

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
(Direktor: Professor Dr. med. Dr. agr. B. Fischer)

**Morphologisch-funktionelle Untersuchungen von pro-Nerve-
Growth-Factor, Nerve-Growth-Factor und Tumornekrose-
faktor- α an der Augenoberfläche und beim Pterygium oculi**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Michael Daniel Pfütze
geboren am: 24.02.1983 in Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen, Erlangen

Gutachter: Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen, Erlangen
PD Dr. rer. nat, Frank Bartel, Halle (Saale)
PD Dr. med. Ulrich Schaudig, Hamburg

Öffentliche Verteidigung am 17.12.2012

*... sein Eigenes immer wieder zu lesen,
strapaziert nicht bloß sondern verdummt auch ...*

[Theodor Fontane]

Referat

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen das Vorkommen und die spezifischen Wirkungen des Nervenwachstumsfaktors NGF, seiner Vorstufe pro-NGF und des Tumornekrosefaktors alpha (TNF- α) an Zellen und Geweben der Augenoberfläche näher untersucht werden. Als Zellmodelle dienen immortalisierte Cornea- und Konjunktivaepithelzelllinien, als Gewebe werden paraffineingebettete Limbusvollpräparate sowie exzidierte Pterygien als Paraffinschnitt und als Gefrierschnitt verwendet. Immunhistochemisch wird zunächst der Nachweis von pro-NGF und TNF- α geführt, hierbei lässt sich in Pterygien eine subjektiv intensivere Farbreaktion beider Faktoren im Gefäßendothel detektieren. Fluoreszenzimmunhistochemisch sind alle drei Faktoren in Pterygien nachweisbar, wobei sich für pro-NGF eine starke Zellmembranassoziation und für TNF- α eine perinukleäre Granulierung in Keratinozyten der Cornea nachweisen lässt. Um Erkenntnisse über das Proliferationsverhalten von Cornea- und Konjunktivaepithelzellen zu erlangen, werden beide Zelllinien mittels Bromodesoxyuridin-Assay nach Stimulation mit steigenden Dosen an NGF, pro-NGF und TNF- α untersucht. Hierbei kommt es zu einer signifikanten Proliferationsinhibition mit steigenden Dosen von NGF und pro-NGF; im Gegensatz dazu steigert TNF- α in physiologischen Konzentrationen signifikant die Proliferation. Da Pterygien ein starkes Wachstumsverhalten aufweisen, werden an Cornea- und Konjunktivaepithelzellen Motilitätsassays mit NGF, pro-NGF und TNF- α durchgeführt. Hierbei wird deutlich, dass weder NGF/pro-NGF, noch TNF- α einen signifikanten Einfluss auf die Zellmotilität besitzen, ungeachtet der Stimulationskonzentration mit der die Horn- und Bindehautzellen inkubiert werden. Die Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass eine Applikation von pro-NGF oder NGF die Proliferation von Pterygien inhibieren kann, ohne Einfluss auf die lokale Zellmotilität zu besitzen. Klinisch sind heute bereits spezifische Antikörper gegen VEGF in Erprobung. Denkbar wäre im weiteren Verlauf der Einsatz von NGF/pro-NGF als topisches Arzneimittel um Patienten mit rezidivierenden Pterygien eine mögliche therapeutische Hilfe zu bieten.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Das Auge des Menschen	1
1.2 Entzündungen und Botenstoffe	2
1.3 Neurotrophine	3
1.3.1 NGF	3
1.3.2 pro-NGF	4
1.3.3 Die Neurotrophin-Rezeptoren	5
1.4 Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)	6
1.5 Das Pterygium	8
1.5.1 Allgemeines	8
1.5.2 Gradeinteilung (Primär und Rezidive)	9
1.5.3 Epidemiologie	10
1.5.4 Diagnose und Differentialdiagnosen	10
1.5.5 Risikofaktoren	11
1.5.6 Pathogenese	12
1.5.7 Therapie	14
2 Zielstellung	15
3 Material und Methodik	16
3.1 Eingesetzte Materialien/Chemikalien/Sterilisation	16
3.1.1 Chemikalien	16
3.1.2 Gebrauchswaren und Geräte	17
3.1.3 Sterilisation von Lösungen und Geräten	18
3.2 Zellkultur	19
3.2.1 Herkunft der Zelllinien	19
3.2.2 Medien und Kultivierung	19
3.2.3 Zellpassagierung/Zellernte	20
3.2.4 Zellzählung	20
3.3 Art und Herkunft der humanen Gewebepräparate	21
3.4 Immunhistochemie	21
3.4.1 Vorbereiten der Präparate	21
3.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE-Färbung)	21
3.4.3 Immunhistochemische Reaktion (IHC-Reaktion)	23
3.5 Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten	25
3.5.1 Vorbereiten der Präparate	25
3.5.2 Immunfluoreszenzreaktion an Gefrierschnitten	25

3.5.3	Immunfluoreszenzreaktion an Zellen	26
3.6	Bromodesoxyuridin-Proliferationsassay	27
3.6.1	Vorbemerkungen	27
3.6.2	BrdU-Assay – Durchführung	27
3.6.3	Anmerkungen zur Statistik	29
3.7	Motilitätsassay/Einzelzellmigration	29
3.7.1	Vorbemerkungen/Vorbereitungen	29
3.7.2	Versuchsdurchführung	30
4	Ergebnisse	33
4.1	Immunhistochemie	33
4.2	Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten	38
4.3	Bromodesoxyuridin-Proliferationsassay	42
4.3.1	Auswirkungen von NGF	42
4.3.2	Auswirkungen von pro-NGF	43
4.3.3	Auswirkungen von TNF- α	44
4.4	Motilitätsassay/Einzelzellmigration	45
5	Diskussion	47
5.1	Expression und Funktion der Neurotrophine in der Bindehaut	47
5.2	Expression und Funktion der Neurotrophine in der Hornhaut	49
5.3	Allgemeine Expression und Funktion der Neurotrophine am menschlichen Auge	50
5.4	Expression und Funktion von TNF- α an gesunden Zellen und Geweben der Augenoberfläche	52
5.5	Expression und Funktion von NGF/pro-NGF/TNF- α im Pterygium	53
5.6	Möglicher therapeutischer Einsatz in der Ophthalmologie	55
6	Zusammenfassung	56
7	Literaturverzeichnis	58
8	Tabellenanhang	77
9	Thesen	78
10	Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BDNF	Brain-Derived-Neurotrophic-Factor
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CNTF	Ciliary-Neurotrophic-Factor
ConA	Concanavalin A lectin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRH	corticotropin releasing hormone
CrP	C reaktives Protein
Cy3	Cyanin 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal-Growth-Factor
Ephrin2	Substrat für den EphB4-Rezeptor
EphB4	Tyrosinkinase-Rezeptor in nervalem Gewebe
E6	Onkoprotein E6
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HCE	humane corneale Epithelzelllinie
HCjE	humane konjunktivale Epithelzelllinie
HCL	Salzsäure
HPV-16	Humanes Papilloma Virus 16
HPV-18	Humanes Papilloma Virus 18
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton

Konz.	Konzentration (in %)
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
MMP`s	Matrixmetalloproteinasen (MMP-1, MMP-2 etc.)
n	Anzahl, Stichprobenumfang
NaOH	Natronlauge
NGF	Nerve-Growth-Factor
NGFR	Nerve-Growth-Factor-Receptor (p75 und TrkA)
NT-3	Neurotrophin 3
NT-4/5	Neurotrophine 4 und 5
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (probability)
PBS	phosphatgepufferte Saline
pro-NGF	pro-Nerve-Growth-Factor
p53	Tumorsuppressorprotein
p75	Hitzeschockprotein (m = 75kd)
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
s	Standardabweichung
S	Sedimentationskoeffizient
sec	Sekunde
TBS	Trisgepufferte Saline
TLR	Toll-Like-Receptor
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkA	Tyrosinkinase-rezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute
U	Units
uv	ultraviolett
VEGF	vascular-endothelial-growth-factor
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: [corneokonjunktivaler] Limbus, modifiziert nach <http://www.medrounds.org/ocular-pathology-study-guide/2006/03/what-are-landmarks-of-limbus.html>
- Abbildung 2: Modell NGF, modifiziert nach http://www.123rf.com/photo_16083533_chemical-structure-of-a-nerve-growth-factor-ngf-protein-molecule-this-signaling-protein-is-important.html
- Abbildung 3: Ultrastruktur pro-NGF, modifiziert nach <http://www.answers.com/topic/pro-nerve-growth-factor>
- Abbildung 4: Ultrastruktur TNF- α , modifiziert nach http://commons.wikimedia.org/wiki/File:TNFa_Crystal_Structure.rsh.png
- Abbildung 5: Typisches Pterygium (nasal lokalisiert), modifiziert nach http://e.learning.studmed.unibe.ch_augenheilkunde_systematik_bindehaut_images_pterygium2.jpg
- Abbildung 6: Typische Pinguecula, modifiziert nach http://e.learning.studmed.unibe.ch_augenheilkunde_systematik_bindehaut_images_pterygium2.jpg
- Abbildung 7: a: Corneaepithelzelllinie (HCE) in Ponceau S rot und b: Konjunktivalepithelzelllinie (HCjE) in Bromphenol blau
- Abbildung 8: Modell indirekte IHC mit ABC-Komplex, modifiziert nach www.pathologie-online.de/meth/img/ih6.gif
- Abbildung 9: 96-Well-Plattenbestückung
- Abbildung 10: Bestücken der [Migrations-]Kammer
- Abbildung 11: Einspannen der Kammer unter dem Mikroskop, Rotlichteinheit im Hintergrund; Mikroskopische Aufsicht bei 400-facher Vergrößerung; Nach „tracking“ einzelner Zellen, Auswertung der Migrationsstrecke
- Abbildung 12: Speedhistogramm am Beispiel eines Fehlversuches
- Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von pro-NGF und TNF- α am corneokonjunktivalen Limbus
- Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von pro-NGF und TNF- α an Konjunktivaepithel
- Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von pro-NGF und TNF- α an Corneaepithel
- Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von pro-NGF und TNF- α an Corneaendothel
- Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis von pro-NGF und TNF- α am Pterygium
- Abbildung 18: Verteilung von pro-NGF und TNF- α im Limbusgewebe; Verteilung von pro-NGF und TNF- α in pterygialem Gewebe
- Abbildung 19: Synopsis Immunhistochemie

- Abbildung 20: Immunfluoreszenz-Nachweis von nerve growth factor (NGF) in Keratinozyten der Cornea (HCE-Zelllinie) in DAPI/NGF-Overlaytechnik, rechts 1000fache Vergrößerung
- Abbildung 21: Immunfluoreszenz-Nachweis von pro-NGF in Keratinozyten der Cornea
- Abbildung 22: Immunfluoreszenz-Nachweis von TNF- α in Keratinozyten der Cornea
- Abbildung 23: a: Nachweis von NGF in HCjE-Zellen (NGF/DAPI-Overlaytechnik)
b: pro-NGF/DAPI-Overlaytechnik an Konjunktivalepithelzellen
- Abbildung 24: Immunfluoreszenz-Nachweis pro-NGF in pterygialem Gewebe in pro-NGF/DAPI-Overlaytechnik
- Abbildung 25: Immunfluoreszenz-Nachweis von NGF (a) und TNF- α (b) in DAPI-Overlaytechnik in pterygialem Gewebe; c: Triple-Overlay von DAPI/NGF/TNF- α ,
d: einfache DAPI-Kernfärbung [Vergrößerung 400x]
- Abbildung 26: Proliferationsraten (HCE Zellen) nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von NGF
- Abbildung 27: Proliferationsraten (HCjE Zellen) nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von NGF
- Abbildung 28: Proliferationsraten (HCE Zellen) nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von pro-NGF
- Abbildung 29: Proliferationsraten (HCjE Zellen) nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von pro-NGF
- Abbildung 30: Proliferationsraten (HCE Zellen) nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- α
- Abbildung 31: Proliferationsraten (HCjE Zellen) nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- α
- Abbildung 32: Einzelzellmigration von HCE-Zellen nach 2-stündiger Stimulation mit pro-NGF, NGF und TNF- α in steigenden Dosierungen
- Abbildung 33: Einzelzellmigration von HCjE-Zellen nach 2-stündiger Stimulation mit pro-NGF, NGF und TNF- α in steigenden Dosierungen

1 Einleitung

1.1 Das Auge des Menschen

Die von außen sichtbare Augenoberfläche besteht aus dem vorderen Teil der Hornhaut und der von der Bindehaut (Konjunktiva) überdeckten Lederhaut. Die Bindehaut ist ebenso wie die Hornhaut durchsichtig, führt aber Gefäße und fungiert, den Bindehautsack bildend, als Schleimhautschicht. Der Bindehautsack setzt sich aus Conjunctiva bulbi, tarsi und fornix sowie der Hornhautvorderfläche zusammen. Die C. bulbi ist gegenüber der Sclera leicht verschieblich und haftet am Hornhautrand (Limbus corneae) fest an. Ihr Epithel geht am Limbus corneae in das Epithel der Hornhaut über (auch als corneokonjunktivaler Limbus bezeichnet; siehe Abb. 1). Die C. tarsi kleidet die Augenlider aus und ist dort fest mit der Lidplatte (Tarsus) verbunden. Im Fornix conjunctivae bildet die lockere C. fornix eine Umschlagsfalte und geht in die C. bulbi über. Diese Umschlagsfalte bildet die sogenannte „Bindehautreserve“ (Lang et al., 2004) und macht die Beweglichkeit des Bulbus in diesem Bereich möglich. Durch ihre Glätte und unter Verwendung des trilaminären Tränenfilms als Gleitmittel ist ein problemloses Übereinandergleiten der Schleimhäute, wie es beispielsweise beim Lidschluss nötig ist, gegeben. Mikroskopisch besteht die etwa 0,5mm dicke Bindehaut aus einem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel, das im Fornixbereich in ein hochprismatisches Epithel mit solitären Becherzellen übergeht (Junqueira et al., 2000). Unter dem Epithel folgt das konjunktivale Stroma (Tela subconjunctiva), das aus lockerem Bindegewebe besteht und sehr gut vaskularisiert ist (Randschlingennetzbildung am corneokonjunktivalen Übergang). Auch immunologische Funktionen werden wahrgenommen, erkennbar an den vielen Mastzellen und Lymphfollikeln („CALT“ = Konjunktiva-assoziiertes-lymphatisches Gewebe; Lang et al., 2004). Den Übergang zwischen Horn- und Bindehaut bezeichnet man als Limbus. Er bildet nicht nur eine rein anatomische Grenze, sondern stellt auch funktionell eine natürliche Barriere für das konjunktivale Epithel dar. Hier sind auch die sog. VOGT-Palisadenzellen der Cornea lokalisiert, die als Limbusstammzellen die Basis für die Regeneration des Corneaeithels darstellen. Die nicht-vaskularisierte Cornea hingegen besteht von außen betrachtet aus fünf Schichten, ganz oberflächlich in dem mehrschichtig unverhornten Plattenepithel liegen nur etwa 5µm dicke, aber bis zu 50µm große polygonale Superfizialzellen, deren Kerne sich leicht vorwölben. Diese Zellen bilden gegenüber dem ihnen anhaftenden Tränenfilm eine Diffusionsbarriere. Sie werden im Alterungsprozess kontinuierlich

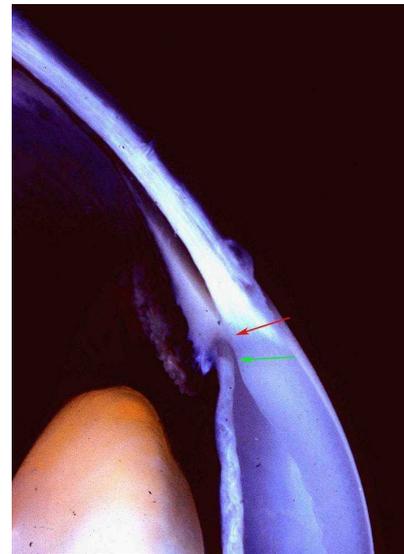


Abb. 1 Corneokonjunktivaler Limbus: der rote Pfeil zeigt den Übergang zwischen Binde- und Hornhaut an.

abgestoßen und von Zellen der darunterliegenden Intermediärschicht ersetzt. Dies nimmt im Mittel einen Zeitraum von circa einer Woche in Anspruch, sodass corneale Traumata, wenn sie lediglich das Epithel betreffen, schnell repariert werden können. Um ein besseres Anhaften des Tränenfilms zu gewährleisten, sind die Korneaepithelzellen mit Micropliquae ausgestattet. Eine weitere Aufgabe der cornealen Keratinozyten ist die Regulation des Salz- und Wassergehaltes des Stromas. Kommt es zu Fehlfunktionen, resultiert daraus eine Trübung mit konsekutiver Visusminderung. Es folgt hiernach die Lamina limitans anterior (Bowmann-Membran), darauf das etwa 90% der Gesamtdicke der Cornea ausmachende Stroma (Substantia propria corneae). Es besteht aus etwa 200 übereinanderliegenden circa 2µm dicken Lamellen, in denen 20-60nm dicke Kollagenfibrillen dicht gepackt und parallel angeordnet sind; des Weiteren aus Proteoglykanen, Wasser und verzweigten Fibrozyten (Kühnel et al., 2002). Das dem Auginneren zugewandte Ende des Stromas wird von der Lamina limitans posterior (Deszemet-Membran) gebildet. Hierauf folgt das einschichtige nicht-regenerationsfähige Hornhautendothel. Hier wird eine weitere Diffusionsbarriere, diesmal gegen das sich in der Augenvorderkammer befindende Kammerwasser (Humor aquosus), gebildet. Der osmotische Gradient ist in Richtung Vorderkammer gerichtet, ein Zusammenbrechen dieses Gradienten, beispielsweise durch Verlust an vitalem Endothel, birgt ebenso die Gefahr der Hornhauttrübung.

1.2 Entzündungen und Botenstoffe

Viele Augenoberflächenerkrankungen gehen mit Entzündungsreaktionen einher. Der Begriff der Entzündung wurde bereits 1854 von R. Virchow geprägt und umfasst, eher auf dem klinisch-makroskopischen Erscheinungsbild fußend, die Phänomene Rubor (Röte), Calor (Wärme), Tumor (Schwellung), Dolor (Schmerz) und functio laesa (Funktionsausfall des betreffenden Organs/Körperteiles) (Virchow, 1854). Mikroskopisch zeigen sich eine Anhäufung von Entzündungszellen sowie eine Hyperämie des betreffenden Gebietes. Die Form der Entzündung kann serös, mukös oder gemischt sero-mukös (häufig viral bedingt), aber auch eitrig bis putride (meist bakteriell bedingt) respektive bakteriell superinfiziert sein. Ebenso kommen granulomatöse Entzündungsformen und phlegmonös-ausbreitend oder abszedierend-begrenzte Verläufe vor. Je nach individueller Abwehrlage oder iatrogener Therapie kommt es zur Regeneration mit oder ohne bleibenden Defekt. Sowohl die Entzündungsvorgänge, als auch die Regenerationsbestrebungen unterliegen maßgeblich den Einflüssen verschiedener Botenstoffe wie Zytokinen und Chemokinen (s.u.). Zytokine sind membrangebundene, meist jedoch frei sezernierte Polypeptide, die immer dann gebildet und freigesetzt werden, wenn eine Immunantwort auf mikrobielle Pathogene oder sonstige (meist fremde) Zellantigene erfolgen soll. Sie dienen der Immunantwort des natürlichen wie auch des erworbenen Immunsystems und bewirken zunächst eine Entzündungsreaktion mit

oben genannten makroskopischen Veränderungen. Ferner führen sie zur Aktivierung und Differenzierung antigenpräsentierender Zellen und Lymphozyten. Ihre Hauptfunktion ist somit die Bereitstellung eines „Netzwerkes von Signalen“ (Holländer et al, 2005), um die Immunabwehr adäquat und spezifisch zu koordinieren. Bis heute ist eine Vielzahl der immunologischen Funktionen, biologisch-biochemisch, physiologisch wie auch pathophysiologisch, teils bis in die Genstruktur aufgeklärt worden. Chemokine (chemotaktische Zytokine) sind eine Untergruppe von Zytokinen. Ihnen kommt eine zentrale Rolle in Bezug auf die Zellmigration zu. Ein Beispiel für auch am Auge vorkommende Zytokine ist die Tumornekrosefaktor-alpha-Familie (siehe Kapitel 1.4), bestehend aus TNF- α , LT α und LT β . TNF- α wird überwiegend von natürlichen Abwehrzellen wie Makrophagen und Lymphozyten synthetisiert (Gordon und Galli, 1990; Hartung et al., 1992; Lieberman et al., 1989; Sawada et al., 1989). Im menschlichen Körper löst es über diverse Signalmoleküle (siehe Abschnitt 1.4) eine caspasenvermittelte Apoptosereaktion aus (Holländer et al., 2005). Es wirkt aber auch zellproliferativ, weshalb im Rahmen dieser Dissertation seine Rolle und sein Vorkommen im Pterygium geklärt werden sollen. Weiterhin werden Wachstum und Einfluss auf die Zellmotilität mit den Neurotrophinen verglichen.

1.3 Neurotrophine

1.3.1 NGF

NGF (Nerve Growth Factor) ist ein neurotropher Mediator, der Entwicklung, Differenzierung und Aufrechterhaltung von sensorischen und sympathischen Neuronen aus dem Neural-kamm reguliert (Anmerkung: Der Neural-kamm setzt sich aus einer Gruppe von Stammzellen zusammen, die während der Embryonalentwicklung stark wandern. Aus ihnen entstehen zahlreiche Gewebe, darunter Knochen und Knorpel des Schädels, die Pigmentzellen der Haut sowie Zellen des Nervensystems). NGF wurde erstmals 1948 von Elmer Bueker beschrieben (Bueker, 1948), der Mäusesarkomgewebe in Hühnerembryonen implantierte. Dabei beobachtete er, dass die Größe paravertebraler Ganglien um das 6-fache anstieg. Die Bezeichnung NGF geht auf Levi-Montalcini zurück (Levi-Montalcini und Hamburger, 1951; Levi-Montalcini, 1952). Es folgten die Isolation aus diversen tierischen Drüsen (Angeletti, 1968; Bailey et al., 1975; Cohen, 1959; Hogue-Angeletti et al., 1976; Chapman et al., 1981; Rubin und Bradshaw, 1981; Harper et al., 1982; Hofman und Unsicker, 1982; Aloe et al., 1981; Darling und Fahnstock, 1988), die Herstellung

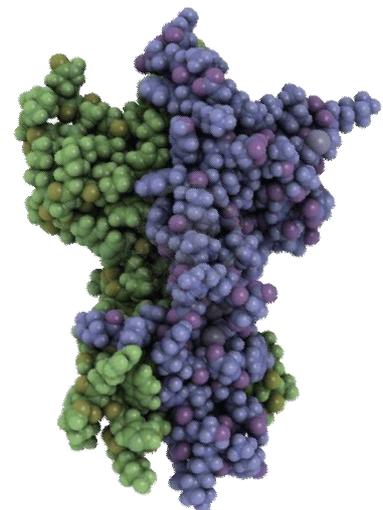


Abb. 2: 3D-Modell von β -NGF, mit zwei nicht-kovalent gebundenen Dimeren (grün und blau dargestellt)

spezifischer NGF-Antikörper und 1983 die Klonierung des NGF Gens beim Menschen (Scott et al., 1983; Ullrich et al., 1983). NGF setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen (α , β und γ ; Server und Shooter, 1977, siehe auch Abb. 2, hier als dreidimensionales Modell schematisch gezeigt), hat einen Sedimentationskoeffizienten von 7S und ein Molekulargewicht von ~ 140000 (Varon et al., 1968). Die zumeist und auch am besten untersuchte Untereinheit ist β -NGF. β -NGF ist ein nicht-kovalent gebundenes Dimer mit einem Molekulargewicht von 26000 ($\sim 12.5\text{kDa}$), das auch nach Spaltung in zwei Monomere biologisch voll aktiv ist (Frazier et al., 1973a; Stach und Shooter, 1974). Die α - und γ -Einheiten gehören zur Familie der Kallikreine (Evans und Richards, 1985; Isackson und Brandshaw, 1984; Evans und Richards, 1985; Thomas et al., 1981a; Ullrich et al., 1984) und sollen, da sie für die vorliegenden Untersuchungen keine Rolle spielen, hier nicht weiter ausgeführt werden. Löst man in Ratten experimentell eine autoimmune Enzephalomyelitis aus, kommt es besonders in der Astroglia zur vermehrten Bildung von NGF und seinen Rezeptoren (Oderfeld-Nowak B et al., 2001). Neueren Erkenntnissen zufolge wirkt NGF allerdings eher als neuro-immuner Modulator, denn als proentzündlicher Faktor; dies konnte im Respirationstrakt von an Asthma bronchiale erkrankten Ratten belegt werden (Stampachiacciere B et al., 2006). Aufgrund dieser Eigenschaft scheint NGF auch humane Monozyten/Makrophagen zumindest zeitweilig vor einer Infektion mit dem HI-Virus schützen zu können (Garaci et al., 1999).

1.3.2 Pro-NGF

Die Translation des NGF-Proteins findet durch alternative Spaltung zweier großer Transkripte statt. So entstehen 34kDa und 27kDa prepro-NGF-Produkte (Precursor). Prepro-NGF wird im endoplasmatischen Retikulum zu pro-NGF-Formen von 32kDa und 25kDa reduziert (Darling et al., 1983; Edwards et al., 1988b; Selby et al., 1987; Ullrich et al., 1983) und glycosiliert. Posttranslational wird pro-NGF sowohl am Amino-, als auch am Carboxyl-Ende verstoffwechselt und so zum reifen, biologisch aktiven NGF (siehe Abb. 3) mit 13.2kDa (Darling et al., 1983). Oxidativer Stress sorgt für eine Kumulation von pro-NGF (Ali et al., 2010). Pro-NGF findet man in Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Hinterhorn ganglien, Rückenmark, Kolon, Haarfollikeln und der Retina der Ratten (Dicou et al. 1986; Chakrabarti et al. 1990; Reinshagen et al., 2000; Yardley et al., 2000; Yiangou et al., 2002) sowie in Stromazellen der Prostata des Menschen (Delsite und Djakiew 1999). Außerdem wurden

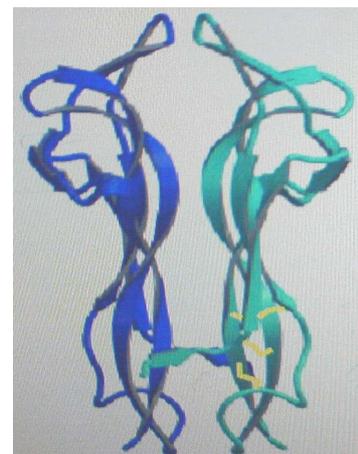


Abb. 3: α -Helix- und β -Faltblatt-Ultrastruktur von pro-NGF; erkennbar sind die beiden Dimere (blau und grün dargestellt) sowie intramolekulare Disulfidbrücken (gelb).

bei Patienten mit subklinischer diabetischer Neuropathie, mit Morbus Crohn und auch mit Morbus Alzheimer pro-NGF und Precursor im Nervengewebe nachgewiesen (Fahnestock et al., 2001). Früher nahm man an, pro-NGF sei nur eine inaktive Vorstufe. Heutzutage mutmaßt man, dass gerade im Gehirn pro-NGF die biologisch aktive Leitsubstanz ist. Es erfolgt eine Bindung mit hoher Affinität zum p75-Rezeptor (siehe auch 1.3.3) und über diesen der apoptotisch vermittelte Zelluntergang (Lee et al., 2001). Das physiologisch synthetisierte pro-NGF bindet den TrkA-Rezeptor und löst die Phosphorylierung in nahezu derselben Aktivität wie das reife NGF aus (Fahnestock et al., 2004). Nach experimentellen Läsionen von corticospinalen Neuronen bei Ratten wird allerdings die Expression von p75 deutlich gesteigert (Giehl et al., 2001). So kommt es bspw. beim Morbus Alzheimer zu einem Ungleichgewicht zwischen p75 und TrkA und pro-NGF ist quantitativ vermehrt nachweisbar (Sobotka et al., 2008), einhergehend mit einer erhöhten Apoptoserate (Podlesniy et al., 2006). Auch nach traumatischen Hirnverletzungen kommt es zu einer vermehrten pro-NGF-Synthese und Sekretion; verhindert man pharmakologisch mittels Antikörpergabe die Bindung zwischen pro-NGF und dem p75-Rezeptor, sinkt die Apoptoserate deutlich (Harrington et al., 2004).

1.3.3 Die Neurotrophin-Rezeptoren

Die Wirkungsentfaltung von NGF findet über die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren statt, von denen zwei Arten bekannt sind. Der Rezeptor p75 (~75 kDa) besitzt eine niedrige Affinität und bindet außer NGF auch alle anderen Neurotrophine. Er gehört zur Familie der Zytokin-Rezeptoren (Mallett und Barclay, 1991) und besteht aus einer extrazellulären, transmembranen und intrazellulären Domäne, kann aber auch in löslicher Form vorkommen (DiStefano und Johnson, 1988). Seine intrazelluläre Domäne, die als „death domain“ bezeichnet wird, wirkt als apoptotischer Faktor (Casaccia-Bonnel et al., 1996; Frade et al., 1996; Majdan et al., 1997). NGF-Applikation führt zur Überexpression der p75-mRNA *in vitro* und steigert die Anzahl beider Rezeptorenarten (p75 und TrkA) in PC12-Zellen (Bernd und Greene, 1984). *In vivo* steigert NGF die Menge an p75-mRNA in cholinergen Neuronen des ZNS (Higgins et al., 1989) sowie in sensorischen und sympathischen Zellen (Miller et al., 1991). Die zweite Rezeptorklasse gehört zur Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und zeigt eine höhere Spezifität für seine Liganden (transmembranöse Tyrosinkinase ~140 kDa) (Barbacid, 1993; Green et al., 1986; Meakin und Shooter, 1992). TrkA bindet selektiv NGF und scheint für das Erreichen der vollen biologischen Wirkung notwendig zu sein (Hempstead et al., 1991; Kaplan, 1991b; Klein et al., 1991a; Loeb et al., 1991). Es kommt zur Rezeptor-vermittelten Endozytose und über die Phosphorylierung anderer Proteine im Zellkern wird dort die Gentranskription verschiedener Proteine und Enzyme induziert (Ehlers et al., 1995; Grimes et al., 1996; Hendry et al., 1974a; Korsching und Thoenen, 1983;

Stöckel et al., 1975). So wird beispielsweise auch Schmerz durch NGF-Applikation an peripheren Nozizeptoren über den TrkA-Rezeptor ausgelöst. Der für NGF spezifische Rezeptor TrkA ist nicht nur bei Nervenzellen, sondern auch bei einer Vielzahl nicht-neuronaler Zellen zu finden. Hieraus erklärt sich die Wirkung von NGF auch auf Zellen des Immunsystems und des endokrinen Systems. Pro-NGF vermittelt seine Wirkung zumeist über den p75-Rezeptor, neueren Erkenntnissen zufolge wird hierbei Sortilin als Co-Rezeptor gebraucht. Sortilin wird in Hirn, Rückenmark, Hoden und Muskeln gefunden. Seine vollständige molekulare und genetische Aufschlüsselung erfolgte durch Petersen et al. (1997). Im eigentlichen Sinne ist es ein Rezeptor für Neurotensin und wird während der Embryogenese in den gleichen Regionen exprimiert wie NGF und pro-NGF. Während NGF seine Effekte über TrkA und p75 vermittelt (siehe oben), leitet pro-NGF die Apoptose lediglich über p75 ein. Manche Zellen benötigen einen Sortilin-pro-NGF-Komplex (gleichzeitige Bindung von pro-NGF an Sortilin und p75), um in die Apoptose zu gehen (Nykjaer et al., 2004). Pro-NGF ist also in Verbindung mit p75 und Sortilin neurotoxisch. Im Alter reichert sich Sortilin in den Neuronen an, dadurch werden diese für Schädigungen jedweder Art empfindlicher. Al-Shawi et al. (2007) konnten zeigen, dass man nicht zwingend die Neurotrophine selbst blockieren muss, sondern nur Sortilin (Al-Shawi et al., 2007). Diese Blockade kann selektiv durch Neurotensin erfolgen (Al-Shawi et al., 2008).

