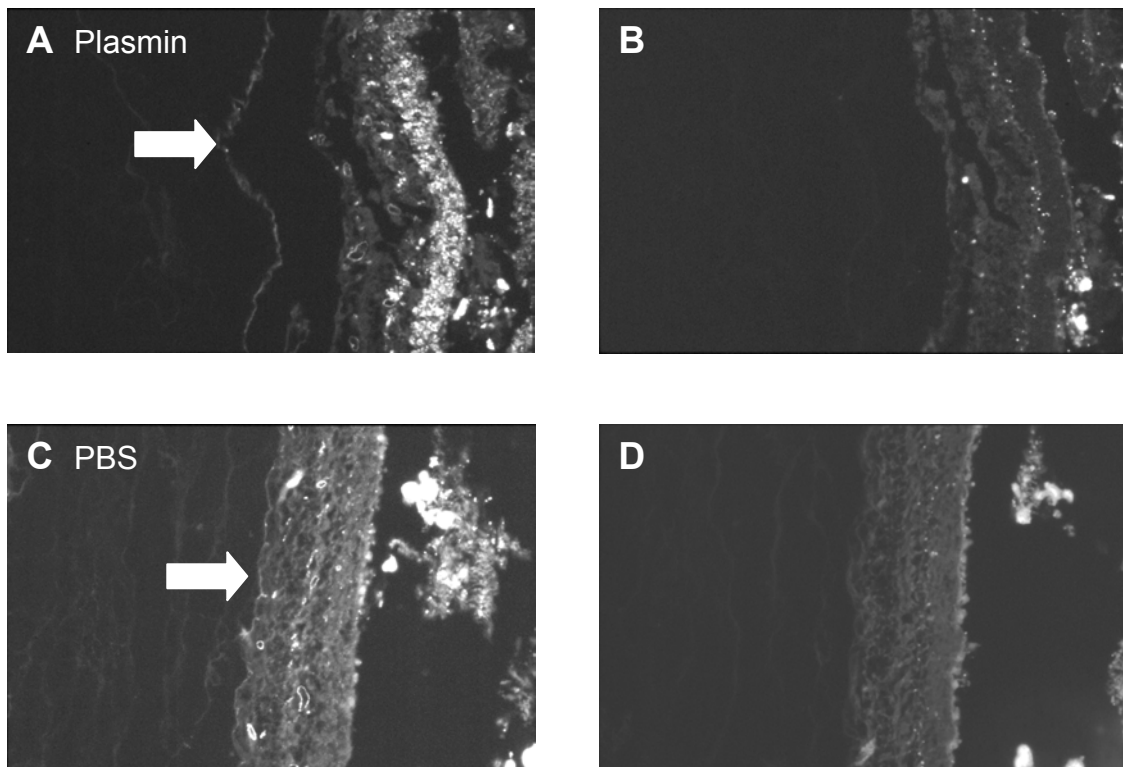
Insgesamt war die Anfärbung des Glaskörpers nach Plasmin-Behandlung mit der in den Kontrollaugen vergleichbar, also schwache Anfärbung im Inneren des Glaskörpers und etwas intensivere Fluoreszenz im Bereich des Glaskörperkortex. Im Unterschied zu den Kontrollaugen war die LLI mit dem Glaskörper abgehoben.

Eine Ausnahme bildete das Präparat PD, da hier kein fluoreszierendes Band gefunden wurde, während die Anfärbung ansonsten den anderen Plasmin-behandelten Augen entsprach.

Bei Präparat PA konnte keine Aussage über die Fluoreszenz des Glaskörper gemacht werden, da nur noch sehr wenig Glaskörpermaterial aufzufinden war.

### Netzhaut

Die Netzhaut war teilweise zerstört. Sie war an der Oberfläche „ausgefranst“. In einigen Augen waren sogar Gefäße aus der Netzhaut herausgelöst und lagen frei.



**Abb. 8** Augenpaar (Alter: 49 Jahre), das vorher eingefroren war. In ein Auge (A) ist Plasmin injiziert worden und in das Partnerauge (B) PBS. **A** Die Netzhautoberfläche ist ausgefranst. Die LLI ist von der Netzhaut abgelöst. **B** Negativkontrolle zu A. **C** Partnerauge zu A. Die Netzhautoberfläche ist intakt und die LLI liegt der Netzhaut an. **D** Negativkontrolle zu C.

An den Gefäßwänden fand sich eine Anlagerung des Antikörpers und die Intensität der Fluoreszenz war in behandelten und unbehandelten Augen vergleichbar.

Die Oberfläche der Netzhaut zeigte – sofern sie erhalten war – keine Färbung, da die LLI mit dem Glaskörper abgelöst war. Eine Ausnahme bildeten die Bereiche im Auge PK, in denen der Glaskörper der Netzhaut anlag. Hier war das fluoreszierende Band an der vitreoretinalen Grenze zu erkennen, während es ansonsten den Glaskörper begrenzte.

### **3.1.2.2 Gruppe B**

Im Unterschied zu Gruppe A waren die Augenpaare nicht eingefroren. Die Strukturen waren hier wesentlich besser erhalten.

#### *Linsenkapsel*

Im behandelten Auge war die Linsenkapsel – dem unbehandeltem Auge vergleichbar – Fibronektin-positiv.

#### *Glaskörper*

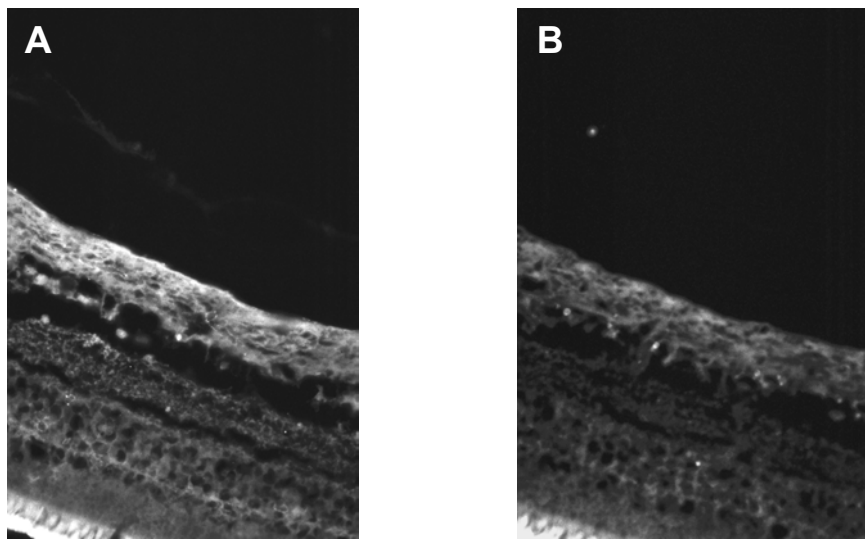
Die Anfärbung des Glaskörpers war mit der in Gruppe A zu vergleichen (allgemein schwache, im Glaskörperkortex intensivere Fluoreszenz).

Vier der fünf Plasmin-behandelten Augen zeigten eine hintere Glaskörperabhebung. Bei den unbehandelten Partneraugen war der Befund jeweils identisch.

Im Unterschied zu den Augen in Gruppe A bestand jedoch an manchen Stellen keine vollständige Glaskörperabhebung, sondern es gab noch einzelne verbindende Fasern zur Netzhaut.

#### *Netzhaut*

Die LLI war immer gefärbt, sowohl in den PBS- als auch in den Plasmin-behandelten Augen. Bezüglich des Auftretens einer Doppelschicht gab es sehr unterschiedliche Ergebnisse (siehe Tab. 2).



**Abb. 9** Adultes Auge (Alter: 41 Jahre) mit Plasmin-Vorbehandlung. **A** Trotz Plasmin-Injektion lässt sich Fibronektin in der LLI markieren. **B** Die Negativkontrolle zu A zeigt eine unspezifische Hintergrundfluoreszenz.

Wie schon bei den normalen Augen beobachtet (siehe unter 3.1.1), war auch in diesen Augen – sowohl bei PBS als auch bei Plasmin – die Oberfläche der Netzhaut im Bereich der großen Netzhautgefäße im Falle einer vollständigen Ablösung unregelmäßig und die fluoreszierende Linie schwächer oder unterbrochen.

Tab. 3 Plasmineffekte

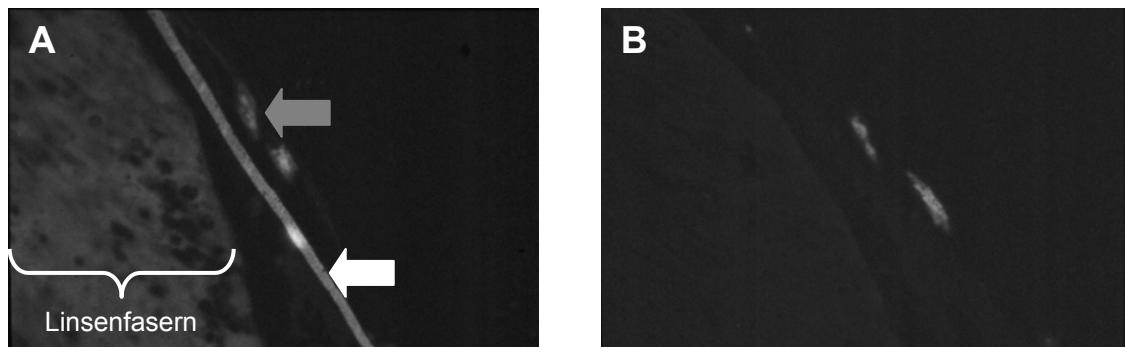
Auge	Plasmin/PBS	GK <sup>1</sup>	LLI	Unterschied
<b>PB und PI</b>	Plasmin	Hinterer GK abgehoben. GK-Basis anliegend.	LLI schwächer als bei PBS. Nie Doppelschicht.	Nur bei PBS Doppelschicht.
	PBS	Wie bei Plasmin.	+, Doppelschicht.	
<b>PE</b>	Plasmin	Hinterer GK abgehoben. GK-Basis anliegend.	+, Doppelschicht, aber nur abgehoben, nicht in Netzhaut	Zwar bei beiden Doppelschicht gesehen, aber nur bei PBS in der Netzhaut.
	PBS	Wie bei Plasmin.	+, Doppelschicht: teils abgehoben teils in Netzhaut.	
<b>PH</b>	Plasmin	Hinterer GK abgehoben. GK-Basis anliegend.	+, Doppelschicht: teils abgehoben, teils in Netzhaut.	Nur bei Plasmin Doppelschicht.
	PBS	Wie bei Plasmin	+, keine Doppelschicht.	
<b>PJ</b>	Plasmin	Überall anliegend.	+. Doppelschicht.	Kein Unterschied.
	PBS	Überall anliegend.	+, Doppelschicht.	

<sup>1</sup>GK= Glaskörper

### 3.1.3 Fetale Augen

#### *Linsenkapsel*

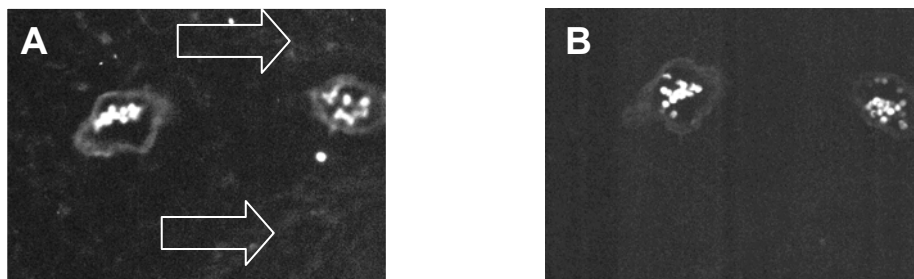
In allen Augen war eine Anfärbung der Linsenkapsel zu erkennen. Auch die Gefäße in der Tunica vasculosa lentis waren Fibronektin-positiv.



**Abb. 10** Linse eines fetalen Auges in der 19. Schwangerschaftswoche (SSW). **A** Die Kapsel (weißer Pfeil) ist stark und die Fasern sind schwach gefärbt. Auch die Gefäße der Tunica vasculosa lentis lassen sich markieren (grauer Pfeil), wobei die darin enthaltenen Erythrozyten eine Eigenfluoreszenz zeigen, die auch auf der Negativkontrolle **B** zu erkennen ist.

### *Glaskörper*

Der primäre Glaskörper und die in ihm enthaltenen Gefäße, wie z.B. die Arteria hyaloidea, zeigten eine Anfärbung. Einzelne fleckförmige Fluoreszenzanreicherungen wurden Hyalozyten zugeordnet.

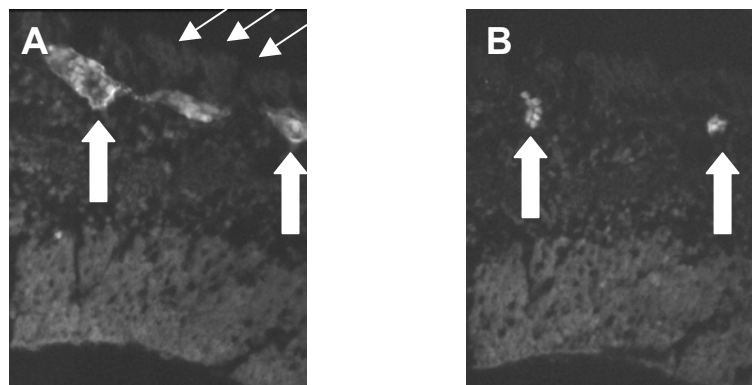


**Abb. 11** Primärer Glaskörper in fetalem Auge (16. SSW) **A** Die Strukturen des primären Glaskörpers sind schwach Fibronectin-positiv. Auch die Gefäßwand ist markiert. **B** Negativkontrolle zu A.

Auch der sekundäre Glaskörper wurde durch den Antikörper angefärbt.

### Netzhaut

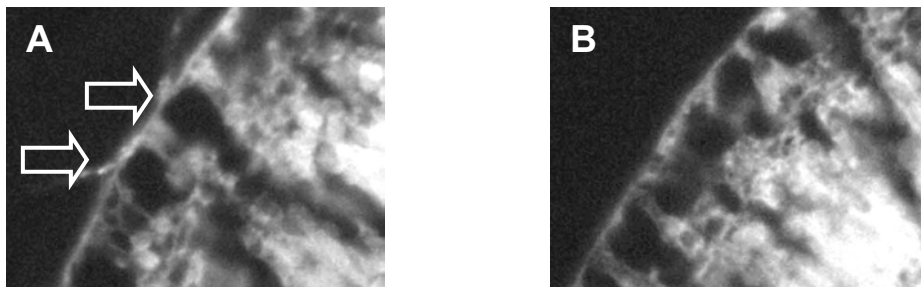
Erstmals wurden die Arteria und Vena centralis retinae in der 16. Woche gesehen (im einzigen jüngeren Auge, 13. SSW, kein Anschnitt dieser Gefäße). Arteria und Vena centralis retinae zeigten nach Fibronektin-Färbung eine Fluoreszenz, die mit den Gefäßen erwachsener Augen vergleichbar war. In der Netzhaut fanden sich – ebenfalls erstmals in der 16. SSW – am hinteren Pol Anschnitte von Netzhautgefäßen (siehe Abb. 12). Auch deren Wände waren Fibronektin-positiv.



**Abb. 12** Fetales Auge (16. SSW), hinterer Pol. **A** Es finden sich Fibronektin-positive Netzhautgefäße (große Pfeile). Die LLI (kleine Pfeile) lässt sich durch den Fibronektin-Antikörper nicht markieren. **B** Negativkontrolle zu A. Die Eigenfluoreszenz der Erythrozyten (Pfeile) ist zu erkennen.

Die innere, also dem Glaskörper zugewandte Oberfläche der Netzhaut war in fünf Augen beschädigt oder fehlte. Diese Augen wurden bezüglich der LLI als „nicht beurteilbar“ bewertet. In zwölf der dreizehn verbleibenden Augen war niemals ein fluoreszierendes Band zu erkennen (siehe Tab. 4).

Nur ein Auge (22. SSW) zeigte eine schwache Anreicherung in diesem Bereich (siehe Abb. 13).



**Abb. 13** Zentrale Netzhaut eines fetalen Auges (22. SSW). **A** In der LLI gibt es eine schwache Anreicherung von Fibronectin, die sich von der Netzhaut löst (Pfeile). **B** Negativkontrolle zu A mit starker unspezifischer Hintergrundfluoreszenz.

