

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité Campus Virchow Klinikum –
Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

In vitro Proliferationsverhalten humaner und boviner
Linsenepithelzellen unter dem Einfluss von
Dorzolamid und Prostaglandin F2-alpha

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maurice Sébastien de Ruijter

aus Arnhem, Niederlande

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. P. W. Rieck

2. Prof. Dr. D.-T. Pham

3. Prof. Dr. G. Duncker

Datum der Promotion:

01. Juni 2008

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Tabellen	5
Verzeichnis der Graphiken	6
Verzeichnis der Abbildungen	6
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung.....	11
1.1. Nachstar.....	11
1.2. Behandlung des Nachstars	12
1.2.1. Die Nd:YAG-Kapsulotomie.....	12
1.2.2. Die chirurgische Nachstarabsaugung	13
1.3. Faktoren, die die Nachstarentwicklung beeinflussen	14
1.3.1. Intraokularlinse.....	14
1.3.2. Ophthalmika	14
1.4. Myopie	15
1.5. Glaukom.....	15
1.6. Prostaglandin F2-alpha und Dorzolamid	16
1.6.1. Prostaglandine	16
1.6.2. Carboanhydrasehemmer	18
2. Problemstellung und Ziele	20
3. Material und Methoden	21
3.1. Verwendete Materialien	21
3.1.1. Verwendete Geräte.....	21
3.1.2. Verwendete Labormaterialien	21
3.1.3. Verwendete Medien und Zusatzsubstanzen	22
3.1.4. Verwendete Testsubstanzen.....	23
3.1.5. Verwendete Software.....	23
3.2. Etablierung humaner und boviner Epithelzellkulturen	24
3.2.1. Probengewinnung humaner Linsenepithelzellen.....	24
3.2.2. Probengewinnung boviner Linsenepithelzellen	25
3.2.3. Etablierung der Zellkulturen	26

3.2.4. Zellpassage.....	27
3.2.5. Kulturmedium.....	27
3.2.5.1. Fetales Kälberserum.....	29
3.2.5.2. HEPES.....	30
3.2.5.3. L-Glutamin.....	30
3.2.5.4. PGF _{2α}	30
3.2.5.5. Dorzolamid.....	31
3.2.6. Proliferationsbestimmung.....	31
3.2.6.1. Ablauf der Zellzählung.....	31
3.2.6.2. Prinzip der Zelldichtebestimmung mit dem CASY® 1-Zellzähler.....	32
3.3. Aufbau der Versuche mit humanen Linsenepithelzellen.....	34
3.4. Aufbau der Versuche mit bovinen Linsenepithelzellen.....	35
3.5. Verwendete Statistik.....	37
4. Ergebnisse.....	38
4.1. Humane Linsenepithelzellen.....	38
4.2. Bovine Linsenepithelzellen.....	42
5. Diskussion.....	56
5.1. Einfluss von Dorzolamid auf die Proliferation von Linsenepithelzellen.....	58
5.2. Einfluss von PGF _{2α} auf die Proliferation von Linsenepithelzellen.....	59
5.3. Klinische Auswirkungen.....	60
5.4. Fazit.....	61
6. Zusammenfassung.....	62
6.1. Hintergrund.....	62
6.2. Methoden.....	62
6.3. Ergebnisse.....	63
6.4. Schlussfolgerungen.....	63
7. Literaturverzeichnis.....	65
8. Anhang.....	71
8.1. Nederlandse Samenvatting.....	71
8.1.1. Achtergrond.....	71
8.1.2. Methoden.....	71
8.1.3. Resultaten.....	72
8.1.4. Conclusies.....	72
8.2. English Abstract.....	73

8.2.1. Background	73
8.2.2. Methods	73
8.2.3. Results	73
8.2.4. Conclusions	74
Danksagung	75
Lebenslauf	76
Eidesstattliche Erklärung	79