1.4 Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)

Der Tumornekrosefaktor (TNF, früher Kachektin) ist ein multifunktionales Zytokin, das Entzündungsvorgänge lokal wie systemisch mediert. Unter TNF subsummiert man die Substanzen TNF- α , LT α und LT β . Im Folgenden soll jedoch nur auf TNF- α eingegangen werden. TNF- α wird überwiegend von Makrophagen, aber auch von T-Lymphozyten, Mikroglia, Astrozyten, Herzmuskelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Mastzellen synthetisiert (Gordon und Galli, 1990; Hartung et al., 1992; Lieberman et al., 1989; Sawada et al., 1989). TNF- α ist 51kDa schwer und liegt als lösliches Trimer (siehe Abb. 4) vor. Große Mengen werden als Antwort auf Lipopolysaccharide, andere bakterielle Produkte und Interleukin-1 β freigesetzt. Die Bildung wird über Toll-like Rezeptoren (TLR) und den MAP-Kinase-Weg sowie die Signalmoleküle TRADD, TRAF2, NIK und NF- κ B angeregt (Holländer et al., 2005). Dabei hängt die Auswahl des TLR entscheidend von dem körperfremden

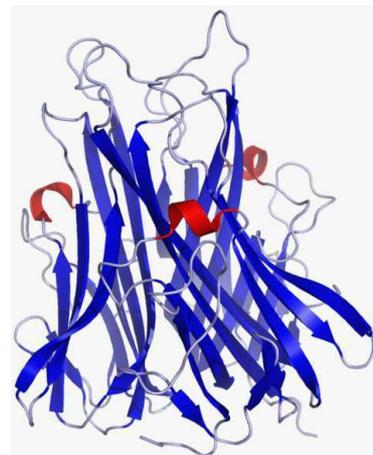


Abb. 4: α -Helix- und β -Faltblatt-Ultrastruktur von TNF- α (dargestellt in blau), eine Visualisierung der Trimerie ist hier nicht möglich. Intramolekulare Disulfidbrücken sind rot dargestellt.

Agens ab (TLR2 bei Mykobakterien, Pilzen, Leptospiren, Trypanosomen, TLR3 bei Viren, TLR4 bei gram-negativen Bakterien und Chlamydien, TLR5 und TLR9 bei diversen Bakterien, TLR9 außerdem noch bei Protozoen). Von den beiden TNF-Rezeptoren (TNF-R1/TNF-R2) wird größtenteils der TNF-R1 benützt. Dieser Rezeptor kann auch ohne die oben genannten Signalmoleküle einen intrazellulären apoptoseinduzierenden Komplex bilden, der über die Aktivierung spezifischer Caspasen die Apoptose auslöst. Seine wichtigste Funktion ist es, die Aktivität verschiedener Immunzellen zu regeln, beispielsweise apoptotische Prozesse zu initiieren, aber auch die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Ausschüttung weiterer Zytokine anzuregen. TNF löst Fieber aus und ist an der Entstehung einer Kachexie bei chronischen Erkrankungen wie z.B. Tuberkulose oder Neoplasien beteiligt. Ferner hat es Effekte auf den Fettstoffwechsel (durch Insulinresistenzinduktion), die Koagulation, die Insulinresistenz und die Endothelfunktion (Hehlhans et al., 2005). Außerdem stimuliert der oben genannte TNF- α -Rezeptorkomplex im Hypothalamus die Ausschüttung von CRH und unterdrückt den Appetit. In der Leber initiiert er die Bildung von Akute-Phase-Proteinen, beispielsweise des CrP. In Makrophagen regt er die Phagozytose an und auf neutrophile Granulozyten wirkt er migrationsfördernd. Lokal erhöhte Konzentrationen von TNF verursachen die unter Punkt 1.2 beschriebenen Entzündungsstigmata. Systemische Applikation kann schockähnliche Zustände generieren. TNF selbst pharmakologisch zu nutzen wird durch seine kurze Halbwertszeit derzeit noch begrenzt. Es gibt allerdings seit geraumer Zeit spezifische TNF- α -Blocker (zumeist spezifische Antikörper) wie Etanercept, Infliximab, Adalimumab oder Certolizumab, die unterschiedlichen Stellenwert in der Therapie von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und der Psoriasis haben. In Bezug auf die NGF-Synthese scheint TNF- α dosisabhängig zu wirken. Bei transgenen Mäusen, die eine TNF- α -Überexpression besitzen, kommt es zu einer Steigerung der NGF-Synthese besonders im Hippocampus (Aloe et al., 1999). Generell wird die Bildung von Neurotrophinen (untersucht an Haarfollikeln und menschlicher Haut) durch TNF- α (etwas weniger durch IL-1 β und IFN- γ) hochreguliert (Bläsing et al., 2005), sodass im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht zuletzt deswegen der Vergleich von Lokalisation und Funktion zwischen den Neurotrophinen einerseits und dem Tumornekrosefaktor andererseits weiter untersucht wird.

1.5 Pterygium

1.5.1 Allgemeines

Carl Ferdinand von Gräfe und Dietrich W. Busch beschreiben im Jahr 1830 ein sogenanntes Augen-, Flügel- oder Nagelfell. Flügel- und Nagelfell deshalb, weil es rein makroskopisch an eine Feder, je nach Wuchsform auch an nagelähnliches Gewebe erinnern kann (griech. πτερύγιον, lat. unguis oculi = „Augennagel“). Es kommt zu einer Verlagerung, respektive einem Vorwachsen von konjunktivalem Gewebe über die durch den

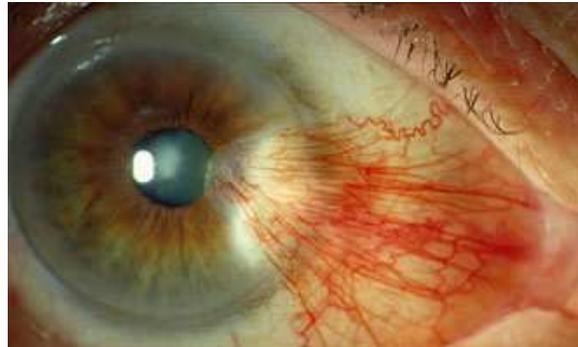


Abb. 5: Beispiel eines typischen Pterygiums, das klassischerweise nasal lokalisiert ist und bereits beginnt, die optische Achse zu verlegen. Deutlich sichtbar ist auch die Hypervaskularisation.

corneokonjunktivalen Limbus anatomisch definierte Grenze auf die Hornhautebene. Ursprung ist zumeist der nasale Augenwinkel (siehe Abb. 5). Diese Ortsprädisposition erklärt sich dadurch, dass hier die Vaskularisation des normalen Bindegewebes am besten ist. Theoretisch kann es aber von jedem Teil des Limbus ausgehen; ein- wie beidseitiger Befall der Augen ist möglich (von Gräfe et al., 1830). Die Form ist gewöhnlich dreieckig, seine Spitze kann aber auch abgerundet, geradlinig bis bizarr gezackt imponieren. Das Kolorit reicht von lachsfarben über gelblich-rot bis grau oder weiß (Fuchsluger, 2007), die Gewebestärke kann zart-lamelliert bis narbig-derb sein. Häufig ist schon von Weitem eine auffallend starke Vaskularisation zu erkennen. Man unterteilt das pterygiale Gewebe klinisch in einen Kopf (Caput pterygii), einen Körper (Corpus pterygii) und einen Schwanz (Cauda pterygii). Der Kopfanteil sowie teilweise der Körper sind fest mit der Horn- beziehungsweise Bindehaut verwachsen, wohingegen der Schwanz der Augenoberfläche lediglich locker aufliegt, sodass man für gewöhnlich eine feine Sonde ein Stück weit darunter vorschieben kann. Die Wachstumsgeschwindigkeiten einzelner Pterygien unterscheiden sich mitunter gravierend. Einige wachsen sehr langsam aber kontinuierlich, andere wachsen anfangs rapide, um dann plötzlich ohne Größenprogredienz zu verharren. Die Arbeitsgruppe um van der Zypen (1975) charakterisiert das Pterygium Mitte der Siebziger Jahre elektronenmikroskopisch als ein Gewebe, das von einem mehrschichtigen, hochdifferenzierten Zylinderepithel bedeckt ist. Die Superficialzellen dieses Epithels tragen einen Mikrovillibesatz, der allerdings in Anordnung und Höhe gewisse Unterschiede zum normalen Bindehautepithel aufweist. Auch zu Sekretion (merokrin, holokrin und mikroapokrin) und Resorption ist das Pterygium fähig. Die basalen Epithelzellen sind besonders reich an metaplastischen Filamenten und tubulöse Drüsenschläuche durchziehen das Epithel bis in das Stroma pterygii hineinreichend. Ihre Wände werden einschichtig von zylindrischen Zellen gebildet, zwischen denen

Becherzellen eingelagert sind (van der Zypen et al., 1975). Im Stroma hingegen findet man reichlich Plasmazellen. Die Vaskularisation ist durch größtenteils gefensterte Kapillarsinusoide gekennzeichnet, die oft degenerative Züge zeigen und deren Basalmembran das fünfzig- bis hundertfache an Dicke, verglichen mit normalen Gefäßen, erreichen können. Auch myelinisierte und unmyelinisierte Nerven findet man (van der Zypen et al., 1975). Mittelfristig kommt es nach längerem Bestehen eines Pterygiums immer zu einem weiteren Progress dieser Neovaskularisation und zur Entzündung (Bradley et al., 2009), die das charakteristische klinische Erscheinungsbild des „roten Auges“ kennzeichnen. Das Vorwachsen des Pterygiums selbst ist zwar schmerzlos, allerdings für den Patienten durch ein unter Umständen immerwährend bestehendes Fremdkörpergefühl belastend. Dieser Reiz führt zum Augenreiben und stellt einerseits an sich, andererseits durch zusätzliches Einbringen von Keimen, einen Entzündungsreiz dar. Ferner kann ein Pterygium durch Zug an der Hornhaut konsekutiv zu einer Stabsichtigkeit (Astigmatismus) führen, wobei der Patient einen fokussierten Punkt mit dem betreffenden Auge als Stab oder Strich wahrnimmt; auch Doppelbilder (Diplopie) sind möglich. Schlimmstenfalls führt ein weiteres ungebremstes Wachstum des Flügelfells zu einer Verlegung der optischen Achse und damit zu einer Erblindung des Auges.

1.5.2 Gradeinteilung (Primär und Rezidive)

Historisch wurde das Flügelfell nach seinem klinischen Erscheinungsbild rein anatomisch-deskriptiv in ein zart-beginnendes (Pterygium tenue), ein derb-fleischiges (P. crassum/P. sarcomatosum), ein zellreiches (P. cellulorum) und ein, bei ausgedehntem Fortschreiten, malignes, bei geringer Alteration stark blutendes, mitunter vereitertes (P. malignum caucosum) Pterygium eingeteilt (von Gräfe et al., 1830). Auch heute noch, gut 180 Jahre später, werden Pterygien klinisch nach Tan et al. (2002) in drei Grade eingeteilt: Grad I beschreibt ein eher atrophes Gewebe mit durchscheinenden episkleralen Blutgefäßen, Grad III ein fleischiges Gewebe, das die episkleralen Gefäße, durch seine Dicke bedingt, völlig verdeckt. Alle anderen Pterygien, die sich zwischen diesen beiden Endpunkten befinden, werden als Grad II (Intermediärstufe) bezeichnet. Anzumerken ist, dass ein Pterygium erst als solches klassifiziert werden darf, wenn es den corneokonjunktivalen Limbus an mindestens einer Stelle um mindestens 3mm überschreitet (Karalezli et al., 2008). Rezidivpterygien nach stattgehabter Exzision werden nach Leippi (2009) ebenfalls in drei Grade (von ihm Rezidivstadien genannt) eingeteilt. Grad I stellt die Bindehauthyperämie dar, bei Grad II zeigt sich fibroblastisches Bindehautgewebe. Als Grad III wird ein frühes Rezidivpterygium (mit vollständiger Ausbildung aller Subgewebe) mit Hornhautbeteiligung bezeichnet, einschließlich einer Hornhautstippung (Leippi et al., 2009).

1.5.3 Epidemiologie

Zur Häufigkeitsverteilung ist vorweg anzumerken, dass zumeist gute Daten und Studien vor allem in den Ländern existieren, in denen die Prävalenz aufgrund ausgeprägterer Risikofaktoren sehr hoch ist (siehe auch Punkt 1.7.5). Generell treten die meisten Pterygien im mittleren Alter (etwa 40 Jahre) auf. Dies bestätigt eine aktuelle Studie aus Kamerun, die zeigt, dass 92% aller Pterygien bei über 30-Jährigen auftreten (Moukoury Nyolo, 2009). Bei 40-jährigen Japanern kommen Pterygien zu 30.8% in mindestens einem, in 13.1% sogar in beiden Augen vor (Shiroma et al, 2009). Meist sind es Männer, die an einem Pterygium leiden. In der ethnischen Subgruppe der Latinos fand West (2009), dass insgesamt 16% aller Latinos mindestens an einem Pterygium leiden. Davon waren 23.7% männliche und 11.5% weibliche Patienten (West et al., 2009). In südlicheren bis äquatornahen Ländern kommen Pterygien so häufig vor, dass beispielsweise in Nigeria rund 11% aller Fälle vom Leitsymptom „rotes Auge“ in einer Augenabteilung auf einem entzündeten Pterygium basieren. Hingegen bilden in unseren Breiten Konjunktivitiden den mit Abstand größten Anteil aller Fälle von roten Augen (Lawan, 2009).

1.5.4 Diagnose und Differentialdiagnosen

Der Befund „Pterygium“ ist an sich, zumindest bei fortgeschrittenem Wachstum, relativ eindeutig, wohingegen bei kleinen Pterygien Fehldiagnosen vorkommen können. Differentialdiagnostisch kommen Narben und Dermoiden, aber auch maligne Tumoren der Augenoberfläche, dem Orbitinneren oder der angrenzenden Nasolabialhaut infrage. Die häufigste Bindehautveränderung ist die Pinguecula (Lidspaltenfleck, Abb. 6), eine meist harmlose Verdickung der Konjunktiva, die auf einer hyalinen Degeneration des subepithelialen Kollagengewebes beruht. Risikofaktoren für das Auftreten einer Pinguecula sind ähnlich denen des Pterygiums (siehe unten). Pingueculae müssen therapeutisch lediglich angegangen werden, wenn sie als kosmetisch störend empfunden werden.



Abb. 6: Dargestellt ist ein Beispiel für eine typische Pinguecula. Auch sie kann nasal lokalisiert sein. Beachte die hier ebenfalls mögliche Hypervaskularisation.

1.5.5 Risikofaktoren

Das Erkennen von Risikofaktoren (siehe Tab. 1) für die Entstehung eines Pterygiums ist schon seit Jahrzehnten Gegenstand der Forschung, weil man sich erhofft, durch möglichst einfache Maßnahmen die Entstehung oder wenigstens die Progredienz bereits vorhandener Pterygien in situ zu verhindern. Schon im 19. Jahrhundert waren es bestimmte Berufsgruppen, die bevorzugt erkrankten, wie Schmiede, Schlosser, Köche, Fuhrleute und Steinmetze (von Gräfe et al., 1830), da sie viel mit Feuer und Stäuben zu tun hatten. Generell sind Männer eher gefährdet als Frauen (nach Fuchsluger 2007; Shiroma et al., 2009), besonders ab etwa 30 Jahren (Moukoury Nyolo, 2009; Shiroma et al., 2009, von Gräfe et al., 1830). Als am besten untersuchter Auslösefaktor gilt die tangentielle UV-Strahlung (Bradley et al., 2009; Fuchsluger, 2007), aber auch indirekte oder an spiegelnden Medien reflektierte Strahlung wie sie an Gewässern oder bei der Arbeit mit Salzkristallen auftritt (Mathur et al., 2005; Taylor et al., 2004). In unseren Breiten sind besonders Surfer und Segler betroffen. Die meisten Menschen, die unter diesen Risikofaktoren (Sonneneinstrahlung und Staubbelastung) leiden, besitzen meist einen niedrigen sozioökonomischen Status (West et al., 2009) mit niedrigem Ausbildungsgrad und niedrigem Pro-Kopf-Einkommen. Besteht zudem noch ein verminderter intraokulärer Druck oder eine Hyperopie, so wird sich ein Pterygium zuerst an dem Auge manifestieren, an dem diese Prädispositionen stärker ausgeprägt sind (Shiroma et al., 2009; Demirok et al., 2008). Auch im Rahmen einer Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) nach Stammzelltransplantation bei Leukämiepatienten treten signifikant mehr Pterygien auf (Karrer, 2004). Als weitere weit verbreitete Noxen wurden der Konsum von Alkohol (Xu et al., 2009) sowie von Tabak (West et al., 2009) untersucht, wobei Alkoholkonsum keinen Risikofaktor darzustellen scheint, Rauchen vermeintlich paradox sogar protektiv ist. Gegenstand experimenteller Forschungen sind eher Risikofaktoren auf zellulärer, humoraler und DNA-Ebene. So scheint die Genese des Pterygiums außer dem oben Gesagten auch von anti-apoptischen wie immunologischen Mechanismen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Modulatoren der Extrazellulärmatrix, genetischen Faktoren und viralen Infektionen erheblich mitgetriggert zu werden (Bradley et al., 2009).

Risikofaktoren	
tangentiale UV-Einstrahlung	verminderter intraokulärer Druck
rezidivierende Staubbelastung	Hyperopie (uni- oder biokulär)
männliches Geschlecht [♂ > ♀]	Graft-versus-Host-Disease
Alter > 30 Jahre	niedriges Pro-Kopf-Einkommen
Humane Papilloma Virusinfektion	niedriger Ausbildungsgrad

Tabelle 1: Übersicht der Risikofaktoren zur Genese des Pterygiums

1.5.6 Pathogenese

Zahlreiche Versuche sind unternommen worden, um die Pathogenese des Pterygiums besser zu verstehen, besonders im Hinblick darauf, herauszufinden, durch welche Faktoren das Flügelfell am Wachstum gehindert, vielleicht sogar in seiner Entstehung verhindert werden kann. Einig ist man sich bisher, dass der corneokonjunktivale Limbus, möglicherweise entartete Limbusstammzellen selbst, die Ausgangsstelle für Zellwachstum und Differenzierung, einhergehend mit einem sogenannten Remodelling des kollagenen Bindegewebes, Neoangiogenese sowie rezidivierenden Entzündungen eines Pterygium ist (Gebhardt et al., 2005; Crăițoiu, 2008). Viele Autoren schreiben Matrixmetalloproteasen (MMP`s) eine bedeutende Rolle zu (Zeng et al., 2004; Schellini et al., 2006; John-Aryankalayil et al., 2006; Di Girolamo et al., 2005). Diese Peptidbindungen spaltenden Enzyme (auch Metallopeptidasen genannt) spalten Eiweiße unter Verbrauch eines Moleküls Wasser (das von einem der zwei Metallkationen, meistens Zink, in Position gehalten wird) und sorgen durch diese lytischen Prozesse nicht nur für das oben genannte Remodelling, sondern werden auch ursächlich für die Destruktion der Bowmann-Membran gemacht (Crăițoiu, 2008). Deren Intaktheit scheint jedoch für einen entscheidenden Schutz vor der Genese eines Pterygiums maßgeblich zu sein (Lang et al., 2004). Die MMP`s 1, 2 und 9 werden besonders häufig in Pterygien detektiert und durch Zerstörung des interstitiellen kollagenen Bindegewebes für den eigentlichen Progress eines Pterygiums verantwortlich gemacht (Zeng et al., 2004; Di Girolamo et al., 2005). Allerdings ist es auch möglich, dass MMP`s zu Beginn der Erkrankung (siehe Gradeinteilung unter 1.5.2) verglichen mit dem normalen Cornea-, Konjunktiva- und Limbusgewebe in äquivalenter Relation vorzukommen scheinen und erst durch Triggerfaktoren wie UV-Licht durch Aktivierung bestimmter Zytokine wie IL-6, IL-8, Lipocalin-2 oder Wachstumsfaktoren (beispielsweise EGF und VEGF) in fortgeschritteneren Graden induziert werden (Gebhardt et al., 2005; Yang et al., 2009; John-Aryankalayil et al., 2006; Mauro et al., 2009; Leippi et al., 2009).

Der Wachstumsfaktor NGF als Vertreter der Neurotrophine und seine Rezeptoren TrkA und p75 wurden immunhistochemisch in Endothelzellen aus Pterygien, Konjunktiva und im corneokonjunktivalem Limbus nachgewiesen (Ribatti, et al., 2009), nicht aber in der Cornea (Di Girolamo et al., 2008). Von weiteren Neurotrophinen (BDNF, CNTF, NT-3, NT-4/5) werden CNTF und NT-4/5 im Pterygium vermehrt detektiert, wobei CNTF im Pterygium durch TNF- α stimuliert werden kann, in normalen Fibroblasten jedoch nicht (Hong et al., 2008). Die UV-Strahlung bewirkt als Primäreffekt eine aktinische Elastose des Stromas und führt somit zum Zusammenbrechen der Bindegewebsmatrix (Ribatti et al., 2009). Ein weiterer zellulärer Signaltransduktionsweg scheint über die Proteinkinase C zu verlaufen. Vergleicht man die genetischen Grundstrukturen eines Pterygiums mit den natürlich vorkommenden Geweben

der Augenoberfläche, so fällt eine Hochregulation von extrazellulärmatrix-orientierten für die Faserbildung zuständigen Genen sowie von proinflammatorischen Genen wie auch Onkogenen auf (John-Aryankalayil et al., 2006). Onkogene können auch von Viren aktiviert werden, so ist beispielsweise bekannt, dass die humanen Papillomaviren (HPV) HPV-16 und HPV-18 p53 in Kopf-/Halstumoren über das HPV E6 Oncoprotein inaktivieren und damit natürlich vorkommende Apoptoseprozesse unterbinden. Die Arbeitsgruppe um Tsai (2009) konnte zeigen, dass HPV-16 und HPV-18 in 24% der untersuchten Pterygien vorkamen, nicht jedoch in normaler Konjunktiva (Khalfaoui et al., 2009). Das Oncoprotein E6 war sogar in 48.3% aller mit HPV infizierten Pterygien nachweisbar, es konnte eine negative Korrelation postuliert werden: je mehr E6 nachgewiesen wurde, desto geringer wurde p53 exprimiert und es konnten konsekutiv weniger apoptotische Kaskaden eingeleitet werden. Auf die Mutationsrate von p53 selbst scheint E6 allerdings keinen Einfluss zu haben (Tsai et al., 2009). Pterygien werden oft als semimalignes Gewebe bezeichnet, da sie keine Metastasierungspotenz aufweisen, dennoch lokal invasiv-destruierend wachsen können, was ihnen einen tumorähnlichen Aspekt verschafft. Bei malignen Tumoren ist Ephrin2 für die verstärkte Angiogenese mitverantwortlich, vermittelt über den EphB4-Rezeptor, der in normaler Konjunktiva lediglich in den Basalzellen vorkommt, in Pterygien aber deutlich überexprimiert wird (Xue et al., 2009). Vimentin ist ein beliebter Marker in der histopathologischen Untersuchung auf Weichteiltumoren, man fand allerdings heraus, dass die Vimentin-exprimierenden Zellen in intakter Konjunktiva wie auch im Pterygium gleich verteilt sind (Chen et al., 2009), was wiederum die These der Degeneration durch oben genannte Risikofaktoren stützt und das pterygiale Gewebe von einer echten Neoplasie unterscheidet.

1.5.7 Therapie

Die derzeitige einzige kausale Therapie besteht in der Operation, wobei versucht wird, das veränderte Gewebe möglichst in toto zu exstirpieren, da das Pterygium besonders bei jungen männlichen Patienten sehr rezidivfreudig ist und übrig gebliebenes Gewebe zur erneuten Proliferation neigt (Meller, 2009). Auch steigt die Komplikationsrate bei Zweiteingriffen deutlich an. Generell stehen mehrere chirurgische Techniken mit oder ohne Zytostatikazusätzen zur Verfügung. Die nach der Exzision entstandene Defektstelle kann mit einer Skleralappenplastik, einem konjunktivalen Lappen oder einem konjunktivalen Autograft gedeckt werden (Alpay et al., 2009). Zusätzlich können Zellgifte wie Mitomycin oder Cyclosporin intra- und/oder postoperativ eingebracht werden, wobei darauf geachtet werden muss, dass das jeweilige Medikament nicht in gesunde Corneaareale gelangen sollte (Avisar et al., 2009). Man erhofft sich durch oben genannte topisch applizierte Substanzen eine Reduktion postoperativer Schmerzen sowie eine Erniedrigung von Komplikations- und Rezidivraten

(Aydin et al., 2008), allerdings gibt es auch Studien, die die ehemals postulierte gute Wirksamkeit in Zweifel ziehen (Pérez-Rico et al., 2009). Auch das Einbringen meist superotemporal gewonnener Limbusstammzellen mit einem konjunktivalen Autograft senkt die Rezidivrate (Soliman Mahdy et al., 2009), wohingegen sich die lange Zeit favorisierten Amnionmembranen nicht zu bewähren scheinen (Ozkurt et al., 2009). Ob die benützten Deckungsmaterialien lieber geklebt werden sollten (Karalezli et al., 2008) oder ob weder Kleben noch Nähen einen Vorteil mit sich bringt (Hall et al., 2009), ist noch umstritten. Neue Ansätze arbeiten mit Antikörpern gegen den vascular-endothelial-growth-factor (VEGF), um eine Reduktion der Neovaskularisation zu erreichen; Leitsubstanz ist hier das Bevacizumab (Mauro et al., 2009), das auch schon in Augentropfen zur Verfügung steht (Leippi et al., 2009). Um Rezidive noch früher erkennen zu können, kann man auch die fluoreszierende Substanz Concanavalin A (ConA) Lectin auf die Exzisionsoberfläche aufbringen (Díaz-González et al., 2007).

2 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollen mittels verschiedener zellbiologischer Verfahren das Vorkommen und die Funktionen von NGF und dessen Vorläufer (pro-NGF) sowie von TNF- α an Zellen und Geweben der Augenoberfläche und beim Pterygium untersucht werden.

Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- a) Können NGF, pro-NGF und TNF- α in Cornea, Konjunktiva, corneokonjunktivalem Limbus und im Pterygium nachgewiesen und lokalisiert werden? In welcher Struktur findet man besonders viel/wenig dieser Faktoren?
- b) Welchen Einfluss besitzen NGF, pro-NGF und TNF- α in Bezug auf die Zellproliferation?
- c) Kommen NGF, pro-NGF und TNF- α auch in Cornea- und Konjunktivalepithelzelllinien vor, die somit als Forschungsmodell dienen könnten?
- d) Wie beeinflussen NGF, pro-NGF und TNF- α die Migration von Epithelzelllinien? Können hieraus weitere Hypothesen über die Pathogenese des Pterygiums abgeleitet werden?

3 Material und Methodik

3.1 Eingesetzte Materialien/Chemikalien/Sterilisation

3.1.1 Chemikalien

AEC Substratlösung	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.
Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Avidin/Biotin Blocking Kit	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.
Biotinylierte Zweitantikörper	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.
BrdU-Assay (Kit)	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Bromphenol Blau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D.
Cy3	Jackson Immunoresearch, Lab, Inc., US.
DAPI	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMEM/HAM's	F12 Biochrom, Berlin, Deutschland
EDTA	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (99,8%)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
FITC polyclonal goat antibody	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.
FITC polyclonal swine antibody	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HCL	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hyaluronidase(5mg/ml)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Invitrogen Matrixgel (pcDNA3.1)	Cohesion Technologies, Palo Alto, US.
Kaninchenserum	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.
50mM MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Moviol	Hoechst sanofi-aventis, Frankfurt, Deutschland
NaCl 0,9%	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Na ₂ CO ₃	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
NaOH	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
NGF (Antikörper)	Chemicon Inc., Nürnberg, Deutschland
NGF (Wachstumsfaktor)	Strathmann Biotech AG, Hamburg, D.
Normalserum	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.

Ponceau S	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
pro-NGF (Antikörper)	Chemicon Inc., Nürnberg, Deutschland
pro-NGF (Wachstumsfaktor)	Strathmann Biotech AG, Hamburg, D.
Propanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Schafserum	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.
Schweineserum	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.
Strept ABCComplex/HRP	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.
TBS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
TNF- α (Antikörper)	Santa Cruz Inc., California, US.
TNF- α (Wachstumsfaktor)	Strathmann Biotech AG, Hamburg, D.
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D.
Wasserstoffperoxid 3%ig	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Wasserstoffperoxid 30%ig	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Xylol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Ziegenserum	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.

3.1.2 Gebrauchswaren und Geräte

Absaugpumpe	HLC, Bovenden, Deutschland
Autoklav	Schütt Labortechnik, Göttingen
Brutschränke	Forma Series II Water Jacketed Co2-Incubatio Hepa Class 100
Cryocut	Cryocut E Reicher-Jung
DAKO-PEN	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.
Deckgläschen 20x20mm	Marienfeld GmbH Co., Lauda-Königshofen, D.
Digital-Kamera	Sony Cyber Shot DSC-F717, Osaka, Japan
Einweg-Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
ELISA-Reader SLT-Spectra	SLT-Labinstruments, Crailsheim, D.
Fluoreszenzmikroskop Eclipse TS 100	Nikon AG, Düsseldorf, Deutschland
Filterpapier	Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland
Filterpapierscheibchen	Whatman Filterpapier Nr. 1450 070
Gefrierschrank -20°C	Liebherr GmbH, Michelstadt, Deutschland
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
HistoBond Adhesion Micro Slides	Marienfeld, Deutschland
Hybond-ECL	Amersham Biosciences, NJ, USA
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, NJ, USA
Kühlschrank (+5-8°C)	AEG electrolux GmbH, Ulm, D eutschland
Küvetten	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland

Mikroliterpipetten	Gilson International B.V., Middleton, US.
Mikrotom	Microm GmbH Type HM400R
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld GmbH Co., Lauda-Königshofen, D.
Objektträger „Starfrost“	Marienfeld GmbH Co., Lauda-Königshofen, D.
Parafilm	„M“, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, US.
PCR Softlubes	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Petrischalen	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Photomikroskope (Axioplan10 & 2)	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Pipette 5, 10, 50ml	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Pipettenspitzen, kristall 0,5 – 10µl	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen, gelb 5 – 100µl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Pipettenspitzen, blau 100 – 1000µl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Pipettenspitzen (diverse)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D.
Stericankanüle, grau	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Sterilbänke	Thermo electon corporation Holton Lamin Air NuAire Inc., Plymouth, US.
Sterilfilter	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexer	Heidolph GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland
Waagen	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
6-Well-Platten	TPP, Switzerland
24-Well-Platten	TPP, Switzerland
96-Well-Platten	TPP, Switzerland
Zählautomat	Coulter T840, AG Beckmann, München, D.
Zellkulturflaschen (50ml)	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Zentrifugen	Centrifuge 5415C, Eppendorf, HH, D. Biofuge fresco, Heraeus GmbH, Hanau, D. EBA 12 R, Hettich AG, Tuttlingen, Deutschland

3.1.3 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Das Autoklavieren hitzeunempfindlicher Chemikalien, Lösungen und sonstiger Gebrauchswaren erfolgt üblicherweise für 30min bei 120°C und 10⁵ Pascal. Thermolabile Lösungen können über einen Sterilfilter mit 0,22µm Porengröße sterilgefiltert werden.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Herkunft der Zelllinien

Im Rahmen dieser Dissertation werden zwei Zelllinien (siehe Abb. 7a und 7b) benutzt, um die Effekte von pro-NGF, NGF und TNF- α an der Augenoberfläche zu simulieren. Zum einen eine Corneaepithelzelllinie, die durch Transfektion mit dem SV40-Virus immortalisiert wurde. SV40 steht für „simian vacuolating virus 40“ und ist ein Poliomavirus aus der Familie der Papovaviridae, die das Large T-Antigen enthalten und erstmals 1960 als angebliche Verunreinigung aus Kulturen von Affennierenzellen isoliert wurden. Die Primärkultur wurde aus einer Donorcornea angefertigt, sodass die HCE-Zelllinie vergleichbare biophysiological Eigenschaften mit humanen Keratinozyten aufweist und damit ein adäquates Versuchsmodell darstellt. Die Zelllinie wurde freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Kaoru Araki-Sasaki (Tane Memorial Eye Hospital, Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt (Araki-Sasaki et al., 1995). Ferner wird eine spontan immortalisierte Konjunktivaepithelzelllinie [HCjE, syn. auch IOBA-NHC (Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada, Universidad de Valladolid, Espana – normal human conjunctiva)] eingesetzt. Die Zelllinie wurde 2003 morphologisch, biophysiological und funktionell charakterisiert, weist eine hohe Zellteilungsrate auf und stellt laut heutigem Stand der Wissenschaft ein adäquates Modell für die Forschung an Bindehautepithelzellen dar. Die humane Herkunft der HCjE-Zelllinie wurde inzwischen auch chromosomenanalytisch verifiziert (Diebold et al., 2003).