**Tab. 4** Befunde an den fetalen Augen

Auge	SSW	Glaskörper	LLI
<b>23/2000</b>	13	+	-
<b>1688</b>	16	+	-
<b>3672</b>	16	+	-
<b>24/00</b>	16	+	-
<b>4067</b>	16	+	-
<b>2658</b>	16	+	-
<b>4741</b>	17	+	-
<b>4992</b>	18	+	-
<b>3701</b>	19	+	-
<b>5257</b>	19	+	-
<b>15/2000</b>	20	+	Nicht beurteilbar
<b>28/2000</b>	20	+	Nicht beurteilbar
<b>0-1679/98</b>	21	+	-
<b>17/2000</b>	22	+	Partiell + (s.Abb.13)
<b>31/2000</b>	22	+	Nicht beurteilbar
<b>4815</b>	24	+	-
<b>39/2000</b>	25	+	Nicht beurteilbar
<b>0-1658/98</b>	32+3	+	Nicht beurteilbar
		<b>18/18</b>	<b>1/13</b>



### 3.1.4 Augen mit uvealem Melanom

#### *Linsenkapsel*

Die Linsenkapsel zeigte ein mit normalen Augen vergleichbares Färbemuster.

#### *Glaskörper*

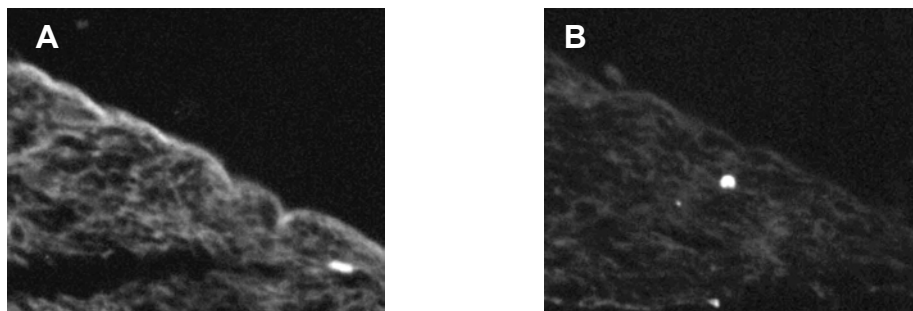
In der Mehrzahl der Augen ( $n=7/10$ ) lag der Glaskörper an, während in drei Augen eine hintere Glaskörper-Abhebung bestand.

Der Glaskörper enthielt Fibronectin ( $n=10/10$ ), wobei in fünf Augen eine wesentlich stärkere Färbung als in normalen Augen auffiel.

#### *Netzhaut*

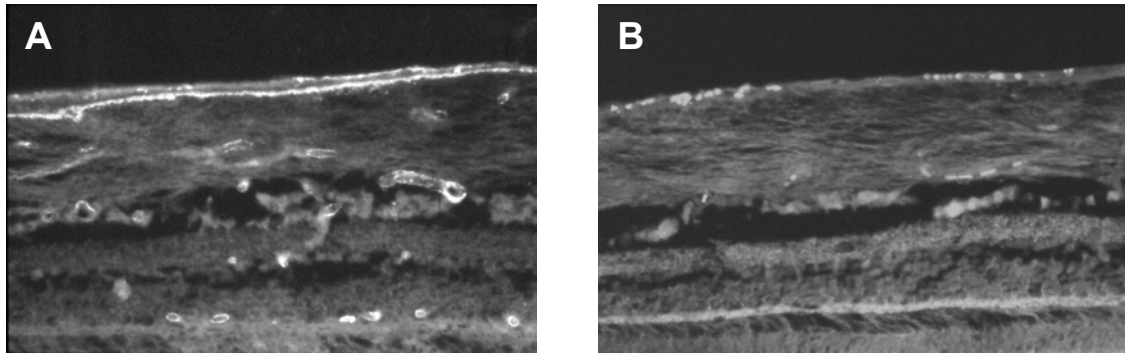
Die Netzhautgefäße waren Fibronectin-positiv, vergleichbar mit den Gefäßen in normalen Augen (Details siehe 3.1.1).

Die Lamina limitans interna war immer positiv und zeigte sich bei acht Augen verdickt (siehe Abb. 15 und 17). Sie war auch an der Papille (siehe Abb. 14) und in der Peripherie zu erkennen.



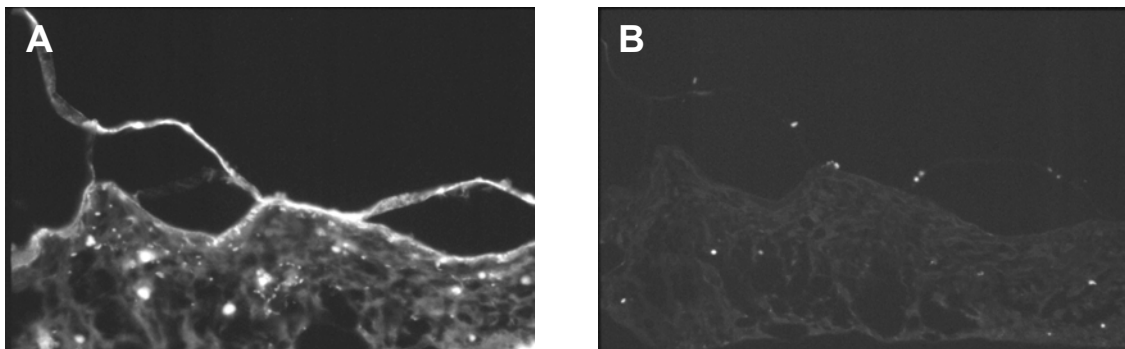
**Abb. 14** **A** Papille eines Auges mit Melanom. Es zeigt sich eine leichte Markierung der LLI. **B** Negativkontrolle zu A.

In drei Augen war eine Doppelschicht zu sehen (siehe Abb. 15). Diese Beobachtung war unabhängig davon, ob der Glaskörper anlag oder nicht.



**Abb. 15** Netzhaut eines Auges mit Aderhaut-Melanom (Alter: 71 Jahre). **A** Gegenüber den normalen adulten Augen zeigt sich in der LLI eine stärkere Markierung von Fibronectin (vergl. Abb. 5). **B** Negativkontrolle zu A.

In einem Auge (Auge MH), in dem die Doppelschicht nicht vorhanden war, hatte der Tumor fast den gesamten hinteren Abschnitt des Bulbus eingenommen. Die Netzhaut am hinteren Pol, in denen die Doppelschicht zu erwarten gewesen wäre, konnte nur eingeschränkt beurteilt werden.

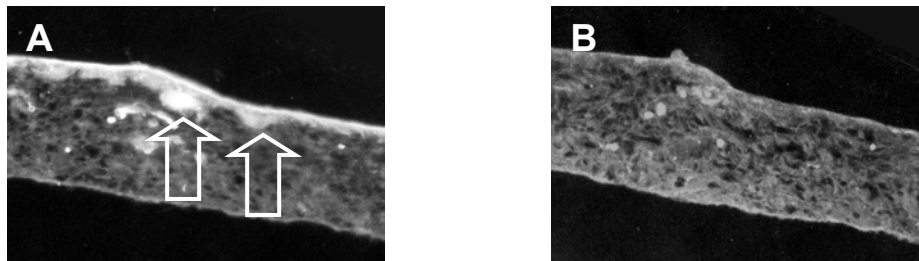


**Abb. 16** Netzhaut eines Auges mit Aderhaut-Melanom (Alter: 80 Jahre). **A** Die LLI ist stark Fibronectin-positiv und unregelmäßig verdickt. Beim Abheben von der Netzhaut teilt sie sich. **B** Negativkontrolle zu A.

In allen Augen löste sich die LLI teilweise von der Netzhaut. Hier teilte sich dann die LLI, so dass sich ein fluoreszierendes Band abhob, während eines an der Netzhaut-Oberfläche verblieb (siehe Abb. 16).

Direkt unterhalb der Lamina limitans interna wurden bei sechs Augen Fibronektineinlagerungen von unregelmäßiger Dicke gefunden (siehe Abb. 17).

Bei allen sechs Augen war auch die Lamina limitans interna als verdickt beurteilt worden.



**Abb. 17** Netzhaut eines Auges mit Aderhaut-Melanom (Alter: 80 Jahre). **A** Unter der verdickten und durch den Fibronectin-Antikörper angefärbten LLI finden sich Anreicherungen von Fibronectin in tieferen Netzhautschichten (Pfeile). **B** Negativkontrolle zu A.

**Tab. 5** Befunde in Glaskörper und Lamina limitans interna (LLI), Melanom-Augen

Auge	Glaskörper		LLI		Anreicherungen unter der LLI
	anl./HGA. <sup>1</sup>	Intensität (+/++) <sup>2</sup>	Verdickt	Doppelschicht	
MA	anl.	+	-	-	-
MB	anl.	++	+	+	+
MC	anl.	++	+	+	-
MD	anl.	+	+	-	+
ME	HGA	+	+	+	+
MF	anl.	++	-	-	-
MG	anl.	++	+	-	+
MH	HGA	++	+	(-) <sup>3</sup>	+
MI	anl.	+	+	-	+
MJ	HGA	+	+	-	-
<b>Gesamt:</b>	Anl.: 7/10	++: 5/10	+: 8/10	+: 3/9	+: 6/10
<b>10</b>	HGA.: 3/10				

<sup>1</sup> anl.=überwiegend anliegend, HGA=Hintere Glaskörperabhebung

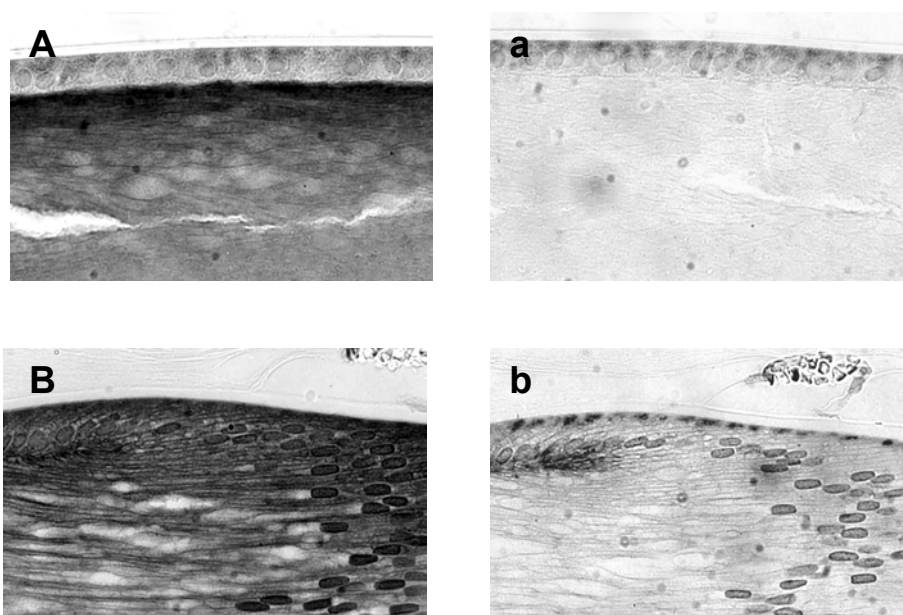
<sup>2</sup> +: normale Anfärbung, ++: Anfärbung stärker als im normalen Auge

<sup>3</sup> im Hinblick auf dieses Merkmal nur eingeschränkt beurteilbar (Begründung siehe 3.1.4)

### 3.2 Galektin-3

#### *Linse*

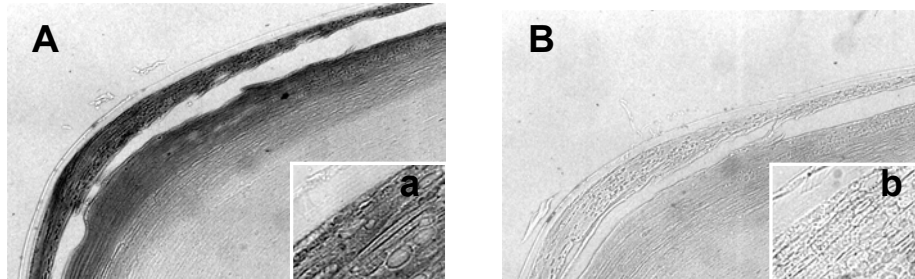
In den fetalen Augen fand sich Galektin-3 in Linsenepithelzellen (LEZ), Rinden- und Kernanteilen der Linse (siehe Abb. 18). Die Färbung war am stärksten an der Zellmembran apikalen Anteile der LEZ und den angrenzenden Linsenfasern. Die basalen Zellanteile wurden ebenso wie die Linsenkapsel nicht markiert.



**Abb. 18** Fetale Linse (22. SSW). **A** Anschnitt des vorderen Linsenpols. Die stärkste Anfärbung von Galektin-3 findet sich in den apikalen Linsenepithelzellen sowie den benachbarten Linsenfasern. Die Linsenkapsel bleibt frei. **a** Negativkontrolle zu A. **B** Anschnitt der Äquatorregion. Die Galektin-3-Markierung ist am stärksten an den Membranen der Linsenfasern und -epithelzellen. Auch die Zellkerne werden markiert.

In adulten Augen (siehe Abb. 19) zeigte sich bezüglich der LEZ ein gleichartiges Färbemuster, jedoch war Galektin-3 nicht mehr im Linsenkern und den zentral gelegenen Anteilen des Linsenkortex nachweisbar. Es ließ sich ein Zusammenhang zwischen der Nachweisbarkeit von Galektin und Zellkernen

bzw. Kernfragmenten erkennen, denn letztere waren bei nicht angefärbten Linsenfasern nicht mehr vorhanden.



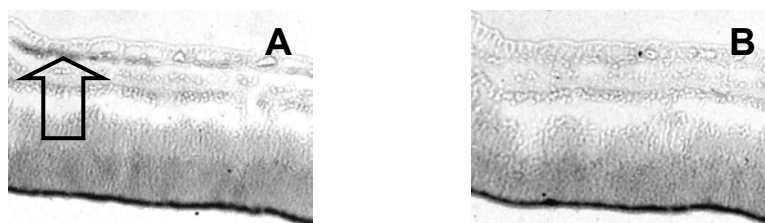
**Abb. 19** Adulte Linse (Alter: 55 Jahre). **A** In der Linsenkapsel lässt sich kein Galektin-3 nachweisen. Die peripheren Linsenanteile sind markiert, nicht jedoch der Linsenkern. **a** Vergrößerung aus **A**. Linsenkortex in der Äquatorebene. **B** und **b** sind die entsprechenden Negativkontrollen.

### *Glaskörper*

Der Glaskörper ließ sich durch den Galektin-3-Antikörper nicht markieren.

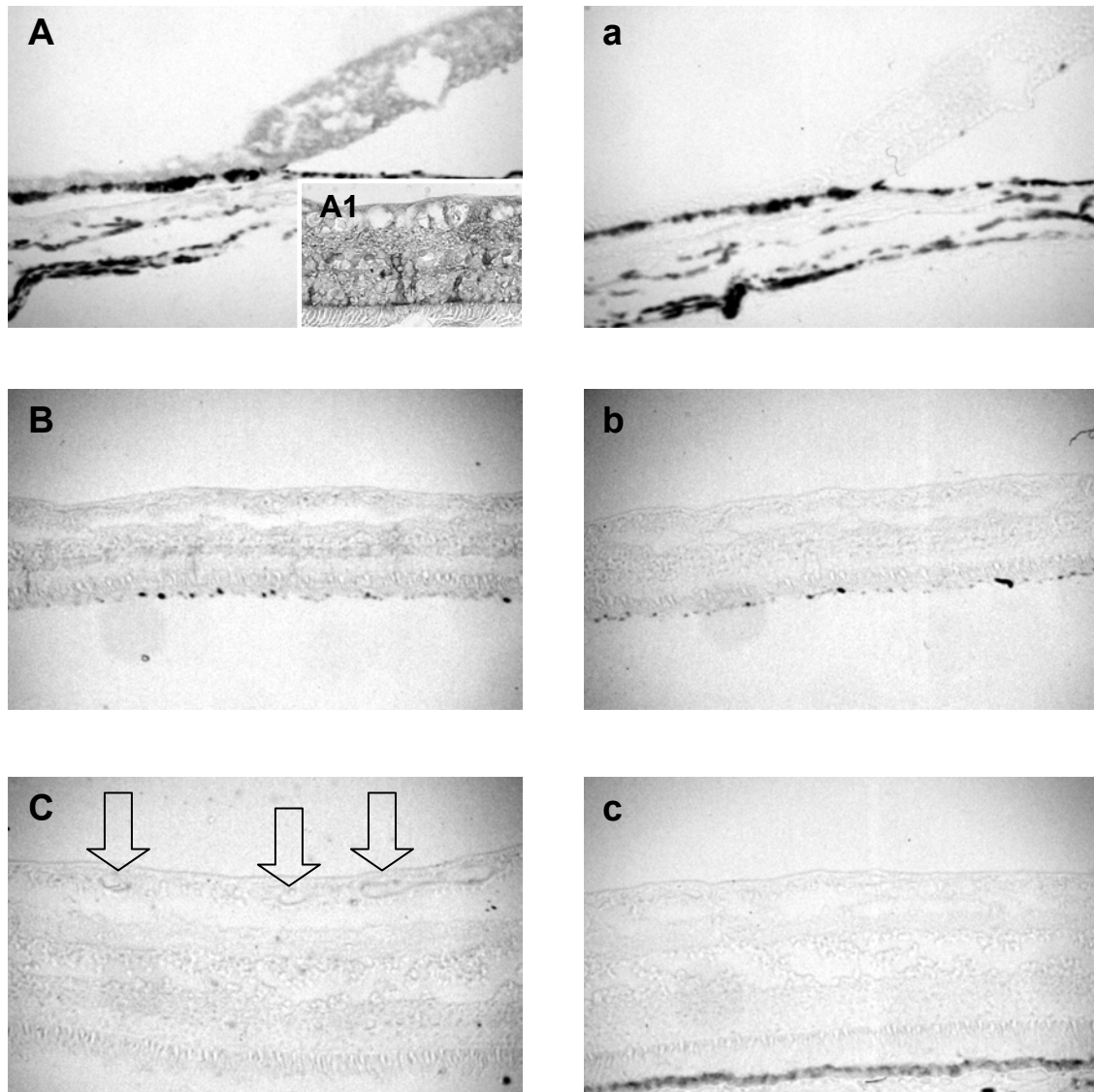
### *Netzhaut*

Auch bei der immunhistochemischen Untersuchung der Netzhaut der fetalen Augen fand sich keine Anfärbung. Einzige Ausnahme bildete ein fetales Auge (22. SSW), bei dem sich am hinteren Pol in der Ganglienzellschicht mehrere Galektin-positive Zellverbände fanden (siehe Abb. 20).