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 3.1 Zusammenstellung der verwendeten Kulturmedien (100 ml) mit 10%, 5% bzw. 2% fetalem Kälberserum.....	28
Tabelle 3.2 Übersicht der Verteilung der Zellkulturen bei dem Versuch mit humanen Linsene­pithelzellen.	35
Tabelle 3.3 Übersicht der Verteilung der Zellkulturen bei dem Versuch mit bovinen Linsene­pithelzellen.	36
Tabelle 4.1 Humane Linsene­pithelzellen: Ergebnisse der Zellzählungen nach 1, 3 und 7 Tagen Kultivierung.....	39
Tabelle 4.2 Humane Linsene­pithelzellen: statistische Auswertung der Zellzahl nach 1, 3 und 7 Tagen.	40
Tabelle 4.3 Bovine Linsene­pithelzellen: Ergebnisse der Zellzählungen von allen Gruppen, verteilt in Gruppe 1, Gruppe 2 und Mittelwerte von Gruppe 1 & 2, nach 1 Tag Kultivierung.	46
Tabelle 4.4 Bovine Linsene­pithelzellen: Ergebnisse der Zellzählungen von allen Gruppen, verteilt in Gruppe 1, Gruppe 2 und Mittelwerte von Gruppe 1 & 2, nach 3 Tagen Kultivierung.	47
Tabelle 4.5 Bovine Linsene­pithelzellen: Ergebnisse der Zellzählungen von allen Gruppen, verteilt in Gruppe 1, Gruppe 2 und Mittelwerte von Gruppe 1 & 2, nach 7 Tagen Kultivierung.	48
Tabelle 4.6 Bovine Linsene­pithelzellen: statistische Auswertung der Zellzahl nach 1, 3 und 7 Tagen.	49

Tabelle 4.7 Bovine Linsenepithelzellen: Kulturzeiten von allen Gruppen, nach 1, 3 und 7 Tagen Kultivierung.....	54
Tabelle 4.8 Bovine Linsenepithelzellen: statistische Auswertung der Kulturzeit nach 1, 3 und 7 Tagen.	55

Verzeichnis der Graphiken

Graphik 4.1 Übersicht zum Proliferationsverhalten humaner Linsenepithelzellen nach 1, 3 und 7 Tagen Kultivierung.....	38
Graphik 4.2 Humane Linsenepithelzellen: Boxplots der gemessenen Zellzahl nach 1 Tag Kultivierung.	40
Graphik 4.3 Humane Linsenepithelzellen: Boxplots der gemessenen Zellzahl nach 3 Tagen Kultivierung.	41
Graphik 4.4 Humane Linsenepithelzellen: Boxplots der gemessenen Zellzahl nach 7 Tagen Kultivierung.	42
Graphik 4.5 Bovine Linsenepithelzellen: Übersicht über das Proliferationsverhalten nach 1, 3 und 7 Tagen Kultivierung.....	43
Graphik 4.6 Bovine Linsenepithelzellen: Vergleichsübersicht vom Proliferationsverhalten nach 1, 3 und 7 Tagen Kultivierung im Zeitverlauf.....	46
Graphik 4.7 Bovine Linsenepithelzellen: Boxplots nach 1 Tag Kultivierung.	50
Graphik 4.8 Bovine Linsenepithelzellen: Boxplots nach 3 Tagen Kultivierung.....	51
Graphik 4.9 Bovine Linsenepithelzellen: Boxplots nach 7 Tagen Kultivierung.....	52
Graphik 4.10 Bovine Linsenepithelzellen: Übersicht von allen Messwerten.	53

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 3.1 Lichtmikroskopische Aufnahme von einem Zellrasen mit einem Teil der Linsenkapsel.	25
Abb. 3.2 Lichtmikroskopische Aufnahme während einer Passage von bovinen Linsenepithelzellen.	26
Abb. 3.3 Lichtmikroskopische Aufnahme von einem konfluenten Zellrasen.....	28