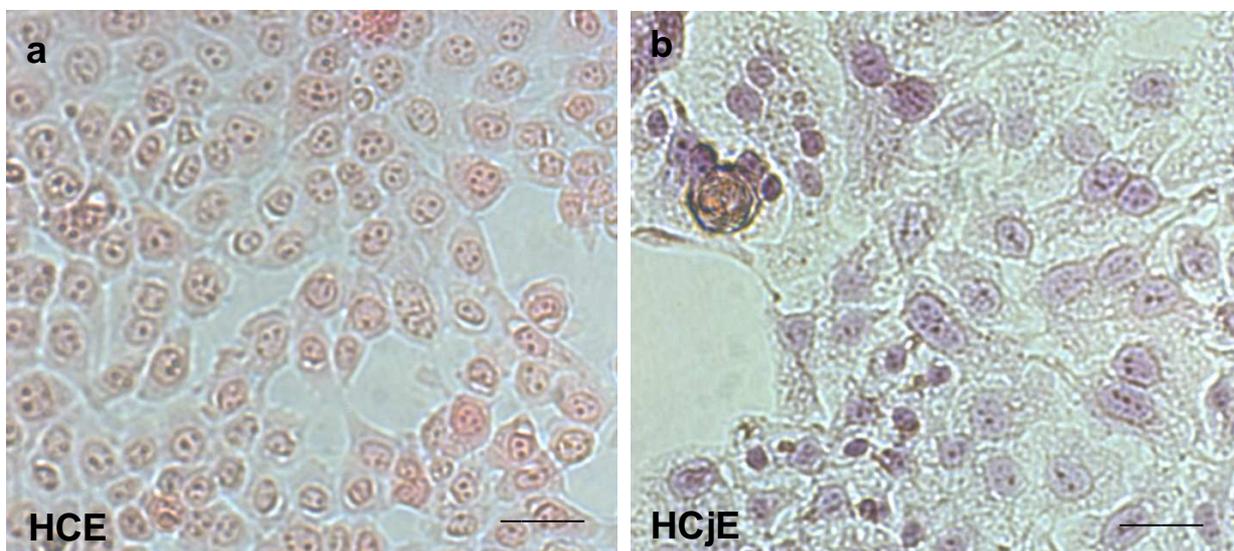


Abb. 7a: Corneaepithelzelllinie (HCE) in Ponceau S rot; **b:** Konjunktivaepithelzelllinie (HCjE) in Bromphenol blau; der Balken in a und b entspricht 8,7 μ m.

3.2.2 Medien und Kultivierung

HCE und HCjE benötigen zum Wachstum ähnliche Bedingungen, was bei der engen phylogenetischen Verwandtschaft zu erwarten ist. Die beimpften Zellkulturflaschen werden unter sterilen Bedingungen mit etwa 5ml Medium befüllt und liegend bei 37°C Temperatur und einer konstanten 5%igen CO₂-Begasung bei 18% O₂-Luftgehalt im Brutschrank inkubiert.

Vor Verwendung der Kulturmedien werden nach Neuansatz je zwei Mediumproben für mindestens 24h bebrütet und mikroskopisch kontrolliert, um eine bakterielle respektive fungale Kontamination auszuschließen. Im Rahmen dieser Dissertation sind keine Antibiotika verwendet worden. Basismedium für das Arbeiten in der Zellkultur ist das DMEM/HAM's F12 im Verhältnis 1:1 gemischt mit dem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FKS). Für die HCjE-Zellen werden zusätzlich 550µl Hydrocortison (5mg/ml) und 550µl Insulin (1µg/ml) bei -20°C tiefgekühlt dazugegeben. Als Wasch- und Stimulationsmedium wird bei einigen Versuchen (siehe unten) auch FKS-freies Kulturmedium benützt. Für die meisten Spülvorgänge wird sterile Phosphat-gepufferte-Saline (PBS), zum Ablösen der am Boden der Zellkulturflaschen adhärenen Zellen 0,25%-ige Trypsin/EDTA-Lösung eingesetzt.

3.2.3 Zellpassagierung/Zellernte:

Die Zellkulturflaschen werden täglich mikroskopisch auf Zellmenge und Kontaminationen kontrolliert und das Nährmedium alle zwei Tage gewechselt. Hierfür werden unter der Sterilfilterbank die Überstände abgesaugt, drei Mal mit warmem sterilem PBS gespült und auf 37°C vorgewärmtes Medium neu zugesetzt (pro Flasche etwa 5ml). Sind die Zellkulturflaschen ausreichend bewachsen (die Zellen besitzen eine physiologische Kontaktinhibition, sodass es erst bei massivem Zellwachstum zu einem gegenseitigen Überwuchern mit Zellklumpenbildung kommt) und kontaminationsfrei, so werden nach dreimaligem Spülen in PBS etwa 1-2ml Trypsin zugesetzt. Nun inkubiert man für 1-5min bei 37°C und kontrolliert lichtmikroskopisch den Ablöseprozess von den Kulturflaschen. Sind alle Zellen homogen abgelöst, wird die Reaktion durch Zugabe von 5ml Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension für 5min bei 1000 Umin⁻¹ zentrifugiert. Die Überstände werden abgesaugt und das entstandene Zellpellet kann zum Herstellen weiterer Zelllösungen verwendet werden. Einen Teil verwendet man gleich zum Neubeimpfen steriler Kulturflaschen, der Rest kann zu Versuchszwecken genutzt respektive verworfen werden.

3.2.4 Zellzählung

Nach dem Ernten der Zellen werden diese für fünf Minuten bei 1000 Umin⁻¹ zentrifugiert und das Zellpellet mit einigen ml Pufferlösung (je nach Pelletgröße) resuspendiert. Hiernach erfolgen eine Verdünnung auf 1:10 und das Aufbringen in eine Neubauerzählkammer. Hier werden lichtmikroskopisch 10 Großquadrate ausgezählt (Z), die Summe durch 10 geteilt und mit 0,1 multipliziert. In dieser Dissertation wird angestrebt, 10.000 Zellen pro Well einer 24-Well-Platte auszusähen, also teilt man 10.000 durch die entstandene Zahl ($Z \cdot 10^4$), multipliziert das Ergebnis mit 1000 und erhält die Menge in µl mit der je ein Well zu bestücken ist. Formel:

$$\Sigma \text{ in } \mu\text{l} = [10.000 / (Z \cdot 10^4)] \cdot 1000$$

3.3 Art und Herkunft der humanen Gewebepräparate

Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen werden Gewebeproben von vierzig Pterygien sowie zwölf Limbuspräparate akquiriert (es handelt sich sowohl um chirurgisch exzidierte Präparate, als auch um solche von Körperspendern des Institutes für Anatomie und Zellbiologie der Universität zu Halle/Wittenberg). Für die Fluoreszenzreaktionen werden 24 Pterygiumpräparate von acht operierten Patienten benutzt, die über die Universitätsaugenklinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Verfügung gestellt wurden. Die Gruppe umfasst je vier Männer und vier Frauen (Alter der Männer: 31-66 Jahre, im Mittel: 44 Jahre und 9 Monate; Alter der Frauen: 39-58 Jahre, im Mittel: 47 Jahre und 3 Monate).

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Vorbereiten der Präparate

Um Vorkommen und Lokalisation spezifischer Proteine darzustellen, wird die Immunhistochemie eingesetzt. Die Gewebe werden für 24h in 4%igem Paraformaldehyd fixiert, danach 24h fließend gewässert (Abspülen der Fixierlösung) und in Paraffin (Paraplast) eingebettet. Die erstarrten Paraffinwürfel werden auf kleine Holzklötzchen aufgeblockt und 7µm dicke Serienschnitte angefertigt. Es werden je zwei Schnitte auf einen Objektträger (bspw. HistoBond Adhesion Micro Slides) aufgezogen und beschriftet (Name, Präparatenr., Datum und (später) Antikörperart und -verdünnung). Es dient jeweils ein Schnitt pro Objektträger als Negativkontrolle. Diese wird in der Immunhistochemie dann nicht mit dem jeweiligen Primärantikörper, sondern lediglich mit TBS inkubiert. Die Schnitte werden 24h gestreckt, danach folgt 24h Trocknen bei 60°C. Hierdurch wird das spätere Herauslösen des Paraffins erleichtert.

3.4.2 Hämatoxilin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE-Färbung)

Um einen Überblick über die mikroanatomischen Verhältnisse zu bekommen und später besser nachvollziehen zu können, welche Gewebeunterart in der immunhistochemischen Behandlung reagiert, werden von jedem Präparat Übersichtsfärbungen mit angefertigt (siehe auch Tab. 2a und 2b). Als Farbstoffe dienen hier Eosin Y, ein saurer Xanthenfarbstoff, der sich von den Fluoresceinen ableitet und acidophile/basische Strukturen wie bspw. Zellplasma-proteine rot färbt und Hämatoxilin (aufbereitet zu Hämalaun), ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum, der basophile/saure Zellbestandteile (insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonucleinsäure (DNA) sowie das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum (rER)) blau färbt. Einige Schnitte werden in eine Glasküvette einsortiert und für je 2x10min in Xylol getaucht. Nun folgt die absteigende Alkoholreihe,

um dem Gewebe schonend Wasser zuzuführen, damit die Farbstoffe später in den Schnitt eindringen und gehalten werden können. Nach dem Xylol folgt eine fünfminütige Behandlung mit Propanol, danach 2x5min in 96%igem Alkohol. Nun jeweils 5min in 80%igem dann 70%igem und 60%igem Alkohol. Zum Schluss werden die Küvetten noch mindestens 5min in destilliertem Wasser (Seradest) stehen gelassen, auch längere Ruhezeiten sind möglich. Zu beachten ist ein schonender Wechsel der Küvetten von einem Medium in ein anderes, da gerade bei größeren Präparaten (Limbi) ein Abschwimmen der Schnitte bei zu brüskem Wechsel/Schwenken vorkommen kann. Zur eigentlichen Färbung werden die Küvetten aus dem Seradest entnommen und für 15min in die Hämalaunlösung nach P. Mayer getaucht, anschließend etwa 15-30min unter leicht fließendem Wasser belassen, um die Bläuung der Kerne zu ermöglichen. Nun folgt die Gegenfärbung mit Eosin für ca. 30-60sec. Die Schnitte werden nach der Eosinfärbung rasch (lediglich 3x eintauchen) von Alkohol zu Alkohol (aufsteigend) gewechselt, um ein Herauslösen der Chromogene zu verhindern. Nachdem dies für die Konzentrationen 60%, 70%, 80% und 2x96% getan wurde, folgt eine dreiminütige Phase in Propanol und danach je 2x10 Minuten in Xylol. Auch in Xylol können die Schnitte (wie im Seradest) beliebig lange verweilen. Nun Abklopfen und Trocknenlassen der Xylolreste sowie Eindecken in Kanadabalsam oder Aquatex für 24h. Die Schnitte werden trocken und dunkel bis zur Auswertung in Präparatekästen gelagert.

a	Medium	Zeit
1	Xylol 1	10min
2	Xylol 2	10min
3	Propanol	5min
4	Alkohol 96%	5min
5	Alkohol 96%	5min
6	Alkohol 80%	5min
7	Alkohol 70%	5min
8	Alkohol 60%	5min
9	Seradest	5min
10	Hämalaun	15min

b	Medium	Zeit
11	Bläuung	15-30min
12	Eosin	30-60sec
13	Alkohol 60%	3x tauchen
14	Alkohol 70%	3x tauchen
15	Alkohol 80%	3x tauchen
16	Alkohol 96%	3x tauchen
17	Alkohol 96%	3x tauchen
18	Propanol	3min
19	Xylol 1	10min
20	Xylol 2	10min

Tabelle 2a & 2b: Übersichtsfärbung; Arbeitsschritte zwischen Vorbereiten und Eindecken (1-10 in a und 11-20 in b)

3.4.3 Immunhistochemische Reaktion (IHC-Reaktion)

Antikörper	TNF-alpha	pro-NGF
Klonalität	monoklonal	polyklonal
Code	sc-52746	ab 1526
Donor	Maus	Kaninchen
Verdünnung	1:1000	1:200
Hersteller	Santa Cruz Biotechnologie Inc., California, USA	Chemicon Inc., Nürnberg, Deutschland

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primärantikörper für die Immunhistochemie

Es wird ausschließlich die indirekte Methode mit Primär- und Sekundärantikörpern verwendet (s. Tab 4). Nach dem Trocknen der OT werden die Schnitte mit einem DAKO-PEN umrandet, um zugegebene Lösungen in situ zu halten. Nun folgt eine 30-minütige Phase in gekühltem 3%igem Wasserstoffperoxid (in Aluminiumfolie verpacken und dunkel stellen), um endogene Peroxydasen zu blocken. Es folgt dreimaliges Spülen der Schnitte mit Seradest und zur Epitopdemaskierung und Antigenverstärkung für 15min in Natriumcitratpuffer (pH-Wert 6,0) in der Mikrowelle kochen lassen (Verfahren nach Shi et al., 1991 und Cattoretti et al., 1993). Nach Abkühlen für 20min werden die Schnitte 3x mit TBS gespült und für 5min mit vorgewärmtem 0,1%igem Trypsin bei 37°C behandelt; anschließend wird wieder 3x mit TBS gespült. Es folgt die 20-minütige Behandlung bei Raumluft mit Normalserum in einer feuchten Kammer, um unspezifische Ladungen (an Kollagenen und anderen Bindegewebeelementen), die zu einer überstarken Hintergrundfärbung führen würden, abzublocken. Die Art des eingesetzten Normalserums (Einwirkzeit 20min) richtet sich nach dem Donor des Sekundärantikörpers. Das Serum wird nun abgeklopft, die Schnitte mit dem Avidin/Biotin Blocking-Kit behandelt (jeweils für 10min, dazwischen 3x Spülen mit TBS) und danach der Primärantikörper (Tab. 3) auf einen der Schnitte aufgebracht, der andere wird mit TBS behandelt und dient als Negativkontrolle. Es folgt eine 24-stündige Inkubationsphase bei 4°C. Danach wird erneut mit TBS gespült und der Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für eine Stunde aufgebracht (diesmal auf beiden Schnitten), hierauf wieder 3x mit TBS-Puffer gespült. Nun werden die Schnitte für 30min mit dem Strept-Avidin-Biotin-Komplex inkubiert, wieder 3x mit TBS gewaschen und für 60sec mit der AEC-Substratlösung behandelt. Diese indirekte Methode der Immunhistochemie (auch als Labeled Strept-Avidin-Biotin-Methode [LSAB] bezeichnet), basiert darauf, dass das von der Bakterienspezies *Streptomyces avidinii* produzierte Protein Avidin (hühnereiweißähnlich) eine sehr hohe Affinität ($K_a \sim 10^{14} - 10^{15} \text{ M}^{-1}$) zu dem Vitamin Biotin besitzt. Strept-Avidin hat vier Untereinheiten, eine Molekülmasse von etwa 67kDa und stellt in Verbindung mit Biotin eine der stärksten bekannten nichtkovalenten

biologischen Bindungen dar. Strept-Avidin und die biotinylierten Zweitantikörper reagieren miteinander und bilden so den Strept-AB-Complex (siehe Abb. 8). Nach Zusatz von 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) bildet sich peroxidasevermittelt durch den Sekundärantikörper ein rotes Oxidationsprodukt, das alkohollöslich und stark lichtempfindlich ist. Zusammenfassend ergibt sich folgendes Flussschema:

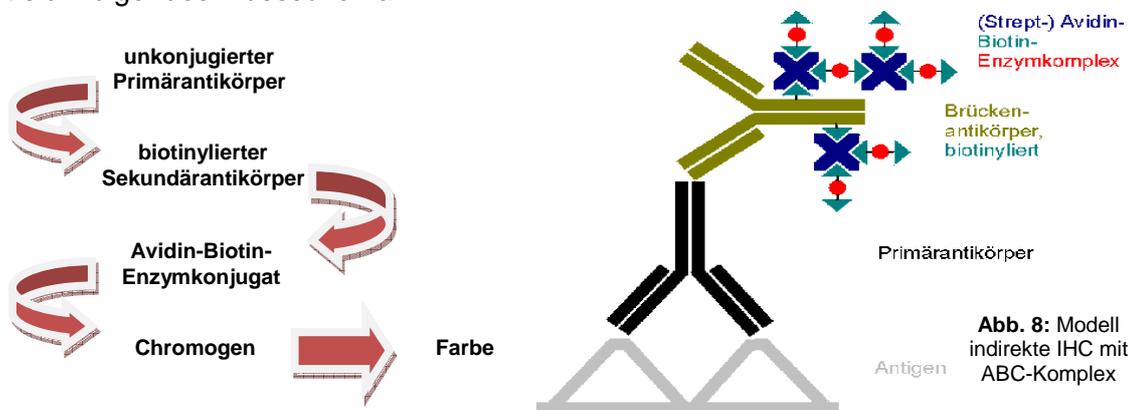


Abb. 8: Modell indirekte IHC mit ABC-Komplex

Anschließend Spülen in Seradest und Gegenfärben mit Hämalaun nach Mayer für 2min. Danach 3x Spülen mit Seradest, wobei die dritte Portion Seradest für 10min auf den Schnitten zum Bläuen verbleibt. Jetzt können die Schnitte vorsichtig angetrocknet und in alkoholfreiem Medium (Aquatex) eingedeckt werden. Auch hier erfolgt die Lagerung nach 24h Trockenphase in vor Licht schützenden Präparatekästen; jeder OT (Kontroll- und Antikörperschnitt) wird am Mikroskop fotografiert und digital gespeichert. Die Auswertung erfolgt semiquantitativ nach relativer Chromogenstärke/Gesichtsfeld mit den Wertungen +/++/+++.

a	Medium	Zeit
1	H ₂ O ₂ 3%ig	30min
2	Seradest	3x spülen
3	Citrat-Puffer	15min
4	Abkühlen	20min
5	TBS-Puffer	3x spülen
6	Trypsin 0,1%ig	5min
7	TBS-Puffer	3x spülen
8	Normalserum	20min
9	Avidin	10min
10	TBS-Puffer	3x spülen
11	Biotin	10min
12	TBS-Puffer	3x spülen

b	Medium	Zeit
13	Antikörper I	24h
14	TBS-Puffer	3x spülen
15	Antikörper II	60min
16	TBS-Puffer	3x spülen
17	StreptABC	30min
18	TBS-Puffer	3x spülen
19	Chromogen	60sec
20	Seradest	3x spülen
21	Hämalaun	2min
22	Seradest	3x spülen
23	Bläuung	10min
24	Trocknen	24h

Tabelle 4a & 4b: Arbeitsschritte Immunhistochemie (1-12 in a und 13-24 in b)

3.5 Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten

3.5.1 Vorbereiten der Präparate

Die operativ gewonnenen Nativpräparate werden nach Exzision in flüssigem Stickstoff schockgefroren (-80°C). Zur Weiterverarbeitung an einem Cryocut-Rotationsmikrotom werden 7µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, in dem die Gewebestückchen mit Tissue-Tec auf den Metallteller „aufgeblockt“ und ad hoc bei -20°C in Serie geschnitten werden. Die so gewonnenen Schnitte werden auf Superfrost Objektträger aufgebracht (zwei Schnitte pro OT, einer dient als Negativkontrolle) und bei -20°C gelagert. Eine Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper zeigt Tab. 5.

Antikörper	TNF-alpha	pro-NGF	NGF	Cy3	FITC	DAPI
primär	+	+	+	-	-	-
sekundär	-	-	-	+	+	-
Klonalität	monoklonal	polyklonal	polyklonal	polyklonal	polyklonal	-
Farbe	-	-	-	rot	grün	blau
Code	sc-52746	ab 1526	ab 927	515-165-062	F0205/F0479	A1001
Donor	Maus	Kaninchen	Kaninchen	Schaf	Schwein/ Ziege	synthetisch
verdünnt	1:200	1:100	1:100	1:100	1:200	1:1000
Hersteller	Santa Cruz Biotech.Inc., California, USA	Chemicon Inc., Nürnberg, Deutschland	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.	Jackson Immunore- search, Lab, Inc., USA	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, D.	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

3.5.2 Immunfluoreszenzreaktion an Gefrierschnitten

Zunächst werden die Serienschnitte für 5min in flüssigem Aceton (Konz. = 100%) bei 4°C fixiert, danach für 2min getrocknet und überschüssiges Aceton abgesaugt. Nach Umranden mit einem DAKO-Pen wird dreimalig mit TBS-Puffer gespült und danach für 30 Minuten mit vorgewärmter Hyaluronidase-Lösung bei 37°C inkubiert. Nach dreifachem Spülen mit TBS und Trocknen werden die Präparate mit dem jeweiligen Normalserum überschichtet. Das Normalserum verbleibt für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den OT und wird anschließend abgeklopft. Es folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur für zwei Stunden in einer feuchten Kammer. Die Negativkontrolle wird statt mit dem Primär-AK mit TBS überschichtet. Danach wird 3x mit TBS gespült und anschließend der Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss in einer feuchten

Kammer aufgebracht. Nach erneutem Spülen erfolgt die DAPI-Kernfärbung. 4',6-Diamidino-2-phenylindol ist ein synthetisch hergestelltes Fluoreszein, das durch Interkalation zwischen Adenosin-Thymin- und Guanodin-Cytosin-Basenpaaren in der Lage ist, DNA sichtbar zu machen. Bei einem Absorptionsmaximum von 340nm emittiert DAPI konstant blaues Licht. Um es für die Immunfluoreszenz einzusetzen, muss es als Arbeitslösung 1:1000 in Methanol verdünnt werden und ist so gekühlt (bei -20°C) und dunkel über längere Zeit lagerbar. Alle Kernfärbungen von Präparaten dieser Dissertation werden bei einer Temperatur von 37°C für 15min angefertigt. Schließlich folgt dreimaliges Spülen mit Methanol und Eindecken der OT in Moviol nach M. Osborn. Damit sich die Fluoreszenz stabilisieren kann, werden die Präparate bei 4°C mindestens einen Tag trocken und dunkel gelagert und können danach am Fluoreszenzmikroskop begutachtet werden. Tab. 6a und b gibt eine Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte.

a	Medium	Zeit	b	Medium	Zeit
1	Aceton	5min	8	TBS-Puffer	3x spülen
2	Trocknen	2min	9	Antikörper II	60min
3	TBS-Puffer	3x spülen	10	TBS-Puffer	3x spülen
4	Hyaluronidase	30min	11	DAPI	15min
5	TBS-Puffer	3x spülen	12	Methanol	3x spülen
6	Normalserum	60min	13	Moviol	Eindecken
7	Antikörper I	120min	14	Lagern 4°C	24h

Tabelle 6a & 6b: Arbeitsschritte Immunfluoreszenz (1-7 in a und 8-14 in b)

3.5.3 Immunfluoreszenzreaktion an Zellen

Für die Immunfluoreszenz von HCE- und HCjE-Zellen werden semikonfluente Zellrasen (60-70% Dichte) auf 20x20mm großen sterilen Deckgläschen in 6-Well-Platten gezüchtet. Die Züchtungsbedingungen entsprechen denen der übrigen Zellkulturen (Brutschrank bei 37°C Temperatur, 5% CO₂ und 18% O₂). Das überstehende Medium wird abgesaugt und mit der Acetonfixation begonnen. Die weitere Prozedur gleicht der von Gefrierschnitten (siehe 3.5.2 und Tab. 5a & b). Zu beachten ist, dass Antikörperkonzentrationen des Primärantikörpers von 1:5000 und des Sekundärantikörpers von 1:200 ausreichend sind.

3.6 Bromodesoxyuridin-Proliferationsassay

3.6.1 Vorbemerkungen

Bromodesoxyuridin (BrdU) ist ein chemisches Analogon des Nucleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin. Es wird zur labordiagnostischen Markierung proliferierender Zellen in vitalen Geweben verwendet; in der vorliegenden Arbeit zur Analyse des Proliferationsverhaltens von HCE und HCjE. BrdU wird von den Zellen aufgenommen und in phosphorylierter Form anstelle des Nucleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) während der Synthesephase in die neu synthetisierte DNS eingebaut. Um eine stattgefundene DNS-Synthese nachzuweisen, wird die Peroxydase-katalysierte Chromogenaktivierung unter Emittierung spezifischer Wellenlängen, die mittels eines ELISA-Readers quantifiziert werden, eingesetzt. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Menge an gebildetem Substrat (siehe unten) und der stattgehabten Proliferationsaktivität. Für die Bindung der Detektionshilfen an das BrdU ist eine Denaturierung der DNA notwendig, die mit Säuren oder Hitze durchgeführt werden kann. Zuvor werden die Zellen in 96-Well-Platten semikonfluent gezüchtet und für je zwei Stunden mit dem entsprechenden Agens (siehe Tab. 7), dessen proliferative Eigenschaft getestet werden soll, stimuliert.

Stimulans	TNF-alpha	pro-NGF	NGF
Quelle	E.coli	E.coli	E.coli
Hersteller	Strathmann Biotech AG, Hamburg, Deutschland	Strathmann Biotech AG, Hamburg, Deutschland	Strathmann Biotech AG, Hamburg, Deutschland

Tabelle 7: Verwendete Zellstimulatoren für den Bromodesoxyuridin-Proliferationsassay

3.6.2 BrdU-Assay – Durchführung

Es werden jeweils 10.000 Zellen (HCE und HCjE) pro Well in die 96-Well-Platten ausgesät und kultiviert, bis sie semikonfluent (60-70% Zellrasendichte) gewachsen sind (siehe Abb. 9). Dabei wird das Nährmedium jeden 2.-3. Tag unter sterilen Bedingungen gewechselt, um Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen zu verhindern. Es erfolgt eine dreimalige Spülung mit PBS sowie Zusatz der jeweiligen stimulierenden Agenzien in aufsteigenden Konzentrationen. Es werden, um die Zellproliferation besser beurteilen zu können, sowohl unterschwellige (10ng/ml), wie physiologisch vorkommende (20-50ng/ml), als auch supraphysiologische (2500-5000ng/ml) Stimulationsdosen gewählt. Die

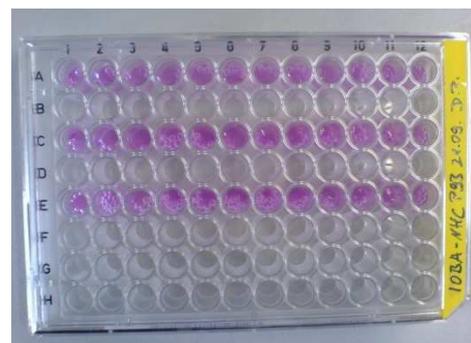


Abb. 9: Bestückung der 96-Well-Platten

Stimulation erfolgt wie die normale Kultivierung bei 37°C über zwei Stunden, wobei die Stimulanzen zu dem jeweiligen Zellkulturmedium dazugegeben werden; als Negativkontrolle dient eine entsprechende Menge serumfreien Mediums. Der Assay läuft über zwei Tage, die Auswertung (siehe unten) erfolgt direkt bei Versuchsende. Nach erfolgter Stimulation werden alle Überstände abgesaugt und die Zellrasen dreifach mit PBS gespült. Nun erfolgt die Inkubation nach Herstellerangaben mit BrdU-Labeling-Solution für 6h bei 37°C im Brutschrank. Dies ist die entscheidende Phase, in der das „Fehl-Nukleotid“ in die DNS der in diesem Zeitraum proliferierenden Zellen eingebaut wird. Anschließend folgt dreifaches Spülen mit PBS. Fixiert werden die Zellen für 30min mittels einer Ethanol-HCL-Fixierlösung. Danach lagern sie 24h luftdicht mit Parafilm verpackt im Kühlschrank. Als weiteres Waschmedium dient Zellkulturmedium mit 10%igem Zusatz an fetalem Kälberserum. Detektiert wird das BrdU mittels mitgelieferter spezifischer Antikörper (30min bei 37°C), die eine endogene Peroxydase tragen. Zuvor muss die neu synthetisierte DNA durch Nukleasen enzymatisch für 30min bei 37°C aufgespalten werden. Es erfolgt ein Waschschrift mit Kit-eigenem washing buffer. Wird nun ein Peroxydasesubstrat hinzugegeben, kommt es zur Katalysation des Substrates mit der Bildung eines bei normalem Licht sichtbarem grünen Reaktionsproduktes. Auf einen Enhancer zur Verstärkung des Chromogens wird aufgrund ausreichender Signalstärke verzichtet. Die Entwicklung des Peroxydasesignales erfolgt exponentiell, um dann nach wenigen Stunden in eine stabile Plateauphase überzugehen respektive zu enden, wenn das gesamte Substrat verbraucht ist. Valide Werte sind am besten nach 60min im ELISA-Reader bei 405nm Wellenlänge gegen 492nm zu messen. Die gemessene Absorption korreliert streng mit der DNS-Syntheserate der jeweiligen Zellpopulation. Zur besseren Übersichtlichkeit wird der gemessene Wert der Kontrolle = „1“ gesetzt; Tab. 8 gibt eine Übersicht der Arbeitsschritte.

a	Arbeitsschritt	Zeit
1	Zellzüchtung	Tage
2	Zellstimulation	2h
3	PBS-Puffer	3x spülen
4	BrdU-Labeling-S.	6h
5	PBS-Puffer	3x spülen
6	C ₂ H ₅ OH-HCL	30min
7	Lagern	24h

b	Arbeitsschritt	Zeit
8	PBS-Puffer	3x spülen
9	Nuklease	30min
10	PBS-Puffer	3x spülen
11	BrdU-AK + BSA	30min
12	Washing buffer	3x spülen
13	Peroxy-substrat	15min
14	Ausmessen	nach 60min

Tabelle 8a & 8b: Arbeitsschritte Bromodesoxyuridin-Proliferationsassay (1-7 in a und 8-14 in b)

3.6.3 Anmerkungen zur Statistik

Alle Versuche sind aus Gründen der Reliabilität mindestens 4-fach durchgeführt worden, wobei jede Konzentration selbst ebenfalls in mindestens vier Wells getestet wurde. Die Mittelwerte und Standardabweichungen werden mittels folgender Formeln berechnet:

$$\bar{x}_{\text{arithm}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

$$s_X^* := \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

Die Berechnung der Signifikanz wurde mittels Student T-Test getätigt und es wurden folgende p-Werte festgelegt:

$$* = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; [(*) = p < 0,1]$$

3.7. Motilitätsassay/Einzelzellmigration

3.7.1 Vorbemerkungen/Vorbereitungen

Der Versuchsaufbau wurde initial von Boyden in der nach ihm benannten Kammer erdacht. Hier wird ein zweidimensionales Zellmigrationsmodell genutzt, die Kammern werden nach einem halbstandardisierten Verfahren selbst hergestellt. Nach erfolgter Zellzucht und Stimulation mit aufsteigenden Konzentrationen (jeweils 10/50/250/500ng/ml TNF- α , NGF, pro-NGF) erfolgte die weitere Verarbeitung, Aufzeichnung und Auswertung im Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität zu Halle-Wittenberg, ehem. Leiter Prof. Dr. S. Hauptmann. Zur Herstellung der Migrationskammern werden handelsübliche Objektträger zunächst an einem Ende mit einer U-förmigen Begrenzung aus einem Vaseline-Paraffin-Gemisch versehen (s. Abb. 10). Dieses muss zügig und gleichmäßig aufgezogen werden, um Luftpinschlüsse zu verhindern, in welche das Gel später eintreten respektive durchtreten könnte. Mittels eines Skalpell wird das halberstarzte Paraffin auf die gewünschte Höhe (etwa 500 μ m) abgetragen und ein Deckgläschen von 20x20mm Größe aufgebracht. Es folgt die Fixation durch erneute Paraffinpinselung, sodass die Kammer auf einer Seite offen bleibt, und anschließend die Lagerung bei 5°C für 24h zum Aushärten.