**Abb. 20** Hinterer Pol der fetalen Netzhaut (22. SSW). **A** In der Ganglienzellschicht lassen sich Zellverbände für Galektin-3 markieren. Ansonsten zeigt sich keine spezifische Färbung in der fetalen Retina. **B** Negativkontrolle zu **A** mit starker unspezifischer Hintergrundfärbung.

Im Gegensatz zu den fetalen Augen ließ sich in der adulten Netzhaut Galektin-3 nachweisen. Hierbei zeigten sich erhebliche lokale Unterschiede, die in allen untersuchten Augen identisch auftraten.



**Abb. 21** Netzhaut eines adulten Auges (Alter: 41 Jahre). **A** Galektin-3 lässt sich in Ora serrata und Peripherie markieren. Bei stärkerer Vergrößerung (**A1**) erkennt man eine Anfärbung von einigen Kernen in der inneren Körnerschicht mit radialen Ausläufern. Während die Lamina limitans externa Anreicherungen des Antikörpers zeigt, bleibt die LLI ungefärbt. **a** Negativkontrolle zu A. **B** In der Äquatorebene ist die Färbung kaum erkennbar verglichen zur Peripherie. **b** Negativkontrolle zu B. **C** Am hinteren Pol lässt sich Galektin-3 nur noch in den Endothelzellen der Gefäße (Pfeile) erkennen. **c** Negativkontrolle zu C.

Die Färbung war in den vorderen Anteilen der Retina, also im Bereich der Glaskörperbasis, am stärksten, nahm zu den hinteren Netzhautanteilen hin ab und ließ sich am hinteren Pol nicht mehr erkennen. Hier waren lediglich die Epithelzellen der Gefäße Galektin-positiv. Die LLI zeigte sich nie Galektin-positiv. Bis auf diese waren in der Peripherie alle Netzhautschichten markiert (siehe Abb. 21A).

Einige Zellkerne in der inneren Körnerschicht, teilweise mit senkrecht in der Netzhaut stehenden Ausläufern, wurden markiert, während ansonsten alle Kerne negativ blieben (siehe Abb. 21/A1). Die Schicht direkt unter der LLI, also die Nervenfaserschicht, und besonders die Lamina limitans externa (zwischen äußerer Körnerschicht und Schicht der Stäbchen und Zapfen) zeigten eine Anreicherung des Galektin-3-Antikörpers.

## 4. Diskussion

Die Lamina limitans interna (LLI) stellt als Nahtstelle zwischen Glaskörper und Netzhaut eine strukturelle und funktionelle Grenzregion dar. Sie spielt in diversen physiologischen und pathologischen Prozessen eine Rolle, für deren Verständnis die Kenntnis von Aufbau und Zusammensetzung wünschenswert ist. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Adhäsionsproteine Fibronektin und Galektin-3, sowie die Effekte der Protease Plasmin untersucht.

### 4.1 Fibronektin

#### 4.1.1 Funktion von Fibronektin

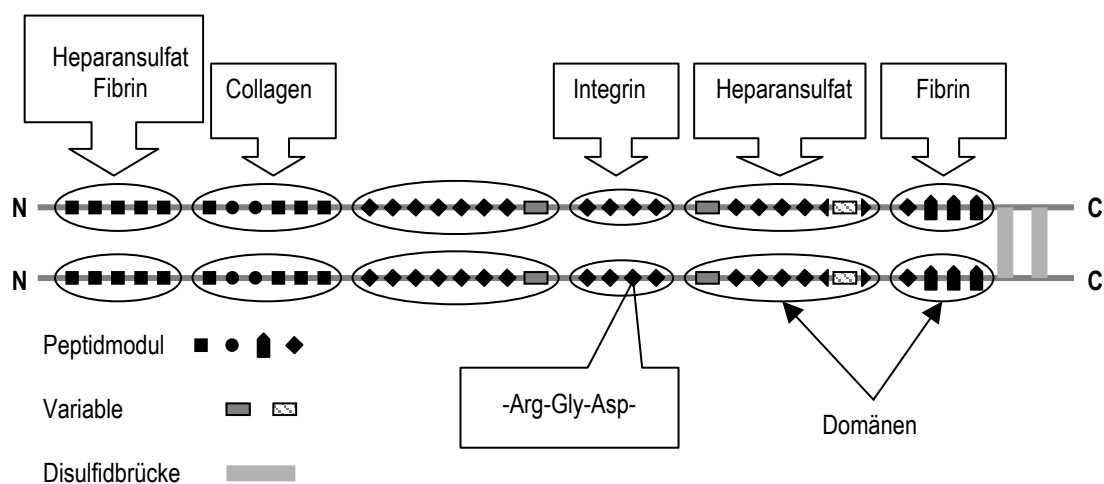
Der Glaskörper besteht fast ausschließlich aus Wasser und extrazellulären Bestandteilen. Die Anheftung von Zellen an Strukturen des Extrazellulärraums, wird im Allgemeinen durch Adhäsionsproteine (meist Glykoproteine) vermittelt, die sowohl an Zellen als auch an Makromoleküle der extrazellulären Matrix binden können. Alle Adhäsionsproteine werden innerhalb der Zelle synthetisiert, anschließend sezerniert und dann an der äußeren Oberfläche der Plasmamembran verankert. Dies geschieht entweder über spezifische Rezeptoren oder über hydrophobe Anteile des Proteins direkt in der Membran.

Ein typischer Vertreter für ein Adhäsionsprotein ist das Fibronektin (Name abgeleitet von lat. „fibra“ für „Faser“ und „nectere“ für „verbinden“), dem die Forschung in der Vergangenheit sehr viel Aufmerksamkeit geschenkt hat. Zahlreiche Untersuchungen auf den Gebieten der Biochemie, der Zell- und der Molekularbiologie haben zu seinem Verständnis beigetragen.

Fibronektin wird von vielen verschiedenen Zellen produziert und sezerniert [Hynes 1990]. Es handelt sich dabei um ein fadenförmiges Dimer aus zwei ähnlichen Untereinheiten (Größe je 250 kDa), die über zwei Disulfidbrücken an ihren C-Termini miteinander verknüpft sind. Fibronektin ist modular aufgebaut und setzt sich aus wenigen Typen von Peptidmodulen zusammen, die sich vielfach wiederholen. Jedes der über 50 Module wird von einem Exon im Gen



des Fibronektins kodiert. Von dem RNA-Transkript des Fibronektin-Gens können durch alternatives Spleißen Fibronektin-Varianten unterschiedlicher Zusammensetzung gebildet werden [Schwarzbauer 1991]. So fehlen z.B. dem von Hepatozyten produzierten, löslichen „Plasma-Fibronektin“ einige Regionen, die das „zelluläre Fibronektin“ auf der Oberfläche von Fibroblasten, Epithelzellen oder Makrophagen enthält [Romberger 1997]. Aber auch von einer einzigen Zelle können verschiedene Fibronektin-Varianten produziert werden [Kumazaki et al. 1999].



**Abb. 22** Schematische Struktur von Fibronektin [nach Koolmann/Röhm 1994]

Die beiden Untereinheiten sind in globuläre Domänen (siehe Abb. 22) gegliedert, die über flexible Regionen verbunden sind. Die einzelnen Domänen verfügen über spezifische und hochaffine Bindungsstellen für Kollagen, Fibrin, verschiedene Proteoglykane (z.B. Heparin, Heparansulfat und Hyaluronsäure) und den Fibronektinrezeptor der Zellmembran [Pierschbacher et al. 1981, Wolfe 1993]. Letzterer gehört zur Protein-Familie der Integrine, bei der es sich um Zelloberflächen-Rezeptoren handelt, die zwar die gleiche Grundstruktur aufweisen, sich jedoch in Bindungsspezifität und Vorkommen unterscheiden. Die Integrine durchspannen die Membran und schaffen eine Verbindung zum Zytoskelett. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Interaktion zwischen

Fibronectin und dem aktivierten Integrin auf der Zelle eine essentielle Voraussetzung für den Aufbau der extrazellulären Matrix darstellt [Wu et al. 1995]. Das Binden von Fibronectin an die extrazelluläre Domäne des membrangebundenen Rezeptors erfolgt über ein Modul, das die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (Ein-Buchstaben-Code: RGD) enthält [Aurich et al. 1998]. Mit dieser Verankerung an der Zelloberfläche einerseits und den weiteren Bindungsstellen andererseits kann Fibronectin eine Brückenfunktion zwischen der extrazellulären Matrix und der Zelle einnehmen.

Hierbei handelt es sich um einen dynamischen Mechanismus, der auch eine Rolle bei der Zellwanderung spielt, denn es müssen fortlaufend Kontakte zur Matrix hergestellt und wieder gelöst werden. Jüngste Untersuchungen zeigen, dass die Anwesenheit von Fibronectin die Migrationsfähigkeit von Fibroblasten erhöht [Andresen et al. 2000]. Auch in der Embryogenese kommen dem Fibronectin wichtige Funktionen zu. Es ist in hohen Konzentrationen in Basalmembranen und extrazellulären Räumen in embryonalen Geweben vorhanden [Sternberg et al. 1986]. Als Beispiele seien hier die Nutzung von Fibronectin sowohl als Leitstruktur bei der Migration als auch in der Adhäsion durch Neuralleistenzellen [Dufour et al. 1988] und das Vorkommen des Glykoproteins in der retinalen Vaskulogenese [Jiang et al. 1994] genannt.

Ebenso wie in diesen physiologischen Beispielen kann Fibronectin in pathologischen Prozessen als Leitstruktur für die Migration genutzt werden, was bei der Entstehung der proliferativen Vitreoretinopathie eine Rolle spielt.

#### **4.1.2 Vorkommen von Fibronectin in der LLI des adulten Auges**

Fibronectin vermittelt in Basalmembranen die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix. Analog zu diesem Mechanismus könnte das Glykoprotein die Verbindung zwischen den Bestandteilen des Glaskörpers und den Zellen der Retina herstellen.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen ist deshalb neben anderen Strukturproteinen das Vorkommen von Fibronectin in der LLI des adulten Auges untersucht worden, allerdings sind die Ergebnisse widersprüchlich. Li et al.

wiesen das Fibronektin in der LLI nach, jedoch bediente sich diese Gruppe im Gegensatz zu den anderen einer elektronenmikroskopischen Technik [Li et al. 2002]. Deshalb ist diese Studie mit den anderen Arbeiten (einschließlich der vorliegenden) nicht direkt vergleichbar und wird von den folgenden Betrachtungen ausgenommen.

Vier weitere Studien werden in Tabelle 7 (nächste Seite) miteinander verglichen, ihre Ergebnisse sind widersprüchlich.

In den beiden jüngeren Studien konnte kein positiver Nachweis von Fibronektin geführt werden [Hiscott et al. 1992, Ljubimov et al. 1996]. Dagegen gaben Jerdan et al. eine starke Reaktion der LLI mit dem Antikörper gegen das Glykoprotein an [Jerdan et al. 1986b]. Eine detaillierte Beschreibung der Verteilung von Fibronektin in der LLI erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Kohno [Kohno et al. 1987a], deren Ergebnisse weitgehend denen der vorliegenden Arbeit entsprechen. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass Fibronektin in der LLI vorhanden ist. Es handelte sich dabei um eine bandförmige Struktur. Diese hatte am hinteren Pol die größte Dicke und wurde zur Peripherie hin dünner. An der Papille war sie nicht zu erkennen. Sie hatte eine glatte innere und eine unregelmäßige äußere Begrenzung. Außerdem beobachteten wir meist (n=13/19) ein doppelschichtiges Verteilungsmuster. Diese hatte Kohno gelegentlich – bei alten Augen (61-83 Jahre alt) immer – beobachtet. Überträgt man Kohnos Alterseinteilung auf die von uns untersuchten Augen, waren in n=6/9 Augen im „mittleren Alter“ (42-59 Jahre) und in n=5/8 „alten Augen“ eine Doppelschicht zu finden. Im „mittleren Alter“ sind unsere Ergebnisse also mit denen von Kohno vergleichbar, während

**Tab. 6** Bisherige immunhistochemische Studien zu Fibronektin in der Lamina limitans interna des Erwachsenen (ausgenommen Li et al. 2002):

Vergleich von Material, Methoden und Ergebnissen

<b>Studie</b>	<b>Jerdan et al. 1986b</b>	<b>Kohno et al. 1987a</b>	<b>Hiscott et al. 1992</b>	<b>Ljubimov et al. 1996</b>
<b>Augen (Alter/Anzahl)</b>	Keine Angabe	Jung (4-37J.):n=6; Mittel (42-59J.): n=8; Alt (61-83 J.):n=10	Keine Altersangabe, n=7	28-68 J. n=3
<b>Schnitt-Dicke und -Technik</b>	4-6µm	8 µm, Kryo-Schnitte	6 µm, Paraffin-Schnitte	Kryo-Schnitte, keine Angabe zur Schnitt-Dicke
<b>Fixierung</b>	Unfixiert	Unfixiert	Fixiert in 3,7% Formalin	Unfixiert
<b>Färbe-Technik</b>	Immunfluoreszenz	Immunfluoreszenz	Immunperoxidase	Immunfluoreszenz
<b>Antikörper</b>	Zu Primär-AK <sup>2</sup> keine Angabe; Rhodamine-conjugated secondary antisera	Rabbit anti-human plasma fibronectin, Bethesda Research Laboratories, Inc. (Gaithersburg, MD); Sekundär-AK: FITC	Rabbit anti-human plasma fibronectin, DAKO Ltd (High Wycombe, UK); Monoklonaler AK, SIGMA (Poole, UK). Mit beiden AK gleiches Färbemuster!	AK gegen Fibronektin (einschließlich Klon BC-1, Vorkommen in Angiogenese), Monoklonaler AK gegen zelluläres Fibronektin (Klon IST-9), Sera-Lab (Crawley Down, UK); Sekundär-AK: FITC/TRITC
<b>FN<sup>1</sup> in der LLI</b>	Vorhanden, starke Reaktion	Vorhanden, in älteren Augen Doppelschicht	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden

<sup>1</sup> FN=Fibronektin <sup>2</sup> AK=Antikörper

wir bei den „alten Augen“ nicht immer eine Doppelschicht gesehen haben. Die von Foos beschriebene Verdünnung der LLI über den großen Gefäßen [Foos 1977] konnten wir bestätigen.

#### **4.1.3 Warum kommt es zu unterschiedlichen Ergebnissen?**

Um die unterschiedlichen Ergebnisse der Arbeiten zu erklären, muss man sich die Vor- und Nachteile von immunhistologischen Färbetechniken klar machen. Sie erlauben es, das Verteilungsmuster von Antigenen in situ zu studieren und sie vereinen daher morphologische mit funktionellen und biochemischen Aspekten. Dabei sind auch kleinste Mengen der gesuchten Substanz nachweisbar. Andererseits darf die Sensitivität auch nicht überschätzt werden, denn viele Gewebebestandteile sind in Konzentrationen vorhanden, die mit den existierenden immunhistologischen Techniken nicht mehr nachweisbar sind. Eine spezifische Färbung ist deshalb immer signifikant, während der fehlende Nachweis keinen Beweis für ein Nicht-Vorhandensein der gesuchten Substanz darstellt. Des weiteren muss in diesem Zusammenhang die Möglichkeit, dass das relevante Antigen durch die Präparation selbst denaturiert wird, in Betracht gezogen werden. Einen Vorteil bietet hier die Verwendung von Gefrierschnitten, die durch schlagartiges Gefrieren bei Temperaturen von weniger als  $-150^{\circ}\text{C}$  und anschließendes Schneiden am Kryostat hergestellt werden. Die Antigen-Reaktivität bleibt besser erhalten im Gegensatz zu Geweben, die fixiert und eingebettet worden sind. Durch das für die Fixierung verwendete Formaldehyd kommt es innerhalb der Proteine zu Quervernetzungen, die das Anlagern des Antikörpers an das Antigen verhindern (sogenannte Maskierung des Antigens). Die morphologischen Ergebnisse der Kryotechnik sind jedoch wesentlich schlechter, weil das Gewebe – besonders der Glaskörper – beim Schneidevorgang stark zerstört wird. Artefakte durch das Schneiden lassen sich natürlich auch mit der von uns gewählten Paraffineinbettung nicht vollständig vermeiden, doch das Gewebe war hier wesentlich besser erhalten. Die bei der Fixierung entstehenden Quervernetzungen lassen sich durch verschiedene Vorbehandlungen (z.B. enzymatisch oder durch Hitzeeinwirkung) lösen. Dies ist bei der Färbung mit dem Galektin-3-Antikörper durch den Einsatz der

Mikrowelle erreicht worden. Bei der Dauer dieser Behandlung musste ein Mittelweg gefunden werden zwischen ausreichender Demaskierung des Antigens und beginnender Zerstörung des Schnittes, da sich im kochenden Puffer – trotz Silan-Beschichtung der Objektträger und dadurch „Festkleben“ der Präparate – Gewebeteile lösten. Bei der Fluoreszenzfärbung des Fibronektins war keine Vorbehandlung notwendig.