Abb. 3.4	Screenshot von einem Beispiel im Casy [®] 1 Measure Modus.	33
Abb. 3.5	Screenshot eines Beispiels im Casy [®] 1 Statistic Modus.....	34

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
b. v.	Gesellschaft mit beschränkter Haftung; besloten vennootschap (nl.)
bzw.	beziehungsweise
C	Celcius
CA	Carboanhydrase; carbonic anhydrase (e.)
ca.	circa
CARP	carbonic anhydrase related proteins (e.)
CO ₂	Kohlendioxid
d. h.	das heißt
DA	Dorzolamid
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (e.)
DOG	Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft
Dpt.	Dioptrie; diopter (e.)
e.	englisch
EDTA	Ethylendiamintetra-Essigsäure; ethylenediaminetetraacetic acid (e.)
EVER	European Association for Vision and Eye Research (e.)
FCS	Fetales Kälberserum; fetal calfserum (e.)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HAVO	Hoger Algemeen Voortgezet Onderwijs (nl.)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IOD	intraokularer Druck
IOL	Intraokularlinse; intraocular lens (e.)
ITN	Intubationsnarkose
L	Liter
Laser	Light amplification by stimulated emission of radiation (e.)
MET	Mittlere Fehldauer; mean error time (e.)
Min.	Minute
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm

μl	Mikroliter
ml	Milliliter
μm	Mikrometer
mM	millimolar
MMC	Mitomycin C
MW	Mittelwert
n, N	Anzahl, Häufigkeit
N. opticus	Nervus opticus, Sehnerv
NaHCO_3	Natriumbicarbonat
Nd:YAG	Neodymium, einbettet in ein Yttrium-Aluminium-Garnat-Medium
nl.	niederländisch
nm	Nanometer
p	Wahrscheinlichkeit, Signifikanz; probability (e.)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung; phosphate buffered saline (e.)
PCO	hintere Kapseltrübung; posterior capsule opacification (e.)
PCOWG	primär chronisches Offenwinkelglaukom
PGD_2	Prostaglandin D2
PGE_1	Prostaglandin E1
PGE_2	Prostaglandin E2
$\text{PGF}_{2\alpha}$	Prostaglandin F2-alpha
PGI_2	Prostacyclin
pH	pondus hydrogenii, negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
pK	negativer Logarithmus der Dissoziationskonstanten eines Elektrolyts
PMMA	Polymethylmethacrylat
®	registriert
RGD-Peptid	Arginin-Glycin-Asparagin-Aminosäuresequenz
Σ	Sigma, Summe
SD	Standardabweichung; Standarddeviation (e.)
%SD	Prozentuale Standardabweichung
sog.	so genannt
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle

™	Warenzeichen, Marke; trademark (e.)
U	Einheit; unit (e.)
U	Umdrehungen
u. a.	unter anderem
UK	Vereinigtes Königreich; United Kingdom (e.)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika; United States of America (e.)
vs.	versus
VWO	Vorbereidend Wetenschappelijk Onderwijs (nl.)
z. B.	zum Beispiel

6. Zusammenfassung

6.1. Hintergrund

Die Entstehung eines Nachstars durch eine Proliferation von Linsenepithelzellen nach Kataraktoperationen stellt ein häufiges Problem dar. Der Einfluss verschiedener Faktoren auf diese Entwicklung wurde bereits untersucht. Auch bei chronischer Anwendung von Antiglaukomatosa besteht möglicherweise ein erhöhtes Risiko einer Entstehung eines Nachstars. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung von Dorzolamid (DA) und Prostaglandin F₂-alpha (PGF_{2α}) auf das Proliferationsverhalten der Linsenepithelzellen in einem in vitro-Modell zu untersuchen.