Abb. 10: Bestücken einer Migrationskammer

3.7.2 Versuchsdurchführung

Die HCE- und HCjE-Zellen werden, nachdem das überstehende Medium abgesaugt wurde, dreifach mit DMEM + 10% FKS gespült und anschließend zur Ablösung 5min mit 0,25%igem Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Der Lyseprozess wird lichtmikroskopisch kontrolliert. Sind alle Zellen gleichmäßig abgelöst, wird die Reaktion durch Zusatz von frischem Kulturmedium (etwa 5ml/Zellkulturflasche) gestoppt. Der Flascheninhalt wird bei 1000 U/min 5min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 1ml Kulturmedium resuspendiert. Unter Zuhilfenahme des Coulter-Zählautomaten wird eine Lösung mit einer Zellkonzentration von 500.000 Zellen/ml hergestellt. Für eine Versuchsdurchführung (vier Migrationsversuche zeitgleich/24h) wird ein Vitrogengemisch bestehend aus folgenden Komponenten erzeugt:

50 µl DMEM + 23 µl Bikarbonat + 375 µl Vitrogen

133µl des Vitrogengemisches werden mit 66µl Zellsuspension gleichmäßig sowie möglichst luftblasenfrei vermischt und in eine Migrationskammer hineinpipettiert (siehe Abb. 10). Alle Teilschritte, in denen mit dem Vitrogengemisch gearbeitet wird, müssen zwingend bei 5-8°C erfolgen, da eine über dieses Maß hinausgehende Wärmezufuhr ein sofortiges Auspolymerisieren des Vitrogengemisches mit konsekutiver Gebrauchsunfähigkeit bewirkt. Es erfolgt das Verschließen der Kammer mit Paraffin-Vaseline. Aus der o. g. Menge an Vitrogengemisch können je zwei Kammern bestückt werden, die restlichen 182µl werden in einem Reaktionstube bei Raumtemperatur belassen, um eine sichere und sachgerechte Auspolymerisation erfassen zu können. Kommt es zu Ausflockungen, Lufteinschlüssen oder Polymerisationsstörungen wird das Material verworfen und der Motilitätsassay neu bestückt. Bei regelrechtem Auspolymerisieren werden die Kammern auf die Beobachtungsmikroskope eingespannt (siehe Abb.11) und der gewünschte Ausschnitt PC-kontrolliert ausgerichtet. Die Rotlichtwärmeboxen werden justiert, hierdurch wird eine konstante Temperatur von 37°C ± 1°C über den Beobachtungszeitraum von 24h gehalten. Alle 10min wird ein Bild aufgezeichnet, sodass nach 24h Datensätze von 145 Aufnahmen entstehen, die mittels Quicktime Player als Video abgespielt werden können. Zum Erfassen der Migrationsstrecke

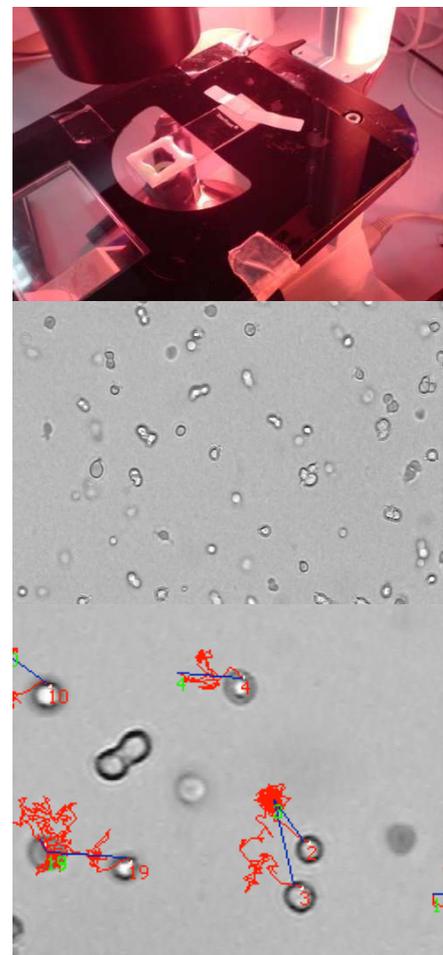


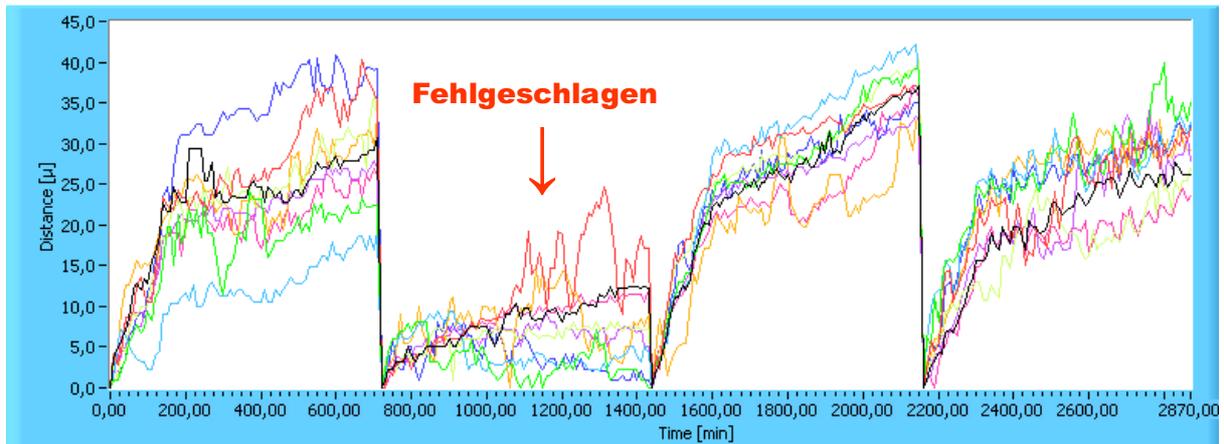
Abb. 11: (von oben nach unten) Einspannen der Kammer unter dem Mikroskop, Rotlichteinheit im Hintergrund; Mikroskopische Aufsicht bei 400-facher Vergrößerung; Nach „tracking“ einzelner Zellen, Auswertung der Migrationsstrecken

werden einzelne Zellen mittels des Grab4PCI-Programmes markiert, die 24h abgespielt und die Strecke in μm als Dezimalzahl angegeben. Zu beachten ist, dass die angegebene Trackingstrecke nicht nur den Unterschied von Startposition A zu Endposition B wiedergibt, sondern vielmehr die reelle Zellmigration abbildet. Als Kontrollen dienen nicht stimulierte Zellen (jeweils mit und ohne 10%igem FKS). Eine Übersicht der Arbeitsschritte gibt Tab. 9a und b.

a	Arbeitsschritt	Zeit	b	Arbeitsschritt	Zeit
1	Zellstimulation	2h	8	Vitrogengem. (V)	10min
2	DMEM+FKS 10%	3x spülen	9	Zellsusp. + V	2min
3	Trypsin 0,25%	5min	10	Kammerfüllung	2min
4	Lysestopp	3sec	11	Paraffinschluss	4min
5	Zentrifugieren	5min	12	Polymerisation	3min
6	Resuspension	1min	13	Einspannen	15min
7	Zellzählung	3min	14	Beobachten	24h

Tabelle 9: Arbeitsschritte Motilitätsassay/Einzelzellmigration (1-7 in a und 8-14 in b)

Als Kontrolle dienen außer der optischen Überprüfung (Verunreinigungen des Deckgläschens/des OT/der Zellkultur, Verrutschen des Präparates, vorzeitige Apoptose durch ungenügende Wärmezufuhr etc.) das Auswerten der Speedhistogramme (siehe Abb. 12). Bei normalen/erwarteten Versuchsabläufen kommt es initial zu einer stark linearen bis exponentiellen Proliferationskurve, die sich aufgrund fehlender Nährstoffzufuhr und Anhäufung von Stoffwechselprodukten zu einem plateauförmigen Verlauf ändert. In die Wertung gehen nur die ersten 24 Stunden des Beobachtungszeitraumes ein. Speedhistogramme mit deutlich anderem Verlauf innerhalb der gleichen Versuchsreihe (gleiche Zelllinie, gleiche Stimulanzienkonzentration) werden als Ausreißer aussortiert und gehen nicht in die statistische Berechnung ein.



Anzahl der Zellen 57
Letztes analysiertes Bild im Verzeichnis : D:\Gunnar\Daniel\IOBA\Kontrolle\IOBAmit FKSKontrolle\4\iobafsko400078.bmp

Abb. 12: Beispiel eines Speedhistogramms. Gezeigt sind vier gleichzeitig stattfindende Ansätze der gleichen Zelllinie (mit einer gleich hohen Konzentration an Stimulanzen behandelt). Die Wachstumskurven des ersten, dritten und vierten Ansatzes verlaufen nahezu identisch (zu Beginn exponentiell, später kommt es zum Erreichen des Plateaus). Die Wachstumskurven des zweiten Ansatzes bieten keinen „erwarteten“ Kurvenverlauf und werden, als „Fehlgeschlagen“ eingestuft, statistisch nicht mitberücksichtigt.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistochemie

Immunhistochemisch wurden an den unter 3.3 genannten Präparaten die Nachweise für pro-NGF und TNF- α geführt, erkennbar an dem roten Reaktionsprodukt. Bei den folgenden Abbildungen wird zur besseren anatomischen Übersicht für jede Gewebeunterart immer eine HE-Färbung mit abgebildet. Zur morphologisch exakten Lokalisation von pro-NGF und TNF- α wird die mit TBS-Puffer inkubierte Negativkontrolle ebenfalls mit abgebildet. Auf den Nachweis von NGF oder seines Rezeptors wird in dieser Dissertation verzichtet. Dieser ist an allen hier untersuchten Geweben schon multipel geführt worden (vgl. bspw. Ribatti et al., 2009).

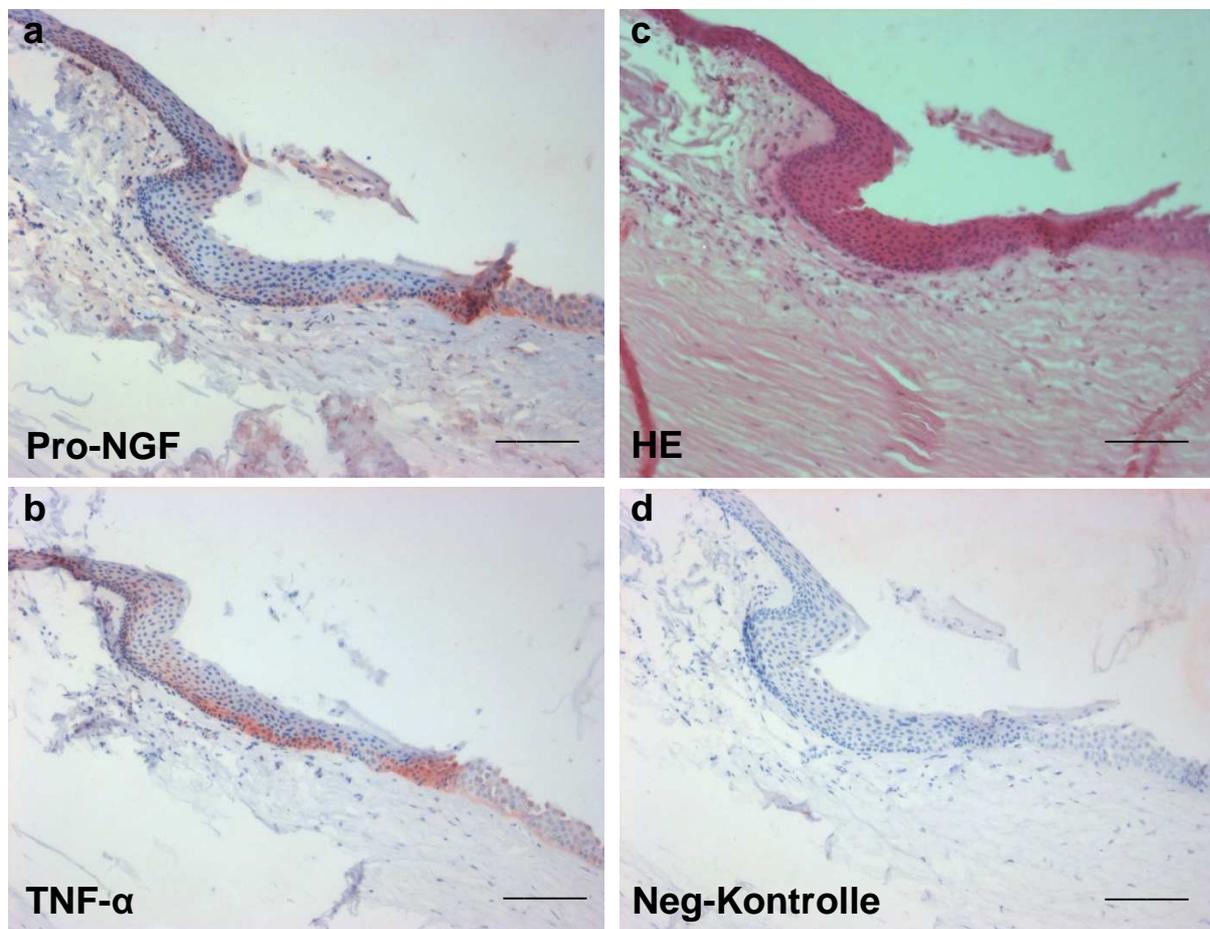


Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis von pro-NGF und TNF- α am corneokonjunktivalen Limbus an Paraffinschnitten. Pro-NGF und TNF- α sind an dem roten Reaktionsprodukt erkennbar. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. **a:** Limbus in 200-facher Vergrößerung mit positivem Nachweis von **pro-NGF**, **b:** Limbus in 200-facher Vergrößerung mit positivem Nachweis von **TNF- α** , **c:** Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (**HE**) ebenfalls in 200-facher Vergrößerung. Der Balken in **a-d** entspricht 905,2 μ m.

Die immunhistochemische Detektion von pro-NGF und TNF- α gelingt in allen 12 Präparaten aus dem Bereich des corneokonjunktivalen Limbus (Abb. 13a und b). Beide Proteine können insbesondere im Stratum basale des Epithels nachgewiesen werden. Die apikalen Anteile des Epithels zeigen kein Vorkommen beider Faktoren. Im Stroma erkennt man eine leichte

pro-NGF-Reaktivität (Abb. 13a), besonders perivaskulär, TNF- α ist nicht detektierbar (siehe Abb. 13b).

In allen 12 Konjunktivae lässt sich pro-NGF immunhistochemisch nachweisen (Abb. 14a), hier gibt es eine homogene holoepitheliale Verteilung. Die konjunktivalen Becherzellen zeigen kein rotes Reaktionsprodukt. Auch subepitheliale Zellen im Bindehautstroma reagieren positiv, insbesondere perivaskulär. Ob es sich hierbei um Bindegewebszellen oder Zellen der Immunabwehr handelt, kann nicht beurteilt werden.

Auch TNF- α ist in 12/12 Konjunktivae holoepithelial detektierbar (Abb.14b). Die Reaktivität des AK ist allerdings schwächer als bei pro-NGF. Im Stroma sieht man nur gefäßnah einzelne positiv reagierende Zellen.

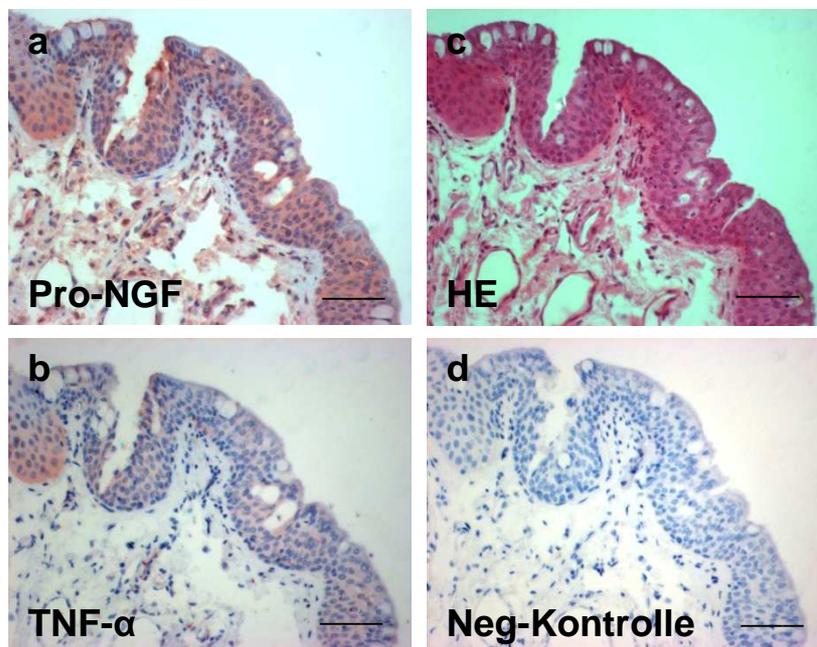


Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis an Paraffinschnitten von **pro-NGF** (a) und **TNF- α** (b) an Konjunktivaepithel (a-d; 400-fache Vergrößerung); Hämatoxyllin-Eosin-Übersichtsfärbung (**HE**; c) und **Negativkontrolle** (TBS; d), die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Der Balken in a-d entspricht 601,3 μ m.

Am Corneaepithel sieht man im gesamten Epithel eine intensive Reaktivität mit dem Antikörper gegen pro-NGF (Abb. 15a). Im Gegensatz dazu ist TNF- α eher in den basalen bis mittleren Epithelschichten detektierbar (Abb. 15b).

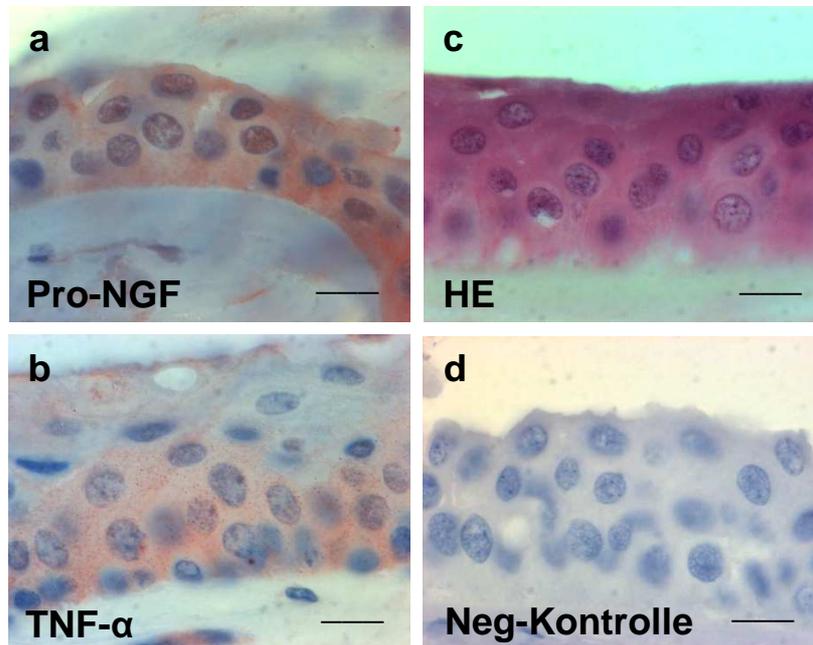


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis an Paraffinschnitten von **pro-NGF** (a) und **TNF- α** (b) an Corneaepithel (a-d; 1000-fache Vergrößerung); Hämatoxillin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE; c) und **Negativkontrolle** (TBS; d), die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalau. Der Balken in a-d entspricht 154,4 μ m.

Auch am Corneaendothel lassen sich pro-NGF und TNF- α nachweisen (Abb. 16a und 16b); im Hornhautstroma kommt bis auf einzelne subepitheliale Zellen keine pro-NGF- oder TNF- α -Reaktivität vor (Abb. 15a, 15b, 16a und 16b).

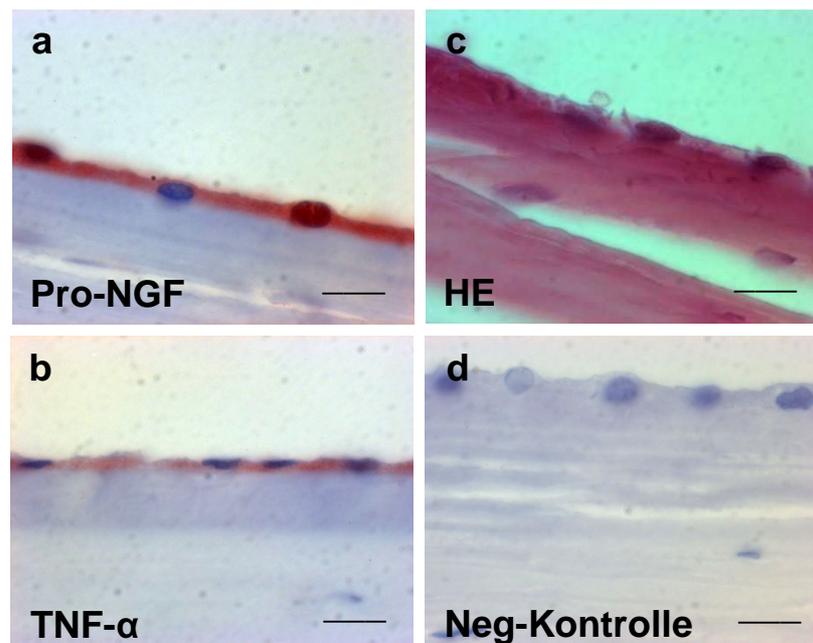


Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis an Paraffinschnitten von **pro-NGF** (a) und **TNF- α** (b) an Corneaendothel (a-d; 1000-fache Vergrößerung); Hämatoxillin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE; c) und **Negativkontrolle** (TBS; d), die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalau. Der Balken in a-d entspricht 50,4 μ m.

Im Pterygium ist pro-NGF im Epithel detektierbar (Abb. 17a). Zusätzlich zeigen muköse Zellen Sekretgranula, in denen sich ebenfalls pro-NGF nachweisen lässt. Im subepithelialen Stroma reagieren nur einzelne Zellen positiv.

TNF- α ist ebenfalls im Pterygiumepithel nachweisbar (Abb. 17b), wobei besonders die basalen Epithelzellen positiv reagieren. Becherzellen reagieren nicht mit dem AK gegen TNF- α ; das Pterygiumstroma reagiert deutlich positiver mit dem TNF- α -AK (Abb. 17b), als mit dem AK gegen pro-NGF (Abb. 17a).

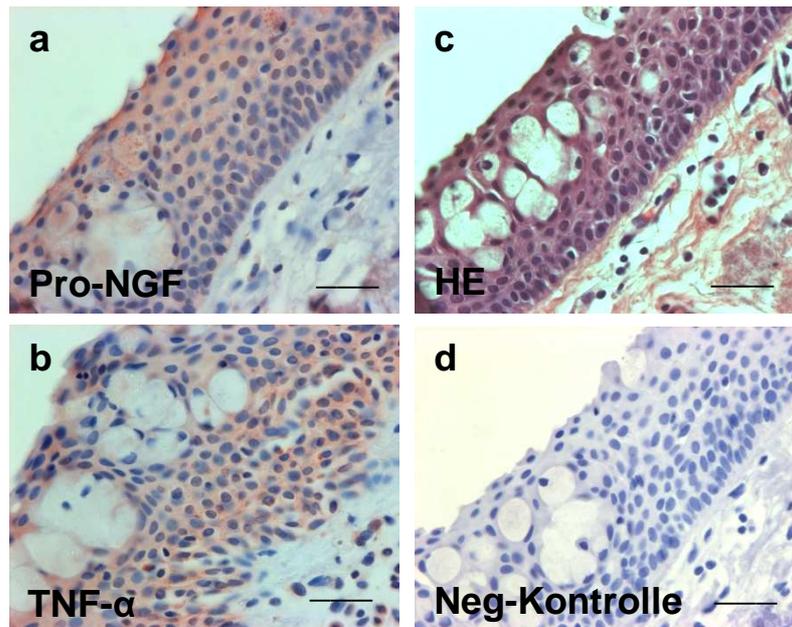


Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis von **pro-NGF** (a) und **TNF- α** (b) an Paraffinschnitten eines Pterygiums (400-fache Vergrößerung). Hämatoxillin-Eosin-Übersichtsfärbung (**HE**; c) und **Negativkontrolle** (TBS; d), die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Der Balken in **a-d** entspricht 217,3 μ m.

Es folgt die unter 3.4.3 ausformulierte semiquantitative lichtmikroskopische Auswertung der relativen Verteilung an pro-NGF und TNF- α . Unterschieden werden folgende Teilgewebe: Epithel, Stroma und (Gefäß-) Endothel (Abb. 18).

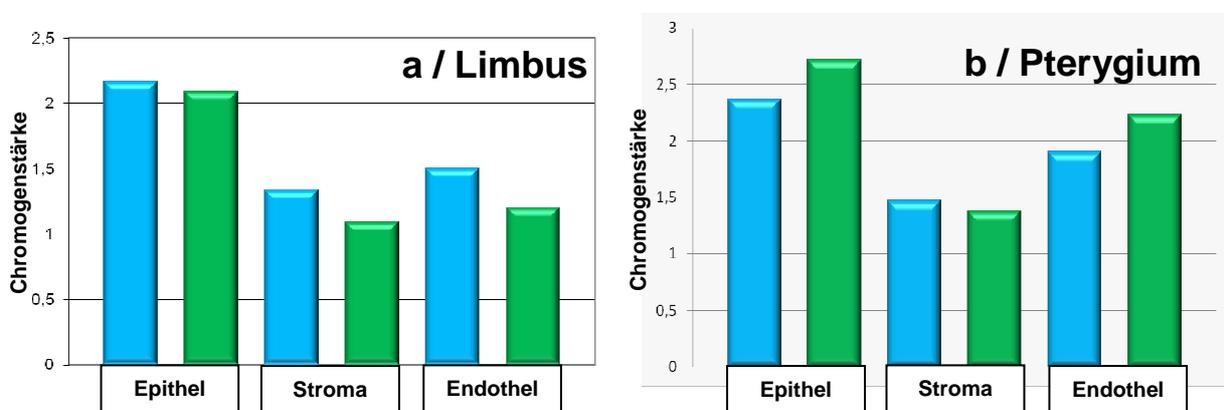


Abb. 18: Das linke Diagramm zeigt die Verteilung von **pro-NGF** [hellblau] und **TNF- α** [grün] im Limbusgewebe (a). Das rechte Diagramm zeigt die Verteilung von **pro-NGF** [hellblau] und **TNF- α** [grün] in pterygialem Gewebe (b). In beiden Diagrammen stellen die zwei linken Säulen das Epithel die beiden mittleren Säulen das Stroma und die beiden rechten Säulen das Gefäßendothel dar. Die Ordinate gibt die relative Chromogenstärke wieder (+ = 1 / ++ = 2 / +++ = 3).

Wie in Abb. 18 zu sehen, ist die relative Menge von pro-NGF wie auch von TNF- α im Epithel am höchsten, gefolgt vom Endothel. Im Stroma ist, sicher auch bedingt durch die geringere Zelldichte insgesamt, der Gehalt an beiden Faktoren am geringsten. Vergleicht man nun in der nachfolgenden Synopsis (Abb. 19) nicht nur die Gewebetypen (Limbus und Pterygium) und deren Subtypen, sondern auch die relative Verteilung von pro-NGF und TNF- α darin, so fällt auf, dass in pterygialem Gewebe relativ mehr pro-NGF und TNF- α zu finden ist, als in normalem Augenoberflächengewebe (corneokonjunktivaler Limbus). Besonders im Gefäßendothel des Flügelfells werden vergleichbare Konzentrationen gesehen wie sie im an sich „faktorreicheren“ gesunden Epithelgewebe vorkommen.

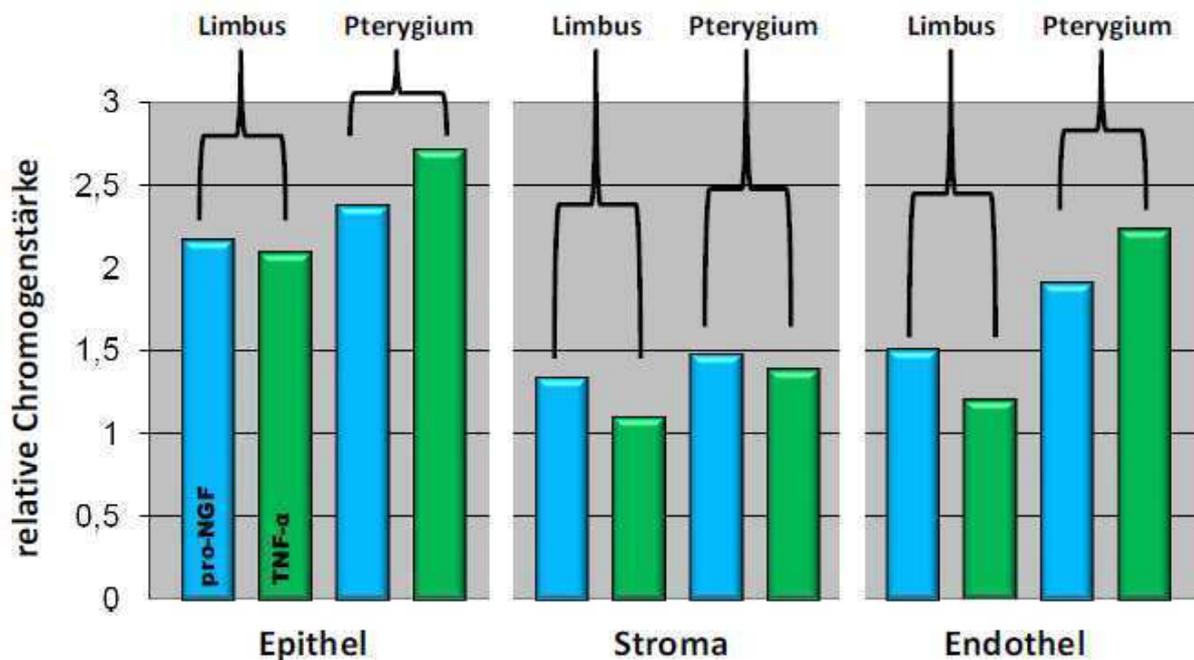


Abb. 19: Synopsis der IHC-Ergebnisse von **pro-NGF** [hellblau] und **TNF- α** [grün], aufgeschlüsselt nach Subgeweben (Epithel, Stroma und Endothel). Die Ordinate gibt die relative Chromogenstärke wieder (+ = 1/++ = 2/+++ = 3)

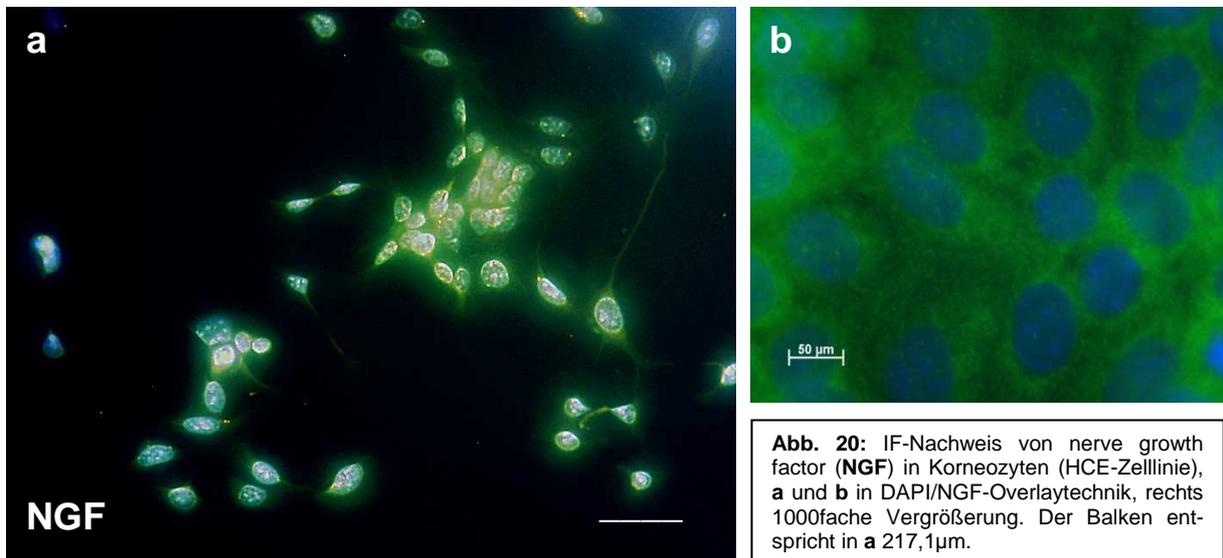
Es folgt eine Übersicht bezüglich Anzahl/Nachweishäufigkeit untersuchter Proben (Tab. 10).

pro-NGF/ TNF- α	Limbus	Konjunktiva	Cornea- epithel	Cornea- stroma	Cornea- endothel	Pterygium
n	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	40/40
positiv	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	40/40
negativ	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
positiv [%]	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100

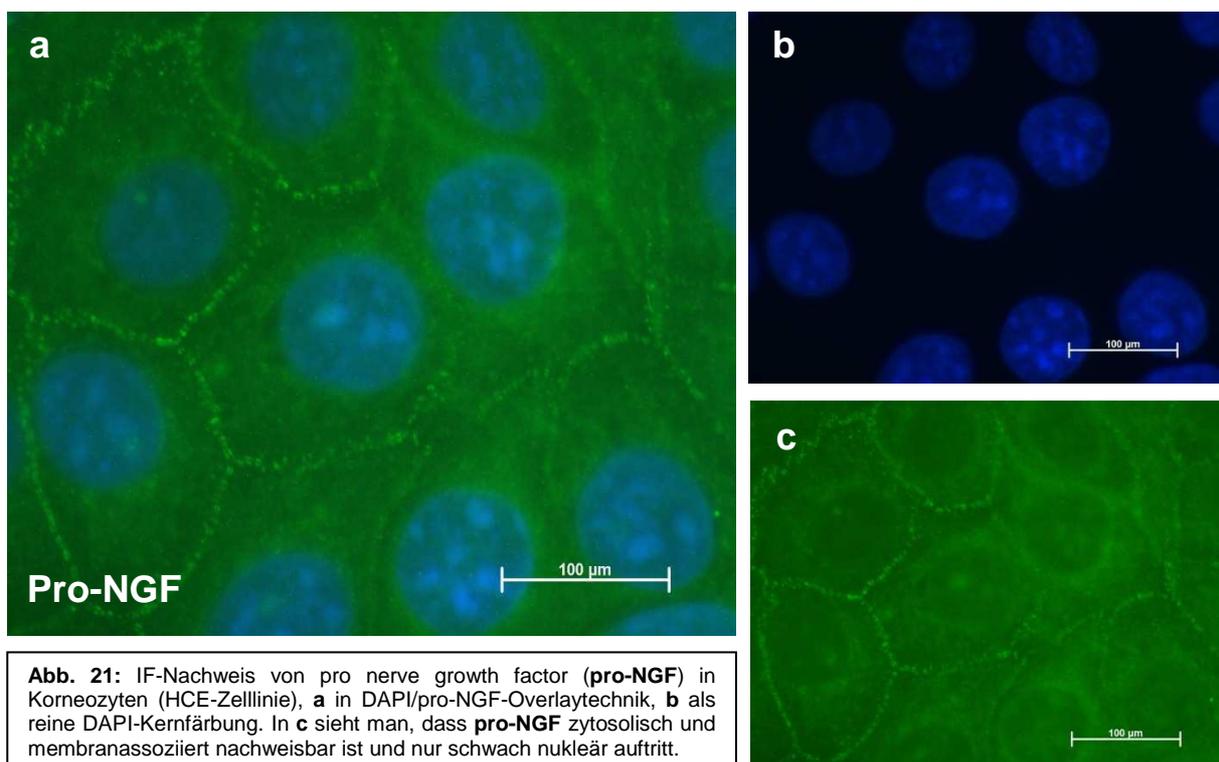
Tab. 10: Gezeigt wird die Anzahl der immunhistochemisch untersuchten Proben, die davon positiven und negativen Nachweise sowie deren prozentuale Verteilung. Zuerst wird jeweils der Wert für pro-NGF, danach der für TNF- α angegeben [pro-NGF/TNF- α].