Ein weiterer Grund für die widersprüchlichen Angaben in der Literatur könnte das Verwenden verschiedener Primärantikörper sein. Diese können in der Antigenspezifität differieren, so dass verschiedene Antikörper das gleiche Antigen unterschiedlich gut erkennen. Außerdem existieren unterschiedliche Fibronektin-Varianten, die durch alternatives Spleißen des RNA-Transkripts des Fibronektin-Gens entstehen [Gutman et al. 1987, Schwarzbauer 1991]. Diese Varianten werden eventuell von einem Antikörper unterschiedlich gut erkannt, was unterschiedliche Resultate erwarten lässt.

Bei der Immunfluoreszenz kommt noch hinzu, dass die Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Färbung durch die relativ starke Hintergrundfluoreszenz erschwert wird.

#### **4.1.4 Altersabhängige und pathologische Veränderungen**

Die von Kohno beschriebene Verdickung der Fibronektinschicht konnten wir nicht nachvollziehen, weil wir keine Bulbi der ersten drei Lebensjahrzehnte zur Verfügung hatten und somit keine Vergleiche zu jüngeren Augen anstellen konnten. In den fetalen Augen fanden wir in der vitreoretinalen Grenzschicht nur in einem Auge eine leichte Anreicherung von Fibronektin. Demnach muss dieses Protein während der Reifung des Auges in Kindheit und Jugend in die LLI eingebaut und später weiter angehäuft werden.

Bei den Augen mit einem uvealen Melanom fanden wir eine verdickte LLI und Fibronektineinlagerungen in darunter liegenden Netzhautschichten. Da in diesen Augen eine Störung der Blut-Retina-Schranke charakteristisch ist [Kincaid et al. 1994], könnte das Fibronektin auf diesem Weg ins Auge hineinkommen. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Müllerzellen – vielleicht

angeregt durch Stoffe, die nun die Blut-Retina-Schranke passieren können – mehr von dem Protein produzieren.

Interessanterweise löste sich die verdickte LLI in den Melanom-Augen teilweise von der Netzhaut ab und trennte sich dabei in zwei Schichten. In Versuchen mit Hamster-Zellen ließ sich die Fibronectin-vermittelte Adhäsion durch das Hinzufügen hoher Konzentrationen von Fibronectin autoinhibieren [Yamada et al. 1984]. Vor diesem Hintergrund lässt sich die These aufstellen, dass die vermehrte Proteineinlagerung im pathologisch veränderten Auge den Zusammenhalt zwischen den beiden Fibronectinschichten schwächt und sich deshalb die obere ablösen kann.

Auch im alten Auge verdickt sich die Fibronectinschicht. Gleichzeitig kommt es zu einer gegenüber dem jungen Auge abgeschwächten Anheftung des Glaskörpers [Sebag 1991]. So könnte auch hier das Phänomen der Autoinhibition eine Rolle spielen.

#### **4.1.5 Funktion von Fibronectin in der LLI**

Die Hauptkomponenten des Glaskörperkortex sind Hyaluronsäure und Kollagen. Die Interaktion von Fibronectin mit nativem, nicht-denaturiertem Kollagen hat nur die Stärke einer schwachen (sub-physiologischen) ionischen Bindung [Ingham et al. 1985]. Dagegen zeigt die Kollagen-bindende Domäne des Fibronectins eine deutlich effektivere Bindung von denaturiertem Kollagen, weshalb Yamada dieser Domäne eher eine Rolle in der Bindung und Beseitigung von denaturierten kollagenen Stoffen des Blutes zuordnete [Yamada 1991]. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass das Fibronectin der LLI an das Kollagen des Glaskörpers bindet und so in vivo die vitreoretinale Verbindung herstellt.

Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass Hyaluronsäure an die Fibrin- und Heparin-bindende Domäne am N-terminalen Ende von Fibronectin bindet. Sie tritt nicht selbst mit der Zelle in Kontakt, sondern unterstützt die Anheftung von Zellen an eine Fibronectinmatrix [Nakamura et al. 1994]. Auf die Zelladhäsion an Laminin, einem weiteren Glykoprotein in der LLI [Kohno et al. 1987a], hat die HA keinen Einfluss. Außerdem wurde gezeigt, dass die beiden GAGs

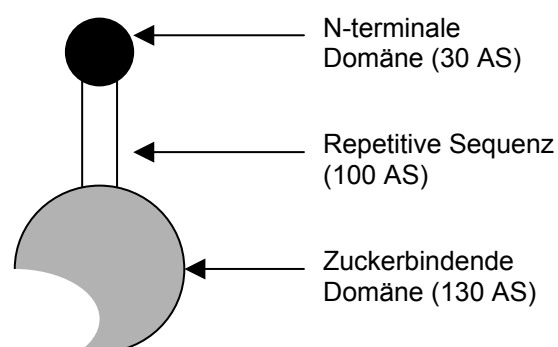
Chondroitin- oder Heparansulfat, die auch im Glaskörper vorkommen, keine Rolle spielen in diesem Zusammenhang [Nakamura et al. 1994].

Offensichtlich verbindet das in der LLI reichlich vorkommende Fibronectin die HA des Glaskörperkortex mit der Zelloberfläche der Müller-Zellen. Die Bindung von HA an Fibronectin kann durch hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen inhibiert werden (halb-maximale Inhibition bei 3 bis 4 mmol  $\text{CaCl}_2$  pro Liter [Hayashi et al. 1982], normale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Glaskörper ca. 1,7 mmol pro Liter [Dufour 1982]). Diese Tatsache könnte man bei der Vitrektomie berücksichtigen und bei der Zusammensetzung der Spülflüssigkeit eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wählen. Normalerweise wird Ringer-Lösung verwendet, die 2,3 mmol  $\text{Ca}^{2+}$  pro Liter enthält. Ob eine höhere Konzentration die Ablösung des Glaskörpers von der Netzhaut erleichtert, müssen zukünftige Studien zeigen.

## 4.2 Galektin-3

### 4.2.1 Funktion von Galektin-3

Eine Möglichkeit, wie das Fibronectin an die umgebende extrazelluläre Matrix (*engl.* extra-cellular matrix, ECM) bindet, stellen Brückenproteine dar, beispielsweise Galektine. Hierbei handelt es sich um eine Untergruppe der Lektine, die an spezifische Oligosaccharidstrukturen von Glykoproteinen und Glykolipiden binden [Perillo et al. 1998]. Die zur Zeit bekannten zehn Mitglieder der Galektinfamilie werden durch zwei Merkmale definiert: charakteristische Aminosäuresequenzen und die Affinität zu  $\beta$ -Galaktosidstrukturen [Barondes et al. 1994]. Ein wichtiges intra- und extrazelluläres Galektin ist das Galektin-3 (vor



**Abb. 23** Schematische Struktur von Galektin-3 [Barondes et al. 1994] AS = Aminosäuren



Einführung der aktuellen Nomenklatur als mL-34, hL-31, CBP-30, CBP-35, IgE-binding protein, Mac-2, oder L-29 bezeichnet), das unter normalen und pathophysiologischen Bedingungen sowohl mit der ECM als auch mit Glykoproteinen der Zelloberfläche interagiert. In adulten Geweben exprimieren es die verschiedensten Zellen: aktivierte Makrophagen, Eosinophile, Neutrophile, Mastzellen, Epithel von Gastrointestinal- und Respirationstrakt sowie einige sensorische Neurone [Hughes 1997].

Das ca. 30 kDa große Galektin-3 enthält drei Domänen (siehe Abb. 23). Während die Funktion des etwa 30 Aminosäuren langen N-terminalen Schwanzes noch unbekannt ist, bedingt die C-terminale zuckerbindende Region (carbohydrate-recognition domain, CRD) die meisten biologischen Eigenschaften und kann durch Galaktose oder Laktose inhibiert werden [Ochieng et al. 1998a]. Durch die zwischen diesen beiden Domänen liegende repetitive Sequenz, die reich an Prolin, Glycin und Tyrosin ist, besitzt das Galektin-3 die Fähigkeit zur Selbstaggregation [Hsu et al. 1992, Massa et al. 1993], bei der allerdings auch der zuckerbindenden Domäne eine Rolle eingeräumt wird [Yang et al. 1998]. Das entstehende multivalente Oligomer ist in der Lage, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion zu vermitteln. Dies geschieht unter anderem über Bindungen an Laminin, Fibronectin, Integrine, das Mac-2 binding protein sowie an MP20, ein Membranprotein der Linsenfaserzellen [Sato et al. 1992, Dong et al. 1997, Ochieng et al. 1998b, Muller et al. 1999, Gonen et al. 2001].

#### **4.2.2 Vorkommen von Galektin-3**

Zum Vorkommen bzw. zur Verteilung von Galektin-3 im menschlichen Auge gibt es bisher keine Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Galektin-3 in der Netzhaut vorkommt. In der zentralen Retina war es immunhistochemisch nicht nachzuweisen (hier waren nur die Endothelzellen der Gefäße Galektin-3-positiv), jedoch fand sich in der anterioren Netzhautabschnitten eine starke Anfärbung. Bei den verwendeten Bulbi handelte es sich um Spenderaugen, denen vor der Fixierung die Hornhaut entnommen wurde. Dadurch hatte die

Fixans zu den vorderen Abschnitten der Netzhaut einen leichteren Zugang. Um Fixationsartefakte auszuschließen, wurde bei der Hälfte der Bulbi deshalb vor der Fixierung auch der hintere Pol eröffnet, indem der Nervus opticus mit umgebendem Skleragewebe entfernt wurde. Da die Färbungen bei allen Augen die gleichen Ergebnisse erbrachten, muss man also davon ausgehen, dass die stärkere Färbung mit einer größeren Menge des Proteins assoziiert ist.

Die Adhäsion von Zellen an Proteine der ECM steigt mit der Menge des exprimierten Galektin-3 [Kuwabara et al. 1996, Matarrese et al. 2000]. Da gerade im Bereich der Glaskörperbasis, wo die Verbindung zur Netzhaut besonders fest ist, große Mengen Galektin-3 gefunden wurden, liegt die Vermutung nahe, dass Galektin-3 eine Rolle in diesem Zusammenhang spielt. Das in den tieferen Schichten der Netzhaut lokalisierte Galektin könnte die Verbindung zur Fibronektinschicht in der LLI herstellen. Außerdem inserieren an der Glaskörperbasis Kollagenfasern aus dem Glaskörper in die Netzhaut [Gloor et al. 1975]. Unbekannt ist jedoch bisher, durch welchen Mechanismus diese Fasern verankert werden und wie groß die Festigkeit dieser Verbindung ist. Eine Möglichkeit wäre, dass die Fasern über Galektin-3 an die Müllerzellen geheftet werden. Letztere übernehmen in der Netzhaut eine Stützfunktion.

Die Markierung von Galektin-3 in der Netzhaut-Peripherie ähnelte dem Färbemuster der Müllerzellen [Terenghi et al. 1983, Chan et al. 1984]. Von deren Kern in der inneren Körnerschicht ziehen Ausläufer durch die gesamte Netzhaut und fächern sich an den Enden breit auf. Demnach müssten die Müllerzellen, die in der gesamten Netzhaut vorhanden sind, Galektin-3 abhängig von ihrer Lokalisation exprimieren. Durch die Produktion des Proteins an der Glaskörperbasis könnten sie hier zur verstärkten Anheftung beitragen.

Müllerzellen produzieren die beiden Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9, die Galektin-3 spalten und so dessen biologische Eigenschaften inhibieren können [Ochieng et al. 1998a]. In Anwesenheit des Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), der in pathologischen Prozessen der Netzhaut eine Rolle spielt, und durch ischämische Zustände der Netzhaut wird die MMP-9-Produktion hochreguliert [Limb et al. 2001, Chintala et al. 2001]. Pathologische Prozesse, zum Beispiel eine Uveitis, in der Glaskörper-Basis

könnten eventuell die adhäsiven Eigenschaften von Galektin-3 beeinflussen. Allerdings sind diese Überlegungen bisher noch höchst spekulativ.

#### **4.2.3 Galektin-3 in der Entwicklung der Netzhaut**

Zur Bedeutung von Galektin-3 für die Entwicklung der Netzhaut gibt es bisher keine Untersuchungen am Auge, weder am menschlichen noch an einem Tiermodell. In der Netzhaut des Hühnerauges konnte jedoch ein „16-kDa Galektin“ nachgewiesen werden. Prä- und postnatal fand es sich in verschiedenen Lokalisationen. Die unterschiedliche Exprimierung lässt auf eine Funktion des 16-kDa Galektins bei den morphologischen Veränderungen der sich entwickelnden Hühnernetzhaut schließen. Während es in der embryonalen Retina auf die äußere Schicht begrenzt war, fand es sich postnatal in der gesamten Netzhaut [Castagna et al. 1994], inklusive der LLI. Das 16-kDa Galektin ist dabei an die Müllerzellen gebunden [Maldonado et al. 1999].

Auch beim Menschen ist es denkbar, dass Galektine in der retinalen Entwicklung eine Rolle spielen. Galektin-3 wurde im ältesten der untersuchten fetalen Augen gefunden, wobei es auf Zellverbände in der Ganglienzellschicht begrenzt war. Diese Lokalisation ist bemerkenswert vor dem Hintergrund, dass Müllerzellen, deren Zellkörper in der reifen Netzhaut in der inneren Körnerschicht liegen, im Laufe der Entwicklung auch in der Ganglienzellschicht auftreten. Die Anzahl dieser Zellen nimmt bei älteren Feten dann immer weiter ab [Spira et al. 1972]. Da Galektine in der retinalen Entwicklung mit Müllerzellen assoziiert sind, könnte es sich bei den Galektin-3-positiven Zellverbänden um Müllerzellen handeln. Die Tatsache, dass sich die Netzhaut von zentral nach peripher ausdifferenziert, würde erklären, warum der Befund zunächst nur am hinteren Pol beobachtet wurde.

Auch die Gefäße entwickeln sich von der Papille zur Peripherie hin, und beim Erwachsenen waren die Endothelzellen der retinalen Gefäße Galektin-3-positiv markiert. Es könnte sich deshalb bei den beschriebenen Zellverbänden im fetalen Auge auch um Zellen der Angiogenese handeln.

Im menschlichen Auge verursacht eine retinale Ischämie die Proliferation von Netzhautgefäßen – bei Frühgeborenen typischerweise in der Netzhaut-

peripherie, im adulten Auge meistens zunächst auf der Papille. In der vorliegenden Arbeit konnte Galektin-3 in der Peripherie und Ora serrata der erwachsenen, nicht aber der fetalen Netzhaut nachgewiesen werden. Möglicherweise verhindert Galektin-3 durch seine adhäsiven Eigenschaften die Gefäßproliferation in der adulten Netzhaut-Peripherie. Dagegen könnte die vergleichsweise geringere Konzentration bzw. das Fehlen von Galektin-3 in der fetalen Netzhaut die Lokalisation der Neovaskularisation dort begünstigen.

### **4.3 Interaktion von Galektin-3 und Fibronektin**

Galektin-3 bindet an Komponenten der ECM und kann die Adhäsion von Zellen an Glykoproteine vermitteln. Diese Bindung erfolgt im allgemeinen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig über Kohlenhydrat-Strukturen [Hughes 1997]. Allerdings spielt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in bestimmten Fällen offenbar doch eine Rolle. So fördert Galektin-3 beispielsweise in niedrigen Konzentrationen die Adhäsion von Neutrophilen an Laminin  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängig, in höheren Konzentrationen unabhängig von diesen Kationen. Die Anheftung von Neutrophilen an Fibronektin dagegen ist immer  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängig. Hier wurde die Adhäsion in Anwesenheit des Chelatbildners EDTA komplett inhibiert [Kuwabara et al. 1996]. Wie allerdings die Adhäsion von retinalen Zellen an Fibronektin durch die Kalzium- oder Magnesium-Konzentration beeinflusst wird, ist bisher nicht bekannt.