6.2. Methoden

In Versuchen mit Zellkulturen von humanen Linsenepithelzellen wurde der Einfluss von drei verschiedenen PGF_{2α}-Konzentrationen im Kulturmedium auf das Proliferationsverhalten im Vergleich zu unbehandelten humanen Linsenepithelzellen gemessen. In bovinen Linsenepithelzellkulturen wurde neben dem Einfluss von PGF_{2α} auch der Einfluss von DA auf die Linsenepithelzellproliferation untersucht. Das Proliferationsverhalten wurde mittels Zellzählungen nach 1, 3 und 7 Tagen Kultivierung ausgewertet. Das primäre Ziel der Arbeit war es, den Proliferationsunterschied nach 7 Tagen Kulturzeit zwischen einer Kontrollkultur und jenen Zellkulturen, welche mit PGF_{2α} bzw. DA behandelt wurden, darzustellen. Die Mediumkonzentrationen von PGF_{2α} lagen bei 1:10, 1:100 und 1:1000 und von DA bei 1:100 und 1:1000 im Vergleich zu den Konzentrationen in Augentropfen von Handelspräparaten mit den Wirkstoffen Latanoprost und DA. Auf Grund des bekannten Hornhautpenetrationsgrades von Latanoprost entspricht die 1/100-Konzentration in diesen Versuchen der in vivo-Kammerwasserkonzentration nach lokaler Applikation.

6.3. Ergebnisse

In diesen Versuchen konnte kein signifikanter Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf das Proliferationsverhalten humaner und boviner Linsenepithelzellen gezeigt werden. In sämtlichen Zellkulturen mit den 3 verschiedenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen im Kulturmedium zeigte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe kein signifikante stimulierender und auch kein signifikanter hemmender Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Linsenepithelzellen nach 7 Tagen Kultivierung. Die p-Werte lagen hier bei 0,6564 (PGF-1/10-Gruppe), 0,8370 (PGF-1/100-Gruppe) und 0,5416 (PGF-1/1000-Gruppe). Obwohl sich nach 7-tägiger Kultivierung eine hemmende Wirkung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf die Proliferation im Vergleich zu der Kontrollgruppe in den Versuchen mit humanen Linsenepithelzellen zeigte, ist hier bei der geringen Anzahl von Kulturen (n=4 bis 6) keine sichere Aussage möglich (PGF-1/10-Gruppe: $p=0,4592$, PGF-1/100-Gruppe: $p=0,2392$ und PGF-1/1000-Gruppe: $p=0,0856$).

In den Versuchen mit bovinen Linsenepithelzellen zeigte sich nach 7 Tagen Kultivierung in der 1/100-Konzentration eine signifikante proliferationshemmende Wirkung des DA im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,0012$). Diese Beobachtung konnte bei einer 1/1000-Konzentration nicht gemacht werden ($p=0,1501$). Auch im Vergleich zu sämtlichen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gruppen zeigte DA in einer 1/100-Konzentration eine signifikant proliferationshemmende Wirkung, mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ in der 1:10-Konzentration ($p=0,0079$), $\text{PGF}_{2\alpha}$ in der 1:100-Konzentration ($p=0,0003$) und $\text{PGF}_{2\alpha}$ in der 1:1000-Konzentration ($p=0,0455$).

6.4. Schlussfolgerungen

DA in einer Konzentration von 1/100 zeigte im Vergleich zu $\text{PGF}_{2\alpha}$ eine signifikante Hemmung der Proliferation boviner Linsenepithelzellen in vitro. In den Versuchen mit humanen Linsenepithelzellen konnte kein eindeutiger Einfluss von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf die Proliferation nachgewiesen festgestellt werden. Sowohl die Inkubation mit DA als auch

die Behandlung mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ führte in keinem Fall zu einer signifikanten Wachstumsstimulation der Linsenepithelzellen.

8. Anhang

8.1. Nederlandse Samenvatting

8.1.1. Achtergrond

Het ontstaan van nastaar door proliferatie van lensepithelcellen na kataraktoperaties is een veelvoorkomend probleem. De invloed van verschillende factoren zijn inmiddels bekend uit onderzoek. Ook bij langdurig gebruik van antiglaucomatosa is een verhoogd risico op het ontstaan van nastaar mogelijk. Het doel van dit promotie-onderzoek was, de invloed van dorzolamide (DA) en prostaglandin F₂-alpha (PGF_{2α}) op de proliferatie van lensepithelcellen te onderzoeken.