4.2 Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten

Mittels Fluoreszenzimmunhistochemie wird NGF in semikonfluenten Cornealepithelmonolayern (HCE-Zelllinie) visualisiert (Abb. 20). Dabei sieht man eine heterogene zytoplasmatische Verteilung mit einer perinukleären Häufung sowie einem kontinuierlichen Quantitätsabfall zur Zellperipherie hin.



Pro-NGF lässt sich ebenfalls auf HCE-Zellen detektieren (Abb. 21a und 21c). Insbesondere nach Subtraktion der DAPI-Kernfärbung (Abb. 21b) zeigt sich eine weitgehend zytoplasmatische Verteilung mit schwächerem intranukleärem Gehalt. Als einziger Faktor fällt pro-NGF durch seine deutlich sichtbare Membranassoziation in HCE-Zellen auf.



In HCE-Zellen zeigt TNF- α eine starke perinukleäre Anreicherung (Abb. 22a und 22b). Zur Zellperipherie hin nimmt die Menge an detektierbarem TNF- α kontinuierlich ab, eine Assoziation zur Zellmembran wie bei pro-NGF ist nicht sichtbar. Nach Abzug der DAPI-Kernfärbung (Abb. 22c) lässt sich ein vollständiges intranukleäres Fehlen von TNF- α klar erkennen (Abb. 22d).

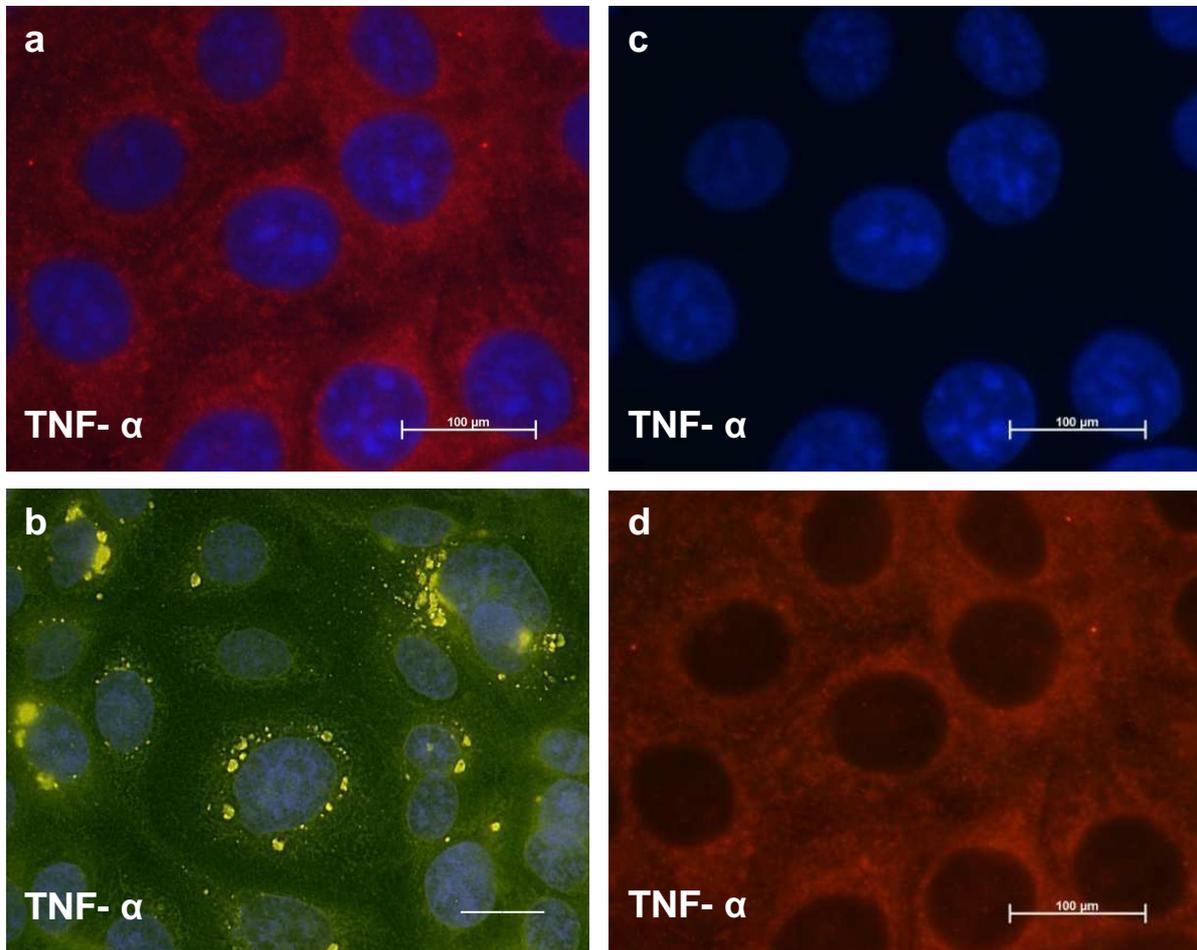


Abb. 22: Nachweis des Tumornekrosefaktors alpha (TNF- α) mittels Fluoreszenzimmunhistochemie in Korneozyten (HCE-Zelllinie), **a** in DAPI/TNF- α -Overlaytechnik (roter Cy3-Antikörper) und **b** in DAPI/TNF- α -Overlaytechnik (grüner FITC-Antikörper) mit starker perinukleärer Anreicherung respektive Granulabildung, **c** reine DAPI-Kernfärbung; in **d** erscheint das TNF- α Signal rein zytosolisch, intranukleär sieht man keine Anreicherung und keine Membranassoziation. Der Balken in **b** entspricht 89,3 μ m.

In konjunktivalen Zellrasen lassen sich fluoreszenzimmunhistochemisch lediglich pro-NGF und NGF nachweisen. Die Quantität von NGF nimmt von perinukleär zur Zellperipherie hin ab (Abb. 23a). Dies ist auch bei pro-NGF der Fall (Abb. 23b), eine Membranassoziation wie bei der HCE- Zelllinie zeigt sich nicht. Die Reaktion für TNF- α fällt bei den HCjE- Zellen stets negativ aus. Eine Zusammenschau über das Vorkommen von NGF, pro-NGF und TNF- α an HCE- und HCjE-Zellen liefert Tabelle 11.

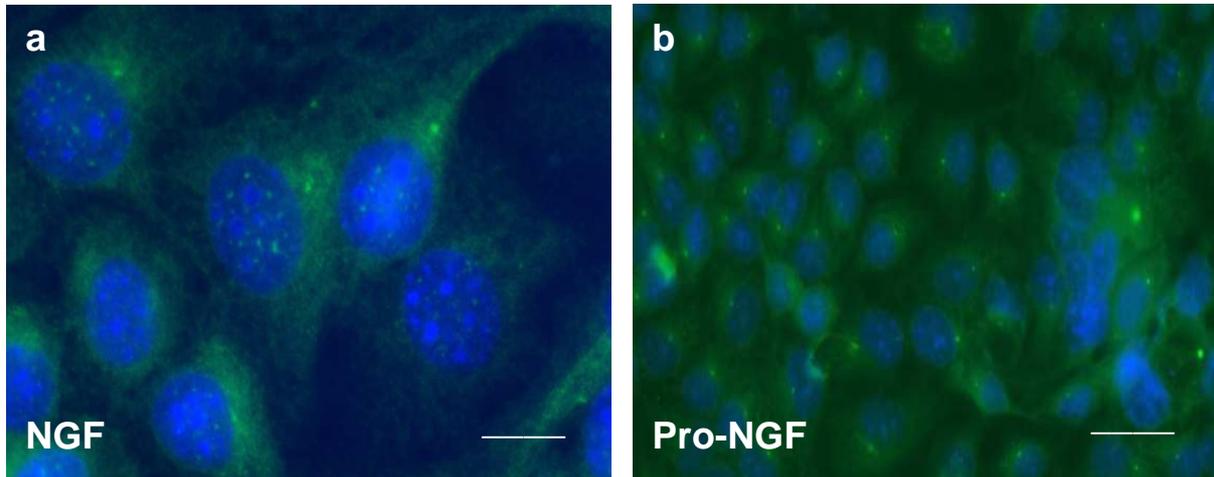


Abb. 23: **a** Nachweis von **NGF** in HCjE-Zellen (NGF/DAPI-Overlaytechnik), gut erkennbar ist die Abnahme der Signalstärke von perinukleär zur Zellperipherie hin, **b** Nachweis von **pro-NGF** an Konjunktivalepithelzellen (pro-NGF/DAPI-Overlaytechnik), man sieht ein Konzentrationsgefälle vom Zellkern zur Zellmembran hin. Eine vermehrte Assoziation zur Zellmembran findet man nicht. TNF- α konnte in HCjE-Zellen nicht detektiert werden. Der Balken entspricht in **a** 48,2 μ m und in **b** 122,3 μ m.

	HCE	HCjE
NGF	+	+
pro-NGF	+	+
TNF-α	+	-

Tab. 11: Der Nachweis für **NGF** und **pro-NGF** kann mittels fluoreszenzimmunhistochemischer Methoden an Korneozyten (**HCE**) und konjunktivalen Zellen (**HCjE**) geführt werden. **TNF- α** hingegen lässt sich lediglich an **HCE**-Zellen detektieren.

Pro-NGF lässt sich an Gefrierschnitten von exzidierten Pterygien zytosolisch lokalisieren (Abb. 24). Die Verteilung innerhalb des Zytoplasmas ist inhomogen und von granulaartigem Charakter.

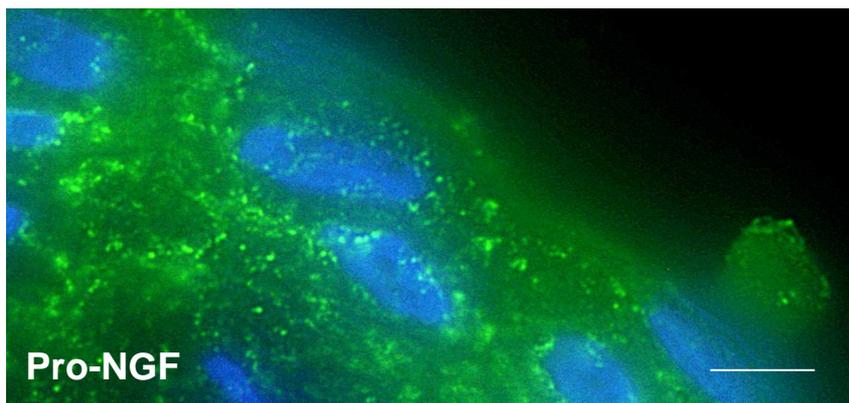


Abb. 24: Immunfluoreszenzchemischer Nachweis **pro-NGF** in pterygialem Gewebe in pro-NGF/DAPI-Overlaytechnik, gut erkennbar an dem grünen Fluoreszenzsignal. Der Balken entspricht etwa 43,7 μ m.

NGF und TNF- α lassen sich auch in Pterygien detektieren (Abb. 25a-c). Das Verteilungsmuster beider Faktoren ist zytoplasmatisch homogen (Abb. 25a und 25b), ein Triple-Overlay beider Faktoren beweist ein morphologisch gleiches Vorkommen (Abb. 25c). Zur besseren Kern-/Plasma-Differenzierung dient die DAPI-Kernfärbung (Abb. 25d). Eine Übersicht bezüglich Anzahl und Nachweishäufigkeit der untersuchten Pterygien gibt Tabelle 12.

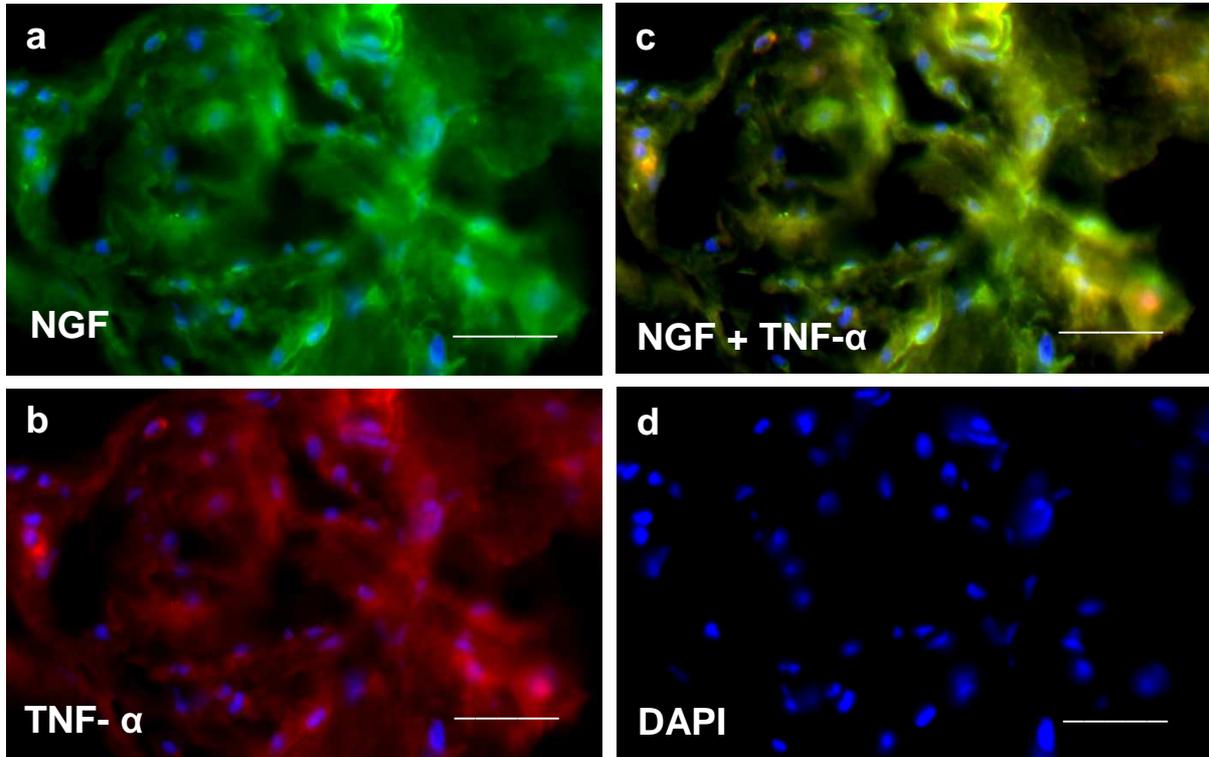


Abb. 25: Homogener Nachweis von NGF (a) und TNF- α (b) in DAPI-Overlaytechnik in pterygialem Gewebe; c Triple-Overlay von DAPI/NGF/TNF- α ; d einfache DAPI-Kernfärbung [Vergrößerung 400x]; Der Balken entspricht in etwa 229.3 μ m.

Pterygium	NGF	pro-NGF	TNF- α
n	24	24	24
positiv	24	24	24
negativ	0	0	0
positiv [%]	100	100	100

Tab. 12: Gezeigt wird die Anzahl der fluoreszenzimmunhistochemisch auf NGF, pro-NGF und TNF- α untersuchten Pterygien, die davon positiven und negativen Nachweise sowie deren prozentuale Verteilung.

4.3 Bromodesoxyuridin-Proliferationsassay

Wenn die Zellrasen in den 96-Well-Platten zu 60-70% konfluent gewachsen sind, werden sie für 2h in FKS-freiem Medium mit NGF/pro-NGF/TNF- α in steigenden Dosen bei 37°C inkubiert. Die Kontroll-Wells werden lediglich mit der gleichen Menge an FKS-freiem Medium bebrütet.

4.3.1 Auswirkungen von NGF

Bei HCE-Zellen kommt es zu einer mit steigender applizierter NGF-Dosis nahezu linear zunehmenden Inhibition der Zellproliferation (Abb. 26). Diese signifikante Wachstumshemmung tritt schon in niedrigen Dosen (10ng/ml) auf und setzt sich im supraphysiologischen Bereich (2500ng/ml) fort. Die Proliferationsrate wird hierbei um 67,5% gesenkt.

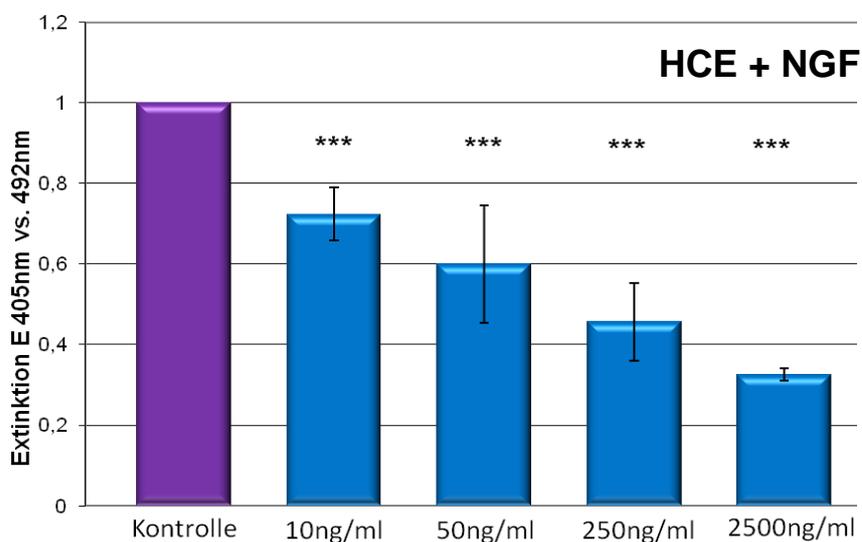


Abb. 26: Sinkende Proliferationsraten nach Stimulation von HCE-Zellen mit steigenden Konzentrationen von NGF

Bei den HCjE-Zellen kommt es nach Applikation von 10ng/ml NGF zu einer signifikanten Senkung der Proliferationsrate um 18,6%. Supraphysiologische Konzentrationen (250-2500ng/ml) von NGF senken die Wachstumsrate um etwa 27,7% (siehe Abb. 27).

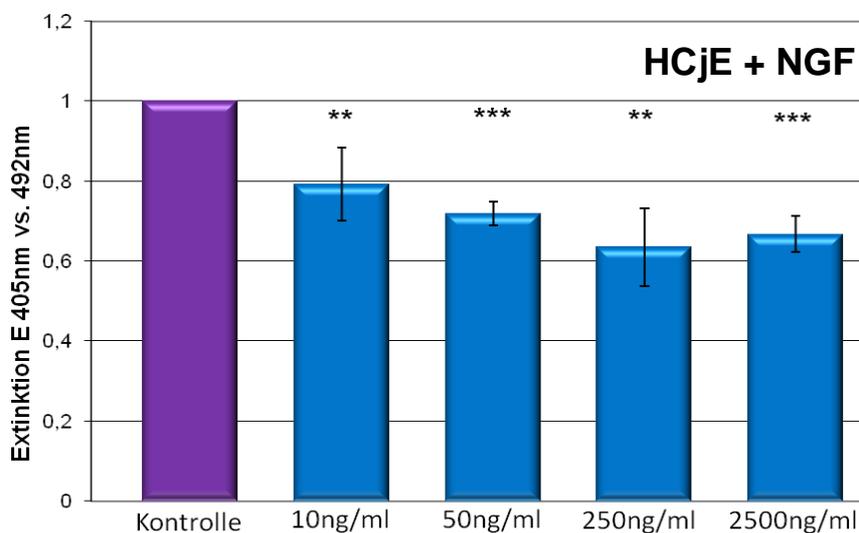


Abb. 27: Sinkende Proliferationsraten nach Stimulation von HCjE-Zellen mit steigenden Konzentrationen von NGF

4.3.2 Auswirkungen von pro-NGF

Werden HCE-Zellen mit pro-NGF in Konzentrationen zwischen 10-500ng/ml inkubiert, zeigt sich eine moderate nicht dosiskorrelierende Reduktion der Proliferationsrate um etwa 26,75% (siehe Abb. 28). Steigert man die Stimulationsdosis auf deutlich suprphysiologische Werte (5000ng/ml), reduziert sich die Wachstumsrate um 64%.

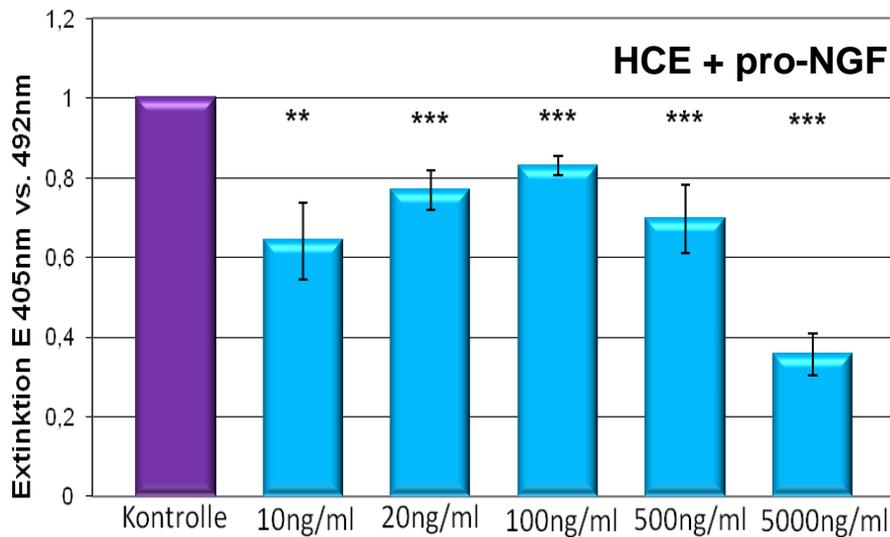


Abb. 28: Sinkende Proliferationsraten nach Stimulation von HCE-Zellen mit steigenden Konzentrationen von pro-NGF

Bei den HCjE-Zellen zeigt sich bei 10ng/ml keine signifikante Hemmung der Proliferation (siehe Abb. 29). Erst höhere Mengen (20-5000ng/ml) reduzieren die Wachstumsrate signifikant um 24-39%.

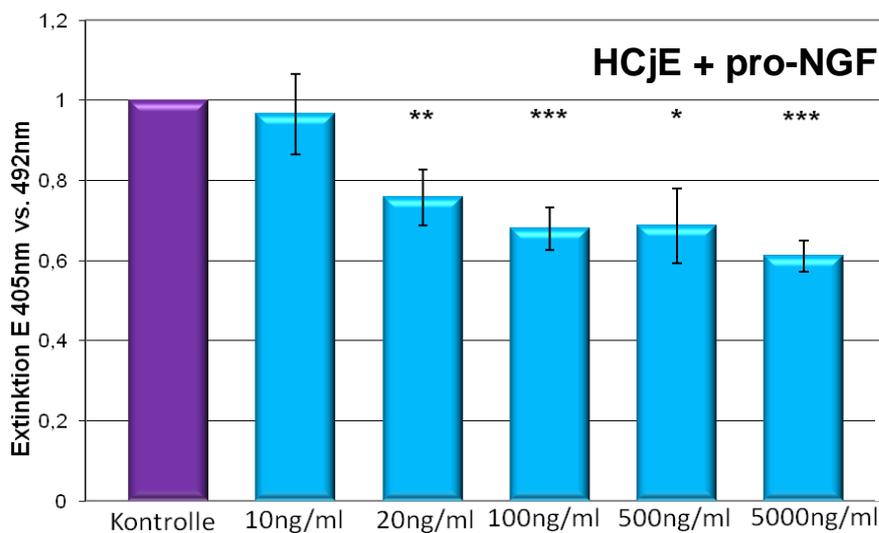


Abb. 29: Sinkende Proliferationsraten nach Stimulation von HCjE-Zellen mit steigenden Konzentrationen von pro-NGF

4.3.3 Auswirkungen von TNF- α

HCE-Zellen werden durch TNF- α signifikant positiv im Sinne eines Anstiegs der Proliferationsrate beeinflusst. Dies trifft insbesondere für niedrige (physiologische) Konzentrationen (10ng/ml) zu, es kommt zu 74% mehr Zellwachstum (Abb. 30). Erhöht man die Konzentration von TNF- α um das 2- bis 6-fache, so zeigt sich lediglich noch ein Anstieg der Proliferationsrate von 15-39%.

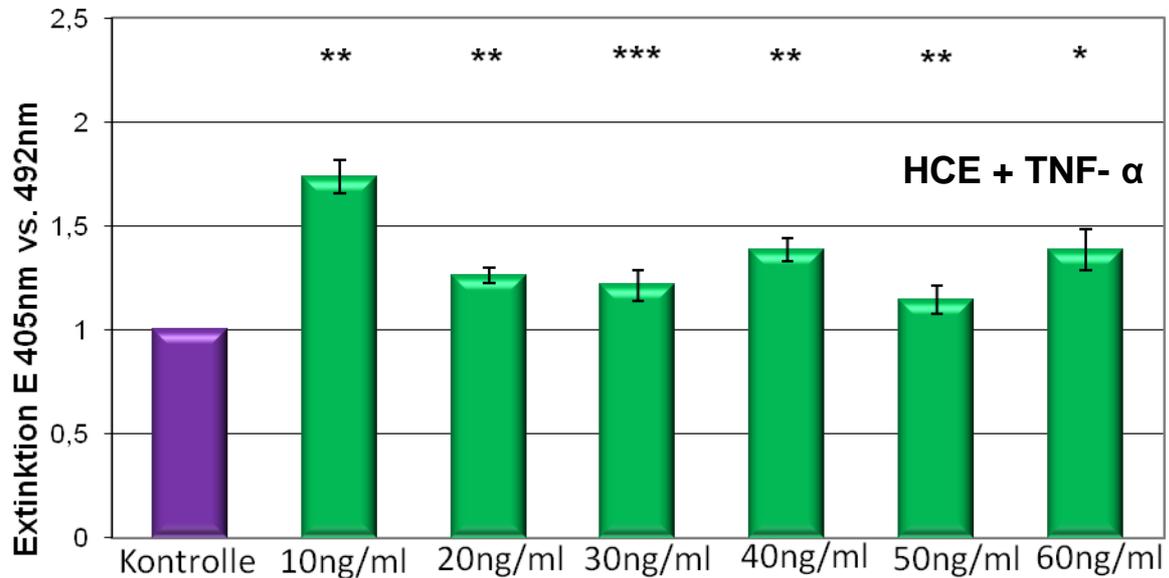


Abb. 30: Erhöhte Proliferationsraten nach Stimulation von HCE-Zellen mit steigenden Konzentrationen von TNF- α .

TNF- α bewirkt bei HCjE-Zellen in physiologischen Dosen von 10ng/ml einen Anstieg der Wachstumsrate von 69%, wenn man als Signifikanzgrundlage $\alpha = 10$ setzt (das Konfidenzintervall also 90 ist, siehe Abschnitt 3.6.3 [(*) = $p < 0,1$]). Höhere Dosen an TNF- α (20-60ng/ml) bewirken bezüglich des positiven Effektes auf die Proliferationsrate einen nahezu linearen Abfall. Bei Faktor 6 wird der Kontrollwert erreicht (siehe Abb. 31).

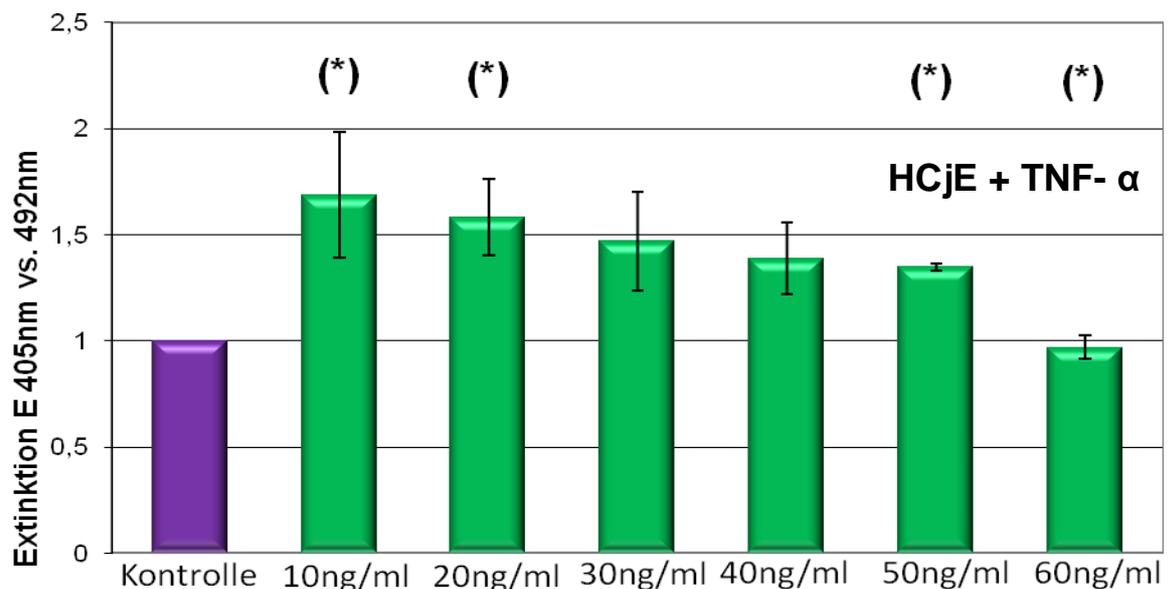


Abb. 31: Erhöhte Proliferationsraten nach Stimulation von HCjE-Zellen mit steigenden Konzentrationen von TNF- α .

4.4 Motilitätsassay/Einzelzellmigration

Werden Motilitätsassays mit 24-stündiger Beobachtung der Einzelzellmigration durchgeführt, so lässt sich feststellen, dass HCE-Zellen durch keinen der applizierten Faktoren in ihrem Migrationsverhalten beeinflusst werden. Dabei zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, ob mit physiologischen (10ng/ml) oder supraphysiologischen (250-500ng/ml) Konzentrationen stimuliert wird (Abb. 32).