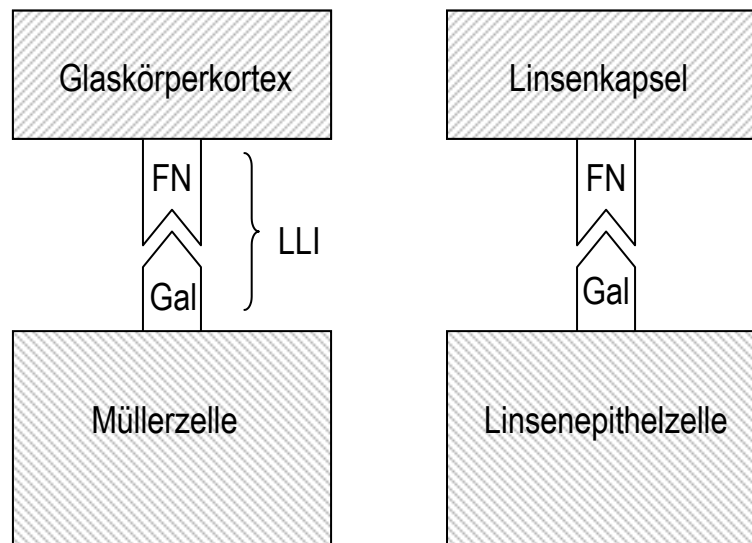
Sato et al. konnten zeigen, dass die Adhäsion von Hamster-Nierenzellen an Laminin durch Galektin-3-Antikörper nicht unterdrückt wird, obwohl die untersuchten Zellen Galektin-3 an der Zelloberfläche exprimieren [Sato et al. 1992]. Dieser Befund lässt vermuten, dass für die Funktion des Galektin-3 in der Zelladhäsion die Bindung an ein anderes Protein, beispielsweise Fibronektin, entscheidender ist. Andererseits fanden Matarrese et al. an Zellen eines humanen Mammakarzinoms durch die Anwesenheit von Laktose eine Inhibierung der Adhäsion an Laminin und Vitronektin, nicht aber an Fibronektin [Matarrese et al. 2000]. Über welches Glykoprotein Galektin-3 Zell-Matrix-

Verbindungen vermittelt, scheint also zelltypspezifisch zu sein. Eine diesbezügliche Untersuchung an retinalen Zellen steht noch aus.

Ein weiteres Beispiel besonders starker Zelladhäsion findet sich in der Linse. Hier ist eine dichte Zusammenlagerung der Linsenfasermembranen erforderlich, um die Lichtstreuung zu minimieren. Dies ist eine Voraussetzung für die optische Transparenz der Linse. Im Linsenkorax des Schafs wurde Galektin-3 an den Plasmamembranen der Linsenfasern biochemisch nachgewiesen [Gonen et al. 2000]. Hier bindet es über seine zuckerbindende Domäne an das Membranprotein MP20 [Gonen et al. 2001].

In der vorliegenden Arbeit wurde räumliche Verteilung von Galektin-3 in humanen Augen gezeigt. In der adulten Linse konnte es in den Linsenepithelzellen (LEZ) und den angrenzenden Fasern markiert werden, jedoch blieb die Linsenkapsel frei. Bemerkenswerterweise enthält die Kapsel jedoch Fibronectin. Hier lassen sich Parallelen zur vitreoretinalen Grenzschicht ziehen, weil in beiden Fällen Zellen (LEZ bzw. retinale Zellen), an denen Galektin-3 nachgewiesen wurde, mit einer Fibronectin-reichen Struktur der ECM (Linsenkapsel bzw. LLI) verbunden werden. Natürlich liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um ähnliche Mechanismen handelt, die auf der Interaktion der beiden Adhäsionsmoleküle Galektin-3 und Fibronectin beruhen (siehe Abb. 24).

Aus dieser Theorie lassen sich therapeutische Ansätze entwickeln. Galaktose hemmt die adhäsiven Eigenschaften des Galektin-3. Man könnte beispielsweise bei der Phakoemulsifikation dem Spülpuffer Galaktose zufügen, wodurch möglicherweise die Ablösung der LEZ von der Linsenkapsel vereinfacht und damit das Auftreten eines Nachstars günstig beeinflusst wird. Eventuell könnte auch ein Galaktosezusatz zum Spülpuffer bei der Vitrektomie die Ablösung des Glaskörpers von der Netzhaut erleichtern.



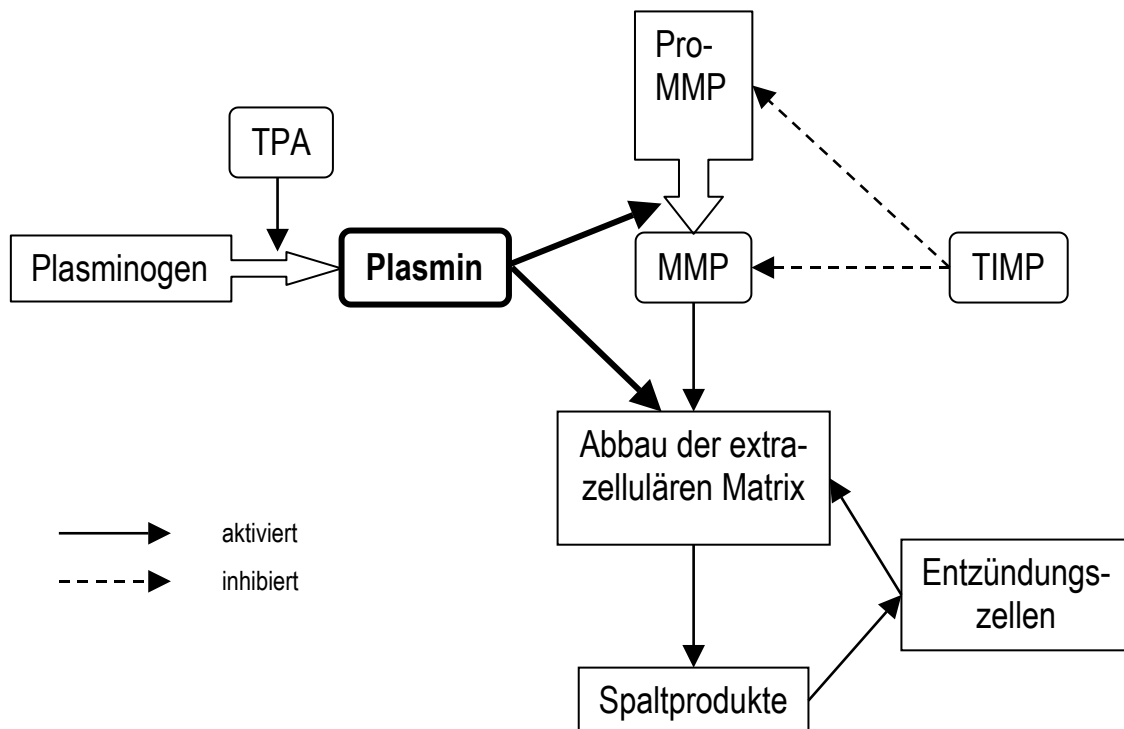
**Abb. 24** Schema zur Interaktion von Fibronectin und Galektin-3 (FN = Fibronectin, Gal = Galektin-3, LLI = Lamina limitans interna)

#### 4.4 Plasmin

Verschiedene Familien proteolytischer Enzyme sind am Abbau der Basalmembranen bzw. der extrazellulären Matrix beteiligt. Serinproteasen wie TPA (tissue plasminogen activator) aktivieren das Proenzym Plasminogen in Gegenwart von Fibrin zu Plasmin, welches Matrixkomponenten abbaut, z.B. Proteoglykane [Edmonds-Alt et al. 1980], Laminin [Schlechte et al. 1989], Typ IV-Kollagen [MacKay et al. 1990] und das hier untersuchte Fibronectin [Jilek 1977]. In der Literatur wird außerdem ein zweiter – wenn auch sekundärer – Effekt an der vitreoretinalen Grenzschicht diskutiert. Im Glaskörper Plasmin-behandelter Augen treten Entzündungszellen auf [Verstraeten et al. 1993], die wahrscheinlich durch Fibronectin-Spaltprodukte induziert werden. Diese Zellen könnten Proteasen, z.B. Elastase, sezernieren, die das Kollagen spalten [Mainardi et al. 1980].

Des Weiteren kann Plasmin indirekt zur Lyse von Matrixproteinen beitragen, indem es Proenzyme der Matrixmetalloproteasen (MMP) aktiviert. Diese

wiederum greifen ein ähnliches Spektrum von Proteinen an wie das Plasmin, unter anderem Kollagen IV, Laminin, Fibronectin, Heparinsulfat, andere Proteoglykane und auch Galektin-3 [Ochieng et al. 1998a]. Die MMP werden von Fibroblasten, Endothelzellen und anderen Zellen (z.B. Tumorzellen) gebildet und als inaktive Proenzyme in den Extrazellulärraum sezerniert. Dort werden sie durch spezifische Inhibitoren, die als TIMP (Tissue inhibitors of metalloproteinases) bezeichnet werden, gehemmt. Normalerweise existiert ein feinreguliertes Gleichgewicht zwischen den MMP und den TIMP. Störungen dieses Gleichgewichtes, wie die Aktivierung der Pro-MMP durch Plasmin, führen zu einem vermehrten Abbau der Substrate [Petrides 1997].



**Abb. 25** Modell zur Wirkungsweise von Plasmin (MMP = Metalloproteinases, TPA = tissue plasminogen activator, TIMP = tissue inhibitors of metalloproteinases)

TPA, das Plasminogen zu Plasmin aktiviert, kann die vollständige Entfernung des Glaskörpers erleichtern. Es wird vor der Vitrektomie intravitreal injiziert und

induziert eine hintere Glaskörperabhebung [Hesse et al. 1999a]. Hierzu muss es Komponenten der LLI angreifen. Beim Hasen zeigen Plasmin-behandelte Augen in einigen Regionen eine HGA, wobei sich noch Kollagenfasern auf der retinalen Oberfläche finden. Erst durch die anschließende Vitrektomie [Verstraeten et al. 1993] oder Gasinjektion von SF<sub>6</sub> (Sulfurhexafluorid) [Hikichi et al. 1999] lässt sich eine vollständige HGA mit glatter Netzhautoberfläche erzeugen. Am Schweineauge [Gandorfer et al. 2001] und am menschlichen Auge [Gandorfer et al. 2002] ermöglicht Plasmin ohne zusätzliche Intervention eine Trennung von Glaskörper und Netzhaut. Verstraeten et al. erreichten im Tierversuch mit einer GK-Dosis von 120 mU/ml Plasmin nach einer 60-minütigen Wartezeit eine HGA. Um bei einem angenommenen Glaskörpervolumen von 4 ml diese enzymatische Aktivität zu erreichen, wurden in der vorliegenden Untersuchung 0,5 U Plasmin in 250 µl PBS injiziert.

Einen spezifischen Effekt von Plasmin bezüglich der Glaskörperabhebung konnten wir nur an der Gruppe A feststellen, also an den Augen, die vorher eingefroren waren. Hier war nicht nur der Glaskörper abgehoben, sondern auch die LLI abgelöst. Die Netzhaut war stark beschädigt, so dass sich sogar Gefäße herausgelöst hatten und frei lagen. Möglicherweise waren die zellulären Strukturen in der Gruppe A durch das Einfrieren geschädigt und dadurch für das Plasmin leichter angreifbar. Die lange Inkubationszeit von sechs Stunden spielt in diesem Zusammenhang wahrscheinlich eher eine unbedeutende Rolle, denn nach intravitrealer Injektion zeigt Plasmin innerhalb von 15 bis 60 Minuten eine maximale Aktivität, die dann schnell abfällt [Verstraeten et al. 1993].

In der Gruppe B zeigte sich kein Unterschied zwischen der Plasmin- und der PBS-Behandlung. Im Gegensatz dazu konnten Gandorfer et al. sowie Li et al. eine HGA an menschlichen Bulbi erzeugen. Diese Arbeitsgruppen injizierten, um den gewünschten Effekt zu erzielen mindestens 2 U Plasmin in 0,1 ml PBS [Gandorfer et al. 2002, Li et al. 2002]. Dies ist eine wesentlich höhere Dosis als die von uns verwendete. Außerdem inkubierten beide Gruppen bei einer Temperatur von 37°C und wir bei Raumtemperatur. Die Aktivität von Plasmin ist zwar temperaturabhängig und bei 37°C höher (Erhöhung der Temperatur um 10°C entspricht einer Verdoppelung der Aktivität), doch das Enzym ist auch bei



Raumtemperatur aktiv [Eigene Untersuchungen, nicht publiziert] und in der Lage, Fibronectin zu spalten [Liotta et al. 1981]. Es wäre deshalb ein Effekt zu erwarten gewesen.

Demnach scheint deshalb eher die zu geringe Dosis, als die Inkubationstemperatur für den fehlenden Effekt bei unserer Untersuchung verantwortlich zu sein.

Interessanterweise ließ sich Fibronectin in der LLI immer markieren. Im Gegensatz dazu stellten Liotta et al. fest, dass eine Basalmembran durch die Einwirkung von Plasmin ihre Immunreaktivität für Fibronectin-Antikörper verliert [Liotta et al. 1981]. Dies ist ein Indiz dafür, dass die LLI im Vergleich zu anderen Basalmembranen besonders viel Fibronectin enthält, das von der eingesetzten Plasminmenge nicht vollständig abgebaut werden konnte. Möglicherweise sind auch die spezifischen Angriffsstellen am Fibronectin in der LLI blockiert, z. B. durch Bindung an andere Moleküle. Eine weitere Erklärung wäre, dass das Plasmin, das ins Zentrum des Glaskörper injiziert wurde, nicht bis zur LLI vorgedrungen ist. Laut Balazs fungieren Glaskörperkortex und LLI als „molekulares Sieb“ [Balazs 1982]. Eventuell hat dies die Diffusion von Plasmin behindert.

Die Tatsache, dass Plasmin eine HGA erzeugt, Fibronectin aber nachweisbar bleibt, legt nahe, dass andere Adhäsionsmoleküle gespalten worden sein müssen, deren Funktionsverlust für die Glaskörperabhebung verantwortlich ist.

#### **4.5 Anatomische Überlegungen zur Zugehörigkeit der LLI**

Die LLI stellt die vitreoretinale Grenzschicht dar. Hier stellt sich die Frage, zu welcher Struktur sie gehört. Traditionell wird sie der Netzhaut zugeordnet, weil sie vermutlich von den Müllerzellen produziert und auch als deren Basalmembran angesehen wird [Sebag 1992, Heegaard 1997]. Nach den Ergebnissen an den eingefrorenen Augen, bei dem sich bei der Glaskörperabhebung die LLI meistens mit ablöste, wäre eher eine Zugehörigkeit zum Glaskörper anzunehmen. Bei den Augen, die vorher nicht

eingefroren waren, fand sich dieses Phänomen jedoch nicht, so dass auch bei Glaskörperabhebung die LLI an der Netzhaut verblieb. Dies legt nahe, dass die Beobachtung bei den eingefrorenen Augen ein Artefakt war, das wahrscheinlich durch Schädigungen beim Gefrieren oder Auftauen zustande kam. Vor diesem Hintergrund ist die LLI der Netzhaut zuzuordnen.

## **4.6 Therapeutische Aspekte**

### **4.6.1 Indikationen zur Erzeugung einer HGA**

Die Trennung von Glaskörper und Netzhaut beeinflusst den Krankheitsverlauf von verschiedenen proliferativen vitreoretinalen Erkrankungen positiv. Ein Beispiel dafür ist die Proliferative Diabetische Vitreoretinopathie (PDVR): Hier sprossen Neovaskularisationen aus der Netzhaut in den Glaskörper. Der Glaskörperkortex dient den wachsenden Zellen als Leitstruktur. Wenn aber die hintere Glaskörpergrenzschicht vollständig abgehoben ist und somit die Leitstruktur fehlt, entsteht kein proliferatives Stadium. Bestehende Proliferationen bilden sich sogar zurück [Jalkh et al. 1982, Tagawa et al. 1986, Akiba et al. 1990a]. Im Gegensatz dazu begünstigt ein partiell an der Netzhaut ziehender Glaskörper Neovaskularisationen [Davies 1965]. Vor diesem pathophysiologischen Hintergrund ist deshalb das therapeutische Ziel die Trennung von Glaskörper und Netzhaut. Diese Trennung soll möglichst vollständig sei, denn wenn Reste der Glaskörpergrenzschicht auf der LLI verbleiben, können von ihnen zelluläre Proliferationen ausgehen [Wiedemann et al. 1990, Casaroli et al. 1994].