8.1.2. Methodes

In een proef met humane lensepithelcelculturen werd de invloed van PGF_{2α} in vergelijking met onbehandelde controle-celculturen op de proliferatie in drie verschillende concentraties in het cultuurmedium getest. In bovine lensepithelcelculturen werd naast de invloed van PGF_{2α} ook de invloed van DA op de celproliferatie onderzocht. Deze invloed op het proliferatiegedrag werd door middel van celtellingen na 1, 3 en 7 dagen cultuurtijd geëvalueerd. Het primaire doel van dit onderzoek was, om het verschil in proliferatie na 7 dagen cultuurtijd te bepalen, tussen de controle-cultuur en alle celculturen die met PGF_{2α} of DA werden behandeld. De concentraties van PGF_{2α} in het medium waren 1:10, 1:100 en 1:1000 en van DA 1:100 en 1:1000, in verhouding tot de concentratie van latanoprost en DA in oogdruppels van preparaten die in de handel zijn. De 1/100-concentratie in deze proeven is in overeenstemming met de in vivo-situatie na lokale applicatie, op basis van de bekende corneale penetratie van latanoprost.

8.1.3. Resultaten

In de proeven werd van $\text{PGF}_{2\alpha}$ geen significante invloed op de proliferatie van humane en bovine lensepitheelcellen gezien. In alle celculturen met de 3 verschillende concentraties $\text{PGF}_{2\alpha}$ in het cultuurmedium kon na 7 dagen cultuurtijd zowel geen significante stimulatie als ook geen significante remming van de celproliferatie worden vastgesteld. De p-waarden waren 0,6564 (PGF-1/10-Groep), 0,8370 (PGF-1/100-Groep) en 0,5416 (PGF-1/1000-Groep). Hoewel na 7 dagen cultuurtijd een remmende werking van $\text{PGF}_{2\alpha}$ op de celproliferatie van humane lensepitheelcellen te zien was in vergelijking met de controle-celculturen, kan bij het geringe aantal celculturen (n=4 tot 6) geen duidelijke uitspraak gedaan worden (PGF-1/10-Groep: p=0,4592, PGF-1/100-Groep: p=0,2392 en PGF-1/1000-Groep: p=0,0856). In de proeven met bovine lensepitheelcellen, werd na 7 dagen cultuurtijd een significante remming van de celproliferatie gezien van DA in de 1/100-concentratie, in vergelijking met de controlegroep (P=0,0012). In de 1/1000-concentratie van DA was deze remming niet significant (p=0,1501). Ook in vergelijking met alle $\text{PGF}_{2\alpha}$ -groepen was de remmende werking van DA op de proliferatie significant (PGF-1/10-Groep: p=0,0079, PGF-1/100-Groep: p=0,0003 en PGF-1/1000-Groep: p=0,0455).

8.1.4. Conclusies

DA in een 1/100-concentratie liet in verhouding tot $\text{PGF}_{2\alpha}$ een significant remmende werking op de proliferatie van bovine lensepitheelcellen in vitro zien. In de experimenten met humane lensepitheelcellen kon van $\text{PGF}_{2\alpha}$ geen duidelijke invloed op de proliferatie worden vastgesteld. In geen geval werd bij de incubatie van lensepitheelcellen met DA als ook met $\text{PGF}_{2\alpha}$ een stimulerend effect op de proliferatie gezien

8.2. English Abstract

8.2.1. Background

Occurrence of posterior capsule opacification (PCO) due to lens epithelial cell proliferation after cataract surgery is a common problem. Several factors influencing PCO have already been investigated. Repeated application of antiglaucomatous drugs may also enhance the risk for PCO after cataract surgery. The aim of this investigation was to determine the effect of dorzolamid (DA) and prostaglandin F₂-alpha (PGF_{2α}) on lens epithelial cell proliferation in an in vitro model.