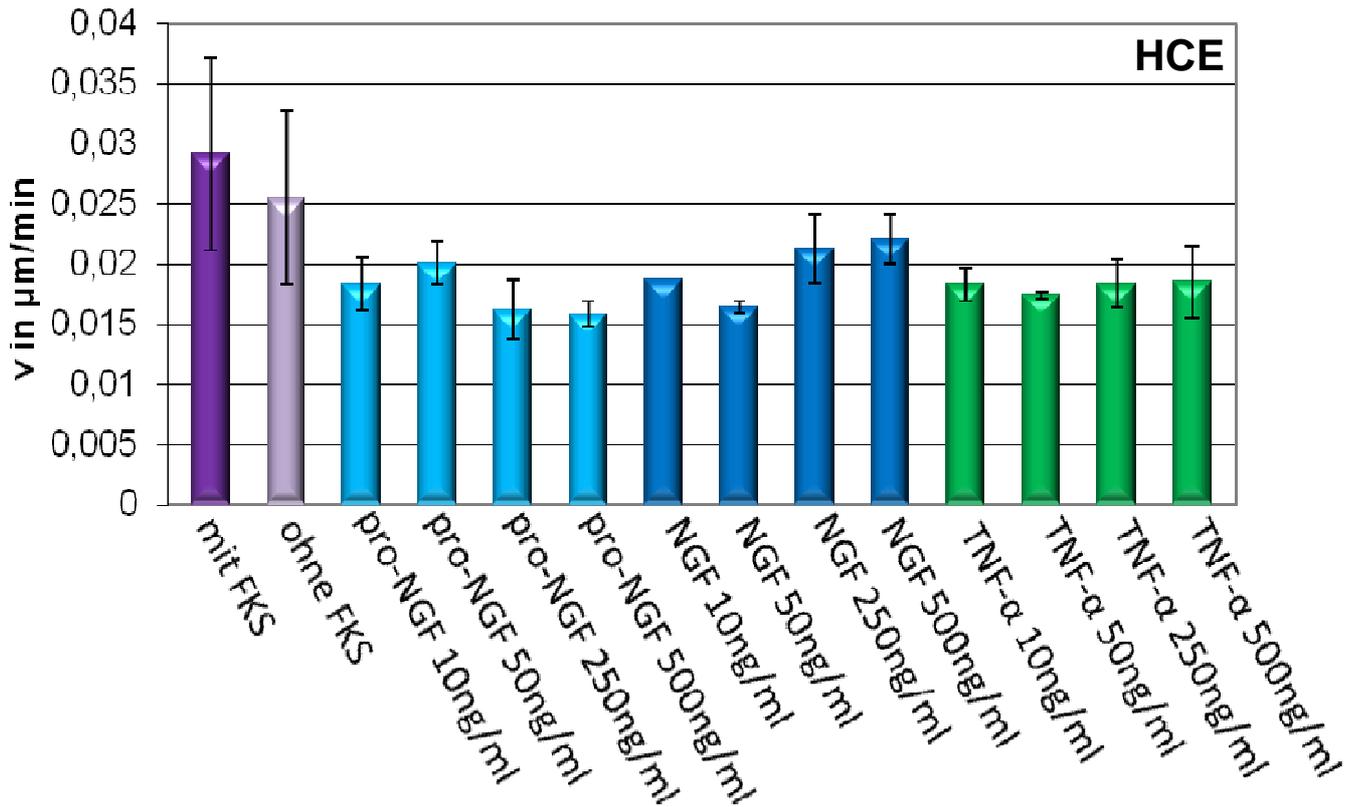


Abb. 32: Einzelzellmigration von HCE-Zellen nach 2-stündiger Stimulation mit pro-NGF (hellblau), NGF (dunkelblau) und TNF- α (grün) in steigenden Dosierungen [10ng/ml; 50ng/ml; 250ng/ml; 500ng/ml]. Zur Kontrolle werden Proben mit und ohne 10%igen FKS-Zusatz mitgeführt.

Werden HCjE-Zellen nach Stimulation mit NGF, pro-NGF und TNF- α auf ihr Migrationsverhalten untersucht (Abb. 33), zeigt sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Faktoren respektive den Konzentrationen (10-500ng/ml). Verglichen mit einer unstimulierten Kontrollzellpopulation (in der dem Stimulationsmedium 10% FKS zugesetzt wird), scheinen pro-NGF, NGF und TNF- α möglicherweise sogar die Zellmotilität zu inhibieren. Die Versuchsreihe mit dem Zusatz von 10% FKS kann hier somit als Positivkontrolle für den Versuchsaufbau gelten.

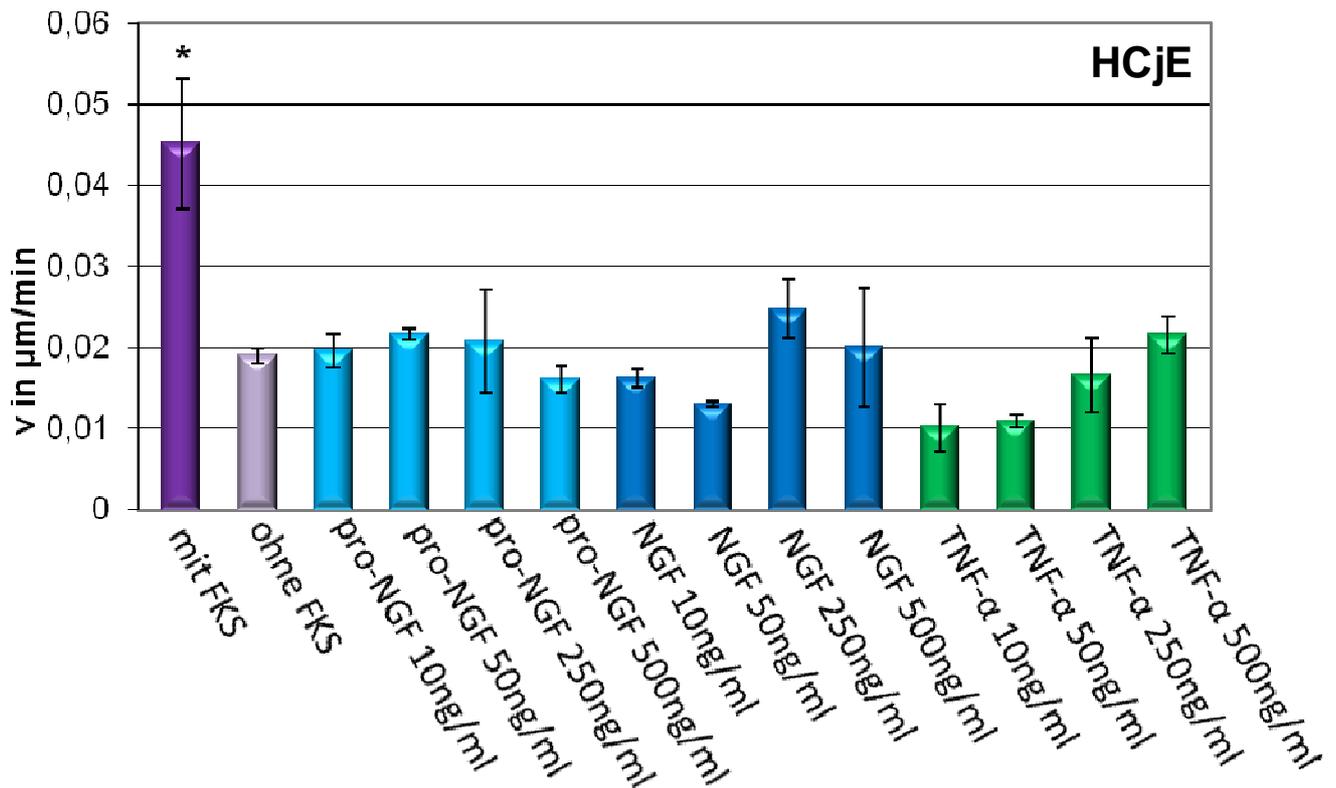


Abb. 33: Einzelzellmigration von HCjE-Zellen nach 2-stündiger Stimulation mit pro-NGF (hellblau), NGF (dunkelblau) und TNF- α (grün) in steigenden Dosierungen [10ng/ml; 50ng/ml; 250ng/ml; 500ng/ml]. Zur Kontrolle werden Proben mit und ohne 10%igen FKS-Zusatz mitgeführt. Bei den HCjE-Zellen steigert der Zusatz von FKS signifikant die Zellmotilität.

5 Diskussion

5.1 Expression und Funktion der Neurotrophine in der Bindehaut

NGF konnte mittels immunhistochemischer Detektion bereits an normaler und entzündeter Konjunktiva nachgewiesen werden (Lambiase et al., 1998; DiGirolamo et al., 2008; Ribatti et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals der immunhistochemische Nachweis für pro-NGF in der Konjunktiva erbracht. Vergleicht man gesunde Bindehaut mit Pterygien, dann kommen NGF und der TrkA-Rezeptor vermehrt im Endothel vor (Ribatti et al., 2009). Die gefundenen NGF-Konzentrationen korrelieren positiv mit der mikrovaskulären Dichte des untersuchten Gewebes (Ribatti et al., 2009). Die Autoren postulieren hier eine autokrine Verbindung zwischen NGF/TrkA-Rezeptor und eine vermehrte Angiogenese. Eigene Befunde zeigen eine vermehrte Anreicherung von pro-NGF nicht nur im Endothel, sondern auch im Stroma und im Epithel. Dabei sind die semiquantitativ erfassten Werte in konjunktivalem Gewebe immer niedriger als im Pterygium. Generell scheint die Verteilung der Neurotrophine insgesamt im Epithel höher zu sein und im Stroma nur bei akuten Entzündungsreaktionen zu akzelerieren (Lambiase et al., 1998).

Für pro-NGF kann in Analogie dazu das Gleiche gezeigt werden: Bei allen untersuchten Präparaten findet man im Epithel die stärkste Immunreaktivität; im konjunktivalen Stroma hingegen nur wenig. Verglichen mit Pterygien, sieht man einen Anstieg der pro-NGF-Konzentration auch im Stroma. Ob pro-NGF nun über die Stromagefäße antransportiert wird oder aber transepithelial ins Stroma diffundiert ist unklar. Der p75-Rezeptor kommt vermehrt im basalen Epithel von Konjunktiva, Limbus und Pterygium vor, der TrkA-Rezeptor zudem in der Kornea (DiGirolamo et al., 2008). Diese Befunde korrelieren mit der vermehrten immunhistochemischen Detektion von pro-NGF im Stratum basale des corneokonjunktiven Limbus. Rios et al. (2007) konnten NGF und seine Rezeptoren mittels Western Blot und Immunfluoreszenz in Bindehäuten von Ratten nachweisen (Rios et al., 2007). Im Rahmen dieser Dissertation gelang mit immunfluoreszenzchemischen Methoden sowohl der Nachweis von NGF, als auch von pro-NGF an humanen Bindehautzellen. Hierbei ergibt sich der Verdacht auf ein Konzentrationsgefälle von perinukleär zur Zellperipherie hin. Ob dies auf eine direkte Syntheseleistung von pro-NGF/NGF durch HCjE-Zellen schließen lässt, müssen weitere Untersuchungen klären.

Neurotrophine werden in entzündeten Geweben vermehrt exprimiert. Dies trifft auch für die vernale Konjunktivitis zu (Micera et al., 2007; Lambiase et al., 1997b). Hierbei reguliert NGF die Typ I Kollagenbildung herunter und es werden vermehrt p75 und Substanz P detektiert. Man nimmt an, dass NGF für das tissue remodeling eine entscheidende Rolle spielt (Micera

et al., 2007). Auch bei Patienten, die an Asthma bronchiale leiden, lassen sich erhöhte Konzentrationen an NGF nachweisen. Hierbei besteht eine positive Korrelation mit einer steigenden Anzahl von T₂-Helferzellen, Mastzellen und Eosinophilen, von denen es produziert und sezerniert wird. Konsekutiv steigt die Neurotrophinrezeptordichte in entzündeten Bindehautarealen (Bonini et al., 2002). Eine NGF-Antikörpergabe bremst hier lokale Entzündungen des oberen Respirationstraktes merklich (Bonini et al., 2002). Wenn die Konjunktiva nur partiell entzündet ist, wie sie es z.B. im Rahmen von juvenilen Bindehautnävii sein kann, findet man erhöhte Konzentrationen von NGF und seinen Rezeptoren lediglich in diesem Bereich (Levi-Schaffner et al., 2002). Die immunhistochemisch detektierten deutlich höheren Konzentrationen an pro-NGF in pterygialen Geweben ergänzen und erhärten demnach die Befunde von Bonini et al. (2002) und Levi-Schaffner et al. (2002).

In Bezug auf die Funktion der Neurotrophine im Bereich der Konjunktiva ist bekannt, dass NGF in HCjE-Zellen IL-10 freisetzt und TLR4 sowie TLR9 hochreguliert (Micera et al., 2009). Auswirkungen auf die Zellproliferation wurden von der Arbeitsgruppe Rios (2007) nicht gesehen (Rios et al., 2007). Eigene Befunde zeigen jedoch sowohl für NGF, als auch für pro-NGF eine signifikante dosiskorrelierende Proliferationsinhibition in HCjE-Zellen. Lambiase (2009) weist mittels BrdU-Assay eine steigende Zellzahl, mittels RT-PCR eine steigende mRNA-Menge sowie eine steigende Muzinfreisetzung nach (Lambiase et al., 2009b). Allerdings wird auch ein gehäuftes Auftreten von Apoptosen beschrieben, sodass sich die Frage stellt, wie lange die Neurotrophine proliferationssteigernd wirken. Möglicherweise bewirken ein Überangebot oder eine verlängerte Einwirkzeit, dass anstelle des TrkA-Rezeptorweges vermehrt über den p75-Signaltransduktionsweg Apoptose vermittelt wird.

NGF wirkt über TGF- β auf Fibroblasten der Bindehaut faserbildend und sorgt für eine erhöhte Konversion von Fibroblasten zu Myofibroblasten sowie zur vermehrten Migration derselben (Micera et al., 2005). Eigenen Beobachtungen zufolge haben weder NGF noch pro-NGF einen signifikanten Effekt auf die Motilität von HCjE-Zellen. Auch bei Patienten mit trockenem Auge wird NGF hochreguliert (Lee et al., 2006). Bremst man die Entzündung mit 0,1%igen prednisolonhaltigen Augentropfen, kann man hier nicht nur die klinischen Entzündungszeichen dämpfen, sondern es sinkt auch nachweislich die NGF-Menge ab (Lee et al., 2006). Versuche, bei Pterygiumpatienten die NGF/pro-NGF Konzentrationen durch Corticosteroide zu beeinflussen, könnten hier wegweisend sein.

5.2 Expression und Funktion der Neurotrophine in der Hornhaut

NGF konnte zunächst von Lambiase (2000) in der Cornea von Ratten mittels Immunhistochemie, FISH, RT-PCR und ELISA nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass NGF dort auch gespeichert und sezerniert wird (Lambiase et al., 2000). 2002 wurden NGF und der TrkA-Rezeptor in der menschlichen Cornea, der Iris, dem Ziliarkörper und der Linse detektiert (Lambiase et al., 2002). Dabei wurde gezeigt, dass NGF von den Zellen dieser Gewebe produziert und aktiv in das Kammerwasser abgegeben wird (Lambiase et al., 2002). Micera konnte 2006 beide Rezeptoren (TrkA und p75) in der Cornea nachweisen und die Arbeitsgruppe um Qi detektierte NGF im Limbusepithel mittels immunhistochemischer Methoden (Micera et al., 2006; Qi et al., 2007). Sornelli et al. (2010) konnten kürzlich NGF in humanen Corneozyten nachweisen und postulieren, dass diese NGF produzieren und freisetzen (Sornelli et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit gelingt der Nachweis von NGF und erstmals auch von pro-NGF mittels Immunfluoreszenz an humanen Corneaepithelzellen. Hierbei zeigt sich für pro-NGF eine ausgeprägte Assoziation zur Zellmembran. Demzufolge liegt es nahe, dass die sezernierten Neurotrophine autokrin auf ihre Ursprungsgewebe wirken.

Ein großes und derzeit sehr aktuelles Forschungsfeld stellt die Wirkung von NGF bezüglich der Therapie cornealer Ulzera dar. Lange schon ist bekannt, dass topisch appliziertes NGF corneale Ulzera in Tierversuchen (Ratten, Kaninchen) schneller zur Ausheilung bringen kann (Aloe et al., 2008; Micera et al., 2006; Lambiase et al., 2000). Setzt man corneale Verletzungen, wird in diesen Abschnitten mehr NGF gefunden (Micera et al., 2006). In Analogie dazu konnte gezeigt werden, dass die Gabe spezifischer NGF-Antikörper (auch Bevacizumab als VEGF-Antikörper) die Heilungsdauer deutlich verlängert und die Mengen an NGF und VEGF deutlich absinken (Lambiase et al., 2000; Kim et al., 2010). Pro-NGF konnte mit immunhistochemischen Techniken sowohl im Corneaepithel, als auch im Corneaendothel nachgewiesen werden. Da insbesondere das Epithel häufig Traumata und Umbaureaktionen unterliegt, könnte dies, in Analogie zu den Befunden von Aloe et al. (2008), Micera et al. (2006) und Lambiase et al. (2000), ein Hinweis dafür sein, dass auch pro-NGF an der Ausheilung derartiger Verletzungen beteiligt ist.

Die Heilungspotenz von NGF hingegen scheint grundsätzlich belegbar zu sein und unabhängig von der spezifischen Noxe. So sprechen auch neuropathische Keratitiden (Bonini et al., 2000) und Ulzera, die nach Trigeminausfall entstehen, gut auf eine lokale Therapie mit NGF an (Lambiase et al., 2007b). Als Nebenwirkungen werden lediglich eine leichte konjunktivale Hyperämie und passager erhöhte Lichtempfindlichkeit gesehen (Lambiase et al., 2007b). Bei Herpeskeratitiden ist die Applikation von NGF der herkömm-

mlichen Therapie mit Aciclovir möglicherweise nicht unterlegen (Lambiase et al., 2007b). Eine Herunterregulation von NGF und dem p75-Rezeptor sowie ein gänzlichliches Fehlen lassen sich auch beim Erkrankungsbild des Keratokonus nachweisen. Hierbei ist das Protein Sp3 (ein Gentranskriptionsfaktor) hochreguliert und man nimmt an, dass Sp3-Isoformen das NGF-Signal steuern können (Lambiase et al., 2005a). Die migrationsfördernde Wirkung von NGF auf Fibroblasten wurde bereits erwähnt (Micera et al., 2006; Micera et al., 2001). Auf HCE-Zellen haben beide untersuchten Neurotrophine allerdings keine Auswirkungen, wie die vorliegenden Befunde belegen. Micera et al. (2001) beschreiben, dass NGF die Proliferation von Haut- und Lungenfibroblasten nicht steigert (Micera et al., 2001). Dieser Effekt kann für pro-NGF und NGF an HCE-Zellen in niedrigen Dosen bestätigt werden, in höherer Dosierung sieht man sogar eine deutliche Wachstumsinhibition.

5.3 Allgemeine Expression und Funktion der Neurotrophine am menschlichen Auge

Es ist gezeigt worden, dass die Neurotrophine NGF und pro-NGF eine wichtige Rolle an der Augenoberfläche spielen. Daher ist davon auszugehen, dass Entwicklung, Differenzierung und Modifikation mitunter maßgeblich von der Anwesenheit dieser beiden Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. Neurotrophine und ihre Rezeptoren werden außer in Cornea und Konjunktiva in Tränendrüse und Tränenflüssigkeit nachgewiesen (Ghinelli et al., 2003). Man kann also postulieren, dass es physiologisch zu einer Benetzung der gesunden Augenoberfläche kommt (Nguyen et al., 1997). Bei Patienten mit trockenem Auge verbessert NGF nach topischer Applikation Parameter wie Schirmertest, tear-break-up-time etc. signifikant (Coassin et al., 2005) und scheint somit auch für die Tränenbildung selbst von Bedeutung zu sein (Muzi et al., 2010). NGF kann sogar, wenn es im Serum und in der Tränenflüssigkeit von Patienten mit diabetischer Retinopathie bestimmt wird, als Verlaufparameter dienen. Es besteht eine gute Korrelation zwischen den gemessenen NGF-Konzentrationen und der Erkrankungsschwere (Park et al., 2008). Da NGF nach systemischer Applikation nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, ist eine topische Gabe (z.B. als Augentropfen) vorzuziehen (Lambiase et al., 2010). Dabei diffundiert NGF nicht nur bis in die hinteren Augenabschnitte wie Retina und Nervus opticus, sondern dringt auch in die vorderen Hirnabschnitte (Nucleus basalis und Septum pellucidum) ein. Die Augenoberfläche kann also als vollkommen neuer galenischer Applikationsweg in der Behandlung, beispielsweise für Alzheimer- oder Parkinsonerkrankung, angesehen werden (Lambiase et al., 2007a; Lambiase et al., 2010).

Wiederkehrende Erhöhungen des Augeninnendrucks führen letztendlich zum Erkrankungsbild des Glaukoms und zur Erhöhung der Neurotrophinmenge im Kammerwasser (Lambiase et al., 1997a). Widersprüchliche Angaben findet man in der absoluten NGF-Menge in der Netzhaut (Sposato et al., 2008; Coassin et al., 2008), topisch appliziert hilft NGF allerdings, den retinalen Ganglienzellverlust beim Glaukom zu minimieren (Colafrancesco et al., 2010) und die funktionellen Sehparameter (Schärfe, Kontrast etc.) zu verbessern (Lambiase et al., 2009). Der Grund dafür scheint darin zu bestehen, dass der TrkA-Rezeptorweg deutlich reduziert ist (Sposato et al., 2008), wohingegen der p75-Rezeptorweg übermäßig stark benutzt wird (Coassin et al., 2008). Eine NGF-Antikörpergabe erbringt genau den entgegengesetzten Effekt (Lambiase et al., 1997a). Eine lokal-oberflächliche Gabe scheint einer intraokulären Injektion nicht unterlegen zu sein (Lambiase et al., 2005a). Auch bei der Retinitis pigmentosa überleben unter einer NGF-Therapie mehr Photorezeptoren (Lenzi et al., 2005). Dieser Effekt scheint über die konsekutive Freisetzung von BDNF, BFGF, TGF- β , VEGF und das Neuropeptid Y mediiert zu werden (Lenzi et al., 2005). Es wird auch die Hypothese diskutiert, dass es durch fehlerhaftes posttranslationales Prozessieren von pro-NGF zu NGF zu retinalen Dystrophien kommt (Srinivasan et al., 2004). Degenerieren nicht nur die ersten Ganglienzellen der Retina, sondern auch die Axone der dritten Ganglienzellschicht, die den Nervus opticus bilden, bezeichnet man dies als Optikusdegeneration. Diese tritt klassischerweise bei der Multiplen Sklerose auf und man findet hier ebenfalls vermehrt NGF und den TrkA-Rezeptor (Micera et al., 1999). Auch in der Linse kommt NGF vor. Einerseits ist es bei Ratten mit einer bestehenden Katarakt quantitativ vermindert, andererseits lassen sich durch die Gabe von NGF-Antikörpern Katarakte in gesunden Linsen erzeugen (Ghinelli et al., 2003). Auf die Möglichkeit, NGF direkt auf die Augenoberfläche zu verabreichen, wurde bereits mehrfach hingewiesen. Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass auch bei altersbedingter Makuladegeneration eine Verbesserung des Krankheitsbildes zu erwarten ist (Lambiase et al., 2009c). Die Detektion von NGF und pro-NGF an HCE-/HCjE-Zellen, Konjunktiva, Cornea und Pterygium (durch Immunhistochemie und -fluoreszenz) unterstreicht die Wichtigkeit dieser Neurotrophine für die Intaktheit der Augenoberfläche. Der topisch applizierten Konzentration sind allerdings Grenzen gesetzt, wie die Proliferationstests zeigen. Supraphysiologische Konzentrationen könnten die zelleigenen Reparaturmechanismen von Heilung hin zu Apoptose umpolen. Eine Lyse oder die Entstehung von Tumoren wird eher nicht begünstigt, wie die Zellmotilitätsassays zeigen.

5.4 Expression und Funktion von TNF- α an gesunden Zellen und Geweben der Augenoberfläche

Der Nachweis von TNF- α dient in der vorliegenden Arbeit nicht nur als Positivkontrolle für die einzelnen Experimente. Schon lange ist bekannt, dass TNF- α die NGF-Synthese positiv beeinflussen kann (Aloe et al., 1999; Bläsing et al., 2005). Aufgrund dieser Verknüpfungen wird vielmehr ein Vergleich zwischen pro-NGF/NGF und TNF- α bezüglich morphologischer Expression sowie funktionellen Einflüssen angestrebt. Verglichen wurden die histologisch/zelluläre Lokalisation mittels (Fluoreszenz-)Immunhistochemie und das Wachstums- und Motilitätsverhalten von Horn- und Bindehautzellen.

An der Konjunktiva gelingt der Nachweis von TNF- α an allen untersuchten Gewebeproben. Dies weist daraufhin, dass TNF- α an der Bindehaut wichtige immunologische Funktionen erfüllt. Insbesondere im basalen Epithel kann TNF- α detektiert werden. Apikal, perivaskulär und im Stroma lässt es sich nicht nachweisen. Ob dies den Schluss zulässt, dass TNF- α im regenerativen Bereich der Konjunktiva auch gebildet wird oder doch (trotz fehlendem perivaskulärem Nachweis) hämatogen hierher gelangt, ist unklar. Im Widerspruch dazu kann der fluoreszenzimmunhistochemische Nachweis an HCjE-Zellen nicht erbracht werden. Dies erhärtet die Möglichkeit des hämatogenen Antransportes von TNF- α . Denn wenn das Stratum basale von HCjE-Zellen in der Lage wäre, TNF- α zu synthetisieren, sollte es sich auch in der Zellkultur nachweisen lassen. Im Gegenzug dazu muss natürlich auch an einen methodischen Fehler bei der Versuchsdurchführung gedacht werden. Funktionell betrachtet führen physiologische Dosen von TNF- α an HCjE-Zellen zu einem Anstieg der Proliferationsrate von fast 70%. Bei der Applikation höherer Dosen sinkt dieser Effekt nahezu linear ab. Als wichtigste Funktionen von TNF- α werden in der Literatur die Zellproliferation und Zelldifferenzierung einerseits sowie die Apoptose andererseits genannt (Hehlgans et al., 2005). Bei 60ng/ml unterscheiden sich die untersuchten Proben nicht mehr von der unstimulierten Kontrolle. Man kann postulieren, dass sich bei dieser Dosis das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelluntergang gerade die Waage hält. Von Versuchen mit supraphysiologischen Dosen (bspw. 100ng/ml oder höher) würde man eine signifikante Proliferationsinhibition erwarten. Die von TNF- α vermittelten Effekte haben keinen positiven Einfluss auf die Zellmotilität von HCjE-Zellen. Das mag daran liegen, dass Konjunktivaepithelzellen ortständige Zellen sind. Denn auf Abwehrzellen des Immunsystems übt TNF- α einen stark migrationsfördernden Effekt aus (Hehlgans et al., 2005).

An allen untersuchten Corneae lässt sich TNF- α in Analogie zur Konjunktiva detektieren. Auch hier zeigt sich in den basalen bis mittleren Epithelzellreihen eine TNF- α -Expression, die apikal und im Hornhautstroma fehlt. Endothelial kommt es ebenfalls vor. Fremdkörper und

mikrobielle Erreger kommen zumeist im Bereich der Hornhaut in Kontakt mit der Augenoberfläche. Da größere Mengen TNF- α durch Lipopolysaccharide (ein bakterielles Produkt) freigesetzt werden (Holländer et al., 2005), war der positive Nachweis insbesondere an der Corneaepithelseite zu erwarten. Im Gegensatz zu den HCjE-Zellen lässt sich der Nachweis von TNF- α an Keratinozyten der Cornea fluoreszenzimmunhistochemisch belegen. Man findet eine ausgeprägte perinukleäre Anreicherung im Sinne einer Granulabildung. Intranukleär und zur Zellperipherie hin fehlt das Antikörpersignal vollständig. Wenngleich Horn- und Bindehaut teils ähnliche Gestalt aufweisen, zeigt sich doch hier klar eine Differenz bezüglich physiologischem Anspruch und Funktion: Das gefäßfreie Hornhautgewebe (Lang et al., 2004) ist bei fehlender Möglichkeit eines hämatogenen Antransportes von TNF- α auf eine Eigensynthese angewiesen. Diese Hypothese wird durch die deutlich sichtbare Granulabildung im zellorganellreichen (perinukleären) Bereich bei vollständigem intranukleärem Fehlen untermauert. Hornhautverletzungen müssen schnell ausheilen, um Störungen des Sehens durch Trübungen oder Brechkraftverluste zu vermeiden. Da Fremdkörper aseptische und Bakterien septische lokale Entzündungen hervorrufen, wird TNF- α immer freigesetzt (Hehlgans et al., 2005). An HCE-Zellen steigert TNF- α die Proliferationsrate in physiologischen Dosen signifikant um fast 75%. Wie schon bei den HCjE-Zellen beschrieben, kommt es bei supraphysiologischer Dosissteigerung zu einem Abfall der Wachstumsrate durch vermehrte Apoptoseinduktion. Auch auf (normalerweise ortsständigen) Keratinozyten der Cornea übt TNF- α wie schon die Neurotrophine keinen motilitätssteigernden Effekt aus. Hierbei ist anzumerken, dass dies physiologisch auch nicht sinnvoll ist und somit einen erwartbaren Befund darstellt.

5.5 Expression und Funktion von NGF/pro-NGF/TNF- α im Pterygium

Das Vorkommen und die möglichen Auswirkungen von Neurotrophinen auf das Pterygium sind bislang kaum untersucht. Hier bleibt nur die Möglichkeit, nach Analogien in verwandten Krankheitsbildern zu suchen. So lassen sich beispielsweise NGF und seine Rezeptoren in retinalen Myofibroblasten nachweisen (Minchiotti et al., 2008). Diese Myofibroblasten werden für die Bildung hypertropher Narben verantwortlich gemacht. Hier könnten sich Therapieansätze nach Pterygiumchirurgie im Sinne einer Rezidivprophylaxe ergeben. In der vorliegenden Arbeit kann der Nachweis von NGF mittels fluoreszenzimmunhistochemischer Methoden eindeutig geführt werden. Es zeigt sich eine homogen zytoplasmatische Verteilung. Diese Ergebnisse korrelieren positiv mit den Befunden von Ribatti et al., die NGF und seine Rezeptoren immunhistochemisch detektieren konnten (Ribatti et al., 2009). Wie bereits erwähnt, hilft NGF beim Glaukom, den retinalen Ganglienzellverlust zu minimieren

(Lambiase et al., 2009a). Auch beim Pterygium handelt es sich um eine degenerative Erkrankung, sodass auch hier Heilungspotential vermutet werden kann. Interessant ist, dass auch in Amnionmembranen, die zum Teil als freies Transplantat nach Hornhautchirurgie (z.B. Pterygiumexzision mit Defekt) Verwendung finden, NGF und seine Rezeptoren nachweisbar sind (Coassin et al., 2006).

Von pro-NGF weiß man, dass es insbesondere nach Hirnverletzungen apoptotisch wirkt (Harrington et al., 2004). Wenn man die Bindung pro-NGF/p75 mit selektiven Antikörpern löst, lassen sich diese Apoptosen signifikant verhindern. Möglicherweise könnten pro-NGF-AK verhindern, dass Limbusstammzellen oder die Bowmannlamelle durch von bekannten Noxen (siehe 1.5.5) gesetzten Schäden untergehen. Immunhistochemisch kann pro-NGF holoepithelial ohne quantitative Abstufungen detektiert werden. In den schleimbildenden pterygialen Becherzellen zeigen sich pro-NGF-positive Sekretgranula. Auch in Gefrierschnitten besitzt die inhomogen-zytosolische pro-NGF-Expression einen granulaartigen Aspekt. Subepithelial reagieren nur vereinzelte Zellen positiv. Damit stellt sich in Analogie zu den Befunden von TNF- α in der Cornea die Frage, ob die epitheleigene pro-NGF-Synthese nicht wahrscheinlicher ist, als ein Antransport auf hämatogenem Wege. Vergleicht man aber die relative Chromogenstärke von pterygialen Gefäßendothelien und gesundem Limbus-epithelgewebe, zeigt sich kein Konzentrationsunterschied mehr. Die für Pterygien typische vermehrte Vaskularisation könnte also durchaus durch steigende pro-NGF-Konzentrationen erklärbar sein. Kongruente Befunde für VEGF wurden bereits 2005 von der Arbeitsgruppe um Gebhardt erhoben (Gebhardt et al., 2005). Spiegelbildlich argumentiert könnte die vermehrte Angiogenese natürlich auch selbst eine reflektorische Konzentrationserhöhung von pro-NGF im Sinne einer gewollten Apoptose mitbedingen.

Auch TNF- α ist als Entzündungsmediator in allen untersuchten Pterygien (fluoreszenz-) immunhistochemisch detektierbar. Hierbei zeigt sich eine Betonung der Expression im Stratum basale, wohingegen die mukösen Zellen nicht an der TNF- α -Synthese beteiligt zu sein scheinen. An Gefrierschnitten konnte mittels der Triple-Overlay-Technik ein histologisch gleiches Expressionsmuster bezüglich TNF- α und NGF bewiesen werden. Diese enge Verknüpfung korreliert mit den Befunden der Arbeitsgruppe Hong et al. (2008). Hier konnte gezeigt werden, dass in Pterygien die Neurotrophine CTNF und NT-4/5 nach Stimulation mit TNF- α vermehrt detektiert werden konnten (Hong et al., 2008).