Eine hintere Glaskörperabhebung beeinflusst nicht nur den Verlauf der PDVR positiv. Die HGA als Therapieziel wird auch bei anderen vitreoretinalen Erkrankungen diskutiert, zum Beispiel beim vitreomakularen Traktionssyndrom [Hikichi et al. 1995], bei der Bildung von Makulalöchern [Akiba et al. 1990b] oder auch beim Verschluss der Zentralvene oder ihrer Äste [Akiba et al. 1991, Avunduk et al. 1997]. Gegenstand aktueller Forschungen ist die Entwicklung von epiretinalen Implantaten, die als „Sehprothesen“ bei

Degenerationserkrankungen der Netzhaut, wie der Retinitis pigmentosa, eingesetzt werden sollen. Um einen optimalen Kontakt von Elektroden und Netzhautoberfläche herzustellen, dürfen idealerweise keine Glaskörperrückstände auf der LLI verbleiben [Hesse et al. 2000c].

#### **4.6.2 Möglichkeiten zur Erzeugung der HGA**

Um einerseits die Netzhaut von traktiven Kräften zu entlasten und andererseits die hintere Glaskörpergrenzschicht vollständig von der Netzhautoberfläche zu entfernen, löst man derzeit den Glaskörper mechanisch durch eine Pars-plana-Vitrektomie von der LLI ab. Die Abtrennung des Glaskörperkortex birgt jedoch die Risiken von Komplikationen, wie Netzhautlöcher, -ablösungen oder die Beschädigung von retinalen Nervenbahnen [Han et al. 1988, Vander et al. 1992]. Eine weniger verlässliche Methode, mit der eine Abhebung des Glaskörpers erzeugt werden kann, stellt die panretinale Laserkoagulation dar [Leuenberger et al. 1985]. Hierbei kommt es häufig zur Vitreoschisis, also der Spaltung des Glaskörperkortex. Dessen periphere Anteile verbleiben dabei an der Netzhaut [Schwartz et al. 1996].

Wünschenswert wäre eine enzymatische Ablösung des Glaskörperkortex. In der Vergangenheit sind verschiedene Enzyme untersucht worden, die eine HGA erzeugen sollten. Hyaluronidase, Kollagenase, Chondroitinase, Dispase, Plasmin und Gewebe-Plasminogen Aktivator (tissue plasminogen activator, TPA) wurden am Tiermodell getestet [Pirie 1948, O'Neill et al. 1973, Verstraeten et al. 1993, Hageman et al. 1994, Tezel et al. 1998, Hesse et al. 2000b, Gandorfer et al. 2001]. Davon sind lediglich Plasmin und TPA am Menschen angewendet worden [Hesse et al. 1995, Chow et al. 1999, Hesse et al. 1999a, Le Mer et al. 1999, Trese et al. 2000]. Die Enzyme wurden im Rahmen der Vitrektomie eingesetzt und mit Ausnahme der Studie von Le Mer et al. zeigten alle Arbeiten einen positiven Effekt, erleichterten also die chirurgische Behandlung. Die Ursache für den fehlenden Effekt in der Arbeit von Le Mer et al. liegt in der zu kurzen Inkubationszeit [Hesse et al. 2000a]. Das TPA wurde nur 15 Minuten vor der Vitrektomie gegeben. Es benötigt jedoch einige Stunden, um Plasmin aus der Vorstufe Plasminogen zu erzeugen. Dem

gegenüber ist die direkte Wirkungsweise des Plasmins für die klinische Anwendung ein entscheidender Vorteil, weil es, im Gegensatz zu TPA, zu Beginn der Pars-plana-Vitrektomie angewendet werden kann. Sowohl für den Patienten als auch für den Chirurgen ist es angenehm, wenn das Enzym direkt vor der Vitrektomie injiziert werden kann.

Unklar ist bisher, in welcher Dosierung Plasmin eingesetzt werden soll. Die von uns gewählten 0,5 U in 250 µl PBS waren nicht ausreichend, um eine HGA zu erzeugen. Gandorfer et al. waren dagegen mit der vierfachen Dosis erfolgreich. Doch insbesondere bei diesen hohen Dosierungen stellt sich die Frage nach der retinalen Toxizität.

#### **4.6.3 Künftige Therapieansätze**

Um die Adhäsion zwischen LLI und Glaskörperkortex enzymatisch gezielt anzugreifen, müssen allerdings die zugrunde liegenden molekularen Strukturen bekannt sein. Diese sind bisher nicht genau bekannt. Bei der Verbindung zwischen Glaskörper und Netzhaut muss es sich um einen Mechanismus handeln, der nicht allein auf einem Protein basiert. Vielmehr machen die vorliegenden Untersuchungen der Adhäsionsproteine Fibronectin und Galektin-3 eine komplexe Interaktion verschiedener Komponenten wahrscheinlich. Da Fibronectin in der LLI, also der strukturellen Grenzregion zwischen Glaskörper und Netzhaut vorhanden ist und Galektin-3 in den Regionen verstärkter Anheftung vorkommt, kann diesen beiden Proteinen eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang zugeschrieben werden.

Dem komplexen Mechanismus entsprechend, müssen medikamentöse therapeutische Ansätze zur Störung der Adhäsion möglichst nicht nur einzelne Komponenten außer Kraft setzen. So ist Plasmin allein nicht ausreichend, um die LLI zu zerstören. Es muss deshalb an weiteren Punkten angesetzt werden, beispielsweise Veränderungen der Spüllösungen, die bei Vitrektomien verwendet werden. Man könnte hier über eine Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nachdenken. Eine erhöhte Konzentration kann die Bindung der HA des Glaskörperkortex an das Fibronectin der LLI inhibieren [Hayashi et al. 1982]. Dagegen kann eine erniedrigte Konzentration die Adhäsion von Zellen

an Fibronectin stören [Kuwabara et al. 1996] und somit die Verbindung zwischen Müllerzellen und LLI schwächen. Beide Mechanismen können die Anheftung des Glaskörpers an die Netzhaut schwächen. Die Änderung der Kalzium-Konzentration kann allerdings auch unerwünschte Effekte haben: So begünstigt eine Kalzium-freie Spüllösung eine Netzhautablösung, weil sie die Anheftung der äußeren Segmente der Netzhaut an das Pigmentepithel schwächt [Kita et al. 1992, Fang et al. 2001].

Um die Funktion des Galektin-3 zu inhibieren, kann Laktose zugesetzt werden. Auch diese Möglichkeit muss untersucht werden, könnte sie doch einen optimalen Effekt bei minimalen Nebenwirkungen erzielen.

Die einfache und komplikationsarme Anwendung macht die Faszination der biologischen Behandlungsmöglichkeiten aus. Derzeit wird zur Ablösung des Glaskörpers die Pars-plana-Vitrektomie durchgeführt. Dieses mechanische Verfahren ist seit seiner Einführung durch Robert Machemer technisch enorm weiterentwickelt worden [Machemer 1972]. So wurden zum Beispiel die Instrumente verfeinert, die Mikroskope verbessert und Endotamponaden (Silikonöl, Gase) entwickelt, die den Glaskörperraum am Ende des Eingriffs füllen. Trotzdem scheint die Zukunft eher biologischen Verfahren zu gehören, deren Vorteile gerade in der einfachen Anwendung liegen. Vermutlich werden die enzymatischen Verfahren die mechanischen unterstützen – oder sogar ersetzen. Insbesondere bei der Prävention vitreoretinaler Erkrankungen könnte der Einsatz von Enzymen hilfreich sein, um operativ schwierig behandelbare Spätkomplikationen zu vermeiden.

## 5. Zusammenfassung

**Einleitung:** An der Lamina limitans interna (LLI), der strukturellen Grenzregion zwischen Glaskörper und Netzhaut, spielen sich pathologische Prozesse ab, wie zum Beispiel die Proliferation von Gefäßen im Rahmen der Proliferativen Diabetischen Vitreoretinopathie (PDVR). Das therapeutische Ziel bei diesen Erkrankungen ist die Trennung von Glaskörper und Netzhaut und wird derzeit nur durch das mechanische Verfahren der Pars-plana-Vitrektomie erreicht. Um dieses durch einfachere und möglicherweise komplikationsärmere enzymatische Verfahren zu ersetzen, muss die Zusammensetzung der LLI sowie der Effekt des Enzyms auf diese Schicht bekannt sein.

**Material und Methoden:** In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die Verteilung der Adhäsionsmoleküle Fibronectin und Galektin-3 im menschlichen Auge immunhistochemisch untersucht. Dabei wurden adulte und fetale Augen verglichen, weil sich die Lokalisation von Gefäßproliferationen (ausgelöst durch VEGF) in diesen Altersgruppen unterscheidet. Um die Effekte der Serinprotease Plasmin auf die LLI zu untersuchen, injizierten wir dieses Enzym an Spenderaugen intravitreal. Veränderungen unter den Bedingungen des Zusammenbruchs der Blut-Retina-Schranke (wie bei der PDVR) wurden an Augen mit einem uvealen Melanom betrachtet.

**Ergebnisse:** Bei den erwachsenen Augen waren Linsenkapsel, Glaskörperkortex, Netzhautgefäße sowie LLI Fibronectin-positiv. In der LLI zeigte sich eine bandförmige Markierung von Fibronectin, die nach innen glatt und nach außen unregelmäßig begrenzt war. Dieses Band verdünnte sich über den großen Netzhautgefäßen, an der Papille sowie zur Peripherie hin und wurde in den posterioren Abschnitten, wo es besonders dick war, zu einer Doppelschicht (n=13/19). Trotz Plasmin-Behandlung blieb Fibronectin nachweisbar. Ein spezifischer Effekt der Serinprotease war nur an den vorher eingefrorenen Augen festzustellen: Glaskörper und LLI waren abgehoben, die Netzhaut teilweise zerstört und die Gefäße herausgelöst. Bei den nicht eingefrorenen Augen zeigte sich kein Effekt.

In den fetalen Augen wurde Fibronectin in Linsenkapsel, primärem und sekundärem Glaskörper sowie Gefäßwänden markiert. Im Bereich der LLI zeigte sich nur in einem fetalen Auge (22. SSW) eine Fibronectin-positive Anreicherung.

Bei den Augen mit einem uvealen Melanom markierte der Fibronectin-Antikörper eine verdickte LLI und Anreicherungen in den darunter liegenden Netzhautschichten.

Der entscheidende Befund bei den Galektin-3-Untersuchungen an den adulten Augen war die intensive Markierung der peripheren Netzhaut, während das Lektin in den zentralen Anteilen nur in den Epithelzellen der Gefäße nachweisbar war. Die LLI wurde nicht markiert. Bei den fetalen Augen zeigte sich – mit Ausnahme von Galektin-3-positiven Zellverbänden in einem Auge – keine Anfärbung der Netzhaut. In der adulten Linse wurde die Linsenrinde und bei den fetalen Augen auch der Linsenkern markiert, nicht jedoch die Kapsel.

**Diskussion:** Fibronectin ist Bestandteil der LLI von adulten Augen und nimmt hier wahrscheinlich eine Brückenfunktion zwischen der extrazellulären Matrix des Glaskörpers und den Müllerzellen der Netzhaut ein. Bei Störung der Blut-Retina-Schranke verdickt sich die Fibronectinschicht und kann somit als Leitstruktur für die Migration von Zellen dienen, durch die z.B. eine PDVR entstehen kann. Mit der Serinprotease Plasmin soll diese Leitstruktur zerstört werden, um Neovaskularisationen vorzubeugen. Nach der Vorbehandlung mit diesem Enzym blieb Fibronectin jedoch nachweisbar, so dass Plasmin alleine offenbar nicht ausreicht, um die LLI zu zerstören. Vielmehr muss eine künftige Therapie – dem komplexen Mechanismus der Anheftung von Glaskörper und Netzhaut entsprechend – an verschiedenen Stellen ansetzen. So fand sich am Ort der besonders festen Adhäsion, der Glaskörperbasis, das multifunktionelle Protein Galektin-3. Dessen adhäsive Eigenschaften können durch Galaktose oder Laktose gehemmt werden. Ein möglicher Effekt auf die vitreoretinale Adhäsion sollte deshalb untersucht werden. Ebenso müssen künftige Studien zeigen, ob durch eine Spülung mit diesen Monosacchariden der Nachstar nach Kataraktchirurgie verhindert wird, weil so die Anheftung der Linsenepithelzellen an die Galektin-3 enthaltende Linsenkapsel inhibiert werden könnte.

## 6. Literaturverzeichnis

Aiello LP.

Vascular endothelial growth factor and the eye: Biochemical mechanisms of action and implications for novel therapies.

Ophthalmic Res 1997;29:354-362

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, Nguyen HV, Aiello LM, Ferrara N, King GL. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders.

N Engl J Med 1994;331:1480-1487

Akiba J, Arzabe CW, Trempe CL.

Posterior vitreous detachment and neovascularization in diabetic retinopathy.

Ophthalmology 1990a;97:889-891

Akiba J, Quiroz MA, Trempe CL.

Role of posterior vitreous detachment in idiopathic macular holes.

Ophthalmology 1990b;97:1610-1613

Akiba J, Kado M, Kakehashi A, Trempe CL.

Role of the vitreous in posterior segment neovascularization in central retinal vein occlusion.

Ophthalmic Surg 1991;22:498-502

Akiba J, Kakehashi A, Ueno N, Tano Y, Chakrabarti B.

Serum-induced collagen gel contraction.

Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1995;233:430-434



Anderson DR.

Ultrastructure of the optic nerve head.

Arch Ophthalmol 1970;83:63-73

Andresen JL, Ledet T, Hager H, Josephsen K, Ehlers N.

The influence of corneal stromal matrix proteins on the migration of human corneal fibroblasts.

Exp Eye Res 2000;71:33-43

Aurich H, Lasch J.

Chemistry and biochemistry of proteins.

In: Graumann W (Hrsg.). Handbook of Histochemistry, Band IV, Teil 1, 1. Auflage.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1998;252-254

Avunduk AM, Cetinkaya K, Kapicioglu Z, Kaya C.

The effect of posterior vitreous detachment on the prognosis of branch retinal vein occlusion.

Acta Ophthalmol Scand 1997;75:441-442

Baker JR, Caterson B.

The isolation of 'link proteins' from bovine nasal cartilage.

Biochem Biophys Acta 1978;532:249-258

Balazs EA.

Molecular morphology of the vitreous body.

In: The structure of the eye. Smelser GK (Hrsg.), Academic Press, New York & London, 1961;293-310

Balazs EA.

The vitreous.

Int Ophthalmol Clin 1973;13:169-187

Balazs EA, Toth LZ, Ozynics V.

Cytological studies on the developing vitreous as related to the hyaloid vessel system.

Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1980;213:71-85

Balazs EA.

Functional anatomy of the vitreous.

In: Biomedical Foundations of Ophthalmology. Duane TD, Jaeger EA (Hrsg.), Band 1, Harper & Row, Philadelphia, 1982;6-12

Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H.

Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins.

J Biol Chem 1994;269:20807-20810

Campochiaro PA, Jerdan JA, Glaser BM.

Serum contains chemoattractants for human retinal pigment epithelial cells.

Arch Ophthalmol 1984;102:1830-1833

Casaroli MR, Vilaro S.

The role of fibronectin, laminin, vitronectin and their receptors on cellular adhesion in proliferative vitroretinopathy.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:2791-2803

Castagna LF, Landa CA.

Distribution of an endogenous 16-kd S-lac lectin in the chicken retina.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:4310-4316

Castellino FJ.

Plasmin.

In: Barret JA, Rawlings ND, Woessner FF (Hrsg.). Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, London, San Diego, 1998;190-199

Chan C, Rozenszajn LA, Nussenblatt RB, Muellenberg-Coulombre C, Hsu S, Palestine AG, Lando Z, BenEzra D.

Monoclonal antibodies to Müller's cells of the retina.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1984;25:1007-1012

Charles S, Flinn CE.

The natural history of diabetic extramacular traction retinal detachment.

Arch Ophthalmol 1981;99:66-68

Chintala SK, Fini ME.

Evidence that matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) induction following retinal ischemia leads to ganglion cell death.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;38:303 [Suppl]

Chow DR, Williams GA, Trese MT, Margherio RR, Ruby AJ, Ferrone PJ.

Successful closure of traumatic macular holes.

Retina 1999;19:405-409

Cunha-Vaz J, Abreu JRF, Campos AJ, Figo GN.

Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes.

Br J Ophthalmol 1975;59:649-656

Davies M.

Vitreous contraction in proliferative diabetic retinopathy.

Arch Ophthalmol 1965;74:741-751

DiMilla PA, Stone JA, Quinn JA, Albelda SM, Lauffenburger DA.

Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength.

J Cell Biol 1993;122:729-737

Donahue ML, Phelps DL, Watkins RH, LoMonaco MB, Horowitz S.  
Retinal vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression is altered  
in relation to neovascularization in oxygen induced retionpathy.  
Curr Eye Res 1996;15:175-184

Dong S, Hughes RC.  
Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen).  
Glycoconjug J 1997;14:267-274

Dufour DR.  
Lack of correlation of postmortem vitreous humor calcium concentration with  
antemortem serum calcium concentration.  
J Forensic Sci 1982;27:889-893

Dufour S, Duband JL, Humphries MJ, Obara M, Yamada KM, Thiery JP.  
Attachment, spreading and locomotion of avian neural crest cells are mediated  
by multiple adhesion sites on fibronectin molocules.  
EMBO J 1988;7:2661-2671

Dunker S, Kleinert R, Faulborn J.  
Immunhistologische Untersuchungen des Glaskörpers.  
Ophthalmologe 1998;95:8-12

Edmonds-Alt X, Quisquater E, Vaes G.  
Proteoglycan- and fibrin-degrading neutral proteinase activities of Lewis lung  
carcinoma cells.  
Eur J Cancer 1980;16:1257-1261

Eisner G.  
Biomicroscopy of the peripheral fundus.  
Springer Verlag, New York, 1973:45-48

Engerman R, Pfaffenbach D, Davis M.

Cell turnover of capillaries.

Lab Invest 1967;17:738-743

Essner E, Lin W-L.

Immunocytochemical localization of laminin, type IV collagen and fibronectin in rat retinal vessels.

Exp Eye Res 1988;47:317-327

Fang XY, Hayashi A, Cekic O, Morimoto T, Ohji M, Kusaka S, Kamei M, Fujikado T, Tano Y.

Effect of Ca<sup>2+</sup>-free and Mg<sup>2+</sup>-free BSS Plus solution on the retinal pigment epithelium and retina in rabbits.

Am J Ophthalmol 2001;131:481-488

Faulborn J, Bowald S.

Microproliferations in proliferative diabetic retinopathy and their relationship to the vitreous: corresponding light and electron microscopic studies.

Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1985;223:130-138

Fauborn J, Bowald S.

Gibt es eine diabetische Vitreopathie?

Klin Monatsbl Augenheilkd 1986;188:403-404

Flynn JT, O'Grady GE, Herrera J, Kushner BJ, Cantolino S, Milam W.

Retrolental fibroplasia: I. Clinical observations.

Arch Ophthalmol. 1977;95:217-23

Flynn JT, Bancalari E, Bachynski BN, Buckley EB, Bawol R, Goldberg R, Cassady J, Schiffman J, Feuer W, Gillings D.

Retinopathy of prematurity. Diagnosis, severity, and natural history.

Ophthalmology 1987;94:620-29

Folkman J, Shing Y.

Angiogenesis.

J Biol Chem 1992;267:10931-10934

Foos RY.

Vitreoretinal juncture over retinal vessels.

Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1977;204:223-234

Foos RY, Kreiger AE, Forsythe AB, Zakka KM.

Posterior vitreous detachment in diabetic subjects.

Ophthalmology, 1980;87:122-128

Foos RY, Wheller NC.

Vitreoretinal juncture, sychisis senilis and posterior vitreous detachment.

Ophthalmology 1982;89:1502-1512

Gärtner J.

Electron-microscopic study on the fibrillar network and fibrocyte-collagen interactions in the vitreous cortex at the ora serrata of human eyes with special regard to the role of disintegrating cells.

Exp Eye Res 1986;42:21-33

Gandorfer A, Putz E, Welge-Lüssen U, Grüterich M, Ulbig M, Kampik A.

Ultrastructure of the vitreoretinal interface following plasmin assisted vitrectomy.

Br J Ophthalmol 2001;85:6-10

Gandorfer A, Priglinger S, Schebitz K, Hoops J, Ulbig M, Ruckhofer J, Grabner G, Kampik A.

Vitreoretinal morphology of plasmin-treated human eyes.

Am J Ophthalmol 2002;133:156-159

Giudice LC, de Zegher F, Gargosky SE, Dsupin BA, de las Fuentes L, Crystal RA, Hintz RL, Rosenfeld RG.

Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth.

J Clin Endocrinol Metab 1995;80:1548-1555

Gloor BP.

The vitreous.

In: Moses RA (Hrsg.) Adler's physiology of the eye. CV Mosby, St. Louis, 1975:252-274

Gloor BP, Daicker BC.

Pathology of the vitreo-retinal border structures.

Trans Ophthalmol Soc UK 1975;95:387-390

Gonen T, Donaldson PJ, Kistler J.

Galectin-3 is associated with the plasma membrane of lens fiber cells.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41:199-203

Gonen T, Grey AC, Jacobs MD, Donaldson PJ, Kistler J.

MP20, the second most abundant lens membrane protein and member of the tetraspasmin superfamily, joins the list of ligands of galectin-3.

BMC Cell Biol 2001;2:17

Green WR.

Vitreoretinal juncture.

In: Retina. Ryan SJ (Hrsg.), CV Mosby, St. Louis, 1994; Band 3;1869-1930

Gutman A, Kornblihtt AR.

Identification of a third region of cell-specific alternative splicing in human fibronectin mRNA.

Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:7179-7182

Hageman GS, Rusell SR.

Chondroitinase-mediated desinsertion of the primate vitreous body.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:28 [Suppl]

Han DP, Abrams GW, Aaberg TM.

Surgical excision of the attached posterior hyaloid.

Arch Ophthalmol 1988;106:998-1000

Hara A.

Surface structure of rabbit and human retina after enzymatic separation of inner limiting membrane.

Jpn J Ophthalmol 1994;38:375-381

Hayashi M, Yamada KM.

Divalent cation modulation of fibronectin binding to heparin and to DNA.

J Biol Chem 1982;257:5263-5267

Heegaard S, Jensen OA, Prause JU.

Structure of the vitread face of the monkey optic disc (*Macacca mulatta*). SEM on frozen resin-cracked optic nerveheads supplemented by TEM and immunohistochemistry.

Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1988;226:377-383

Heegaard S.

Structure of the human vitreoretinal border region.

Ophthalmologica 1994;208:82-91

Heegaard S.

Morphology of the vitreoretinal border region.

Acta Ophthalmol Scand 1997;222:1-31 [Suppl]



Hellström A, Perruzzi C, Ju M, Engström E, Hård AL, Liu JL, Albertsson-Wikland K, Carlsson B, Niklasson A, Sjödell L, LeRoith D, Senger DR, Smith LE.

Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:5804-5808

Hendrikse F, Yeo KT.

Die Rolle des Glaskörpers in der diabetischen Retinopathie.

Klin Monatsbl Augenheilkd 1993;203:319-323

Hesse L.

Gewebe-Plasminogen Aktivator. Ein vielfältig einsetzbares Enzym in der Augenheilkunde.

Ophthalmologe 1997;94:366-71

Hesse L.

Einsatz von Enzymen im hinteren Augenabschnitt. Derzeitiger Stand und zukünftige Möglichkeiten.

Ophthalmologe 2001;98:1176-1180

Hesse L, Chofflet J, Kroll P.

Tissue plasminogen activator as a biochemical adjuvant in vitrectomy for proliferative diabetic vitreoretinopathy.

German J Ophthalmol 1995;4:323-327

Hesse L, Kroll P.

Enzymatisch induzierte hintere Glaskörperabhebung bei proliferativer diabetischer Vitreoretinopathie.

Klin Monatsbl Augenheilkd 1999a;214:84-89

Hesse L, Kroll P.

TPA-assisted vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy. (Kommentar)

Retina 2000a;20:317-318

Hesse L, Nebeling B, Schroeder B, Heller G, Kroll P.

Induction of posterior vitreous detachment in rabbits by intravitreal injection of tissue plasminogen activator following cryopexy.

Exp Eye Res 2000b;70:31-39

Hesse L, Schanze T, Wilms M, Eger M.

Implantation of retina stimulation electrodes and recording of electrical stimulation responses in the visual cortex of the cat.

Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 2000c;238:840-845

Hikichi T, Yoshida A, Trempe CL.

Course of vitreomacular traction syndrome.

Am J Ophthalmol 1995;119:55-61

Hikichi T, Yanagiya N, Kado M, Akiba J, Yoshida A.

Posterior vitreous detachment induced by injection of plasmin and sulfur hexafluoride in the rabbit vitreous.

Retina 1999;19:55-58

Hilfer SR, Randolph GJ.

Immunolocalization of basal lamina components during development of chick otic and optic primordia.

Anat Rec 1993;235:443-452

Hiscott P, Waller HA, Grierson I, Butler MG, Scott D

Local production of fibronectin by ectopic human retinal cells.

Cell Tissue Res 1992;267:185-92

Hsu DK, Zuberi R, Liu FT.

Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin.

J Biol Chem 1992;267:14167-14174

Hughes RC.

The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules.

Biochem Soc Trans 1997;25:1194-1198

Hynes RO.

Fibronectins.

In: Springer Series in Molecular Biology, Rich A (Hrsg.).

Springer; New York; 1990; 49-82

Ingham KC, Landwehr R, Engel J.

Interaction of fibronectin with C1q and collagen. Effects of ionic strength and denaturation of the collagenous component.

Eur J Biochem 1985;148:219-224

Jalkh A, Takahashi M, Topilow HW, Trempe CL, McMeel JW.

Prognostic value of vitreous findings in diabetic retinopathy.

Arch Ophthalmol 1982;100:432-434

Jerdan JA, Glaser BM.

Retinal microvessel extracellular matrix: an immunofluorescent study.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1986a;27:194-203

Jerdan JA, Kao L, Glaser BM.

The inner limiting membrane – A modified basement membrane?

Invest Ophthalmol Vis Sci 1986b;27:230 [Suppl]

Jiang B, Liou GI, Behzadian MA, Caldwell RB.

Astrocytes modulate retinal vasulogenesis: effects on fibronectin expression.

J Cell Sci 1994;107:2499-2508

Jilek F.

Cold-insoluble globulin III. Cyanogen bromide and plasminolysis fragments containing a label introduced by transamidation.

Z Physiol Chem 1977;358:1165-1168

Kaltner H, Stierstorfer B.

Animal lectins as cell adhesion molecules.

Acta Anat 1998;161:162-179

Kamei A, Totani A.

Isolation and characterization of minor glycosaminoglycans in the rabbit vitreous body.

Biochem Biophys Res Comm 1982;109:881-887

Kincaid MC, Green WR

Pathology of choroidal melanoma.

In: Retina, Ryan SJ (Hrsg.), Band 1, 2. Auflage, CV Mosby, St.Louis, 1994:753-761

King GL.

Cell biology as an approach to the study of the vascular complications of diabetes.

Metabolism 1985;34:17-22 [Suppl]

Kita M, Negi A, Marmor MF.

Lowering the calcium concentration in the subretinal space in vivo loosens retinal adhesion.

Inv Ophthalmol Vis Sci 1992;33:23-29

Klein R, Klein BEK, Moss SE, Davis MD, DeMets DL.

The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years.

Arch Ophthalmol 1984;102:520-526

Kohno T, Sorgente N, Ishibashi T, Goodnight R, Ryan SJ.

Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1987a;28:506-514

Kohno T, Sorgente N, Goodnight R, Ryan SJ.

Alterations in the distribution of fibronectin and laminin in the diabetic human eye.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1987b;28:515-521

Koolmann J, Röhm K-H.

Taschenatlas der Biochemie. 1.Auflage,

Thieme-Verlag Stuttgart, New York, 1994; 309

Kroll P, Meyer-Rüsenberg H, Busse H.

Vorschlag zur Stadieneinteilung der proliferativen diabetischen Retinopathie.

Fortschr Ophthalmol 1987;84:360-363

Kroll P, Wiegand W, Schmidt J.

Vitreopapillary traction in proliferative diabetic retinopathy.

Br J Ophthalmol 1999;83:261-264

Kumazaki T, Mitsui Y, Hamada K, Sumida H, Nishiyama M.

Detection of alternative splicing of fibronectin mRNA in a single cell.

J Cell Sci 1999;112:1449-1453

Kuwabara I, Lia F-T.

Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin.

J Immunol 1996;156:3939-3944

Kuwabara T, Cogan DG.

Studies of retinal vascular patterns.

Arch Ophthalmol 1960;64:124-131

Larsson L, Österlin S.

Posterior vitreous detachment: A combined clinical and physicochemical study.

Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1985;223:92-95

Le Mer Y, Korobelnik JF, Morel C, Ullern M, Berrod JP.

TPA-assisted vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy: results of a double-masked, multicenter-trial.

Retina 1999;19:378-382

Leuenberger S, Faulborn J, Gülecek O.

Histologische Untersuchungen über die Auswirkungen der Lichtkoagulation der Netzhaut auf den Glaskörper.

Klin Monatsbl Augenheilkd 1985;186:272-274

Li X, Shi X, Fan J.

Posterior vitreous detachment with plasmin in the isolated human eye.

Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 2002;240:56-62

Limb GA, Daniels JT, Pleass R, Blood I, Charteris DG, Luthert PJ, Khaw PT.

Expression of MMP-2 and MMP-9 by retinal Muller cells: modulation by extracellular matrix-bound TNF $\alpha$ .

Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;38:303 [Suppl]

Lindner B.

Acute posterior vitreous detachment and its retinal complications.

Acta Ophthalmol Copenh 1966;87:1-108 [Suppl]

Lineham JD, Smith RM, Dahlenburg GW, King RA, Haslam RR, Stuart MC,  
Faull L.

Circulating insulin-like growth factor I levels in newborn premature and full-term  
infants followed longitudinally.

Early Hum Dev 1986;13:37-46

Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V, Garbisa S.

Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on  
glycoprotein and collagenous components of basement membrane.

Cancer Res 1981;42:4629-36

Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Couchman JR, Zardi LZ, Ninomiya  
Y, Sado Y, Huang Z, Nesburn AB, Kenney AC.

Basement membrane abnormalities in human eyes with diabetic retinopathy.

J Histochem Cytochem 1996;44:1469-1479

Machemer R.

A new concept for vitreous surgery. II. Surgical technique and complications.

Am J Ophthalmol 1972;74:1022-1033

MacKay AR, Corbitt RH, Hartzler JL, Thorgeirsson UP.

Basement membrane type IV collagen degradation: evidence for the  
involvement of a proteolytic cascade independent of metalloproteinases.

Cancer Res 1990;50:5997-6001

Mainardi CL, Dixit SN, Kang AH.

Degradation of (type IV) basement membrane collagen by a proteinase isolated from human polymorphonuclear leukocyte granules.

J Biol Chem 1980;255:5435-5441

Maldonado CA, Castagna LF, Rabinovich GA, Landa CA.

Immunocytochemical study of the distribution of a 16-kDa galectin in the chicken retina.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40:2971-2977

Matarrese P, Fusco O, Tinari N, Natoli C, Liu F-T, Semeraro ML, Malorni W, Iacobelli S.

Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties.

Int J Cancer 2000;85:545-554

Matsumoto B, Blanks JC, Ryan SJ.

Topographic variations in the rabbit and primate internal limiting membrane.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1984;25:71-82

Massa SM, Cooper DN, Leffler H, Barondes SH.

L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity.

Biochemistry 1993;32:260-267

Miller JW, Adamis AP, Aiello LP.

Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy.

Diabetes Metab Rev 1997;13:37-50



Muller SA, Sasaki T, Bork P, Wolpensinger B, Schulthess T, Timpl R, Engel A, Engel J.

Domain organization of Mac-2 binding protein and its oligomerization to linear and ring-like structures.

J Mol Biol 1999;291:801-813

Mullin DE, Rohrich ST.

The role of proteinases in cellular invasiveness.

Biochim Biophys Acta 1983;695:177-214

Nakamura M, Mishima H, Nishida T, Otori T.

Binding of hyaluronan to plasma fibronectin increases the attachment of corneal epithelial cells to a fibronectin matrix.

J Cell Physiol 1994;159:415-422

Ochieng J, Green B, Evans S, James O, Warfield P.

Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases.

Biochem Biophys Acta 1998a;1379:97-106

Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P.

Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3.

Biochem Biophys Res Commun 1998b;246:788-791

O'Neill R, Shea M.

The effects of bacterial collagenase in rabbit vitreous.

Can J Ophthalmol 1973;8:366-370

Palmer EA, Flynn JT, Hardy RJ, Phelps DL, Phillips CL, Schaffer DB, Tung B.

Incidence and early course of retinopathy of prematurity. The Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group.

Ophthalmology 1991;98:1628-1640

Pe'er J, Shweiki D, Itin A, Hemo I, Gnessin H, Keshet A.  
Hypoxia induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells  
is a common factor in neovascularizing ocular disease.

Lab Invest 1995; 72:638-645

Perillo NL, Marcus ME, Baum LG.

Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell  
death.

J Mol Med 1998;76:402-412

Peterson PE, Pow CST, Wilson DB, Hendrickx AG.

Localisation of glycoproteins and glycosaminoglycans during early eye  
development in the macaque.

J Anat 1995;186:31-42

Petrides PE.

Binde-und Stützgewebe.

In: Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie.

5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1997;733-760

Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LEH.

Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a  
mouse model of retinal neovascularization.

Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:905-909

Pierschbacher MD, Hayman EG, Ruoslahti E.

Location of the cell-attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies  
and proteolytic fragments of the molecule.

Cell 1981;26:259-267

Pirie A.

Effect of hyaluronidase injection on vitreous humor of the rabbit.

Br J Ophthalmol 1948;33:678-684

Quinn GE, Dobson V, Barr CC, Davis BR, Flynn JT, Palmer EA, Robertson J, Trese MT.

Visual acuity in infants after vitrectomy for severe retinopathy of prematurity.

Ophthalmology 1991;98:5-13

Romberger DJ.

Fibronectin.

Int J Biochem Cell Biol 1997;29:939-943

Roy S, Cagliero E, Lorenzi M.

Fibronectin overexpression in retinal microvessels of patients with diabetes.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1996;37:258-266

Russell SR, Shepherd JD, Hagemann GS.

Distribution of glycoconjugates in the human retinal internal limiting membrane.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1991;32:1986-1995

Sato S, Hughes RC.

Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylectosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin.

J Biol Chem 1992;267:6983-6990

Schlechte W, Murano G, Boyd D.

Examination of the role of the urokinase receptor in human colon cancer mediated laminin degradation.

Cancer Res 1989;49:6064-6069

Schwatz SD, Alexander R, Hiscott P, Gregor ZJ.

Recognition of vitreoschisis in proliferative diabetic retinopathy. A useful landmark in vitrectomy for diabetic traction retinal detachment.

Ophthalmology 1996;103:323-328

Schwarzbauer JE.

Fibronectin: from gene to protein.

Curr Opin Cell Biol 1991;3:786-791

Sebag J.

Age-related changes in human vitreous structure.

Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1987;235:89-93

Sebag J.

The Vitreous. Structure, Function and Pathobiology.

Springer-Verlag, New York, 1989;47-54

Sebag J.

Age-related differences in the human vitreoretinal interface.

Arch Ophthalmol 1991;109:966-971

Sebag J.

Anatomy and pathology of the vitreo-retinal interface.

Eye 1992;6:541-552

Seiler MJ, Aramant RB, Bergstrom A.

Co-transplantation of embryonic retina and retinal pigment epithelial cells to rabbit retina.

Curr Eye Res 1995;14:199-207

Simons BD, Flynn JT.

Retinopathy of prematurity and associated factors.

Int Ophthalmol Clin 1999;39:29-48

Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, Robinson G, Driver S, Bischoff J, Zhang B, Schaeffer JM, Senger DR.

Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor.

Nat Med 1999;5:1390-1395

Smith WJ, Underwood LE, Keyes L, Clemmons DR.

Use of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein measurements to monitor feeding of premature infants.

J Clin Endocrinol Metab 1997;82:3982-3988

Spira AW, Hollenberg MJ.

Human retinal development: ultrastructure of the inner retinal layers.

Dev Biol 1973;31:1-21

Spirin KS, Saghizadeh M, Lewin SL, Zardi L, Kenney MC, Ljubimov AV.

Basement membrane and growth factor gene expression in normal and diabetic human retinas.

Curr Eye Res 1999;18:490-499

Sternberg J, Kimber SJ.

Distribution of fibronectin, laminin and entacin in the environment of migrating neural crest cells in early mouse embryos.

J Embryol Exp Morphol 1986;91:267-282

Stone J, Hin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chang-Ling T, Keshet E.  
Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia.  
J Neurosci 1995;15:4738-4747

Tagawa H, McMeel JW, Trempe CL.  
Role of the vitreous in diabetic retinopathy. II. Active and inactive vitreous changes.  
Ophthalmology 1986;93:1188-1192

Tezel TH, Del Priore LV, Kaplan HJ.  
Posterior vitreous detachment with dispase.  
Retina 1998;18:7-15

The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity.  
An international classification of retinopathy of prematurity.  
Arch Ophthalmol 1984;102:1130-1134

Theopold H, Faulborn J.  
Scanning electron microscopic aspects of the vitreous body.  
Mod Probl Ophthalmol 1979;20:92-95

Therenghi G, Cocchia D, Michetti F, Diani AR, Peterson T, Cole DF, Bloom SR, Polak JM.  
Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina – 1. Light microscopical immunocytochemistry.  
Invest Ophthalmol Vis Sci 1983;24:976-980

Trease MT, Williams GA, Hartzler MK.  
A new approach to stage 3 macular holes.  
Ophthalmology 2000;107:1607-1611

Uehara F, Ohba N, Ozawa M.

Isolation and characterization of galectins in the mammalian retina.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:2164-2172

Ueno N, Watanabe M, Chakrabarti B.

Biochemistry of vitreous non-collagenous protein: a review.

Folia Ophthalmol Jpn 1991;42:983-991

Uga S, Smelser GK.

Electron microscopic study of the development of retinal Mullerian cells.

Invest Ophthalmol 1973;12:295-307

Vander JF, Kleiner R.

A method for induction of posterior vitreous detachment during vitrectomy.

Retina 1992;12:172-173

Verstraeten TC, Chapman C, Hartzler M, Winkler BS, Trese MT, Williams GA.

Pharmacologic induction of posterior vitreous detachment in the rabbit.

Arch Ophthalmol 1993;111:849-854

Weller M, Wiedemann P, Heimann K, Zilles K.

The significance of fibronectin in vitreoretinal pathology. A critical evaluation.

Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1988;226:294-298

Wiedemann P, Weller M, Heimann K.

Proliferative Vitreoretinopathie: Neue Erkenntnisse in Pathophysiologie und Therapie.

Klin Monatsbl Augenheilkd 1990;197:355-361

Wolfe SL.

Molecular and cellular biology.

Wadsworth Publishing Company, Belmont, 1993; 274-310

Wu C, Keivens VM, O'Toole TE, McDonald JA, Ginsberg MH.  
Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of  
a fibronectin matrix.

Cell 1995;83:715-724

Yamada KM, Kennedy DW.

Dualistic nature of adhesive protein function: fibronectin and its biologically  
active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function.

J Cell Biol 1984;99:29-36

Yamada KM.

Fibronectin and other cell interactive glycoproteins.

In: Cell biology of extracellular matrix, 2. Auflage, Hay ED (Hrsg.).

Plenum Press, New York, 1991:111-146

Yang RY, Hill PN, Hsu DK, Liu FT.

Role of the carboxyl-terminal lectin domain in self-association of galectin-3.

Biochemistry 1998;37:4086-4092



## 7. Anhang

**Tab. 7** Adulte Augen für die Fibronectin-Untersuchung

<b>Auge<sup>1</sup></b>	<b>W/M<sup>2</sup></b>	<b>Alter</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Eingefroren: Ja/Nein</b>
<b>A</b>	W	37	1	Ja
<b>B</b>	W	41	1	Nein
<b>C</b>	M	42	1	Ja
<b>D</b>	M	42	1	Ja
<b>E</b>	M	49	1	Ja
<b>F</b>	M	53	1	Ja
<b>G</b>	M	55	1	Ja
<b>H</b>	M	57	1	Ja
<b>I</b>	M	57	1	Ja
<b>J</b>	M	57	1	Ja
<b>K</b>	M	58	1	Ja
<b>L</b>	M	63	1	Ja
<b>M</b>	M	64	2 (M1+M2)	Nein
<b>N</b>	M	65	2 (N1+N2)	Nein
<b>O</b>	M	65	1	Nein
<b>P</b>	M	72	1	Ja
<b>Q</b>	M	76	1	Ja

<sup>1</sup>Wegen des Datenschutzes wurde jedes Auge (geordnet nach dem Alter) mit einem Buchstaben versehen.

<sup>2</sup>W = Weiblich, M = Männlich

**Tab. 8** Augenpaare für die Plasmin-Behandlung

<b>Augenpaar<sup>1</sup></b>	<b>W/M<sup>2</sup></b>	<b>Alter</b>	<b>Eingefroren: Ja/Nein</b>	<b>Gruppe</b>
PA	W	37	Ja	A
PB	W	41	Nein	B
PC	M	42	Ja	A
PD	M	42	Ja	A
PE	W	46	Nein	B
PF	M	49	Ja	A
PG	M	53	Ja	A
PH	M	62	Nein	B
PI	M	65	Nein	B
PJ	M	74	Nein	B
PK	M	76	Ja	A

<sup>1</sup>Wegen des Datenschutzes wurde jedes Auge (geordnet nach dem Alter) mit einem Buchstaben versehen.

<sup>2</sup>W = Weiblich, M = Männlich

**Tab. 9** Adulte Augen für die Galektin-3-Untersuchung

<b>Auge<sup>1</sup></b>	<b>W/M<sup>2</sup></b>	<b>Alter</b>	<b>Hinterer Pol eröffnet</b>
B	W	41	Nein
EA	W	61	Ja
EB	W	50	Ja
EC	W	48	Ja
N	M	65	Nein
O	M	65	Nein

<sup>1</sup> Drei Augen waren auch für die Fibronektin-Färbung benutzt worden. Sie behielten ihren Buchstaben. Die drei anderen wurden mit einem E (für Eröffnung des hinteren Pols) versehen.

<sup>2</sup> W = Weiblich, M = Männlich

Tab. 10 Fetale Augen für die Fibronektin-Untersuchung

Patho-Nummer	Alter (SSW) <sup>1</sup>	Grund des Schwangerschaftsabbruchs	Ausgeschlossen
23/2000	13	Abort	
2658	16	Trisomie 21	
3672	16	Trisomie 21	
4067	16	Trisomie 21	
24/00	16	Unbekannt	
1688	16	Unbekannt	
4741	17	Trisomie 21	
4992	18	Trisomie 21	
3701	19	Trisomie 21	
5257	19	Trisomie 21	
15/2000	20	Infans mortus	
28/2000	20	Spontanausstoßung	
0-1679/98	21	Trisomie 18	
3450	21/22	Trisomie 21	ja
17/2000	22	Anencephalus	
31/2000	22	Interruptio, Citrullinämie	
4815	24	Trisomie 21	
39/2000	25	Unbekannt	
3900	26	Trisomie 21	ja
0-1658/98	32+3	Hydrops	

<sup>1</sup> SSW = Schwangerschaftswoche

Tab. 11 Fetale Augen für die Galektin-3-Untersuchung

Patho-Nummer	Alter (SSW) <sup>1</sup>	Grund des Schwangerschaftsabbruchs
23/2000	13	Abort
24/00	16	Unbekannt
1688	16	Unbekannt
15/2000	20	Infans mortus
0-1679/98	21	Trisomie 18
17/2000	22	Anencephalus

**Tab. 12** Augen mit malignem Melanom der Aderhaut

<b>Name<sup>1</sup></b>	<b>W/M<sup>2</sup></b>	<b>Alter (Jahre)</b>
<b>MA</b>	M	51
<b>MB</b>	M	59
<b>MC</b>	M	65
<b>MD</b>	M	69
<b>ME</b>	W	71
<b>MF</b>	M	71
<b>MG</b>	M	77
<b>MH</b>	W	80
<b>MI</b>	M	81
<b>MJ</b>	W	85

<sup>1</sup>Wegen des Datenschutzes wurde jedes Auge (geordnet nach dem Alter) mit einem M für Melanom und einem Buchstaben versehen.

<sup>2</sup> W = Weiblich, M = Männlich

### Immunfluoreszenzfärbungen - Protokoll Nr.

Datum	Präparat (Nr., Alter, Geschlecht, Vorbehandlung, Pathologie)	Foto- Nr.	Bildbeschreibung	Ver- größe- rung	Belichtungs- zeit	Fibronectin			Bemerkungen
						Gefäßwand	Linsen- kapsel	LLI	

**Abb. 26** Protokollbogen für die Immunfluoreszenzfärbungen

### Immunperoxidasefärbungen - Protokoll Nr.

Datum	Präparat (Nr., Alter, Geschlecht, Vorbehandlung, Pathologie)	Foto- Nr.	Bildbeschreibung	Ver- größe- rung	Galektin-3		Bemerkungen
					Linse	Netzhaut	

**Abb. 27** Protokollbogen für die Immunperoxidasefärbungen

## Protokoll für die Plasmininjektion

Bulbi: \_\_\_\_\_

Bulbi entnommen am \_\_\_\_\_ um \_\_\_\_\_ Uhr.

Hornhaut entfernt am \_\_\_\_\_ um \_\_\_\_\_ Uhr.

Injektion von Plasmin nach \_\_\_\_\_ Stunden.

Bei Raumtemperatur wurde injiziert: 0,5 U Plasmin in 250 µl PBS

Partnerauge: 250 µl PBS

Inkubationszeit für beide Augen: 1 h bei Raumtemperatur

Anschließend beide Augen in 3,8 % Formalin/PBS fixieren.

**Abb. 28** Protokollbogen für die Plasmininjektion

## Protokoll zur Bulbuseröffnung

Bulbus: \_\_\_\_\_

Bulbus entnommen am \_\_\_\_\_ um \_\_\_\_\_ Uhr.

Hornhaut entfernt am \_\_\_\_\_ um \_\_\_\_\_ Uhr.

Eröffnen des hinteren Pols nach \_\_\_\_\_ Stunden.

Vorgehen: Um Sehnerv herum Loch in den Bulbus schneiden (freier Zugang bis zum Glaskörper).

Anschließend in 3,8 % Formalin/PBS fixieren.

**Abb. 29** Protokollbogen für die Bulbuseröffnung für die Galektin-3-Färbung

## 8. Tabellarischer Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Geburt	16. Januar 1976 in Vechta
Eltern	Dr. Dietrich Lühr (Tierarzt) und Doris Lühr (Malerin)
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### **Schulbildung**

1982 – 1986	Grundschule Drebber
1986 – 1988	Orientierungsstufe Barnstorf
1988 – 1995	Gymnasium Graf-Friedrich-Schule Diepholz
24.05.1995	Abitur

### **Studium**

Seit WS 1995/96	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
20.08.1997	Physikum
27.08.1998	Erstes Staatsexamen
27.03.2001	Zweites Staatsexamen
10/2001-09/2002	Praktisches Jahr
	1. Tertial: Innere Medizin, Philipps-Universität Marburg
	2. Tertial: Chirurgie, Hôpital Cochin Paris
	3. Tertial: Augenheilkunde, Universitäts-Augenklinik Köln
07.11.2002	Drittes Staatsexamen



### **Famulaturen**

---

02/1998-03/1998	Chirurgie, St. Marienhospital Vechta
03/1998-04/1998	Augenheilkunde, Medizinisches Zentrum für Augenheilkunde der Philipps-Universität Marburg
03/1999-04/1999	Innere Medizin, St. Marienhospital Vechta
07/1999-08/1999	Augenheilkunde, Universitätsklinik für Augenheilkunde und Optometrie des AKH Wien
03/2000	Radiologie, Röntgenpraxis Diepholz

### **Tätigkeiten außerhalb des Studiums**

---

05/2001-08/2001	Praktikum in der Wissenschaftsredaktion der Süddeutschen Zeitung, München
Seit 09/2001	Freie Mitarbeit in der Wissenschaftsredaktion der Süddeutschen Zeitung, Artikel zu medizinischen Themen

### **Berufliche Tätigkeit**

---

Seit 01/03	Ärztin im Praktikum in der Augenklinik des SLK- Klinikums Heilbronn
------------	--

Marburg, 04.September 2003

## 9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg (Nachnamen in alphabetischer Reihenfolge):

Arnold, Aumüller, Austermann, Barth, Basler, Bauhofer, Baum, Bien, Boudriot, Celik, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Eissele, Elsässer Engel, Feuser, Fruhstorfer, Gemsa, Geus, Gotzen, Griss, Grzeschik, Happle, Hasilik, Hellinger, Herzum, Hesse, Himmelmann, Hoffmann, Hofmann, Hörsch, Joseph, Junge, Kaiser, Katschinski, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Krieg, Kroll, Lang, Lennartz, Leppek, Löffler, Lorenz, Maisch, Mc Gregor, Moll, Moosdorf, Mueller, Oertel, Petermann, Pfab, Pfeiffer Radsak, Ramaswamy, Rechzeh, Reichardt, Renschmidt, Renz, Richter, Rosenow, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schneyer, Schuermann, Schulz, Schurek, Steiniger, Stief, Stiletto, Sturm, Vohland, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, von Wichert, Wille, Wirth, Zwioerek

In Paris:

Dousset, Houssin

In Köln:

Krieglstein, Rüssmann

## 10. Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Lutz Hesse für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Seine Anregungen und seine Begeisterung für das Thema haben sehr viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Kern möchte ich für seine wertvollen Ratschläge danken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Elsässer, der jederzeit als Ansprechpartner bereit stand.

Herzlichen Dank an Waltraud Ackermann für ihre stets geduldige Einführung in die Untersuchungsmethoden und für ihre tatkräftige Unterstützung, an Roland Schmidt und Volkwin Kramer für die Hilfe beim Erstellen der Abbildungen.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des histologischen Labors der Marburger Augenklinik und der Hornhautbank der Medizinischen Hochschule Hannover bedanken.

Vielen Dank an meinen Bruder Henning, der mir bei allen Computer-Problemen immer wieder mit Rat und Tat beiseite gestanden hat, an meine Brüder Andreas und Christian für die Motivation, an Susanne Löhr, die die gesamte Arbeit Korrektur gelesen hat und an Thorsten Hirsch für die seelische Unterstützung.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders bedanken. Sie haben mich während meines gesamten Weges unterstützt und gefördert.