8.2.2. Methods

The effect of three different concentrations of PGF_{2α} in culture media on human lens epithelial cell proliferation in vitro was investigated. In the bovine lens epithelial cell cultures additionally the effect of DA on cell proliferation was examined. Cell proliferation was measured by cell count using an automated cell counter on days 1, 3 and 7. The primary goal of this investigation was to demonstrate the difference in cell proliferation between the untreated control group and cell cultures inoculated with PGF_{2α} and DA respectively at day 7. Compared to the concentration in commonly available eye drops containing latanoprost and DA the concentrations in the cell culture media were 1:10, 1:100 and 1:1000 for PGF_{2α} and 1:100 and 1:1000 for DA. Considering the known corneal penetration rate of latanoprost the 1:100 concentration in these experiments compares to the in vivo concentration reached in the aqueous after topical application.

8.2.3. Results

The experiments showed no significant effect of PGF_{2α} on the proliferation of either human or bovine lens epithelial cells. Neither a proliferative nor an inhibitory effect was

seen in all cell cultures using the three different concentrations of $\text{PGF}_{2\alpha}$ after 7 days of cultivation. P-values measured 0.6564 (PGF-1/10) 0.870 (PGF-1/100) and 0.5416 (PGF-1/1000). The observation that $\text{PGF}_{2\alpha}$ did have an inhibitory effect on cell proliferation in the human lens epithelial cell model compared to the control group was not significant due to the low number of cell cultures (n=4-6) (PGF-1/10-Group: p=0,4592, PGF-1/100-Group: p=0,2392 and PGF-1/1000-Group: p=0, 0856).

The experiments using bovine lens epithelial cells showed a significant inhibition of cell proliferation in the 1:100 concentration of DA compared to the control group (p=0,0012). This effect was not seen using the 1:1000 concentration (p=0.1501). DA in the 1/100 concentration showed a significant inhibitory effect in comparison to all cell cultures incubated with $\text{PGF}_{2\alpha}$, in the 1:10 (p=0.0079), 1:100 (p=0.0003) and 1:1000 (p=0.0455) concentration.

8.2.4. Conclusions

Incubation of bovine lens epithelial cells with DA in the concentration 1/100 resulted in a significant inhibition of cell proliferation in vitro. In human lens epithelial cell cultures no distinct effect of $\text{PGF}_{2\alpha}$ on cell proliferation could be demonstrated. Neither treatment with DA nor $\text{PGF}_{2\alpha}$ led to a significant increase in cell proliferation.

Danksagung

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Peter Rieck für seine Unterstützung, für die Überlassung des Themas und die Betreuung auf dem Weg. Ich freue mich außerdem sehr, mit ihm als meinem leitenden Oberarzt im klinischen Alltag arbeiten zu dürfen.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Christian Hartmann (†) für seine Unterstützung und die Möglichkeit, mich mit dem Thema zu beschäftigen.

Diese Arbeit wurde zum Teil ermöglicht durch die Unterstützung der Firma Chibret Pharmazeutische GmbH (Haar), durch Lieferung der Dorzolamid-Grundsubstanz. Diesbezüglich danke ich insbesondere Frau Marie-Luise Meckler und Herrn Dr. Karl-Heinz Datum.

Frau Sylvia Metzner danke ich sehr für ihre Unterstützung im Labor, vor allem bei den Zellkulturen. Sie hat mich in die praktische Laborarbeit eingeführt und dabei sehr unterstützt.

Dr. univ.-med. Roland Rieger danke ich für seine Hilfe an allen Fronten, vor allem die, bei der die sozialen Aspekte eine große Rolle spielen.

Meiner Frau Dr. med. Susanne de Ruijter danke ich für die Deutschkorrekturen, aber am meisten für alles drum herum.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Maurice de Ruijter, an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, 09. Januar 2008