Das Pterygium stellt aufgrund seines lokal invasiven Charakters ein semimalignes Gewebe dar. Unklar ist, welche Faktoren dazu führen, dass primär gesunde Zellen der Augenoberfläche ihren angestammten Organverbund verlassen und zu anderen Orten wandern. Daher sind Migrations-/Zellmotilitätsversuche mit HCE- und HCjE-Zellen durchgeführt

worden. Pro-NGF/NGF und TNF- α haben keinen signifikanten Einfluss auf die Zellmotilität. Dies erhärtet (unter Einbeziehung der unter 1.5.5 durch Literaturrecherche herausgearbeiteten Risikofaktoren) die Hypothese, dass Pterygien eher dem degenerativen Krankheitspektrum zuzuordnen sind. Wenn auch das klinisch-makroskopisch sichtbare Gewebsplus einen tumorähnlichen Anschein haben kann, treten doch bei fehlender Metastasierungstendenz echte neoplastische Aspekte in den Hintergrund.

5.6 Möglicher therapeutischer Einsatz in der Ophthalmologie

Große Teile des Auges sind als vorgeschobene Hirnanteile zu verstehen, deswegen liegt die Vermutung nahe, dass einerseits Proliferation an die Anwesenheit von NGF gebunden ist, andererseits auch Fehlwachstum aufgrund einer pro-NGF-/NGF-Dysbalance entstehen könnte. Ein Beispiel von diesem sogenannten Fehlwachstum stellt das Pterygium des Auges dar (siehe auch Kapitel 1.5), dessen einzige Heilung derzeit durch eine Operation möglich ist. Nicht alle Patienten sind operationsfähig. Dies kann einerseits technisch durch Lokal komplikationen oder funktionell-inoperabel aufgrund eines moribunden Habitus bedingt sein. Andererseits kann den Patienten gerade in Entwicklungs- und Schwellenländern häufig keine chirurgische Intervention angeboten werden. Da man ferner die Operation und die damit verbundenen Risiken gerne umgehen möchte, wäre eine lokale, nicht-invasive Therapiemöglichkeit verständlicherweise eine interessante Alternative. Diese könnte in Form einer Augensalbe, Tropfen oder eines Gels bestehen. Enthalten sollte ein Stoff sein, der die Proliferation des pterygialen Gewebes deutlich hemmt, bestenfalls sogar zu einer Regression führt, ohne dabei das natürlich vorkommende Gewebe zu schädigen. Der Nachweis von pro-NGF und NGF wird in der vorliegenden Arbeit sowohl an normalem Gewebe, als auch im Pterygium erbracht. Die *in vitro* Zellkulturexperimente an Konjunktiva- und Corneaepithelzelllinien zeigen, dass die Wirkung beider Proteine eine signifikante Proliferationsinhibition bewirkt. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch lokal (*in vivo*) an pterygialem Gewebe appliziert, eine proliferationshemmende Wirkung möglich wäre. Hieraus könnte sich letztendlich eine klinisch nutzbare supportive Therapieoption ergeben.

TNF- α ist ebenfalls an der Augenoberfläche nachweisbar, insbesondere in Pterygien. Dies war bei der häufig gleichzeitig ablaufenden Begleitentzündung zu erwarten. Auf Cornea- und Konjunktivaepithelzellen des Auges wirkt TNF- α proliferationssteigernd. Es ist daher anzunehmen, dass TNF- α auch für die Massenzunahme von Pterygien eine Rolle spielt. Interessant wäre es herauszufinden, ob TNF- α -Blocker oder klassische Glukokortikoide, beide topisch appliziert, die Entzündungsreaktion und damit auch die Progredienz (insbesondere das Gewebeplus) von Pterygien minimieren können.

6 Zusammenfassung

Neurotrophine sind eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, die für die Entwicklung, Reifung und Differenzierung neural-cerebraler Strukturen essentiell sind. Heutzutage wird gemutmaßt, dass pro-NGF im Gehirn die biologisch aktive Leitsubstanz ist, man kann daher annehmen, dass es auch im Bereich der Augen als „vorgeschobene Hirnanteile“ wichtige Funktionen erfüllt. Vermittelt werden diese Prozesse einerseits über den p75-Rezeptor und über den TrkA-Rezeptor, einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor. Der weitere zelluläre Signaltransduktionsweg ist endozytosevermittelt, es kommt zur Proteinphosphorylierung und letzten Endes zur Gentranskription im Zellkern.

Der Tumornekrosefaktor α ist ein multifunktionales Zytokin, das Entzündungsvorgänge lokal und systemisch mediert. Zu seinen Hauptfunktionen gehören die Aktivitätsregulation verschiedener Abwehrzellen, Apoptoseprozesse einzuleiten und Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Ausschüttung weiterer Zytokine anzuregen. Es kann Fieber und Kachexie, bspw. im Rahmen neoplastischer Grunderkrankungen, auslösen und hat Effekte auf den Fettstoffwechsel, die Blutgerinnung, die Insulinresistenz und die endotheliale Funktion.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das morphologische Vorkommen und die funktionelle Bedeutung von NGF, pro-NGF und TNF- α an Zellen und Geweben der Augenoberfläche zu untersuchen. Als Zellmodelle dienen hierfür humane Cornea- und Konjunktivaepithelzelllinien. Als Gewebepräparate werden Ausschnitte, die den corneokonjunktivalen Übergangsbereich (Limbus) beinhalten sowie multiple Pterygiumpräparate gewählt. Aus klinischer Sicht wird der Frage nachgegangen, ob die Faktoren NGF, pro-NGF und TNF- α eine wesentliche Rolle im Entstehungsprozess des Pterygiums spielen. Weiterhin soll geklärt werden, ob es möglicherweise von Vorteil ist, oben genannte Faktoren topisch zu applizieren respektive spezifisch zu hemmen, entweder um Risikopatienten ein Prophylaktikum anzubieten oder um eine Wachstumsprogredienz bestehender Pterygien zu limitieren bis gar zum Stillstand bringen zu können.

Das Pterygium selbst ist eine semimaligne, durch multiple Risikofaktoren, insbesondere rezidivierende Mikrotraumatisierungen durch Stäube und durch chronisch ultraviolette Strahlung ausgelöste, meist von nasal vorwachsende dreieckige Geschwulst. Wahrscheinlich spielen virale Infektionen und die Destruktion der Bowmannlamelle eine entscheidende

pathogenetische Rolle. Durch immunhistochemische Experimente am Paraffinschnitt und durch fluoreszenzimmunhistochemische Untersuchungen an frisch-gefrorenen Flügelfellen lässt sich das Vorkommen von NGF und seiner Vorstufe pro-NGF eindeutig nachweisen. Auch TNF- α kann man mit beiden Methoden im Gewebe lokalisieren, was bei der klinisch als rotes Auge imponierenden charakteristischen Begleitentzündungsreaktion zu vermuten war.

Sowohl pro-NGF, als auch das reife Molekül NGF scheinen *in vitro* einen deutlichen und signifikanten Inhibitionseffekt auf proliferierende humane Horn- und Bindehautzellen zu haben. Dieser Effekt verstärkt sich umso mehr, je höher die applizierte Dosis ist. Ob diese Effekte nun apoptotisch-caspasenvermittelter oder nekrotisch-toxischer Natur sind, ist bislang unklar. Der TNF- α hingegen führt zu einer deutlichen Steigerung der Proliferationsrate, wenn er in physiologischen Konzentrationen zugesetzt wird. Hierdurch könnte beispielsweise auch erklärt werden, warum entzündete Pterygien verstärkt vorwachsen. Es kommt also infolge von Massenzunahme zu einem Circulus vitiosus aus Geschwulstzunahme \rightarrow Reizzunahme \rightarrow steigender Entzündungsneigung \rightarrow Entzündungsunterhaltung \rightarrow Proliferationsreiz \rightarrow Geschwulstzunahme.

Migrationsversuche an humanen Cornea- und Konjunktivaepithelzellen zeigen, dass die Zellmotilität, die vom Ausprägungsgrad her ein wichtiges Kriterium maligner Zellen darstellt, sowohl in Anwesenheit von pro-NGF und NGF, als auch nach Applikation steigender Dosen von TNF- α nicht signifikant beeinflusst wird. Auch wenn keine pterygialen Zelllinien verwendet wurden gibt dies doch einen wichtigen Hinweis, dass die Genese des Flügelfells eher eine degenerativ-entzündliche ist, als eine im engeren Sinne neoplastische.

Es wird deutlich, dass die Pathogenese des Pterygiums ein komplexer Prozess ist: Ein Zusammenspiel von genetischer Prädisposition, aquirierten Risikofaktoren und einer Dysbalance zwischen diversen Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Bisher kann nicht postuliert werden, dass es den einen Faktor gibt, der spezifisch gehemmt oder gefördert werden sollte, um ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern, sodass operative Verfahrenstechniken in allen ihren Facetten immer noch den Goldstandard in der Therapie des Pterygiums bilden.

7 Literaturverzeichnis

- Ali TK, Al-Gayyar MM, Matragoon S, Pillai BA, Abdelsaid MA, Nussbaum JJ, El-Remessy AB (2010) Diabetes-induced peroxynitrite impairs the balance of pro-nerve growth factor and nerve growth factor, and causes neurovascular injury. *Diabetologia*. 19:12-20.
- Aloe L, Levi-Montalcini R (1977) Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. *Brain Res*. 133:358-366.
- Aloe L, Levi-Montalcini R (1979) Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells in vivo into sympathetic neurons: effects of antiserum to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1246-1250.
- Aloe L, Cozzari C, Levi-Montalcini R (1981) The submaxillary salivary glands of the African rodent *Praomys (mastomys) natalensis* as the richest available source of the nerve growth factor. *Exp. Cell. Res*. 133:475-480.
- Aloe L, Alleva E, Böhm A, Levi-Montalcini R (1986) Aggressive behaviour induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6184-6187.
- Aloe L (1988) The effect of nerve growth factor and its antibody on mast cells in vivo. *J. Neuroimmunol*. 18:1-12.
- Aloe L: (1989) Adrenalectomy decreases nerve growth factor in young adult rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5636-5640.
- Aloe L, Tuveri MA, Carcassi U, Levi-Montalcini R (1992a) Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. *Arthritis. Rheum*. 35:351-355.
- Aloe L, Tuveri MA, Levi-Montalcini R (1992b) Studies on the carrageenan-induced arthritis in adult rats: presence of nerve growth factor and role of sympathetic innervation. *Rheumatol Int* 12:213-216.
- Aloe L, Tuveri MA, Levi-Montalcini R (1992c) Nerve growth factor and distribution of mast cells in the synovium of adult rats. *Clin. Exp. Rheumatol*. 10:203-204.
- Aloe L, Probert L, Kollias G, Bracci-Laudiero L, Spillantini MG, Levi-Montalcini R (1993) The synovium of transgenic arthritic mice expressing human tumor necrosis factor contains a high level of nerve growth factor. *Growth Factors* 9:149-155.

- Aloe L, Skaper SD, Leon A, Levi-Montalcini R (1994a) Nerve growth factor and autoimmune diseases. *Autoimmunity* 19:141-150.
- Aloe L, Bracci-Laudiero L, Alleva E, Lambiase A, Micera A, Tirassa P (1994b) Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10440-10444.
- Aloe L, Probert L, Kollias G, Micera A, Tirassa P (1995) Effect of NGF antibodies on mast cell distribution, histamine and substance P levels in the knee joint of TNF-arthritis transgenic mice. *Rheumatol Int* 14:249-252.
- Aloe L, Tuveri M, Guerra G, Pinna L, Tirassa P, Micera A, Alleva E (1996) Changes in human plasma nerve growth factor level after chronic alcohol consumption and withdrawal. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 20:462-465.
- Aloe L, Tuveri MA (1997) Nerve growth factor and autoimmune rheumatic disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* 15:433-438.
- Aloe L, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Manni L (1997) The expanding role of nerve growth factor: from the neurotrophic activity to immunological diseases. *Allergy* 52:883-904.
- Aloe L, Manni L, Sebastiani G, Tuveri MA (1999) Nerve growth factor in the synovia of patients with rheumatoid arthritis: Correlation with TNF- α and IL-1 β and possible functional significance. *Clin. Exp. Rheumatol.* 17:632-633.
- Aloe L (2004) Nerve growth factor, human skin ulcers and vascularization. Our experience. *Prog. Brain Res.* 146:515-522.
- Aloe L, Properzi F, Probert L, Akassoglou K, Kassiotis G, Micera A, Fiore M (1999) Learning abilities, NGF and BDNF brain levels in two lines of TNF-alpha transgenic mice, one characterized by neurological disorders, the other phenotypically normal. *Brain Res.* 840:125-37.
- Aloe L, Tirassa P, Lambiase A (2008) The topical application of nerve growth factor as a pharmacological tool for human corneal and skin ulcers. *Pharmacol Res.* 57:253-8.

- Alpay A, Uğurbaşı SH, Erdoğan B (2009) Comparing techniques for pterygium surgery. *Clin Ophthalmol.* 3:69-74.
- Al-Shawi R, Hafner A, Chun S, Raza S, Crutcher K, Thrasivoulou C, Simons P, Cowen T (2007) ProNGF, sortilin, and age-related neurodegeneration. *Ann NY Acad Sci.* 11:208-15.
- Al-Shawi R, Hafner A, Olsen J, Chun S, Raza S, Thrasivoulou C, Lovestone S, Killick R, Simons P, Cowen T (2008) Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system. *Eur J Neurosci.* 8:2103-14.
- Angeletti RH (1968) Studies on the nerve growth factor (NGF) from snake venom molecular terogeneity. *J.Chromatogr.* 37:62-69.
- Avisar R, Apel I, Avisar I, Weinberger D (2009) Endothelial cell loss during pterygium surgery: importance of timing of mitomycin C application. *Cornea.* 8:779-781.
- Aydin A, Karadayi K, Aykan U, Can G, Colakoglu K, Bilge AH (2008) Effectiveness of topical ciclosporin A treatment after excision of primary pterygium and limbal conjunctival autograft. *J Fr Ophtalmol.* 7:699-704.
- Bailey GS, Banks BE, Pearce FL and Shipolini RA (1975) A comparative study of nerve growth factors from snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. B* 51:429-438.
- Barbacid M (1993) Nerve growth factor a tale of two receptors. *Oncogene* 8:2033-2042.
- Bernd P, Greene LA (1984) Association of ¹²⁵I-NGF with PC12 pheochromocytoma cells. Evidence for internalization via high-affinity receptors only and for long-term regulation by nerve growth factor of both high- and low-affinity receptors. *J. Biol. Chem.* 259:15509-15516.
- Benzel, I (2001) Signaltransduktion des Neurotrophinrezeptors p75 durch die Zinkfingerproteine NRIF1 und NRIF2. 1:1-2.
- Bläsing H, Hendrix S, Paus R (2005) Pro-inflammatory cytokines upregulate the skin immunoreactivity for NGF, NT-3, NT-4 and their receptor, p75NTR in vivo: a preliminary report. *Arch Dermatol Res.* 296:580-4.
- Bonini S, Lambiase A, Lapucci G, Properzi F, Bresciani M, Bracci Laudiero ML, Mancini MJ, Procoli A, Micera A, Sacerdoti G, Bonini S, Levi-Schaffer F, Rasi G, Aloe L (2002) Nerve growth factor and asthma. *Allergy.* 57:13-5.

- Bonini S, Lambiase A, Rama P, Caprioglio G, Aloe L (2000) Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. *Ophthalmology*. 107:1347-51.
- Bradley JC, Yang W, Bradley RH, Reid TW, Schwab IR (2009) The Science of Pterygium. *Br J Ophthalmol*. 5:855-857.
- Bueker ED (1948) Implantation of tumors in the hind limb field of the embryonic chick and the developmental response of the lumbo-sacral nervous system. *Anat. Rec*. 102:368-390.
- Casaccia-Bonnet P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV (1996) Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 383:716-719.
- Chakrabarti S, Sima AA, Lee J, Brachet P, Dicou E (1990) Nerve growth factor (NGF), proNGF and receptorlike immunoreactivity in BB rat retina. *Brain Res*. 523:11-15.
- Chapman CA, Banks BE, Vernon CA and Walker JM (1981) The isolation and characterization of nerve growth factor from the prostate gland of the guinea-pig. *Eur. J. Biochem*. 115:347-351.
- Chen YT, Tseng SH, Tsai YY, Huang FC, Tseng SY (2009) Distribution of vimentin-expressing cells in pterygium: an immunocytochemical study of impression cytology specimens. *Cornea*. 5:547-52.
- Coassin M, Lambiase A, Costa N, De Gregorio A, Sgrulletta R, Sacchetti M, Aloe L, Bonini S (2005) Efficacy of topical nerve growth factor treatment in dogs affected by dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 243:151-5.
- Coassin M, Lambiase A, Sposato V, Micera A, Bonini S, Aloe L (2008) Retinal p75 and bax overexpression is associated with retinal ganglion cells apoptosis in a rat model of glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 12:1743-9.
- Coassin M, Lambiase A, Micera A, Tirassa P, Aloe L, Bonini S (2006) Nerve growth factor modulates in vitro the expression and release of TGF-beta1 by amniotic membrane. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 244:485-91.
- Cohen P, Sutter A, Landreth G, Zimmermann A, Shooter EM (1980) Oxidation of tryptophan-21 alters the biological activity and receptor binding characteristics of mouse nerve growth factor. *J. Biol. Chem*. 255:2949-2954.

- Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V (1954) A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 118. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 40:1014-1018.
- Cohen S, Levi-Montalcini R (1956) A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 42:571-574.
- Cohen S (1959) Purification and metabolic effects of a nerve growth promoting protein from snake venom. *J. Biol. Chem.* 234:1129-1137.
- Cohen S (1960) Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 46:302-311.
- Colafrancesco V, Parisi V, Sposato V, Rossi S, Russo MA, Coassin M, Lambiase A, Aloe L (2010) Ocular Application of Nerve Growth Factor Protects Degenerating Retinal Ganglion Cells in a Rat Model of Glaucoma. *J Glaucoma.* 29:834-37.
- Crăițoiu S, Ciprian L, Rodica M, Mihai A, Anca EI (2008) Etiopathogenic aspects in development and evolution of pterygium. *Oftalmologia.* 2:29-34.
- Darling TLJ, Petrides PE, Beguin P, Frey P, Shooter EM, Selby M, Rutter WJ (1983) The biosynthesis and processing of proteins in the mouse 7S nerve growth factor complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (Part 1)* 48:427-434.
- Darling TLJ, Fahnestock M (1988) The high molecular weight nerve growth factor complex from *Mastomys natalensis* differs from the murine nerve growth factor complex. *Biochemistry* 27:6686-6692.
- Delsite R, Djakiew D (1999) Characterization of nerve growth factor precursor protein expression by human prostate stromal cells: a role in selective neurotrophin stimulation of prostate epithelial cell growth. *Prostate* 41:39-48.
- Demirok A, Cinal A, Yener HI, Yasar T, Kiliç A (2008) The risk factors of pterygium development: a hospital-based study. *Ann Ophthalmol (Skokie)* 40:103-106.
- Díaz-González JA, Mayoral-Chávez MA, Bohórquez PL, de la Torre Mdel P, Hernández-Cruz P, Martínez-Cruz R, Pérez-Campos E (2007) Role of concanavalin A lectin in recognition of pterygium remnant after surgical excision: preliminary results of a prospective study. *Indian J Ophthalmol.* 55:349-53.
- Dicou E, Lee J, Brachet P (1986) Synthesis of nerve growth factor mRNA and precursor protein in the thyroid and parathyroid glands of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7084-7088.

- Dicou E (1989) Interaction of antibodies to synthetic peptides of proNGF with in vitro synthesized NGF precursors. *FEBS Lett.* 255:215-218.
- Dicou E, Nerrière V, Labropoulou V (1991) Naturally occurring antibodies against nerve growth factor in human and rabbit sera: comparison between control and herpes simplex virus-infected patients. *J. Neuroimmunol.* 34:153-158.
- Dicou E (1992) Nerve growth factor precursors in the rat thyroid and hippocampus. *Mol. Brain Res.* 14:136-138.
- Dicou E, Hurez D, Nerrière V (1993a) Natural autoantibodies against nerve growth factor in autoimmune diseases. *J. Neuroimmunol.* 47:159-167.
- Dicou E, Masson C, Jabbour W, Nerrière V (1993b) Increased frequency of NGF in sera of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Neuroreport* 5:321-324.
- Dicou E, Perrot S, Menkes CJ, Masson C, Nerrière V (1996) Nerve growth factor (NGF) autoantibodies and NGF in the synovial fluid: Implications in spondylarthropathies. *Autoimmunity* 24:1-9.
- Di Girolamo N, Coroneo M, Wakefield D (2005) Epidermal growth factor receptor signaling is partially responsible for the increased matrix metalloproteinase-1 expression in ocular epithelial cells after UVB radiation. *Am J Pathol.* 167:489-503.
- Di Girolamo N, Sarris M, Chui J, Cheema H, Coroneo MT, Wakefield D (2008) Localization of the low-affinity nerve growth factor receptor p75 in human limbal epithelial cells. *J Cell Mol Med.* 12:2799-2811.
- DiStefano PS, Johnson EM (1988) Identification of a truncated form of nerve growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:270-274.
- DiStefano PS, Friedman B, Radziejewski C, Alexander C, Boland P, Schik CM, Lindsay RM, Wiegand SJ (1992) The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron* 8:983-993.
- Edwards RH, Selby MJ, Garcia PD, Rutter WJ (1988a) Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 263:6810-6815.

- Edwards RH, Selby MJ, Mobley WC, Weinrich SL, Hurby DE, Rutter WJ (1988b) Processing and secretion of nerve growth factor: expression in mammalian cells with a vaccinia virus vector. *Mol. Cell. Biol.* 8:2456-2464.
- Ehlers MD, Kaplan DR, Price DL, Koliatsos VE (1995) NGF-stimulated retrograde transport of trkA in the mammalian nervous system. *J. Cell. Biol.* 130:149-156.
- Evans BA, Richards RI (1985) Genes for the α and γ subunits of mouse nerve growth factor are contiguous. *EMBO J* 4:133-138.
- Fahnestock M, Bell RA (1988) Molecular cloning of a cDNA encoding the nerve growth factor precursor from *Mastomys natalensis*. *Gene* 69:257-264.
- Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD (2001) The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 18:210-220.
- Fahnestock M, Yu G, Michalski B, Colquhoun A, Ross GM, Coughlin MD (2004) The nerve growth factor precursor proNGF exhibits activity but is less active than mature nerve growth factor. *J. Neurochem.* 89:581-592.
- Frade JM, Rodríguez-Tébar A, Barde YA (1996) Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383:166-168.
- Frazier WA, Boyd LF, Bradshaw RA (1973a) Interaction of nerve growth factor with surface membranes: biological competence of insolubilized nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 70:2931-2935.
- Frazier WA, Hogue-Angeletti RA, Sherman R, Bradshaw RA (1973b) Topography of mouse 2.5S nerve growth factor. Reactivity of tyrosine and tryptophan. *Biochemistry* 12:3281-3293.
- Fuchsluger TA. (2007) "Hornhautbank: Erkrankungen" in <http://www.uniklinik-essen.de/augenlinik/hornhaut3.html>, aufgerufen am 03.01.2009.
- Garaci E, Caroleo MC, Aloe L, Aquaro S, Piacentini M, Costa N, Amendola A, Micera A, Calìò R, Perno CF, Levi-Montalcini R (1999) Nerve growth factor is an autocrine factor essential for the survival of macrophages infected with HIV. *Proc Natl Acad Sci USA.* 24:14013-8.

- Gebhardt M, Mentlein R, Schaudig U, Pufe T, Recker K, Nölle B, Al-Samir K, Geerling G, Paulsen FP (2005) Differential expression of vascular endothelial growth factor implies the limbal origin of pterygia. *Ophthalmology* 6:1023-30.
- Ghinelli E, Aloe L, Cortes M, Micera A, Lambiase A, Bonini S (2003) Nerve growth factor (NGF) and lenses: effects of NGF in an in vitro rat model of cataract. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 241:845-51.
- Ghinelli E, Johansson J, Ríos JD, Chen LL, Zoukhri D, Hodges RR, Dartt DA (2003) Presence and localization of neurotrophins and neurotrophin receptors in rat lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:3352-7.
- Giehl KM, Röhrig S, Bonatz H, Gutjahr M, Leiner B, Bartke I, Yan Q, Reichardt LF, Backus C, Welcher AA, Dethleffsen K, Mestres P, Meyer M (2001) Endogenous brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 antagonistically regulate survival of axotomized corticospinal neurons in vivo. *J. Neurosci.* 21:3492-3502.
- Gordon JR, Galli SJ (1990) Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature* 346:274-276.
- Green LA (1977) A quantitative bioassay for nerve growth factor (NGF) activity employing a colonal pheochromocytoma cell line. *Brain Res.* 133:350-353.
- Green PG, Luo J, Heller PH, Levine JD (1993) Further substantiation of a significant role for the sympathetic nervous system in inflammation. *Neurosci* 55:1037-1043.
- Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall DE, Valletta JS, Topp KS, LaVail JH, Bunnett NW, Mobley WC (1996) Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J. Neurosci.* 16:7950-7964.
- Hall RC, Logan AJ, Wells AP (2009) Comparison of fibrin glue with sutures for pterygium excision surgery with conjunctival autografts. *Clin Experiment Ophthalmol.* 37:584-589.
- Harper GP, Glanville RW and Thoenen H (1982) The purification of nerve growth factor from bovine seminal plasma. Biochemical characterization and partial amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 257:8541-8548.
- Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo JC, Lee R, Mörl K, Meyer M, Hempstead BL, Yoon SO, Giehl KM (2004) Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:6226-30.

- Hartung HP, Toyka KV (1983) Activation of macrophages by substance P: induction of oxidative burst and thromboxane release. *Eur. J. Pharmacol.* 89:301-305.
- Hartung HP, Schäfer B, Heininger K, Toyka KV (1989) Recombinant interleukin-1 β stimulates eicosanoid production in rat primary culture astrocytes. *Brain Res.* 489:113-119.
- Hartung HP, Jung S, Stoll G, Zielasek J, Schmidt B, Archelos JJ, Toyka KV (1992) Inflammatory mediators in demyelinating disorders of the CNS and PNS. *J. Neuroimmunol.* 40:197-210.
- Helgans T, Pfeffer K (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115:1–20.
- Hempstead BL, Schleifer LS, Chao MV (1989) Expression of functional nerve growth factor receptors after gene transfer. *Science* 243:373-376.
- Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low affinity NGF receptor. *Nature* 350:678-683.
- Hendry IA, Stöckel K, Thoenen H, Iversen LL (1974a) The retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain. Res.* 68:103-121.
- Hendry IA, Stach R, Herrup K (1974b) Characteristics of the retrograde axonal transport system of nerve growth factor in the sympathetic nervous system. *Brain. Res.* 82:117-128.
- Higgins GA, Koh S, Chen KS, Gaga FH (1989) NGF induction of NGF receptor gene expression and cholinergic neuronal hypertrophy within the basal forebrain of the adult rat. *Neuron* 3:247-256.
- Hofman H-D, Unsicker K (1982) The seminal vesicle of the bull: a new and very rich source of nerve growth factor. *Eur. J. Biochem.* 128:421-426.
- Hogue-Angeletti RA, Frazier WA, Jacobs JW, Niall HD and Bradshaw RA (1976) Purification, characterization and partial amino acid sequence of nerve growth factor from cobra venom. *Biochem.* 15:26-34.
- Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L: *Immunologie – Grundlagen für Klinik und Praxis.* 1.Aufl. Urban & Fischer, München, Jena, 2005, S.147-148.

- Hong S, Choi JY, Lee HK, Seong GJ, Seo KY, Kim EK, Byeon SH (2008) Expression of neurotrophic factors in human primary pterygeal tissue and selective TNF- α -induced stimulation of ciliary neurotrophic factor in pterygeal fibroblasts. *Exp Toxicol Pathol.* 60:513-520.
- Isackson PJ, Bradshaw RA (1984) The α -subunit of mouse 7S nerve growth factor is an inactive serine protease. *J. Biol. Chem.* 259:5380-5383.
- Isackson PJ, Nisco SJ, Bradshaw RA (1987) Expression of the α -subunit of 7S nerve growth factor in the mouse submandibular gland. *Neurochem. Res.* 12:959-966.
- Isackson PJ, Ullrich A, Bradshaw RA (1984) Mouse 7S nerve growth factor: complete sequence of a cDNA coding for the α -subunit precursor and its relationship to serine proteases. *Biochem.* 23:5997-6002.
- John-Aryankalayil M, Dushku N, Jaworski CJ, Cox CA, Schultz G, Smith JA, Ramsey KE, Stephan DA, Freedman KA, Reid TW, Carper DA (2006) Microarray and protein analysis of human pterygium. *Mol Vis.* 12:55-64.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Sinnesorgane, in Gratzl M (Hrsg), *Histologie*, 5. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2000, S.428-440.
- Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF (1991a) The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252:554-558.
- Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF (1991b) Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 350:158-160.
- Karalezli A, Kucukerdonmez C, Akova YA, Altan-Yaycioglu R, Borazan M (2008) Fibrin glue versus sutures for conjunctival autografting in pterygium surgery: a prospective comparative study. *Br J Ophthalmol.* 92:1206-1210.
- Karrer S (2003) Graft-versus-Host-Disease der Haut. *Hautarzt.* 54:465–482.
- Khalifaoui T, Mkannez G, Colin D, Imen A, Zbiba W, Errais K, Anane R, Beltaief O, Zhioua R, Ben Hamida J, Lizard G, Ouertani-Meddeb A (2011) Immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) and p53 expression in pterygium from Tunisian patients. *Pathol Biol (Paris).* 59:137-41.

- Kim EC, Lee WS, Kim MS (2010) The inhibitory effects of bevacizumab eye drops on NGF expression and corneal wound healing in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:4569-73.
- Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M (1991a) The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell.* 65:189-197.
- Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M (1991b) The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell.* 66 395-403.
- Klein R, Lamballe F, Bryant S, Barbacid M (1992) The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* 8:947-956.
- Korsching S, Thoenen H (1983) Quantitative demonstration of retrograde axonal transport of endogenous nerve growth factor. *Neurosci. Lett.* 39:1-4.
- Korsching S (1986) The role of NGF in the CNS. *Trends. Neurosci* 9:570-573.
- Korsching S, Thoenen H (1987) Two-site enzyme immunoassay for nerve growth factor. *Methods Enzymol.* 47:167-185.
- Korsching S (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J. Neurosci.* 13:2739-2748.
- Kühnel W: Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. 11. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2002, S.458-470.
- Lambiase A, Centofanti M, Micera A, Manni GL, Mattei E, De Gregorio A, de Feo G, Bucci MG, Aloe L: (1997a) Nerve growth factor (NGF) reduces and NGF antibody exacerbates retinal damage induced in rabbit by experimental ocular hypertension. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 235:780-5.
- Lambiase A, Bonini S, Micera A, Tirassa P, Magrini L, Bonini S, Aloe L (1997b) Increased plasma levels of substance P in vernal keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38:2161-4.
- Lambiase A, Bonini S, Micera A, Rama P, Bonini S, Aloe L (1998) Expression of nerve growth factor receptors on the ocular surface in healthy subjects and during manifestation of inflammatory diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39:1272-5.

- Lambiase A, Manni L, Bonini S, Rama P, Micera A, Aloe L (2000) Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:1063-9.
- Lambiase A, Bonini S, Manni L, Ghinelli E, Tirassa P, Rama P, Aloe L (2002) Intraocular production and release of nerve growth factor after iridectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:2334-40.
- Lambiase A, Merlo D, Mollinari C, Bonini P, Rinaldi AM, D' Amato M, Micera A, Coassin M, Rama P, Bonini S, Garaci E (2005a) Molecular basis for keratoconus: lack of TrkA expression and its transcriptional repression by Sp3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:16795-800.
- Lambiase A, Tirassa P, Micera A, Aloe L, Bonini S (2005b) Pharmacokinetics of conjunctivally applied nerve growth factor in the retina and optic nerve of adult rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:3800-3806.
- Lambiase A, Pagani L, Di Fausto V, Sposato V, Coassin M, Bonini S, Aloe L (2007a) Nerve growth factor eye drop administered on the ocular surface of rodents affects the nucleus basalis and septum: biochemical and structural evidence. *Brain Res.* 1127:45-51.
- Lambiase A, Coassin M, Sposato V, Micera A, Sacchetti M, Bonini S, Aloe L (2007b) NGF topical application in patients with corneal ulcer does not generate circulating NGF antibodies. *Pharmacol Res.* 56:65-69.
- Lambiase A, Coassin M, Costa N, Lauretti P, Micera A, Ghinelli E, Aloe L, Rama P, Bonini S (2008) Topical treatment with nerve growth factor in an animal model of herpetic keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 246:121-127.
- Lambiase A, Aloe L, Centofanti M, Parisi V, Mantelli F, Colafrancesco V, Manni GL, Bucci MG, Bonini S, Levi-Montalcini R (2009a) Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: Implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* Epub ahead of print.
- Lambiase A, Micera A, Pellegrini G, Merlo D, Rama P, De Luca M, Bonini S, Bonini S (2009b) In vitro evidence of nerve growth factor effects on human conjunctival epithelial cell differentiation and mucin gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50:4622-4630.

- Lambiase A, Coassin M, Tirassa P, Mantelli F, Aloe L (2009c) Nerve growth factor eye drops improve visual acuity and electrofunctional activity in age-related macular degeneration: a case report. *Ann Ist Super Sanita.* 45:439-42.
- Lambiase A, Mantelli F, Bonini S (2010) Nerve growth factor eye drops to treat glaucoma. *Drug News Perspect.* 23:361-7.
- Lang GK: *Augenheilkunde* 3. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2004, S.1-89.
- Lawan A (2009) Causes of red eye in Aminu Kano Teaching Hospital, Kano-Nigeria. *Niger J Med.* 18:184-5.
- Lee HK, Ryu IH, Seo KY, Hong S, Kim HC, Kim EK (2006) Topical 0.1% prednisolone lowers nerve growth factor expression in keratoconjunctivitis sicca patients. *Ophthalmology.* 113:198-205.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 294:1945-8.
- Leippi S, Grehn F, Geerling G (2009) Antiangiogenic therapy for pterygium recurrence. *Ophthalmologe.* 106:413-419.
- Lenzi L, Coassin M, Lambiase A, Bonini S, Amendola T, Aloe L (2005) Effect of exogenous administration of nerve growth factor in the retina of rats with inherited retinitis pigmentosa. *Vision Res.* 45:1491-500.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951) Selective growth-stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 116:321-361.
- Levi-Montalcini R (1952) Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55:330-343.
- Levi-Montalcini R, Angeletti PU (1968) The nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 48:534-569.
- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237.1154-1162.
- Levi-Schaffer F, Micera A, Zamir E, Mechoulam H, Puxeddu I, Piliponsky AM, Aloe L, Pe'er J (2002) Nerve growth factor and eosinophils in inflamed juvenile conjunctival nevus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:1850-6.

- Lieberman AP, Pitha PM, Shin HS, Shin ML (1989) Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolisaccharide or a neurotropic virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6348-6352.
- Lippert H: Lehrbuch Anatomie. 5. Aufl. Urban & Fischer, München, Jena, 2000 S.524-548.
- Loeb DM, Maragos J, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF, Greene LA (1991) The trk proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF–nonresponsive PC12 cell lines. Cell 66:961-966.
- Loeb DM, Greene LA (1993) Transfection with trk restores “slow” NGF binding, efficient NGF uptake, and multiple NGF responses to NGF-nonresponsive PC12 cell mutants. J. Neurosci 13:2919-2929.
- Majdan M, Lachance C, Gloster A, Aloyz R, Zeindler C, Bamji S, Bhakar A, Belliveau D, Fawcett J, Miller FD, Barker PA (1997) Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. J. Neurosci. 17:6988-6998.
- Mallett S, Barclay AN (1991) A new superfamily of cell surface proteins related to the nerve growth factor receptor. Immunol. Today 12:220-223.
- Mathur ML, Haldiya KR, Sachdev R, Saiyed HN (2005) The risk of pterygium in salt workers. Int Ophthalmol. 26:43-47.
- Mauro J, Foster CS (2009) Pterygia: pathogenesis and the role of subconjunctival bevacizumab in treatment. Semin Ophthalmol. 24:130-134.
- Meakin SO, Shooter EM (1992) The nerve growth factor family of receptors. Trends Neurosci. 15:323-331.
- Micera A, Stampachiacchiere B, Normando EM, Lambiase A, Bonini S, Bonini S (2009) Nerve growth factor modulates toll-like receptor (TLR) 4 and 9 expression in cultured primary VKC conjunctival epithelial cells. Mol Vis. 15:2037-44.
- Micera A, Lambiase A, Stampachiacchiere B, Sgrulletta R, Normando EM, Bonini S, Bonini S (2007) Nerve growth factor has a modulatory role on human primary fibroblast cultures derived from vernal keratoconjunctivitis-affected conjunctiva. Mol Vis. 13:981-7.
- Micera A, Lambiase A, Rama P, Aloe L (1999) Altered nerve growth factor level in the optic nerve of patients affected by multiple sclerosis. Mult Scler. 6:389-94.

- Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, Bonini S, Maquart FX, Aloe L, Levi-Schaffer F (2001) Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:6162-7.
- Micera A, Puxeddu I, Lambiase A, Antonelli A, Bonini S, Aloe L, Pe'er J, Levi-Schaffer F (2005) The pro-fibrogenic effect of nerve growth factor on conjunctival fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta. *Clin Exp Allergy.* 35:650-6.
- Micera A, Lambiase A, Puxeddu I, Aloe L, Stampachiacchiere B, Levi-Schaffer F, Bonini S, Bonini S (2006) Nerve growth factor effect on human primary fibroblastic-keratocytes: possible mechanism during corneal healing. *Exp Eye Res.* 83:747-57.
- Miller FD, Mathew TC, Toma JG (1991) Regulation of nerve growth factor receptor gene expression by nerve growth factor in the developing peripheral nervous system. *J. Cell. Biol.* 112:303-312.
- Minchiotti S, Stampachiacchiere B, Micera A, Lambiase A, Ripandelli G, Billi B, Bonini S (2008) Human idiopathic epiretinal membranes express NGF and NGF receptors. *Retina.* 4:628-37.
- Moukoury Nyolo E, Epee E, Nsangou J F I, Noa Noa Tina B (2009) Pterygium in a tropical region. Analysis of 344 cases in Cameroon. *Bull Soc Belge Ophtalmol.* 311:11-15.
- Muzi S, Colafrancesco V, Sornelli F, Mantelli F, Lambiase A, Aloe L (2010) Nerve growth factor in the developing and adult lacrimal glands of rat with and without inherited retinitis pigmentosa. *Cornea.* 29:1163-8.
- Nguyen DH, Beuerman RW, Thompson HW, DiLoreto DA (1997) Growth factor and neurotrophic factor mRNA in human lacrimal gland. *Cornea.* 2:192-9.
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature.* 427:843-8.
- Oderfeld-Nowak B, Zaremba M, Micera A, Aloe L (2001) The upregulation of nerve growth factor receptors in reactive astrocytes of rat spinal cord during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Lett.* 308:165-8.

- Ozkurt YB, Kocams O, Comez A, Uslu B, Dogan OK (2009) Treatment of Primary Pterygium. *Optom Vis Sci.* 86:1178-81.
- Park KS, Kim SS, Kim JC, Kim HC, Im YS, Ahn CW, Lee HK (2008) Serum and tear levels of nerve growth factor in diabetic retinopathy patients. *Am J Ophthalmol.* 145:432-7.
- Pérez-Rico C, Benítez-Herreros J, Montes-Mollón MA, Germain F, Castro-Rebollo M, Gómez-Sangil Y, Paz-Moreno J, Teus MA (2009) Intraoperative Mitomycin C and Corneal Endothelium After Pterygium Surgery. *Cornea.* 28:1135-8.
- Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH, Roigaard H, Gliemann J, Madsen P, Moestrup SK (1997) Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem.* 272:3599-605.
- Podlesniy P, Kichev A, Pedraza C, Saurat J, Encinas M, Perez B, Ferrer I, Espinet C (2006) Pro-NGF from Alzheimer's disease and normal human brain displays distinctive abilities to induce processing and nuclear translocation of intracellular domain of p75NTR and apoptosis. *Am J Pathol.* 169:119-31.
- Qi H, Chuang EY, Yoon KC, de Paiva CS, Shine HD, Jones DB, Pflugfelder SC, Li DQ (2007) Patterned expression of neurotrophic factors and receptors in human limbal and corneal regions. *Mol Vis.* 13:1934-41.
- Rahman MM, McFadden G (2005) Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. *PLoS Pathogens* 2:2-4.
- Reinshagen M, Geerling I, Eysselein VE, Adler G, Huff KR, Moore GP, Lakshmanan J (2000) Commercial recombinant human beta-nerve growth factor and adult rat dorsal root ganglia contain an identical molecular species of nerve growth factor prohormone. *J. Neurochem.* 74:2127-2133.
- Ribatti D, Nico B, Perra MT, Maxia C, Piras F, Murtas D, Crivellato E, Sirigu P (2009) Correlation between NGF/TrkA and microvascular density in human pterygium. *Int J Exp Pathol.* 90:615-20.
- Ríos JD, Ghinelli E, Gu J, Hodges RR, Dartt DA (2007) Role of neurotrophins and neurotrophin receptors in rat conjunctival goblet cell secretion and proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48:1543-51.

- Rubin JS, Bradshaw RA (1981) Isolation and partial amino acid sequence analysis of nerve growth factor from the guinea pig prostate. *J. Neurosci. Res.* 6:451-464.
- Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T (1989) Production of tumor necrosis factor- α by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* 491:394-397.
- Schellini SA, Hoyama E, Oliveira DE, Bacchi CE, Padovani CR (2006) Matrix metalloproteinase-9 expression in pterygium. *Arq Bras Oftalmol.* 69:161-164.
- Scott J, Selby M, Urdea M, Quiroga M, Bell GI, Rutter WJ (1983) Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor. *Nature* 302:538-540.
- Scott SA, Crutcher KA (1994) Nerve growth factor and Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 5:179-211.
- Selby MJ, Edwards R, Sharp F, Rutter WJ (1987b) Mouse nerve growth factor gene: structure and expression. *Mol. Cell. Biol.* 7:3057-3064.
- Server AC, Shooter EM (1977) Nerve growth factor. *Adv. Protein Chem.* 31:339-409.
- Shiroma H, Higa A, Sawaguchi S, Iwase A, Tomidokoro A, Amano S, Araie M (2009) Prevalence and Risk Factors of Pterygium in a Southwestern Island of Japan: The Kumejima Study. *Am J Ophthalmol.* 148:766-771.
- Sobottka B, Reinhardt D, Brockhaus M, Jacobsen H, Metzger F (2008) ProNGF inhibits NGF-mediated TrkA activation in PC12 cells. *J Neurochem.* 107:1294-303.
- Soliman Mahdy MA, Bhatia J (2009) Treatment of primary pterygium: role of limbal stem cells and conjunctival autograft transplantation. *Eur J Ophthalmol.* 19:729-732.
- Sornelli F, Lambiase A, Mantelli F, Aloe L (2010) NGF and NGF-receptor expression of cultured immortalized human corneal endothelial cells. *Mol Vis.* 16:1439-47.
- Sposato V, Bucci MG, Coassin M, Russo MA, Lambiase A, Aloe L (2008) Reduced NGF level and TrkA protein and TrkA gene expression in the optic nerve of rats with experimentally induced glaucoma. *Neurosci Lett.* 446:20-4.
- Srinivasan B, Roque CH, Hempstead BL, Al-Ubaidi MR, Roque RS (2004) Microglia-derived proneurotrophin growth factor promotes photoreceptor cell death via p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem.* 279:41839-45.

- Stach RW, Shooter EM (1974) The biological activity of cross-linked β nerve growth factor protein. *J. Biol. Chem.* 249:6668-6674.
- Stach RW, Server AC, Pignatti P-F, Piltch A, Shooter EM (1976) Characterization of the γ subunits of the 7S nerve growth factor complex. *Biochem.* 15:1455-1461.
- Stampachiachiere B, Aloe L, Micera A, Bonini S: (2006) Allergic bronchial airway inflammation in nerve growth factor (NGF)-deprived rats evidence suggesting a neuroimmunomodulatory role of NGF. *Exp Lung Res.* 32:305-20.
- Stöckel K, Schwab M, Thoenen H (1975) Specificity of retrograde transport of nerve growth factor (NGF) in sensory neurons: a biochemical and morphological study. *Brain. Res.* 89:1-14.
- Tan H, Donald T, Edward J (2002) Ocular Surface. *Disease Medical and Surgical Management* 6:65-91.
- Taylor DM, Bennett D, Carter M, Garewal D, Finch CF (2004) Acute injury and chronic disability resulting from surfboard riding. *J Sci Med Sport.* 7:429-437.
- Thomas KA, Baglan NC, Bradshaw RA (1981a) The amino acid sequence of the γ -subunit of mouse submaxillary gland 7S nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 256:9156-9166.
- Thomas KA, Silverman RE, Jeng I, Baglan NC, Bradshaw RA (1981b) Electrophoretic heterogeneity and polypeptide chain structure of the γ -subunit of mouse submaxillary 7S nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 256:9147-9155.
- Tsai YY, Chang CC, Chiang CC, Yeh KT, Chen PL, Chang CH, Chou MC, Lee H, Cheng YW (2009) HPV infection and p53 inactivation in pterygium. *Mol Vis.* 15:1092-1097.
- Ullrich A, Gray A, Berman C, Dull TJ (1983) Human b-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* 303:821-825.
- Ullrich A, Gray A, Wood WI, Hayflick J, Seeburg P (1984) Isolation of a cDNA clone coding for the gamma-subunit of mouse nerve growth factor using a high-stringency selection procedure. *DNA* 3:387-392.
- van der Zypen F, van der Zypen E, Daicker B (1975) Ultrastructural studies on the pterygium. I. Epithelium and glands of the conjunctival part (part I) *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 193:161-175.

- van der Zypen F, van der Zypen E, Daicker B (1975) Ultrastructural studies on the pterygium. II. Connective tissue, vessels and nerves of the conjunctival part (part II). *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 193:177-187.
- Varon S, Shooter EM: The nerve growth factor proteins of the mouse submaxillary gland. In: Bowman, R.E., Datta, S.P. (eds) *Biochemistry of brain and behaviour.* Plenum, New York, S.41-64.
- Varon S, Nomura J, Shooter EM (1968) Reversible dissociation of the mouse nerve growth factor protein into different subunits. *Biochem.* 7:1296-1303.
- von Gräfe CF, Busch DW (1830) *Encyclopädisches Wörterbuch der medicinischen Wissenschaften.* 112-131 in <http://books.google.de/books?pg=PA113&lpg=PA116&dq=grad+l+pterygium&id=D34jAAAacAAJ&ots=enidVRhKf#v=onepage&q=grad%20l%20pterygium&f=false>, aufgerufen am 05.01.2009
- Virchow R: Die Entzündung. in *Handbuch der Speziellen Pathologie und Therapie.* Band 1. Allg. Störungen der Ernährung und des Blutes. Erlangen, Enke, 1854, S.46-94.
- West S, Muñoz B (2009) Prevalence of pterygium in Latinos: Proyecto VER. *Br J Ophthalmol.* 93:1287-1290.
- Xu L, You QS, Jonas JB (2009) Prevalence of alcohol consumption and risk of ocular diseases in a general pop.: the beijing eye study. *Ophthalmology.* 116:1872-1879.
- Xue C, Huang Z, Wang J, Dong Y, Zhou X (2009) EphrinB2 and EphB4 expression in pterygia: new insights and preliminary results. *Can J Ophthalmol.* 44:185-188.
- Yang SF, Lin CY, Yang PY, Chao SC, Ye YZ, Hu DN (2009) Increased expression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) in pterygia and pterygium fibroblasts with disease progression and activation of protein kinase C. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 10:4588-4596
- Yardley G, Relf B, Lakshmanan J, Reinshagen M, Moore GP (2000): Expression of nerve growth factor mRNA and its translation products in the anagen hair follicle. *Exp. Dermatol.* 9:283-289
- Yiangou Y, Facer P, Sinicropi DV, Boucher TJ, Bennett DL, McMahon SB, Anand P (2002) Molecular forms of NGF in human and rat neuropathic tissues: decreased NGF precursor-like immunoreactivity in human diabetic skin. *JPNS.* 7:190-197
- Zeng J, Jiang D, Liu X, Tang L (2004) Expression of matrix metalloproteinase in human pterygia. *Yan Ke Xue Bao.* 20:242-245.

8 Tabellenanhang

- Tabelle 1: Übersicht der Risikofaktoren zur Genese des Pterygiums
- Tabelle 2: Übersichtsfärbung; Arbeitsschritte zwischen Vorbereiten und Eindecken
- Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primärantikörper für die Immunhistochemie
- Tabelle 4: Übersicht Arbeitsschritte Immunhistochemie
- Tabelle 5: Immunfluoreszenz; Übersicht Primär- und Sekundär-AK
- Tabelle 6: Übersicht Arbeitsschritte Immunfluoreszenz
- Tabelle 7: Übersicht Zellstimulatoren (BrdU-Assay)
- Tabelle 8: Arbeitsschritte Bromodesoxyuridin-Proliferationsassay
- Tabelle 9: Arbeitsschritte Motilitätsassay/Einzelzellmigration
- Tabelle 10: Immunhistochemie; Ergebnisse pro-NGF/TNF- α
- Tabelle 11: Immunfluoreszenz; Ergebnisse HCE und HCjE
- Tabelle 12: Immunfluoreszenz; Ergebnisse Pterygium

9 Thesen

1. Der Nervenwachstumsfaktor NGF ist ein äußerst wichtiger neuronotropher Mediator, der Genese, Differenzierung und Aufrechterhaltung von sensorischen und sympathischen Neuronen aus dem Neuralkamm reguliert. Heutzutage stehen Antikörper für dieses kovalent gebundene Dimer zur Verfügung und das humane NGF-Gen ist vollständig kloniert.
2. Pro-NGF ist die direkte Vorstufe von NGF und gilt heutzutage als die im Cerebrum hauptsächlich biologisch aktive Form. Pro-NGF wurde bisher in der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, in Hinterhorn ganglien und Rückenmark, im Kolon, in Haarfollikeln und in der Retina nachgewiesen.
3. NGF und pro-NGF entfalten ihre spezifischen Wirkungen über zwei verschiedene Rezeptorsysteme, den p75-Rezeptor und den TrkA-Rezeptor. In der Folge werden intrazellulär Proteine phosphoryliert und intranukleär die Gentranskription verschiedener Proteine und Enzyme induziert.
4. An der Augenoberfläche ließ sich der morphologische Nachweis von pro-NGF in humaner Horn- und Bindehaut immunhistochemisch verifizieren. Dies mag einerseits damit zusammenhängen, dass sich das menschliche Auge phylogenetisch von diencephalen Hirnanteilen ableitet, andererseits legt es auch nahe, dass pro-NGF auch für die Genese und Aufrechterhaltung der Funktionen der differenzierten Gewebe der Augenoberfläche eine wichtige Rolle spielt.
5. Auch in menschlichen Pterygien sind pro-NGF und NGF mittels fluoreszenz-immunhistochemischer Methoden nachweisbar, insbesondere im Gefäßendothel fällt der Nachweis stark positiv aus. Verstärkte bis überschießende Angiogenese ist ein essentielles Merkmal des Flügelfelles, sodass das vermehrte Vorkommen von inhibitorisch wirkendem pro-NGF (siehe Punkt 6) möglicherweise eine physiologische Antwort des Organismus auf die Gefäßneubildung darstellt.
6. Sowohl für pro-NGF als auch für NGF selbst kann eine proliferationssenkende Wirkung *in vitro* nachgewiesen werden. Diese inhibitorischen Effekte sind dosisabhängig und für humane Cornea- und Konjunktivaepithelzellen reliabel nachweisbar. Ob es sich hierbei um caspasevermittelte Apoptoseprozesse handelt oder nekroseinduzierende zytotoxische Dosen appliziert wurden, müssen weitere Untersuchungen über zelluläre Signaltransduktionswege für pro-NGF und NGF an Geweben der Augenoberfläche klären.

7. Der Tumornekrosefaktor alpha ist ein Zytokin mit mannigfaltigen Wirkungen und ist nahezu ubiquitär im menschlichen Organismus detektierbar. Als wichtiger Entzündungsmediator kommt es in Gebieten florider Entzündung besonders häufig vor. Auch in pathophysiologisch „normalem“ Gewebe wie Cornea und Konjunktiva lässt sich TNF- α mittels Immunhistochemie spezifisch nachweisen.
8. Auf proliferierende humane Horn- und Bindehautepithelzellen hat TNF- α *in vitro* in physiologischen Dosen einen deutlich wachstumssteigernden Einfluss. Bei steigender Dosis nivelliert sich dieser Effekt allerdings schnell. Dies lässt vermuten, dass es bei überschießenden Entzündungsprozessen (mit lokalem Anstieg der TNF- α -Konzentration) nicht mehr zu einem Gewebsplus kommt, sondern die Induktion nekrotischer Abläufe im Vordergrund steht, um nachfolgend Raum für Regenerationsgewebe zu bieten.
9. Die histologischen Analysen legen eine TNF- α -Synthese in HCE-Zellen nahe, wohingegen HCjE-Zellen und Konjunktiva eher auf hämatogenem Wege durch TNF- α beeinflusst werden.
10. Da das Pterygium (wenn auch zunächst nicht zu Beginn) im Verlauf mit charakteristischen Entzündungsstigmata einhergeht, war es zu erwarten, dass TNF- α in diesem Gewebe nachweisbar ist.
11. Pro-NGF, NGF und TNF- α haben keinen signifikanten Einfluss auf die Motilität einzelner Cornea- und Konjunktivaepithelzellen. Warum also physiologische Zellstrukturen ihre angestammte Position im jeweiligen zellulären Verband verlassen und sich als Pterygium in Richtung auf die optische Achse bewegen, kann durch diese Ergebnisse nicht geklärt werden.
12. Bedenkt man die genetisch und morphologisch große Ähnlichkeit zwischen pterygialen Epithelzellen und physiologischen Horn- und Bindehautepithelzellen und unterstellt ein *in vitro* ähnliches Verhalten in der Einzelzellmigration, kann man eher, nach Aquisie multipler Risikofaktoren, von einer degenerativen Pathogenese des Flügelfelles ausgehen, als von einer echten Neoplasie trotz lokal invasiv-destruktiven Wachstums.

10 Anhang

10.1 Lebenslauf

24.02.1983 als erstes Kind von Michael Pfütze und Marion Pfütze, geb. Hempel, in Leipzig geboren

Schulbildung

- 1989-1993 Besuch der Greenwich-Grundschule zu Berlin
- 1993-1999 Besuch des Bertha-von-Suttner-Gymnasiums zu Berlin
- 1999-2002 Besuch des Emil-Fischer-Gymnasiums zu Berlin
- 2002 Abitur mit Auszeichnung als Jahrgangsbester
- 2002 Regional- und Landessieger Jugend Forscht – Kategorie *Biologie*

Berufsbildung

- 2002-2008 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle/ Wittenberg
- 2005 Beginn der vorliegenden Dissertation
- 12/2008 Approbation als Arzt
- 2009-2010 Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik des Westküstenklinikums in Heide/Holstein (Chefarzt Prof. Dr. med. F.S. Keck)
- seit 04/2010 Zweitstudium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg zur Erlangung der Facharztanerkennung „Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie“
- seit 04/2010 Assistenzarzt der Abteilung für Neurochirurgie des Ordenshauses der Barmherzigen Brüder in Regensburg (Chefarzt Dr. med. A. Müller)

Michael Daniel Pfütze

Effects of nerve growth factor (NGF), pro-NGF, and tumor necrosis factor alpha on corneal and conjunctival epithelial cells with regard to pterygium pathology



Daniel Pfützte (1), Gunnar Müller (2),

Steffen Hauptmann (2) and Friedrich Paulsen (1)

(1) Department of Anatomy and Cell Biology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Grosse Steinstrasse 52, D-06097 Halle/Saale, Germany, contact: daniel_pfuetze@yahoo.de

(2) Department of Pathology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Magdeburger Strasse 14, D-06112 Halle/Saale, Germany



Purpose To get deeper insights into the pathogenesis of pterygia (Fig. 1) which are invasive and highly vascularized growths at the ocular surface we examined nerve growth factor (NGF), its precursor (pro-NGF), as well as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), a cytokine found commonly in inflammation processes with regard to cell proliferation and motility effects on corneal (HCE) and conjunctival (HCjE) epithelial cell lines as well as pterygia.

Methods HCE and HCjE were cultured in 96-well-plates, stimulated with several doses of NGF, pro-NGF and TNF- α , and incubated with bromodesoxyuridin bases. Absorption was measured with an ELISA-reader. Migration-assays were used to analyze differences in cell motility after stimulation of cultured cells. Moreover, NGF, pro-NGF, and TNF- α were localized by immunofluorescence (IF) and immunohistochemically (IHC).

Results Proliferation of HCE and HCjE was significantly inhibited after stimulation with NGF and pro-NGF whereas TNF- α increases cell proliferation. (Fig. 2) All three factors had no significant effect on cell motility. (Fig. 5) IHC of human samples from limbus, cornea, conjunctiva, and primary pterygia revealed presence of pro-NGF and TNF- α especially in epithelial cells. (Fig. 3) Using IF, all three factors could be visualized in pterygia and HCE whereas in HCjE only NGF was detectable. (Fig. 4)

Conclusion Based on their inhibiting effects on cell proliferation, increased secretion of NGF and pro-NGF in pterygium may function in blocking growth of the pterygium itself. Further studies are necessary to clarify this aspect. However, hypothetically topical application of NGF and pro-NGF may support inhibition of pterygial recurrency after surgical excision.

Special thanks: To U. Beyer and S. Möschter for their kind technical assistance.



Figure 1: A pterygium in a left human eye, characteristically triangular and strongly vascularized, growing from the nasal angle, obliterates the optical axis threatening the visus.

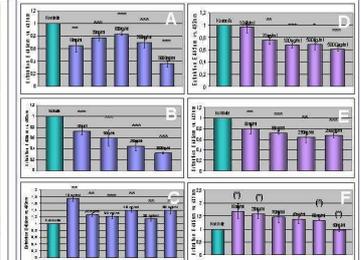


Figure 2: Anti-proliferating effects of ocular surface cells stimulated with pro-NGF or NGF compared with TNF- α . On the left side: human corneal epithelial cells, stimulated with several doses of pro-NGF (A), NGF (B), and TNF- α (C). On the right side: human conjunctival epithelial cells, stimulated with several doses of pro-NGF (D), NGF (E), and TNF- α (F). Cell lines were stimulated with the cytokines for 24 hours. Values are compared between the stimulated and non-stimulated cells (medium alone). Statistic: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ (†) $p < 0.1$. Each bar represents the mean \pm SD of three independent experiments.

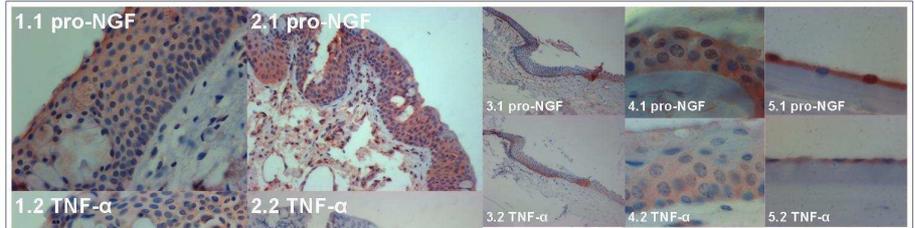


Figure 3: Detection of pro-NGF and TNF- α using immunohistochemical devices. Tissues: 1.1 & 1.2 pterygium, 2.1 & 2.2 conjunctiva, 3.1 & 3.2 limbus, 4.1 & 4.2 corneal epithel, 5.1 & 5.2 corneal endothel. Notes: About forty different pterygia and twelve limbi were examined with antibodies against pro-NGF (polyclonal rabbit) and TNF- α (monoclonal mouse). High expressive areas within one high-power-field are rated with +++ (3), medium ones with ++ (2) and areas in where only some cells are marked with + (1).

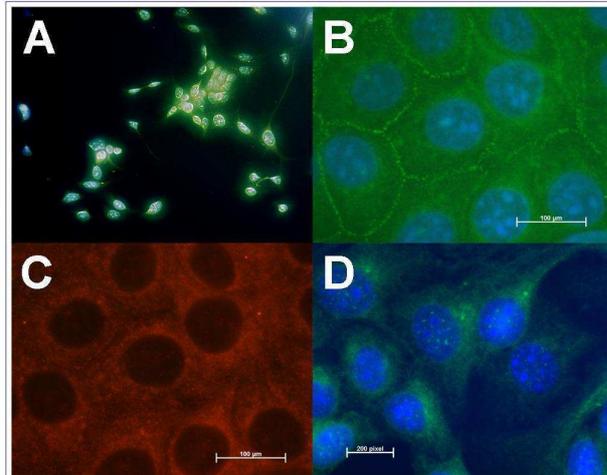
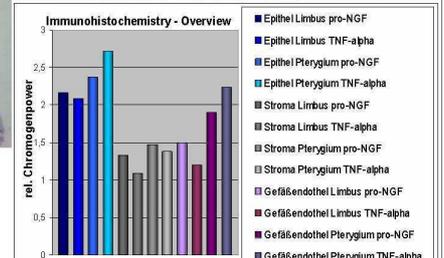


Figure 4: Detection of pro-NGF, NGF and TNF- α using immunofluorescence devices. A/B/C: human corneal cells, D: conjunctival epithelial cells. A: NGF (FITC-conjugated Antibody - green) and DAPI (blue) in overlay-technique. B: pro-NGF (FITC-conjugated Antibody - green) and DAPI (blue) in overlay-technique. C: TNF- α (Cy3-conjugated Antibody - red). D: NGF (FITC-conjugated Antibody - green) and DAPI (blue) in overlay-technique.

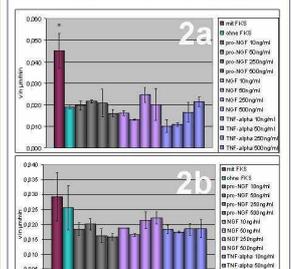
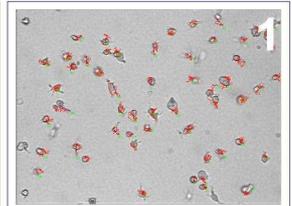


Figure 5: Migrationassays show that pro-NGF, NGF and TNF- α have no significant effects on cell motility of epithelial cell lines. 1: Live picture, Boydenassay, 2a: conjunctiva epithelial cell line (HCjE), 2b: cornea cell line (HCE). Significant effects are seen if cells are treated with fetal bovine serum (FKS / positive control).

10.2 Hinweis der Publikation von Ergebnissen dieser Arbeit

1. Pfütze D, Müller G, Hauptmann S, Paulsen F (2007)

Effects of nerve growth factor (NGF), pro-NGF and tumor necrosis factor alpha on corneal and conjunctival epithelial cells with regard to pterygium pathology. Poster auf der 24. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg 2007 – DOI 10.3337/anatges.2007.0004

10.3 Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter der Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Michael Daniel Pfütze

10.4 Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Michael Daniel Pfütze

10.5 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. **Friedrich Paulsen** gilt mein besonderer Dank im fachlich-wissenschaftlichen Bereich, in dem er mich wann immer nötig tatkräftig unterstützt hat, und im menschlichen, als betreuender Doktorvater.

Herrn **Gunnar Müller**, Bundeswehrkrankenhaus zu Koblenz, Abteilung für Pathologie, Herrn **Frederik Frenzen**, Universitätsklinik zu Halle-Wittenberg, Abteilung für Innere Medizin, **Jörg Illert**, Universitätsklinik Halle-Wittenberg, Abteilung für Neurochirurgie und **Isabel Jacob**, Klinikum Köln Hohlweide, Abteilung für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, möchte ich insbesondere für teils fachlich-kritische, aber auch oft benötigt aufmunternd-motivierenden Anmerkungen und Anregungen danken!

Frau **Daniela Hammer**, B.A. danke ich für geduldigen Beistand und Rat bezüglich Computersoftware und Layout.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. med. **Steffen Hauptmann**, damals Universitätsklinikum Halle-Wittenberg, Direktor des Instituts für Pathologie, für die kollegiale Mitwirkung und Bereitstellung der Materialien für Teile der Motilitätsassays.

Herrn Chefarzt Prof. Dr. med. **Stefan Knipping**, Klinikum Dessau, Abteilung für Hals-, Nasen und Ohrenheilkunde sei für die Bereitstellung von Biopsaten und Exzidaten aus dem Tränen-Nasenbereich sehr gedankt.

Frau MTA **Ute Beyer**, MTA **Susann Möschter** und MTA **Michaela Risch** danke ich für die Einweisung in die laborchemischen Arbeitsmethoden und die außerordentlich angenehme Zusammenarbeit; sowie Herrn Dr. biol. **Fabian Garreis** und Herrn Juniorprofessor Dr. rer. nat. **Lars Bräuer** für ihre immerwährende Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft.