

**Entwicklung und Charakterisierung eines  
humanen kornealen Epithel-Modells  
auf der Basis einer SV40-immortalisierten Zelllinie  
zur Bestimmung der okularen Toxizität**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Judith Wanda Seeber**  
aus Köln

Juni, 2008

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

2. Gutachter: Frau PD Dr. Maria Engelke

Datum der Disputation: 29. August 2008

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von  
Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting  
in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie des Instituts für Pharmazie  
der Freien Universität Berlin angefertigt.

Mein Dank gilt Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting, die die vorliegende Arbeit nicht nur grundsätzlich ermöglicht und die interessante Thematik vorgeschlagen, sondern die Entwicklung der Arbeit durch ihre stete Gesprächsbereitschaft, ihre wissenschaftlichen Anregungen und ihr Vermitteln von Kooperationspartnern in vielfältiger Weise unterstützt hat.

Frau PD Dr. Maria Engelke danke ich herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens, die Einführung in die Thematik des Kornea-Projekts und die konstruktiven, kritischen und anregenden Gespräche, mit denen Sie mich vor Ort und aus der Entfernung begleitet hat.

Frau Dr. Michaela Zorn-Kruppa von der Akademie für Tierschutz in Neubiberg und meiner Kollegin Frau Anna Katharina Manzer danke ich für die immerwährende Diskussionsbereitschaft und den regen Gedankenaustausch.

Frau Professor Dr. May Griffith gilt mein besonderer Dank für die unkomplizierte Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe am Eye Institute der University of Ottawa und ihre großartige Gastfreundschaft.

Herrn Professor Dr. Hans Christian Korting und den Mitarbeitern des Elektronenmikroskopischen Labors der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Durchführung der histologischen Schnitte sowie ihrer Beurteilung. Ferner danke ich Frau Professor Dr. Johanna Plendl und Frau Monika Sachtleben des Instituts für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin für die Aufnahmen der transmissionselektronenmikroskopischen Bilder. Herrn Professor Dr. Matthias Melzig des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Freien Universität Berlin möchte ich für die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops herzlich danken.

Den gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitskreise von Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting, Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser und Herrn Professor Dr. Heinz Pertz danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und den freundschaftlichen Umgang miteinander. Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Simone Lombardi-Borgia für seine wertvolle Unterstützung bedanken. Seine wissenschaftlich stets bereichernden sowie aufmunternden Kommentare halfen mir wesentlich, die Arbeit in der vorliegenden Weise auszuführen.

Mein besonderer Dank gilt allen voran meinen lieben Eltern, die mir meine akademische Ausbildung so selbstverständlich haben erscheinen lassen und diese Dissertation wohlwollend und unterstützend begleitet haben.

### ORIGINALARBEITEN

Seeber, J.W., Zorn-Kruppa, M., Lombardi-Borgia, S., Scholz, H., Manzer, A.K., Rusche, B., Schäfer-Korting, M., Engelke, M., 2008. Characterisation of human corneal epithelial cell cultures under serum-free conditions. Alternatives to laboratory animals: ATLA (im Druck)

Manzer, A.K., Lombardi-Borgia, S., Seeber, J.W., Schäfer-Korting, M., Zorn-Kruppa, M., Engelke, M., 2008. Characterization of an SV40-Transformed Cell Strain from Human Corneal Keratocytes. Experimental Eye Research: Exp Eye Res (eingereicht)

### POSTER

Engelke, M., Lombardi-Borgia, S., Manzer, A.K., Seeber, J.W., Zorn-Kruppa, M., Characterization of a new human corneal equivalent based on immortalized cell lines. Innovation for Sustainable Production: I-SUP 2008, 22. - 25. April 2008, Brügge (Belgien)

Seeber, J.W., Lombardi-Borgia, S., Schäfer-Korting, M., Engelke, M., Characterisation of Morphology and Barrier Properties of a New Human Corneal Epithelium Model. 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 21. - 25. August 2007, Tokyo (Japan)

Lombardi-Borgia, S., Manzer, A.K., Seeber, J.W., Engelke, M., Characterisation of a new human corneal equivalent based on immortalised cell lines. 14<sup>th</sup> International Workshop on In Vitro Toxicology: INVITOX, 2. - 5. Oktober 2006, Ostende (Belgien)

Seeber, J.W., Lombardi-Borgia, S., Schäfer-Korting, M., Engelke, M., Characterisation of morphology and barrier properties of a human corneal epithelium cell line. 13<sup>th</sup> Congress on Alternatives to Animal Testing, 2. - 4. Juni 2006, Linz (Österreich)

Seeber, J.W., Manzer, A.K., Schäfer-Korting, M., Engelke, M., Optimization of a tissue engineered human cornea: Stabilization by glutaraldehyde crosslinking. DPhG-Tagung, 5. - 8. Oktober 2005, Mainz

Zorn-Kruppa, M., Engelke, M., Tykhonova, S., Scholz, H., Manzer, A.K., Seeber, J.W., Rusche, B., A tissue engineered human corneal model for the prediction of ocular irritation. 5<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 21. - 25. August 2005, Berlin

### VORTRÄGE

Seeber, J.W., Lombardi-Borgia, S., Schäfer-Korting, M., Engelke, M., Morphology and Barrier Properties of a New Human Corneal Epithelium Model. International Congress on eye and skin irritation, burns and decontamination, 12. - 13. Oktober 2007, Köln

Seeber, J.W., Ein humanes Kornea-Konstrukt zur Identifizierung okularer Irritationen. Doktorandenforum Natur und Wissenschaft der Studienstiftung des deutschen Volkes, Tagung Frühjahr 2007, 22. - 25. April 2007, Lutherstadt Wittenberg

Seeber, J.W., Rekonstruktion eines humanen in vitro-Kornea-Modells. Doktorandenforum Natur und Wissenschaft der Studienstiftung des deutschen Volkes, Tagung Herbst 2005, 1. - 4. Dezember 2005, Burg Liebenzell

### AUSZEICHNUNG

Prix Prevor 2007 (Best Presentation). A 3-D Corneal Construct with Human Corneal Cells. International Congress on eye and skin irritation, burns and decontamination, 12. - 13. Oktober 2007, Köln

### STIPENDIEN

Promotionsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes (Juli 2005 – Juni 2008)

Kurzstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes (August 2007), Kongressreise zum 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Tokyo (Japan)

Kurzstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes (September – November 2006), Forschungsaufenthalt am Eye Institute der University of Ottawa (Kanada)

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	Tierversuche und Alternativmethoden .....	1
1.2	Politische Maßnahmen zur Einschränkung von Tierversuchen .....	2
1.3	Methoden zur Bestimmung der okularen Toxizität .....	3
1.4	Anatomie, Physiologie und Funktionalität der Kornea .....	12
1.5	Differenzierung des kornealen Epithels .....	16
1.6	Korneale Absorption von Arzneistoffen .....	21
1.7	Problemstellung und Zielsetzung .....	22
2	MATERIAL UND METHODEN .....	25
2.1	Material .....	25
2.1.1	Technische Geräte .....	25
2.1.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterial .....	26
2.1.3	Zellkulturmedien .....	28
2.1.4	Lösungen zur Zellkultivierung .....	29
2.1.5	Stromapräparation nach Zorn-Kruppa .....	29
2.1.6	Stromapräparation nach Griffith .....	30
2.1.7	Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie .....	30
2.1.8	Fixationsmedium nach Karnovsky .....	31
2.1.9	Lösungen für die Zellyse und die Proteinbestimmung .....	31
2.1.10	Lösungen für die Western Blot-Analyse .....	32
2.1.11	Lösungen der Testsubstanzen .....	33
2.2	Humane Zellkulturen .....	34
2.3	Aufbau der humanen Kornea-Konstrukte .....	35
2.4	Untersuchungen zur Zellproliferation an Epithelzellen mittels Durchflußzytometrie .....	38
2.5	Lichtmikroskopische Untersuchungen .....	39
2.6	Transelektronenmikroskopische Untersuchungen .....	40
2.7	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen .....	40
2.8	Proteindetektion mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot-Analytik .....	42
2.9	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) .....	44
2.10	Messung der parazellulären Permeabilität .....	45
2.11	Messung der Esteraseaktivität .....	46
2.12	Testung auf Gewebsregeneration .....	47
2.13	Statistik .....	47
3	ERGEBNISSE .....	49
3.1	Rekonstruktion des Zorn-Kruppa-Modells .....	49
3.2	Entwicklung und Charakterisierung des Epithel-Modells .....	51
3.2.1	Einfluss verschiedener Medien auf die Adhärenzfähigkeit der Epithelzellen .....	52
3.2.2	Vergleich des Wachstums der Epithelzellen in verschiedenen Kulturmedien .....	53

3.2.3	Einfluss verschiedener Kulturmedien auf die Morphologie des Epithel-Modells .....	54
3.2.4	Einfluss verschiedener Kulturmedien auf die Barriereigenschaften des Epithel-Modells .....	58
3.2.5	Charakterisierung der Metabolisierungsaktivität.....	69
3.2.6	Gewebsregeneration.....	71
3.3	Entwicklung und Charakterisierung des Stroma-Epithel-Modells .....	72
4	DISKUSSION .....	78
4.1	Einfluss der Kulturmedien auf die Morphologie .....	78
4.2	Einfluss der Kulturmedien auf die Barriere .....	83
4.3	Esteraseaktivität.....	88
4.4	Gewebsregeneration .....	89
4.5	Rekonstruktion des Stroma-Epithel-Modells .....	90
4.6	Ausblick.....	92
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	96
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	101
7	LEBENS LAUF .....	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A	Fläche der Filtermembran
AA	Ascorbinsäure
ALDH	Aldehyddehydrogenase
BAC	Benzalkoniumchlorid
BCOP-Test	Rinderhornhaut Opazitäts- und Permeabilitätstest
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BPE	Rinderhypophysenextrakt
BSA	Bovines Serumalbumin
BwM	Bowman-Membran
C <sub>0</sub>	Ausgangskonzentration im Donorkompartiment
CEM	Korneales Differenzierungsmedium Cambrex <sup>®</sup> (Lonza, Verviers, Belgien)
CYP	Cytochrom P
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DM	Descemet-Membran
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Europäische Kommission
ECVAM	Europäisches Zentrum zur Validierung alternativer Methoden
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N' -tetraessigsäure
En	Endothel
Ep	Epithel
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
FACS	fluorescence activated cell sorting
FD	Fluoresceindiacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
GA	Glutaraldehyd
HaCaT	Humane, spontan transformierte Keratinozyten Zelllinie

HC	Hydrocortison
HCC	Humanes Kornea-Konstrukt
HCE	Humane korneale Epithelzelllinie
HCEC	Humane korneale Endothelzelllinie
HCK	Humane korneale Keratocytenzelllinie
hEGF	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HET-CAM	Hühnerei-Test an der Chorion-Allantois-Membran
ICE-Test	Test am isolierten Auge eines Huhnes
IF	Intermediärfilamente
IRE-Test	Test am isolierten Kaninchenauge
J	Flux
KBM	Keratinozytenbasalmedium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KGM	Keratinozytenwachstumsmedium
MA	Macula adherentes
MMAS	modified maximum average score (Draize score)
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert; Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
P	Permeabilitätskonstante
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4
PI	Propidiumiodid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RA	Retinsäure
REACH	Registrierung, Bewertung und Zulassung von Chemikalien
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SP	Stroma-Matrix
SSC	Seitwärtsstreulicht
SV40	Simianes Virus 40 (Polyomaviridae)
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TG	Transglutaminase
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TJ	Zonula occludentes (tight junction)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
V	Volumen des Akzeptorkompartiments
$V_K$	Verteilungskoeffizient
WST	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolium]-1, 3-benzendisulfonat
ZA	Zonula adherentes
ZO-1	Zona occludin 1

## **EINLEITUNG**

---

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Tierversuche und Alternativmethoden

Die Verwendung von Tieren für experimentelle Zwecke wird in unserer Gesellschaft vehement in Frage gestellt. Im Wesentlichen werden heute drei Gründe vorgebracht, warum Tierversuche durch Alternativen ersetzt werden sollten. Vom wirtschaftlichen Standpunkt aus sind Tierversuche kosten- und personalintensiv und deshalb betriebswirtschaftlich schwer zu vertreten. Die wissenschaftliche Argumentation gegen Tierversuche beruft sich auf schlechte Reproduzierbarkeit und mangelnde Übertragbarkeit von Tierversuchen auf den Menschen und fordert feinere Messmethoden. Vor allem aber, und für die breite Öffentlichkeit am wichtigsten, sind es ethische Gründe, die für Alternativmethoden sprechen.

Der Einsatz von Tieren zu Versuchszwecken erfolgt in der biomedizinischen Forschung, in der Arzneimittelentwicklung, zur Substanzprüfung auf Verträglichkeit und Unbedenklichkeit, zur Qualitätskontrolle von Produkten und im Umweltschutz. Laut Tierschutzbericht 2007 wurden 2,4 Millionen Versuchstiere auf nationaler und 10,7 Millionen auf europäischer Ebene eingesetzt. Zur Erforschung von Erkrankungen von Menschen oder Tieren wurden 54,5 % der Tiere, für rechtlich vorgeschriebene Versuche bei der Herstellung oder Qualitätskontrolle von Produkten für die Human-, Zahn- oder Veterinärmedizin bzw. für toxikologische Sicherheitsprüfungen wurden 18,8 % der Tiere eingesetzt (Tierschutzbericht, 2007).

In den letzten 20 Jahren haben Verfahren, die es gestatten auf Tierversuche zu verzichten, weltweit eine rasante Entwicklung genommen. Angestoßen haben diese Entwicklung William Russell und Rex Burch, die schon 1959 mit ihrem „Prinzip der 3 R“ (Refine, Reduce, Replace) die Möglichkeiten für Alternativmethoden systematisch vorstellten (Russell & Burch, 1959). Alternativmethoden können sich gemäß dieser wegweisenden Arbeit in einem Raster von Verbesserung, Verringerung und Ersatz von Tierversuchen bewegen (Balls, 2007; Balls et al., 1995). Durch eine Verbesserung und Weiterentwicklung von Tierversuchen soll eine Entlastung des Versuchstiers von Stress, Schmerz,

Angst oder Leiden erreicht sowie aus dem einzelnen Tierversuch mehr Information gewonnen werden. Eine Reduzierung von Tierversuchen wird dadurch ermöglicht, dass dem Tierversuch geeignete andere Verfahren vorangehen bzw. durch internationale Harmonisierung und adäquate statistische Methoden die Anzahl der Tests verringert wird. Ein vollständiges Ersetzen von Tierversuchen schließlich kann vielleicht einmal durch Versuche an isolierten Organen oder mit Zellkulturen aus tierischem und menschlichem Gewebe, durch biochemische Tests, durch physikalisch-chemische Methoden oder durch Computer-Modelling erreicht werden (Reinhardt, 1990).

### 1.2 Politische Maßnahmen zur Einschränkung von Tierversuchen

**REACH-Verordnung.** Vor dem Hintergrund der aktuellen EU-Gesetzgebung wird die Notwendigkeit der Entwicklung und Validierung alternativer Testmethoden im Allgemeinen deutlich (Huggins, 2003), um sie als adäquaten Ersatz für Tierversuche anzuerkennen. Die neue Chemikalienverordnung der EU zur Registrierung, Evaluierung und Autorisierung von Chemikalien (REACH-Verordnung) ist am 1. Juni 2007 in Kraft getreten. Die Hauptziele von REACH sind die Verbesserung des Schutzes der menschlichen Gesundheit und der Umwelt vor möglichen chemikalienbedingten Risiken. Hierbei wurden unter der vorherigen Chemikaliengesetzgebung gravierende Schwächen gesehen, insbesondere durch Wissenslücken auf dem Gebiet der chemischen Altstoffe: Während nach dem vorherigen System die so genannten „angemeldeten Stoffe“ – ab September 1981 in Verkehr gebrachte Chemikalien – umfassend hinsichtlich ihrer Gefährlichkeit für Umwelt und Gesundheit bewertet werden mussten, unterlagen die vor 1981 auf dem Markt gebrachten Altstoffe nie solchen umfassenden Prüfvorschriften. Gegenüber nur knapp 3.000 angemeldeten und geprüften Stoffen gibt es jedoch circa 100.000 verschiedene Altstoffe auf dem heutigen Markt – gerade also die Stoffe für die relevante Wissenslücken befürchtet werden. Aus diesem Grunde schreibt REACH vor, sicherheitstoxikologische Basisinformationen von Chemikalien in einem einheitlichen System zu erfassen. Für chemische Stoffe, die in einer Menge von über einer Tonne pro Jahr und Hersteller in Verkehr gebracht werden, sind ausführliche Angaben im Hinblick auf die Risiken für Mensch und Umwelt erforderlich. Dies hat zur Folge, dass für rund 30.000 Altstoffe, die über dieser Mengenschwelle liegen, entsprechende Nachuntersuchungen im Rahmen

einer Registrierung erforderlich werden. Diese ungeheure Anzahl von Industriechemikalien – sie übersteigt die bereits toxikologisch charakterisierten angemeldeten Substanzen fast hundertfach – können keinesfalls alle dem Standardprogramm toxikologischer Tierversuche zugeführt werden. Im schlimmsten Fall wären 45 Millionen und im günstigsten Fall, d.h. unter Einbeziehung bereits existierender „in-house“ Daten aus Toxizitätsuntersuchungen der Industrie, Informationen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SARs) sowie intelligenter Teststrategien bis zu 7,5 Millionen Tierversuche zusätzlich zu dem aktuellen Verbrauch erforderlich. Der Bedarf an einfachen und aussagefähigen Alternativmethoden wächst somit erheblich (Hofer et al., 2004).

**Direktive 2003/15/EG.** Auch die am 11. März 2003 in Kraft getretene siebte Änderung der EU-Kosmetikrichtlinie (Direktive 2003/15/EG) beinhaltet als Schlüsselement die „Vermeidung von Tierversuchen“. In einem ersten Schritt wurden Tierversuche für die Prüfung von kosmetischen Fertigprodukten wie Shampoos, Lippenstifte oder Duschcremes ab September 2004 in der EU verboten. Weiterhin wurde ein Tierversuchsverbot für die Inhaltsstoffprüfung – wie etwa Tenside, Konservierungs- oder Duftstoffe – ab 2009 festgelegt. Auch der Verkauf von Kosmetika, die außerhalb der EU in Tierversuchen getestet wurden, wird zukünftig EU-weit verboten. Dieses Importverbot tritt generell 2009 in Kraft. In bestimmten Ausnahmefällen sind Tierversuche bis einschließlich 2013 erlaubt, dann müssen auch für diese Ausnahmebereiche tierversuchsfreie Testmethoden entwickelt worden sein.

Es wird also deutlich, dass auf diesem Gebiet Forschungs- und Handlungsbedarf besteht.

### 1.3 Methoden zur Bestimmung der okularen Toxizität

**Der Kaninchen-Augen-Irritationstest nach Draize.** Kaum ein Tierversuch wird so stark kritisiert wie der Augen-Irritations-Test am Kaninchen, der 1944 von dem amerikanischen Toxikologen John M. Draize entwickelt wurde (Draize et al., 1944; Friedenwald et al., 1944; ILSI TCAAT, 1996). Bei diesem Test werden sechs Versuchskaninchen steigende Konzentrationen der potentiell augenreizenden Prüfsubstanz in je ein Auge geträufelt. Das andere Auge dient als Kontrolle. Die Reaktion des behandelten Auges wird anschließend in definierten Abständen (1h,

24h, 48h, 72h so dann bis zu 21 Tagen) beobachtet. Die Augenschädigungen der Tiere, die nach einem Standardschema protokolliert werden, reichen von Rötungen und Schwellungen der Bindehaut, Trübung der Hornhaut und Narbenbildung bis hin zur Erblindung mit Todesfolge.

Aufgrund der hohen Schmerzempfindlichkeit des Auges ist der Draize-Test ein extrem belastender Tierversuch. Außerdem gilt er als schlecht reproduzierbar, da die Beurteilung der klinischen Parameter am Kaninchenauge sehr subjektiv ausfällt (Weil & Scala, 1971). Als problematisch werden auch die strukturellen und physiologischen Unterschiede zwischen dem Auge des Kaninchens und dem menschlichen Auge angesehen (Atkinson et al., 1992), was Zweifel an der Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Kaninchen auf den Menschen aufkommen läßt. Der Test wird daher seit langem auch von Toxikologen heftig kritisiert (Rowan, 1981; Sharpe, 1985; Wilhelmus, 2001)!

### **Bedeutung der bisher entwickelten Alternativmethoden zum Draize-Test.**

Derzeit sieht die OECD-Prüfrichtlinie 405 (*Acute Eye Irritation/Corrosion*) eine sequenzielle Test- und Bewertungsstrategie vor, bei der vorhandene Erfahrungen am Menschen, die Vorhersage mittels Struktur-Wirkungs-Beziehungen sowie bestimmte chemisch-physikalische Eigenschaften – wie etwa extreme pH-Werte – dazu genutzt werden können, auf den Tierversuch zu verzichten (OECD TG 405, 2002). Darüber hinaus wurden von Mitte der 1980er bis Mitte der 1990er Jahre Validierungsstudien zum Ersatz des Draize-Tests am Kaninchenauge durchgeführt. Das Ergebnis dieser *ex vivo*-Studien hat dazu geführt, dass seit 1995 in Europa vier organotypische *in vitro*-Tests zur Klassifizierung und Kennzeichnung von Stoffen mit stark augenreizenden Eigenschaften (R41) verwendet werden dürfen. Es handelt sich dabei um den BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability), den HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane) und den IRE (Isolated Rabbit Eye) beziehungsweise den ICE (Isolated Chicken Eye) Test. Eine Vorhersage von schwach augenreizendem Potenzial (R36) oder der Abwesenheit augenreizender Eigenschaften mit den genannten *in vitro*-Methoden ist bisher behördlich nicht akzeptiert (Expert Panel Report, ICCVAM) (*Tab. 1*).

Method	Organ	Anerkennung	Testungsabsicht	Referenzen
BCOP	Isolierte Rinderkornea	ICCVAM; ECVAM	R41	(Muir, 1985)
ICE	Isoliertes Hühnerauge	ICCVAM; ECVAM	R41	(Prinsen & Koeter, 1993)
IRE	Isoliertes Kaninchenaug	(a)	R41	(Burton et al., 1981)
HET-CAM	Bebrütetes Hühnerrei	(a)	R41	(Lüpke, 1992; Spielmann et al., 1993)

Tab. 1: Validierte *in vitro*-Testsysteme zur Klassifizierung von R41. (a) Obwohl formell nicht als valide anerkannt, können die Ergebnisse zur Einstufung und Kennzeichnung für stark augenreizende Stoffe (R41) EU-weit genutzt werden.

**Immortalisierte Zellkulturen des kornealen Epithels.** Neben diesen *ex vivo*-Alternativen haben *in vitro*-Modelle auf Zellkulturbasis in den letzten zehn Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Allerdings konnten auch diese Korneaäquivalente den hohen Erwartungen an eine Alternativmethode nicht gerecht werden: Die Misserfolge in den Validierungsstudien der bisher existierenden Zellkulturmodelle lassen sich damit erklären, dass diese Modelle die komplexe *in vivo*-Situation nur unzureichend darstellen (Balls et al., 1999; Spielmann & Liebsch, 2001). Beispielsweise zeigen sowohl das kommerziell erhältliche EpiOcular<sup>TM</sup>-Modell (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) primärer dermaler Keratinozyten sowie das S-HCE-Modell (SkinEthic Laboratories, Nizza, Frankreich) eine höhere Sensibilität als intakte Kornea (Kaluzhny et al., 2007; Van Goethem et al., 2006). Die Tests sind somit überprädiktiv; sie liefern keine zuverlässigen Voraussagen über die Toxizität von Prüfsubstanzen. Dennoch gelten solche *in vitro*-Modelle als sinnvolle Testsysteme, da diese nicht nur wertvolle Daten bezüglich der Okulotoxizität, sondern auch wegweisende Erkenntnisse auf dem Gebiet der okularen Wundheilung, der regenerativen Therapie, der Arzneistoffmetabolisierung sowie -absorption liefern. Im Folgenden sollen deshalb die bereits etablierten epithelialen Zelllinien und deren Modelle vorgestellt werden:

**HCE-T-Zelllinie.** Kahn et al. transfizierten die ersten humanen kornealen Epithelzellen mit dem SV40 T-Antigen-Plasmid pRSV-T (HCE-T; (Kahn et al., 1993). Die HCE-T-Zellen zeigen morphologische und phänotypische Charakteristika ähnlich denen primärer Zellkulturen. HCE-T-Zellkulturen bewahren ihre funktionelle Viabilität über einen Zeitraum von drei Wochen hinweg. Obwohl

die Zelllinie ursprünglich für Toxizitätsstudien etabliert worden war, stellte sich ihre Anwendung als äußerst limitiert heraus, da Viruspartikel ins Kulturmedium ausgeschieden wurden (Kruszewski et al., 1997; Ward et al., 1995).

**HCE-Zelllinie.** Daraufhin entwickelten Araki-Sasaki et al. eine SV40-immortalisierte humane korneale Zelllinie (HCE), die nach Infektion der Zellen keine SV40-viralen Partikel mehr produzierte (Araki-Sasaki et al., 1995). Diese Zelllinie wächst über 400 Generationen und zeigt einen backsteinartigen Phänotypus ähnlich dem des humanen epithelialen Erscheinungsbildes. Die Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze führt innerhalb von drei Wochen zu einem fünf- bis achtlagigen Gewebe, dessen Oberflächenzellen abgeflacht und mit Microvilli besetzt sind. Jene Zelllinie gilt als hinreichend charakterisiert bezüglich ihres Permeationsvermögens und der metabolischen Aktivität (Ranta et al., 2003; Toropainen et al., 2001; Toropainen et al., 2003). HCE-Zellen wurden ebenfalls für Zytotoxizitäts- (Huhtala et al., 2003; Huhtala et al., 2002; Saarinen-Savolainen et al., 1998) und Wundheilungsstudien (Filenius et al., 2003; Murphy et al., 1998) herangezogen. Die HCE-Zellen sind zudem Bestandteil des von Zorn-Kruppa et al. rekonstruierten Kornea-Modells (Zorn-Kruppa et al., 2005). Diese Modelle fordern die Kultivierung in serumhaltigem Medium (15 %). Dieser sehr hohe Anteil an Serum ist aufgrund seiner nicht-standardisierten Zusammensetzung von Wachstumsfaktoren, Hormonen, Vitaminen und Spurenelementen (Boxberger, 2006; Schroedel, 2007) ursächlich für eine schlecht reproduzierbare Aufzucht. Der Wunsch nach einem validierbaren *in vitro*-Modell auf der Grundlage von reproduzierbaren Kultivierungsbedingungen regte die vorliegende Arbeit an (*siehe 1.5; Differenzierung in vitro*).

**CEPI-17-CL4-Zelllinie.** Offord et al. immortalisierten primäre humane korneale Epithelzellen mit einem rekombinaten SV40 T-Antigen-retroviralen Vektor (Offord et al., 1999). Später erfolgte eine Klonierung der Population mit dem besten Zellwachstum. Diese Zelllinie (CEPI-17-CL4) zeigt einen dem humanen Epithel ähnlichen Phänotypus und wächst über 200 Passagen hinweg unverändert. Die Expression der Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie der metabolischen Enzyme ist vergleichbar mit der Expression in humanen Epithelzellen (Offord et al., 1999). Diese Zelllinie wurde von Reichl et al. für den Aufbau eines Kompletmodells der Kornea verwendet (*siehe 1.3; Komplet-Modelle der Kornea*) (Reichl et al., 2004).

**HPV16-E6/E7-Zelllinie.** Das kommerziell erhältliche C-HCE-Modell (Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz) nutzt Epithelzellen, die durch den Tetrazyklin-responsiven humanen Papillomavirus HPV16-E6/E7 transfiziert wurden (Mohan et al., 2003). Die immortalisierten Zellen zeigen eine typische korneale Epithelzell-Morphologie, exprimieren charakteristische Keratine und bilden ein ausdifferenziertes Multilayer mit Oberflächen-Microvilli und Desmosomen (C-HCE-Modell). Die Fluorescein-Permeation wurde bestimmt, dahingegen fehlt eine Charakterisierung der Arzneistoff-Permeabilität bzw. der physikalischen Barriereigenschaften.

**IHCEC-Zelllinie.** Die durch Beuermann am *Eye Center* der *Louisiana State University* immortalisierte IHCEC-Zelllinie ist die Grundlage des kommerziell erhältlichen humanen Epithelmodells (S-HCE-Modell) für *in vitro*-Toxizitätstestungen (SkinEthic Laboratories, Nizza, Frankreich). IHCEC-Zellen werden in einem chemisch definierten Medium auf Polycarbonat-Kultureinsätzen an der Luft-Medium-Grenze kultiviert. Unter diesen Bedingungen wächst ein vollständig differenziertes Epithel heran. Desmosomen, Hemidesmosomen, Laminin- und Keratinexpression wurden untersucht. Der Einsatz dieses Modells beschränkt sich auf die Toxizitätsprüfungen (Doucet et al., 2006; Van Goethem et al., 2006). Die Eignung für Permeabilitätsstudien wurde bisher noch nicht getestet.

**SIRC-Zelllinie.** Die kontinuierlich wachsenden SIRC-Zellen (Statens Seruminstitut Rabbit Corneal Cells) wurden in den letzten drei Jahrzehnten in zahlreichen Permeabilitäts- (Dey et al., 2003; Tak et al., 2001; Talluri et al., 2006) und Toxizitätsstudien (North-Root et al., 1985; Scuderi et al., 2003) eingesetzt, obwohl man herausfand, dass es sich bei dieser Zelllinie nicht um korneale Epithelzellen, sondern um Keratozyten handelt (Niederhorn et al., 1990). Sie wachsen als dichtes Monolayer und bilden eine effektive Barrierefunktion aus (Goskonda et al., 1999). Das Modell wurde bereits erfolgreich zur Vorhersage von Arzneistoff-Permeation über die Kornea hinweg eingesetzt (George et al., 2000).

Die verschiedenen Zelllinien und die daraus resultierenden Epithel-Modelle sowie deren Charakterisierung und mögliche Anwendungsgebiete sind in *Tabelle 2* zusammengefasst.

Zelllinie/ Spezies	Kultivierungs- bedingungen	TEER [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]	Charakteri- sierung	Anwendung	Referenzen
<b>HCE-T</b> Human <i>NESTEC</i>	Luft-Medium- Grenze  Kollagen- beschichtung  Serumfrei  6 Tage Kulti- vierungsdauer	~ 400-600	Morphologie  Biophysikalische Parameter  Keratinmuster	Genregulations- studien  Zellbiologie  Toxizitätstestung	(Kahn et al., 1993; Kruszewski et al., 1997; Ward et al., 1995)
<b>HCE</b> Human	Luft-Medium- Grenze  Kollagen- beschichtung  15 % Serum  3-4 Wochen Kultivierungsdau- er	~ 400-800	Morphologie  Biophysikalische Parameter  Permeabilität  Esteraseaktivität  Parazelluläre Porengröße	Permeations- studien  Toxizitätstestung  Wundheilungs- studien	(Araki-Sasaki et al., 1995; Ranta et al., 2003; Toropainen et al., 2007; Toropainen et al., 2001; Toropainen et al., 2003)
<b>CEPI-17-CL4</b> Human		k. A.	Morphologie  Keratinmuster  Zytokin- expression  Wachstums- faktoren	Toxizitätstestung  Wundheilungs- studien	(Offord et al., 1999; Reichl et al., 2004)
<b>HPV16-E6/E7</b> Human C-HCE-Modell <i>Lonza</i>	Luft-Medium- Grenze  Serumfrei	~ 1500- 1700	Morphologie  Biophysikalische Parameter  Gewebs- regeneration	Toxizitätstestung	(Halbert et al., 1991; Powers et al., 2007)
<b>IHCEC</b> Human S-HCE-Modell <i>SkinEthic</i>	Luft-Medium- Grenze  Serumfrei	~ 90-120	Morphologie  Biophysikalische Parameter  Mukosubstanzen	Toxizitätstestung	(Doucet et al., 2006; Van Goethem et al., 2006)
<b>Primäre Kerationzyten</b> Human EpiOcular™ <i>MatTek</i>	Luft-Medium- Grenze  Serumfrei	k. A.	Morphologie	Toxizitätstestung	(Klausner et al., 2005; Ricker et al., 1994)
<b>SIRC</b> Kaninchen	Luft-Medium- Grenze  10 % Serum	~ 300- 1300	Morphologie  Biophysikalische Parameter	Permeations- studien  Toxizitätstestung	(Nieder Korn et al., 1990)

Tab. 2: *Immortalisierte Zelllinien des kornealen Epithels tierischen sowie humanen Ursprungs.*

**Komplett-Modelle der Kornea.** Die vollständige Rekonstruktion der Kornea aus allen drei Zelltypen gelang erstmals Minami et al. mittels primärer Zellen, die aus dem Rinderauge isoliert wurden (Minami et al., 1993). Sie entwickelten eine Methode zur Kultivierung der epithelialen Schichten an der Luft-Medium-Grenze und konnten dabei die Ausbildung typischer kornealer epithelialer Strukturen beobachten. Ebenfalls ausgehend von primären bovinen Zellen rekonstruierten Tegtmeyer et al. ein Komplettmodell für Permeationsstudien von Arzneistoffen zur ophthalmologischen Anwendung (Tegtmeyer et al., 2001; Tegtmeyer et al., 2004). Zieske et al. beschrieben ein dreidimensionales Konstrukt bestehend aus epithelialen und stromalen Kaninchenzellen sowie einer kontinuierlichen Zelllinie von endothelialen Zellen der Maus (Zieske et al., 1994). Zieske et al. konnten die Bedeutung der Kultivierungsbedingungen an der Luft-Medium-Grenze und der Anwesenheit von Endothelzellen im Konstrukt auf die Ausbildung einer Basalmembran zeigen.

Auf der weiteren Suche nach einem *in vitro*-Modell für toxikologische Untersuchungen als Alternative zum Draize-Test untersuchten Schneider et al. die Kultivierung eines Konstrukts aus porcinen Zellen, die sie aus fetalem Gewebe isolierten (Schneider, 1997; Schneider et al., 1999). Sie konnten an ihrem Modell, das über die gesamte Kultivierungsdauer submers kultiviert wurde, ebenfalls die Ausbildung von Basalmembrankomponenten sowie von verschiedenen Mukosubstanzen im stromalen Gewebe nachweisen. Das Modell, welches von Reichl et al. in Hinblick auf die Verwendung zu Studien über das transkorneale Permeationsverhalten entwickelt wurde, bediente sich ebenfalls primärer porciner Zellen (Reichl & Müller-Goymann, 2003).

Humane primäre Korneazellen wurden erstmals von Germain et al. isoliert und zur Rekonstruktion eines Komplettmodells eingesetzt (Germain et al., 1999; Germain et al., 2000).

Nachteil all dieser Modelle ist, dass durch die Verwendung von Primärkulturen nur eine begrenzte Anzahl an Korneamodellen rekonstruiert werden kann und sie fast alle tierischen Ursprungs sind. Im Hinblick auf ein prädiktives Testsystem ist eine Übertragung auf die humane Ebene vonnöten und die Verwendung immortalisierter Zelllinien unumgänglich (Freshney & Freshney, 1996), um die Bedingungen *in vivo* bestmöglich zu simulieren und eine Standardisierung zu gewährleisten. Reproduzierbare Testresultate und die gleichzeitige Bereitstellung

von Testmodellen in bedarfsgerechter Zahl – entsprechend dem erheblichen Mehrbedarf der chemischen Industrie (*siehe 1.2*) – scheinen so möglich:

Das erste auf der Basis immortalisierter humaner Kornea-Zelllinien geschaffene Gewebeäquivalent zur regenerativen Therapie stellte die auf diesem Gebiet führende Forschergruppe um May Griffith vor (Griffith et al., 1999). Dieses Modell zeigte starke Ähnlichkeiten mit dem Originalgewebe hinsichtlich Morphologie, Transparenz, biochemischer Marker und Ionen-Transport.

Erst kürzlich gelang es Zorn-Kruppa et al., ein Konstrukt auf der Basis immortalisierter Zellen epithelialen und mesenchymalen Ursprungs zu entwickeln. Dieses bildet die Grundlage des vorliegenden Dissertationsvorhabens (Zorn-Kruppa et al., 2005; Zorn-Kruppa et al., 2004).

Reichl et al. stellten das HCC-Modell vor. Das humane Konstrukt, bestehend aus immortalisierten humanen Endothel-Zellen (HCEC), primären Keratozyten und immortalisierten humane Epithel-Zellen (CEPI-17-CL4) wurde bereits für okuläre Absorptionsuntersuchungen von Arzneistoffen (Meyer et al., 2005; Reichl et al., 2004; Reichl et al., 2005) und Nanosuspensionen (Friedrich et al., 2005) eingesetzt (*Tab. 3*).

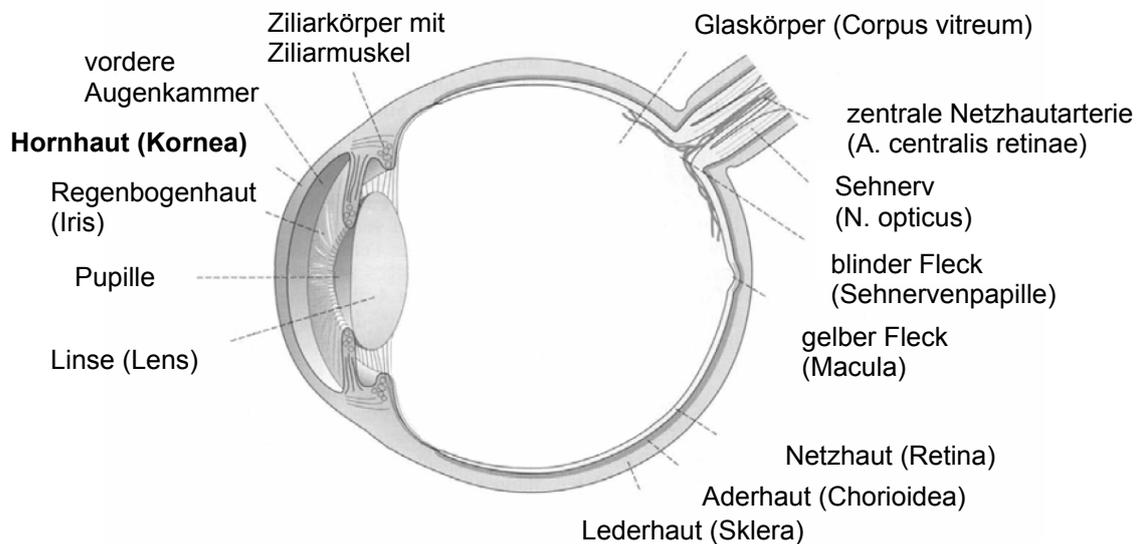
Spezies/ Zelllinie	Kultivierungs- bedingungen	Charakterisierung	Anwendung	Referenzen
<b>Human</b> HCE HCK HENC	Luft-Medium-Grenze 5 % Serum	Morphologie	Toxizitätstestung	(Zorn-Kruppa et al., 2005)
<b>Human</b> CEPI-17-CL4 HENC primäre Keratocyten	Luft-Medium-Grenze 2 % Serum	Morphologie, Ultrastrukturelle Analyse  Esteraseaktivität  Permeabilität	Permeations- und Metabolisierungs- studien;  Testung von Nanosuspensionen	(Friedrich et al., 2005; Meyer et al., 2005; Reichl et al., 2004; Reichl et al., 2005)
<b>Human</b> Immortalisierte Zelllinien	Luft-Medium-Grenze Serumfrei	Morphologie  Transparenz  Ionen-Transport  Biochemische Marker	Transplantation	(Griffith et al., 1999; Suuronen et al., 2004a)
<b>Human</b> Primäre Zellkultur	Submerse Kultivierung 10 % Serum 3-Tages-Kultur	Morphologie  Basalmembran- Komponenten  Keratinmuster	Toxizitätstestung	(Germain et al., 1999)
<b>Schwein</b> Primäre Zellkultur	Luft-Medium-Grenze 2 % NBCS	Morphologie  Permeabilität  Basalmembran- komponenten  Oberflächenstrukturen  Keratinmuster	Permeations- studien	(Reichl & Müller-Goymann, 2003)
<b>Schwein</b> Fetales Gewebe	Submerse Kultivierung 10 % Serum	Morphologie  Basalmembran- komponenten  Mukosubstanzen	Toxizitätstestung	(Schneider et al., 1999)
<b>Kaninchen</b> Immortalisierte Mäuse- Endothelzellen	Luft-Medium-Grenze Submerse Kultivierung 10 % NBCS	Morphologie, Ultrastrukturelle Analyse  Basalmembran- komponenten	Toxizitätstestung	(Zieske et al., 1994)
<b>Rind</b> Primäre Zellkultur	Luft-Medium-Grenze 20 % Serum	Morphologie, Ultrastrukturelle Analyse  Keratinmuster	Permeations- studien	(Minami et al., 1993; Tegtmeyer et al., 2001)

Tab. 3: *Komplett-Modelle der Kornea tierischen sowie humanen Ursprungs.*

### 1.4 Anatomie, Physiologie und Funktionalität der Kornea

Die Kornea gehört zum vorderen Augenabschnitt und trennt die vordere Augenkammer mit ihrem Kammerwasser von der Luftumgebung (*Abb. 1*). Sie hat somit eine ausgeprägte Schutzfunktion zu erfüllen.

Die Kornea bildet einen Teil des optischen Systems und nur durch ihre Transparenz wird der Sehvorgang erst ermöglicht. Diese bemerkenswerte Transparenz des Gewebes wird in erster Linie durch einen genau definierten Hydratationsgrad des Hornhautstromas, die Formkonstanz der Kornea und vor allem durch die Gefäßfreiheit gewährleistet (Rohen, 1996).



*Abb. 1: Waagerechter schematischer Querschnitt durch den linken Augapfel, von oben gesehen (Speckmann & Wittkowski, 1994).*

Die Hornhaut stellt eine konvex-konkave elliptische Linse dar, zirkulär durch den Limbus von der Sklera abgegrenzt (Maidowsky, 1980). Der Krümmungsradius dieser Linse beträgt zwischen 7-8 mm mit einer Brechkraft von 43 dpt. Der horizontale Durchmesser ist im Allgemeinen 1 mm größer als der vertikale Durchmesser und beträgt im Durchschnitt 11,6 mm. Die Hornhautdicke *in vivo* beträgt 0,52 mm im Zentrum und 0,67 mm in der Peripherie (Barraquer & Rutllan, 1991).

Histologisch betrachtet hat die Kornea eine verhältnismäßig einfache Struktur – im weitesten Sinne handelt es sich um einen fünfschichtigen Aufbau (*Abb. 2*):

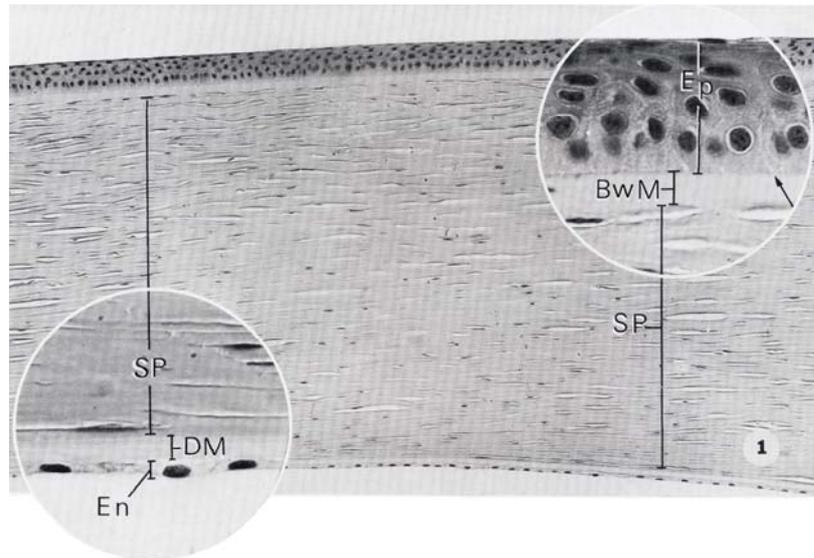


Abb. 2: Vertikalschnitt durch die humane Kornea. Epithel (Ep), Bowman-Membran (BwM), Stroma-Matrix (SP), Descemet-Membran (DM) und Endothel (En) (Ross et al., 1995).

**Epithel.** Das korneale Epithel ist ein nicht verhornendes mehrschichtiges Plattenepithel mit einer Dicke von ungefähr 50 µm. Dies entspricht etwa 10 % der gesamten Hornhautdicke. Das humane Korneaepithel besteht aus fünf bis sechs Zellschichten und ist unterteilt in drei Zelltypen: Basal-, Flügel- und Oberflächenzellen (Nishida, 1997). Die säulenartigen Basalzellen bilden eine einschichtige Zelllage, die mit Hemidesmosomen an der Basalmembran fixiert ist. Allein die Basalzellen besitzen mitotische Aktivität. Aus ihnen entstehen durch Migrationsprozesse die Flügel- und Oberflächenzellen. Die Oberflächenzellen schilfern schließlich ab und werden in den Tränenfilm abgegeben. Dieser Entwicklungsvorgang nimmt in etwa sieben Tage in Anspruch. Neue Basalzellen generieren sich aus den kornealen Stammzellen, die in der Limbusregion zwischen Kornea und Sklera liegen. Die Flügelzellen sind zwei- bis dreischichtig angeordnet und haben dünne stachelartige Fortsätze. Sie stellen ein Zwischenstadium im Differenzierungsprozess des Korneaepithels dar und enthalten weniger Organellen und Desmosomen als die Basalzellen. An der Oberfläche befinden sich zwei bis vier Lagen von langen, extrem flachen ausdifferenzierten Oberflächenzellen. Die Oberfläche der äußersten Zellen ist durch Falten (Microplicae) und Zotten (Microvilli) vergrößert. Ihnen ist der präkorneale Tränenfilm aufgelagert. Die Oberflächenzellen sind durch enge Zellkontakte (tight junctions), die eine interzelluläre Permeationsbarriere für

eindringende Substanzen bilden, fest miteinander verknüpft. Durch die Desmosomen der Basal- und Flügelzellen an den Vorder- und Seitenwänden sowie die basalen Hemidesmosomen-Verankerungen mit der Basalmembran wird das Korneaepithel widerstandsfähig gegen mechanische Beanspruchung.

**Basalmembran.** Die 40-60 nm dicke Basalmembran wird wahrscheinlich von den Basalzellen selbst gebildet. Hauptbestandteile sind Kollagen Typ IV, Laminin sowie Fibronectin. Die Basalmembran soll für die Erhaltung eines mehrschichtigen, gut organisierten Epithels und dessen Adhäsion an das Hornhautstroma wichtig sein (Nishida, 1997).

**Bowman-Schicht.** Die Bowman-Schicht – auch Bowman-Membran genannt – ist ein 12 µm dickes azelluläres Band zwischen Basalmembran und Stroma. Die Bowman-Schicht ist weniger eine Membran als eine Ansammlung von zufällig angeordneten Kollagenfibrillen des Typ I und III und Proteoglykanen. Die genaue biologische Funktion der Bowman-Schicht ist noch nicht vollständig geklärt, doch scheint auch sie der Strukturhaltung des Epithels zu dienen. Wird sie beschädigt, kann sie sich nicht bzw. nur unter Narbenbildung regenerieren. Interessanterweise verfügt die Kornea der meisten Säugetiere, die im Tierversuch sowie bei *ex vivo*-Methoden zur Testung auf okuläre Toxizität Verwendung finden, über keine Bowman-Schicht.

**Stroma.** Das Stroma macht ca. 90 % der gesamten Hornhautdicke aus. Es ist die mittlere und mit 400-500 µm die dickste Schicht der Hornhaut. Das Hornhautstroma besteht hauptsächlich aus Wasser (75 %), extrazellulärer Matrix sowie zu zwei bis drei Prozent aus spindelförmigen stromalen Zellen, die auch als Keratozyten bezeichnet werden und im stromalen Gewebe netzwerkartig eingebettet vorliegen. Das korneale Stroma enthält ebenfalls Nervenfasern. Die extrazelluläre Matrix, welche von den Keratozyten synthetisiert wird, besteht im Wesentlichen aus Kollagen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen. Mit dem Elektronenmikroskop betrachtet erscheinen die Kollagenfibrillen nicht ausgereift; sie behalten das ganze Leben lang einen embryonalen Charakter. Sie sind alle ähnlich dick (ca. 25-30 nm) und innerhalb einer Lamelle parallel angeordnet. Die Kollagenfibrillen haben mit 10 % Kollagentyp III und 90 % Kollagentyp I ein für Bindegewebe typisches Kollagenmuster. Man geht davon aus, dass sich im Stroma etwa 100-150 Lamellen mit Fibrillen befinden, die ca. 5-6 µm dick sind. Die Lamellen kreuzen sich jeweils unter einem Winkel von 90°, verlaufen parallel zu

den anderen Schichten und bilden auf diese Weise ein regelmäßiges Gitter von besonders hoher Stabilität. Diese Anordnung ist neben dem Quellungsgleichgewicht eine der Voraussetzungen für die Transparenz der Hornhaut.

**Descemet-Membran.** Die lichtmikroskopisch homogen erscheinende Descemet-Membran ist vermutlich ein Ausscheidungsprodukt des Endothels. Sie kompensiert die mit zunehmendem Alter abnehmende Pumpleistung des Endothels. Die Descemet-Membran ist durchsichtig und besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern des Typs IV und Laminin. Die Kollagenfibrillen bilden ein regelmäßiges, zweidimensionales Sechseckraster. Damit wird die Descemet-Membran zur widerstandsfähigsten elastischen Membran der gesamten Kornea. Als Schutzschicht für das Endothel wirkt die Descemet-Membran effektiv Infektionen, mechanischen und chemischen Verletzungen sowie enzymatischer Zerstörung entgegen. Verletzungen heilen, ähnlich der Bowman-Schicht, nur unter Narbenbildung aus.

**Endothel.** Das Endothel stellt die innere Schicht der Kornea dar und bildet die Oberflächenbedeckung gegen die vordere Augenkammer. Es besteht aus einer Einzelschicht hexagonaler Zellen. Diese sind etwa 5 µm dick und haben einen Durchmesser von ca. 20 µm. Normalerweise sind die Zellen in ihrer Form regelmäßig und ähnlich groß. Endothelzellen besitzen große Kerne und reichlich zytoplasmatische Organellen wie Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, freie Ribosomen und einen ausgeprägten Golgi-Apparat. Damit sind die Endothelzellen aktiv am Stoffwechsel beteiligt. Absterbende oder ausfallende Zellen werden durch Polymorphismus und Polymegatismus ersetzt. Dabei verlieren die Zellen ihre sechseckige Form, und es entstehen Zellen unterschiedlicher Form und Größe. Durch diesen Vorgang ist gewährleistet, dass die Descemet-Membran immer vollständig von Endothelzellen bedeckt bleibt. Für die Aufrechterhaltung der Pumpleistung des Endothels ist eine Zelldichte von mindestens 300-800 Zellen/mm<sup>2</sup> nötig, andernfalls kommt es zur Dekompression des Stromas und zur Eintrübung der Kornea. Eine der wichtigsten Aufgaben des Endothels ist es, die Aufrechterhaltung des Hydratationszustandes zu sichern und die Transparenz der Hornhaut zu erhalten. Eine weitere Aufgabe besteht in der Synthese bestimmter Komponenten der Descemet-Membran und der Regulierung des Austausches von Stoffwechselprodukten zwischen Kammerwasser und

Stroma. Das durch den Stoffwechselfvorgang eindringende Wasser muss von den Endothelzellen unter Verbrauch von Stoffwechselenergie wieder aus der Hornhaut herausgepumpt werden.

### 1.5 Differenzierung des kornealen Epithels

**Differenzierung *in vitro*.** Zelldifferenzierung *in vitro* sollte zur Expression phenotypischer Eigenschaften führen, die charakteristisch für die strukturell und funktionell ausdifferenzierte Zelle sind (Freshney, 1987). Mit zunehmendem Differenzierungsstatus der Zelle nimmt gleichzeitig deren Zellteilungsrate ab und die Synthese von Zelltyp-spezifischen Produkten steigt an. Es ist bekannt, dass sich Zellen, die aus ihrer gewohnten Umgebung entfernt werden, im Allgemeinen *in vitro* gewebsspezifisch verhalten (Alberts et al., 2002). Dieses Phänomen kann sehr gut in primären Zellkulturen beobachtet werden, die direkt aus dem Originalgewebe gezüchtet werden.

Der Differenzierungsprozess und -status von Zellkulturen kann durch entsprechende Kultivierungsbedingungen stark beeinflusst werden: Die besten Ergebnisse werden durch die möglichst reale Nachahmung der *in vivo*-Bedingungen hinsichtlich Temperatur, Sauerstoff- und CO<sub>2</sub>-Gehalt, pH-Wert, Osmolalität und Nährmedium erreicht. Besonders die Differenzierung des kornealen Epithels unterliegt neben den eben genannten Parametern drei weiteren wichtigen Einflussfaktoren: Lösliche Faktoren, das permeable Membransystem und die Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze haben einen entschiedenen Einfluss auf die Differenzierungsprozesse und sind einzeln in *Tabelle 4* aufgeführt.

Parameter		Aufgabe	Referenzen
Lösliche Faktoren	EGF	Stimuliert die Zellmigration, -proliferation sowie die Synthese von Basalmembran- und Matrixkomponenten	(Schultz et al., 1992; Schultz et al., 1994)
	BPE		
	TGF- $\alpha$	Stimuliert die Zellproliferation und -differenzierung in serumfreien Medium	(Castro-Munozledo et al., 1997)
	Insulin	Übt metabolische und mitogenetische Effekte an der Augoberfläche aus	(Rocha et al., 2002)
	Transferrin	Eisenlieferant	(Alberts et al., 2002)
	Selen	Schutz der Zellmembran und DNA vor oxidativer Zerstörung	(Saito et al., 2003)
	Hydrocortison	Unterstützt die Differenzierung und Wundheilung	(Rarey et al., 1991)
	DMSO	Stimuliert die Zelldifferenzierung	(Santos et al., 2003)
	Choleratoxin	Erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration	(Spangler, 1992)
	Ca <sup>2+</sup>	Stimuliert die Zellproliferation und -differenzierung	(Kruse & Tseng, 1992)
Membransystem	Permeabler Filter	Ermöglicht die Polarisierung des Epithels, Zellen können sowohl apikal als auch basolateral ernährt werden	
	Kollagenbeschichtung	Anheftung und Differenzierung der Zellen, Ausbildung von Basalmembrankomponenten	(Ohji et al., 1994)
Luft-Medium-Grenze		Fördert die Differenzierung	(Ban et al., 2003a; Minami et al., 1993)

*Tab. 4: Zusammenstellung der verschiedenen Faktoren, die die Differenzierung des kornealen Epithels induzieren.*

Zusätzlich enthalten die meisten Nährmedien zur Kultivierung des kornealen Epithels einen hohen Anteil an Serum, das neben Aminosäuren, Kohlenhydraten, anorganischen Salzen, Vitaminen- und Spurenelementen auch spezielle Wachstumsfaktoren, Hormone sowie Bindungs- und Anheftungsfaktoren liefert (Cartwright & Shah, 2002). Allerdings wurde in der Literatur proliferations- und differenzierungshemmende Effekte des Serums beschrieben (Chang et al., 2000; Kruse & Tseng, 1993) und sogar von einer verbesserten Zelldifferenzierung in serumfreiem Milieu von humanen Epithelzellen berichtet (Kruszewski et al., 1997; Robertson et al., 2005). Zudem birgt die Verwendung von Serum auch eine Reihe von Nachteilen: Erstens stellt Serum eine schlecht definierte Komponente in

Kulturmedien dar – die genaue qualitative Zusammensetzung ist bis heute nicht bekannt. Die quantitative Zusammensetzung unterliegt ebenfalls starken Schwankungen. Eine Standardisierung von Zellkulturprotokollen im Sinne einer *Good Cell Culture Practice* ist somit nicht möglich. Zweitens wurden in letzter Zeit massive ethische Bedenken laut in Bezug auf ein mögliches Leiden der Rinderföten bei der Rohserumgewinnung (van der Valk et al., 2004). Drittens wurde jüngst die Frage aufgeworfen, ob der weltweite Bedarf an fetalem Kälberserum in Forschung und biotechnologischer Industrie überhaupt abgedeckt werden kann (Eder et al., 2006; Falkner et al., 2006). Und schließlich ist die mögliche Kontamination des Rohserums mit gramnegativen Bakterien, Endotoxinen oder Rinderviren riskant, welche das Wachstum der Zellen negativ beeinflusst und das entstehende Gewebe unbrauchbar macht.

Um definierte und kontrollierte Kulturbedingungen zu schaffen, die eine Produktion des *in vitro*-Modells in industriellem Maßstab ermöglichen, und um Zellproliferation und -differenzierung bestmöglich zu beeinflussen, wurde in dem vorliegenden Disserationsvorhaben intensiv nach Alternativen zur Verwendung von Serum in der Zellkultur gesucht.

**Marker der epithelialen Zelldifferenzierung.** Der Differenzierungsstatus kornealer Epithelzellen kann durch die Expression eines Markers – vorzugsweise aber durch die Kombination mehrere – angezeigt werden. Eine Reihe typischer Markerproteine vollständig differenzierter kornealer Epithelzellen ist in *Tabelle 5* aufgeführt. Diese Marker werden meist nach Isolierung primärer Epithelzellen aus intaktem Korneagewebe bestimmt oder aber nach Immortalisierung primärer Epithelzellen zur eindeutigen Identifizierung der entsprechenden Zellkultur herangezogen.

Tight junction-assoziierte Proteine, die Ausbildung von Desmosomen und Microvilli sowie ein charakteristisches Keratinmuster stellen typische Marker des terminalen Differenzierungsstatus des kornealen Epithelgewebes dar (Chang et al., 2000; Mohan et al., 2003; Reichl et al., 2004; Ward et al., 1997). Messungen des epithelialen Widerstands und Permeabilitätsuntersuchungen unterstützen die morphologischen Befunde. Der Prozess der Desquamation wurde erstmals von Robertson et al. als Marker für die vollständige Differenzierung des Kornea-Epithels herangezogen (Robertson et al., 2005).

Marker		Referenzen
<b>Keratinmuster</b>	64 kDa (K3) 55 kDa (K12)	(Araki-Sasaki et al., 1995; Geerling et al., 2001; Hernandez-Quintero et al., 2002; Kahn et al., 1993; Offord et al., 1999)
<b>Morphologie</b>	Anzahl der Zellschichten, Zellform, Microvilli, Tight junction-Komplex, Desmosomen	
<b>Tight junction-assozierte Proteine</b>	Claudine, Occludin, ZO-1, ZO-2, ZO-3	(Ban et al., 2003b; Robertson et al., 2005; Yi et al., 2000)
<b>Metabolische Enzyme</b>	ALDH Cytochrome P450	(Hernandez-Quintero et al., 2002; Offord et al., 1999)
<b>Weitere</b>	Cytokine, Wachstumsfaktoren, Basalmembrankomponente, Effluxproteine, Transporterproteine	(Kawazu et al., 2006; Mannermaa et al., 2006; Sakanaka et al., 2006; Zieske et al., 1992)

Tab. 5: Differenzierungsmarker des kornealen Epithels.

**Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte in Epithelien und ihre Bedeutung für die epitheliale Barrierefunktion.** Zell-Zell-Kontakte dienen der Aufrechterhaltung des Zellverbands, der Barrierefunktion und der Kommunikation zwischen den Zellen.

**Tight junctions.** Die epitheliale Barriere wird durch tight junctions (Zonulae occludentes, parazelluläre Barriere) gebildet, die den parazellulären Transport limitieren, die Zelle abdichten und sie durch ihre Anordnung im apikalen Bereich polarisieren. Gebildet werden die tight junctions durch transmembranäre Occludine und Claudine. Diese sind über intrazelluläre Proteine, wie z.B. das Zona Occludens Protein-1 (ZO-1), mit dem Aktingerüst verbunden (Tab. 6). Neben den tight junctions gibt es noch weitere Strukturen, die Zellen miteinander verbinden und zum so genannten Verbindungskomplex (junctional complex) gehören. Sie werden als adherens junctions, gap junctions und Desmosomen bezeichnet. Darüber hinaus gibt es vielfältige Kontakte mit der extrazellulären Matrix über Integrine, die in Hemidesmosomen und Fokalkontakten konzentriert sind (Brown & Davis, 2002; Cereijido et al., 2000) (Abb. 3).

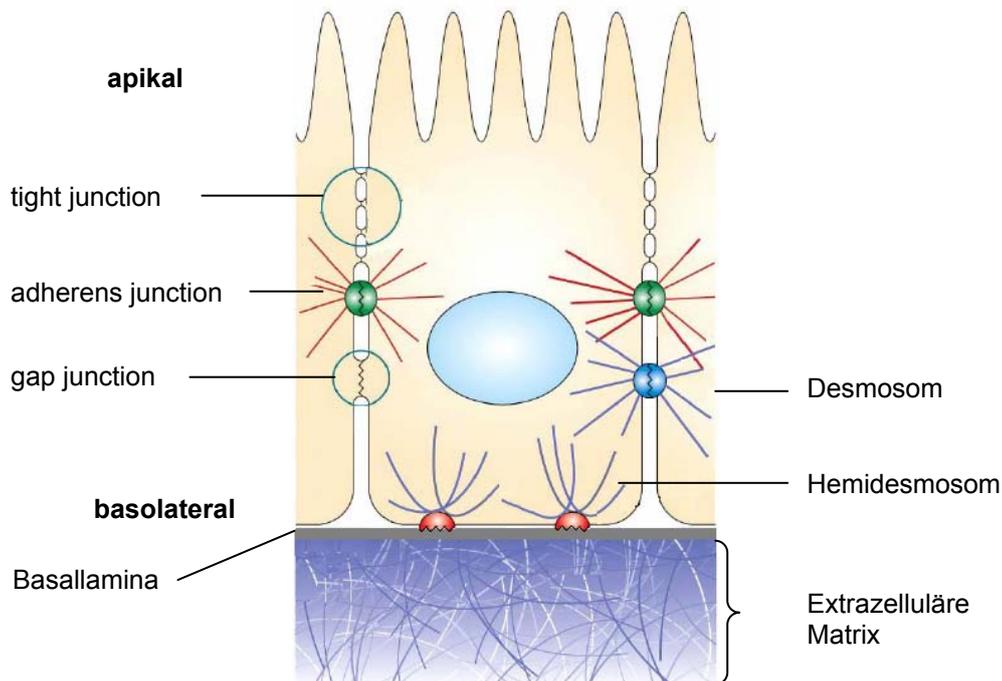


Abb. 3: Schematische Darstellung von Zell-Zell-Verbindungen im Epithelgewebe (tight junction, adherens junction, Desmosom, gap junction) und Zell-Matrix-Verbindungen (Hemidesmosomen)

**Adherens junctions.** Adherens junctions (Zonulae adherentes) stellen homodimere Zell-Zell-Kontakte dar, die auf der extrazellulären Seite über klassische Cadherine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig miteinander verknüpft sind. Die einfach transmembranären Cadherine sind auf der intrazellulären Seite wiederum über  $\alpha$ -Catenin,  $\beta$ -Catenin und Vinculin oder Plakoglobin an das Aktin-Zytoskelett gebunden und sorgen so für den mechanischen Zusammenhalt der Zellen im Gewebe (Tab. 6). Zu den bekanntesten klassischen Cadherinen zählen das epitheliale Cadherin (E-Cadherin) und das neuronale Cadherin (N-Cadherin) (Angst et al., 2001).

**Desmosomen.** Desmosomen (Maculae adherentes) verteilen Spannungs- und Scherkräfte und dienen damit hauptsächlich der Gewebestabilität. Auch sie sind über transmembranäre desmosomale Cadherine (Desmocolline und Desmogleine) miteinander verbunden und über die zytoplasmatischen Bindungspartner Desmoplakin und Plakoglobin mit Keratinfasern verknüpft (Garrod et al., 2002) (Tab. 6).

**Hemidesmosomen.** Hemidesmosomen verknüpfen die basale Oberfläche der Epithelzellen mit der darunterliegenden Basallamina. Die extrazellulären

Adhäsionsmoleküle sind hier nicht Cadherine – wie bei den adherens junctions und Desmosomen – sondern Integrine. Dabei binden die extrazellulären Domänen des Integrin an Laminin-Proteine der Basallamina. Die intrazelluläre Domäne des Integrin bindet über Ankerproteine (Plektin) an Keratinfilamente (Tab. 6).

**Gap junctions.** Gap junctions bestehen aus Proteinen der Connexinfamilie, die zu Membranporen zwischen benachbarten Zellen geformt sind. Durch diese Poren können hydrophile Moleküle von bis zu 1 kDa diffundieren. So wird ein Austausch von Ionen, Botenstoffen und Metaboliten zwischen benachbarten Zellen ermöglicht (Tab. 6).

Zellstruktur	Transmembranale Adhäsionsproteine	Weitere Proteine (zytosolisch)	Zyto-skelett	Funktion
tight junction	Claudine (24 bekannt) Occludin Junctional Adhesion Molecules	ZO-1, ZO-2, ZO-3; Cingulin	Aktin	Parazelluläre Diffusionsbarriere; Barriere zwischen Membrankompartimenten
adherens junction	Cadherine (z.B. E-Cadherin)	$\alpha$ - und $\beta$ -Catenin; ZO-1; Vinculin	Aktin	Zelladhäsion
gap junction	Connexine (>20 bekannt)	ZO-1	IF	Poren zwischen Zellen
Desmosom	Cadherine (Desmogleine, Desmocolline)	Desmoplakin; Plakoglobin; Plakophiline	IF	Zelladhäsion
Hemidesmosom	Integrine	Plektin	IF	Adhäsion von Zellen an extrazellulärer Matrix

Tab. 3: Zusammenfassung der wichtigsten Proteine des Zellkontaktbereichs. Mit dem Zytoskelett sind sie entweder durch Aktinfilamente oder durch Intermediärfilamente (IF) verbunden.

### 1.6 Korneale Absorption von Arzneistoffen

Im Allgemeinen stellt die Permeation durch die Kornea den Haupttransportweg für die Aufnahme von Arzneistoffen aus der Tränenflüssigkeit in das Innere des Auges dar (Doane et al., 1978). Das lipophile Epithel ist dabei die Hauptbarriere für hydrophile Arzneistoffe (Chien et al., 1988; Huang et al., 1983), denn die tight junctions umgeben vollständig die Oberflächenzellen des Epithels und versiegeln

weitgehend den parazellulären Raum. Damit limitieren die tight junctions die Permeation von Molekülen zwischen den Zellen (Claude, 1978; Gumbiner, 1987), sofern keine aktiven Transportmechanismen von den hydrophilen Substanzen genutzt werden (Hosoya et al., 1998; Mannermaa et al., 2006). Eine entsprechende Lipophilie der Arzneistoffe ist Voraussetzung für die transzelluläre Permeation im kornealen Epithel.

Über die korneale Permeation von Arzneistoffen liegen bereits zahlreiche Untersuchungen vor. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Arzneistoffe determinieren den Permeationsweg und die Permeationsrate durch die Kornea. Ein wichtiger Parameter ist u.a. der Verteilungskoeffizient ( $V_K$ ); in der Regel nimmt die Permeabilität mit steigender Lipophilie des Wirkstoffs bzw. höherem  $V_K$  zu (Prausnitz & Noonan, 1998). Molekülgröße und -form des Arzneistoffs sind weitere wichtige Faktoren, die die Permeation beeinflussen. Außerdem spielt der Ionisationsgrad des Arzneistoffs eine entscheidende Rolle (Brechue & Maren, 1993; Rojanasakul et al., 1992). Die nichtionisierte, lipophile Form des Arzneistoffs passiert das Epithel in der Regel leichter als die ionisierte, hydrophile Form. So permeiert z.B. die freie Pilocarpinbase zwei- bis dreimal leichter durch die Kornea als die ionisierte Form (Mannermaa et al., 2006). Bei einem pH-Wert über dem isoelektrischen Punkt der Cornea (pH 3,2) trägt das Gewebe negative Ladungen. Deshalb ist der Interzellularraum leichter permeabel für positiv geladene Moleküle, was bedeutet, dass bei physiologischem pH kationische Moleküle leichter die Kornea passieren können als anionische.

Das korneale Epithel stellt nicht nur eine Permeationsbarriere dar, sondern ist auch metabolisch aktiv, wodurch die Permeation zahlreicher Xenobiotika limitiert wird. Diese enzymatische Barriere besteht im kornealen Epithel hauptsächlich aus Esterasen (Lee, 1983; Lee et al., 1982), Aminopeptidasen (Stratford & Lee, 1985), Aldo-Keto-Reduktasen (Lee et al., 1988) und N-Acetyltransferasen (Campbell et al., 1991). Esterasen und Aldo-Keto-Reduktasen spielen aufgrund ihrer Fähigkeit Prodrugs zu aktivieren wahrscheinlich die größte Rolle für das transkorneale Permeationsverhalten von Ophthalmika.

### 1.7 Problemstellung und Zielsetzung

Tierversuche werden für das Screening von potentiellen Arzneistoffen, sowie Industriechemikalien und – bis Ende 2008 – auch zur Untersuchung von

Inhaltsstoffen von Kosmetika hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und toxikologischen Unbedenklichkeit eingesetzt. Noch heute ist der in den 1940er Jahren entwickelte Kaninchen-Augen-Irritationstest nach Draize (Draize et al., 1944) fester Bestandteil der Teststrategie innerhalb der OECD-Prüfrichtlinie 405 (OECD TG 405, 2002) zur okulotoxischen Sicherheitsprüfung neuer Substanzen.

Der Draize-Test bedeutet nicht nur eine hohe Belastung für das Tier, vielmehr wurde auf internationalen Symposien und in zahlreichen Publikationen darauf hingewiesen (Eskes et al., 2005; Jester, 2006; Salem & Katz, 2003), dass die Aussagekraft dieses Tests eingeschränkt ist. Daher besteht ein hoher Bedarf an der Entwicklung und Validierung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu diesem Tierversuch. Obwohl in den letzten Jahren mit der Ausweitung von Tierersatzverfahren erhebliche Fortschritte erzielt wurden, existiert bis heute keine wissenschaftlich validierte und auf OECD-Ebene anerkannte Alternativmethode zum Draize-Test.

Die vorliegende Arbeit entstand unter dem Aspekt, das humane Kornea-Epithel – die wichtigste Barrierschicht des vorderen Augenabschnitts – auf der Basis von humanen immortalisierten Zellkulturen als Alternative zum Draize-Test zu rekonstruieren. Der Entwicklung und Charakterisierung dieses in vitro-Modells ging zunächst eine Optimierung des Kultivierungsmediums voraus. Aufgrund des Vorsatzes, ein einfach reproduzierbares Modell zu etablieren, sollte die Verwendung von Serum als Zusatz zum Nährmedium des in vitro-Gewebes vermieden sowie der Einfluss von Hormonen und Vitaminen auf die Differenzierung des mehrschichtigen Epithels getestet werden.

Die Arbeit gliedert sich somit in folgende Teilgebiete:

1. Entwicklung geeigneter Kultivierungsbedingungen für die SV40-immortalisierte HCE-Zelllinie zum Aufbau eines mehrschichtig ausdifferenzierten Kornea-Epithels.
2. Umfassende Charakterisierung des kornealen Epithel-Modells bezüglich Morphologie, TEER und Fluorescein-Permeabilität.
3. Testung des optimierten Gewebeäquivalents hinsichtlich seiner Esteraseaktivität und Fähigkeit zur Gewebsregeneration.
4. Rekonstruktion und ultrastrukturelle Analyse der Zell-Matrix-Grenzschicht eines Stroma-Epithel-Modells unter Verwendung zweier Kollagenvernetzungs-techniken.

## **MATERIAL UND METHODEN**

---

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Technische Geräte**

Autoklav	Guwina-Hofmann, Berlin
Brutschrank BB 6220	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern	Biometra, Göttingen
EndOhm™-12 Elektrode	WPI, Berlin
Entwicklungskassette	Kodak, München
EVOMX™ Voltohmmeter	WPI, Berlin
FACS-Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop BX41	Olympus, Hamburg
FLUOstar OPTIMA Platerreader	BMG Labtech, Offenburg
Frigocut N 2800	Reichert-Jung, Heidelberg
Heißhomogenisator Micron Lab 40 APV	Gaulin, Lübeck
Lamin Air-Sterilarbeitsbank	Heraeus, Hanau
Magnetrührer IKAMAG® RCT	Janke & Kunkel, Staufen
Neubauer-Zählkammer (0,0025mm <sup>2</sup> /0,1mm)	Carl-Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop	Carl-Zeiss, Jena
pH-Meter	Knick, Nürnberg
Pipetten Eppendorf Reference®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy®	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttelmaschine LS10	Gerhardt, Bonn
Schüttler IKA® MT-2	Karow, Berlin
Spektralphotometer, Tank-Blot	Biometra, Göttingen Biometra, Göttingen
Thermoblock TB 1	Biometra, Göttingen
Transmissionselektronenmikroskop EM 10 CR	Carl-Zeiss, Jena
Trockenschrank UT5042EK	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Sonorex® RK 100	Bandelin, Berlin
Ultraschallsonotrode Sonoplus GM 70	Bandelin, Berlin
Vakuumgerät Vacuboy®	Integra Biosciences, Fernwald
Vakuum-Zentrifuge Speed-Vac® SC 100A	Savant, Bethesda, MD
Wasser Deionierungsanlage MilliQ	Millipore-Waters, Eschborn
Wasserbad DC3/W26	Haake, Karlsruhe
X-Omat Film-Entwicklungsgerät	Kodak, München
Zentrifuge Eppendorf 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1,0 R	Heraeus, Hanau
Ultrastainer LKB 2168	Leica, Nussloch

### 2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Acrylamid/Bisacrylamid 40 %, 29:1	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Advanced DMEM / Ham's F12 Medium (1:1)	Invitrogen, Karlsruhe
Alcon BSS Plus <sup>®</sup>	Alcon Pharma, Freiburg
Ammoniumpersulfat	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Amphotericin B	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Ascorbinsäure, AA	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Benzalkoniumchlorid, BAC	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Borsäure	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Bradford Reagenz	Biometra, Göttingen
Bromphenolblau	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub>	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Coomassieblau	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Cryotube <sup>™</sup> vials	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen, Durchmesser: 18 mm	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat, DEPC	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid, DMSO	Merck, Darmstadt
Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Dithiothreitol, DTT	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
DMEM / Ham's F12 Medium (1:1)	Invitrogen, Karlsruhe
Einbettmedium für Gefrierschnitte,	Leica, Nussloch
Einmalküvetten, reduziert	Merck, Darmstadt
Einmalkanülen (0.8 / 80 mm)	VWR, Darmstadt
Einmalspritzen (Braun Injekt 5 ml und 20 ml)	VWR, Darmstadt
Epon <sup>®</sup>	Serva, Heidelberg
Essigsäure	VWR, Darmstadt
Ethanol, LiChrosolv <sup>®</sup>	VWR, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Röhrchen, Falcon	Merck/Eurolab, Berlin
Fetales Kälberserum, FKS	Biochrom, Berlin
Filme, Kodak X-OMAT, XAR-5	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Filmentwickler	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Filmfixierer	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Filterpapier, Ø 10 cm	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
FITC-gekoppelter Anti-Mäuse-IgG-Antikörper	Roche, Penzberg
Fluorescein	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Fluoresceindiacetat	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Glycin	ICN, Eschwege
Ham's F12 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
HRP-gekoppelter Anti-Mäuse-IgG-Antikörper	New England Biolabs, Frankfurt
humaner epidermaler Wachstumsfaktor, hEGF	Biochrom, Berlin
Hydrocortison	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Insulin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Kaliumchlorid, KCl	Sigma/Aldrich, Deisenhofen

Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Keratozytenwachstumsmedium, KGM	Lonza, Verviers, Belgien
Korneales Differenzierungsmedium Cambrex <sup>®</sup> , CEM	Lonza, Verviers, Belgien
Lab-Tek <sup>™</sup> II Chamber Slides	Nunc, Wiesbaden
Laemmli-SDS-Probenpuffer (Gelelektrophorese)	New England Biolabs, Beverly
Leupeptin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
L-Glutamin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
LumiGlo Chemilumineszenz Reagenz	New England Biolabs, Frankfurt
Medium 199	Invitrogen, Karlsruhe
Monoklonaler Anti-E-Cadherin-Antikörper (IgG Maus)	BD Biosciences, Heidelberg
Monoklonaler Anti-Claudin-1-Antikörper (IgG Maus)	Invitrogen, Karlsruhe
Monoklonaler Anti-ZO-1-Antikörper (IgG Maus)	Invitrogen, Karlsruhe
Multititer-Platten TPP (6-, 12-, 24-, 96-Loch)	Biochrom, Berlin
N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin, TEMED	Biometra, Göttingen
Natriumazid, $\text{NaN}_3$	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid, $\text{NaCl}$	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat, SDS	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumhydrogenphosphat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumhydroxid, $\text{NaOH}$	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumorthovanadat, $\text{Na}_3\text{VO}_4$	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Oregon Green <sup>®</sup> 488 Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Penicillin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Pepstatin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Phosphat-gepufferte Salzlösung, Calcium- und Magnesiumfrei	Invitrogen, Karlsruhe
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Transfermembran	Millipore, Eschborn
Propidiumiodid, PI	Alexis, Grünberg
Proteinmarker	Calbiochem, Bad Soden/Ts.
Rattenschwanzkollagen, Typ I (3,48 mg/ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Rattenschwanzkollagen, Typ I, Puder	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Retinolsäure, RA	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
SDS-Probenpuffer	New England Biolabs, Frankfurt
Serumalbumin vom Rind, Fettsäurefrei, BSA	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Stanzen (Biopsy Punch, $\varnothing = 6 \text{ mm}$ )	Stiefel Laboratorium, Offenbach
Sterilfilter Minisart (0,22 $\mu\text{m}$ )	Sartorius, Göttingen
Streptomycin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Transwell <sup>®</sup> -Membraneinsätzen	Invitrogen, Karlsruhe
Tris Base	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	ICN, Eschwege
Zellkultureinsätze, Polycarbonat-Membran, Porengröße 0,4 $\mu\text{m}$ , $\varnothing = 10 \text{ mm}$	Nunc, Wiesbaden

Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup> )	Renner, Dannstadt
Zellkulturschalen TPP, 10 cm	Biochrom, Berlin
Zellschaber	Renner, Dannstadt
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	Biochrom, Berlin
Ziegenserum	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

### 2.1.3 Zellkulturmedien

**Endothel- und Keratozytenmedium.** Für Anzucht und Kultivierung der Endothel- und Stromazellen als auch für die Kultivierung des Zorn-Kruppa-Modells diente, wenn nicht anders angegeben, F99 Medium. Die Herstellung erfolgte aus einer 1:1 Mischung von Medium 199 und Ham's F12 durch Zusatz folgender Supplemente:

5 %	FKS
1 %	Antibiotika-Antimykotika-Lösung

**Epithelmedium.** Die Standardkultivierung der HCE-Zellen erfolgte in einem 1:1 Gemisch von DMEM und Ham's F12 Medium unter Zugabe von:

15 %	FKS
5 µg/ml	Insulin
1 ng/ml	hEGF
2 mM	L-Glutamin
1 %	Antibiotika-Antimykotika-Lösung

**Serumfreies Epithelmedium.** Für die serumfreie Kultivierung der Epithel-Modelle wurde Keratinozytenwachstumsmedium (KGM) eingesetzt. Die Herstellung erfolgte aus Keratinozytenbasalmedium (KBM) durch Zusatz folgender Supplemente:

30 µg/ml	BPE
0,1 ng/ml	hEGF
0,5 µg/ml	Hydrocortison
5 µg/ml	Insulin
50 ng/ml	Amphotericin B
50 µg/ml	Gentamicinsulfat

### 2.1.4 Lösungen zur Zellkultivierung

#### Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

0,2 g/l	KCl
8,0 g/l	NaCl
0,2 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,44 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
in	Aqua bidest.

#### Trypsin-EDTA-Lösung

1,67 mg/ml	Trypsin
0,67 mg/ml	EDTA
in	PBS

#### Einfríermedium

20 %	DMSO
30 %	FKS
in	dem jeweiligem Wachstumsmedium

### 2.1.5 Stromapräparation nach Zorn-Kruppa

#### Puffer A (pH 7,69)

22,2 g/l	NaHCO <sub>3</sub>
47,7 g/l	HEPES
in	0,05 N NaOH

#### Kollagen-Lösung

10 mg	Kollagen Typ I
3 ml	CH <sub>3</sub> COOH 0,1 % (pH 3,3)

Das Kollagen wurde ohne Rühren über Nacht bei RT gelöst und anschließend bei 4 °C unter Lichtausschluss aufbewahrt.

### 2.1.6 Stromapräparation nach Griffith

#### Kollagenpuffer

9 ml	200 mM HEPES-Puffer
9 ml	10x DMEM

#### Glutaraldehyd-Lösung (0,02 %iges Gel)

6 µl	Glutaraldehyd 25 %
94 µl	20 % Dextran in DMEM

#### Glutaraldehyd-Lösung (0,002 %iges Gel)

3 µl	Glutaraldehyd 25 %
470 µl	20 % Dextran in DMEM

Die Glutaraldehyd-Lösungen wurden erst kurz vor der Zugabe zum Kollagen frisch hergestellt.

### 2.1.7 Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie

#### Blockierungslösung

2 %	Ziegenserum
1 %	BSA
0,05%	Tween 20
0,05%	NaN <sub>3</sub>
in	PBS

#### Antikörperverdünnungslösung

1 %	BSA
0,05 %	NaN <sub>3</sub>
in	PBS

#### Propidiumiodid-Lösung

1 µg/ml	Propidiumiodid
10 µg/ml	RNase A
in	PBS

### Mowiol-Lösung (pH 7,4)

6 g	Glycerol
2,4 g	Mowiol
6 ml	Aqua bidest.
12 ml	0,2 M Tris

### 2.1.8 Fixationsmedium nach Karnovsky

#### Stammlösung

72,07 g/l	Paraformaldehyd 37 %
9,56 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
1,76 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
in	Aqua bidest.

#### Arbeitslösung

75 %	Stammlösung
10 %	Glutaraldehyd 25 %
in	Aqua bidest.

### 2.1.9 Lösungen für die Zellyse und die Proteinbestimmung

#### RIPA-Puffer

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
1 %	Nonidet P-40
0,5 %	Desoxycholinsäure
0,1 %	SDS
1 mM	EDTA

#### supplementiert mit

1 mM	PMSF
1 µg/ml	Leupeptin
1 µg/ml	Pepstatin
1 µg/ml	Aprotinin
1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
50 mM	NaF

### **Bradford-Reagenz (5fach)**

125 mg	Coomassieblau
125 ml	Ethanol 96 %
250 ml	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85 %
125 ml	Aqua bidest.

Die Lösung wurde vor Gebrauch 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt.

### **2.1.10 Lösungen für die Western Blot-Analyse**

#### **Trenngelpuffer (pH 8,8)**

1,88 M	Tris
30 %	1 M HCl
in	Aqua bidest.

#### **Sammelgelpuffer (pH 6,8)**

0,5 M	Tris
48%	1 M HCl
in	Aqua bidest.

#### **Laufpuffer (pH 8,3)**

14,4 mg/ml	Glycin
3,02 mg/ml	Tris-Base
1 mg/ml	SDS
in	Aqua bidest.

#### **Blotpuffer (pH 8,3)**

14,4 g/ml	Glycin
3,00 g/ml	Tris-Base
in	Aqua bidest.

### Trenngele

<b>10 %</b>	<b>7,5 %</b>	
10 µl	10 µl	Temed
60 µl	60 µl	Ammoniumpersulfat
3,0 ml	2,3 ml	Acrylamid/Bisacrylamid 40 %
2,4 ml	2,4 ml	Trenngelbuffer
1,2 ml	1,2 ml	SDS-Lösung 1 %
5,4 ml	6,1 ml	Aqua bidest.

### Sammelgel (Polyacrylamid 5 %)

4 µl	Temed
20 µl	Ammoniumpersulfat
0,5 ml	Acrylamid/Bisacrylamid 40 %
0,8 ml	Sammelgelbuffer
0,4 ml	SDS-Lösung 1 %
2,3 ml	Aqua bidest.

### TBST-Puffer

2 mM	Tris (pH 7,4)
15 mM	NaCl
0,05 %	Tween 20
in	Aqua bidest.

### Blockpuffer

5 % Magermilchpulver in TBST-Puffer

#### 2.1.11 Lösungen der Testsubstanzen

Fluorescein wurde in Alcon BSS Plus<sup>®</sup> in einer Konzentration von 10 µM gelöst. Aufgrund seiner schlechten Löslichkeit wurde Fluoresceindiacetat zunächst in DMSO gelöst und schließlich mit Alcon BSS Plus<sup>®</sup> bis zu 10 µM verdünnt. Beide Lösungen wurden auf die gleiche Konzentration an DMSO (0,5 %) eingestellt und lichtgeschützt bei -20 °C gelagert.

Benzalkoniumchlorid (BAC) wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in Aqua bidest gelöst und bei -20 °C gelagert.

Natriumlaurylsulfat (SDS) wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in Aqua bidest hergestellt und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

### 2.2 Humane Zellkulturen

**Korneale Endothelzellen.** Bei den eingesetzten humanen Endothelzellen (HCEC-Zellen) handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, die freundlicherweise von der Augenklinik des Uniklinikums Eppendorf in Hamburg zur Verfügung gestellt wurde. Nach einer von Engelmann et al. (Engelmann et al., 1988) beschriebenen Methode wurde eine Primärkultur humaner kornealer Endothelzellen ausgehend von der Hornhaut eines 91-jährigen Spenders gewonnen. Die Immortalisierung der Zellen erfolgte durch SV40-Transfektion mittels Elektroporation (Bednarz et al., 2000). Die HCEC-Zellen wurden in F99 Wachstumsmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

**Korneale Keratozyten.** Die Keratozyten-Zelllinie (HCK-Zellen) wurde durch Zorn-Kruppa et al. (Zorn-Kruppa et al., 2005) etabliert. Die Immortalisierung erfolgte unter Zuhilfenahme des SV40-largeT-Antigens. Die HCK-Zellen wurden ebenfalls im F99 Wachstumsmedium kultiviert.

**Korneale Epithelzellen.** Bei den verwendeten humanen Epithelzellen (HCE-Zellen) handelt es sich um die gut charakterisierte SV40-immortalisierte Zelllinie von Araki-Sasaki et al. (Araki-Sasaki et al., 1995). Als Wachstumsmedium zur Standardkultivierung wurde ein 1:1 Gemisch aus DMEM und Ham's F12 supplementiert mit 15 % FKS, 5 µg/ml Insulin, 10 ng/ml hEGF, 2 mM L-Glutamin und 1 % Antibiotika-Antimykotika-Lösung verwendet.

**Passagierung.** Zur Passagierung wurden die Zellen kurz vor Erreichen der vollständigen Konfluenz mit PBS gewaschen und durch Zusatz von 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung bis zur Ablösung vom Flaschenboden im Brutschrank inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde mit serumhaltigem Medium gestoppt und mögliche Zellcluster durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C). Die Zellen wurden in F99 Medium bzw. in einer 1:1 Mischung aus DMEM und Ham's F12 resuspendiert. 2 – 2,5 x 10<sup>5</sup> Zellen wurden in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 25 ml vorgelegtem Wachstumsmedium ausgesät.

**Zelladaptation.** Da es sich bei der HCE-Zelllinie um äußerst anspruchsvolle Zellen handelte, wurde die graduelle Adaptationsmethode für die Umsetzung der

Zellkultur in serumfreies Milieu gewählt. Die Zellen wurden aus der logarithmischen Wachstumsphase von der serumhaltigen Kultur (15 % FKS) nach dem Trypsinierungsvorgang direkt in DMEM/F12 + 5 % FKS überführt. Die gewohnten Einsaatdichten wurden um das Zweifache erhöht. Nach zwei Passagen bei 5 % FKS Supplementierung wurde der FKS-Gehalt auf 1 % gesenkt. Nach weiteren zwei bis drei Passagen mit 1 % FKS wurde der Serumgehalt auf 0,5 % reduziert und das DMEM/F12-Medium 1:1 mit KGM-Medium gemischt. Nach einer weiteren Passage bei 0,5 % FKS-Gehalt konnten die Zellen schließlich ohne Zusatz von FKS in KGM-Medium kultiviert werden.

**Lagerung und Reaktivierung der Zelllinien.** Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden Zellen mit einem Konfluenzgrad von 80 – 90 % durch die Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung zunächst aus der Kulturflasche gewonnen und nach der Zentrifugation bei 300 g, 4 °C für 5 min mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Einfriermedium resuspendiert. 1,8 ml dieser Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und in einer speziellen Einfrierbox für mindestens zwei Tage bei -80 °C gelagert, bevor sie in -196°C kalten flüssigen Stickstoff überführt wurden. Die Reaktivierung der Zellen erfolgte durch schnelles Auftauen bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 20 ml vorgelegtem Wachstumsmedium überführt. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und 25 ml frisches Wachstumsmedium in die Zellkulturflasche gegeben.

### 2.3 Aufbau der humanen Kornea-Konstrukte

**Komplett-Modell nach Zorn-Kruppa.** Auf der Basis der SV40-transformierten, humanen kornealen Zelllinien wurde die dreidimensionale *in vitro*-Kornea nach Zorn-Kruppa schrittweise rekonstruiert (Zorn-Kruppa et al., 2005). Der Aufbau des Kornea-Modells erfolgte in Nunc-Filtereinsätzen für 12-Loch-Platten, bestehend aus einer Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 0,4 µm und einer Wachstumsoberfläche von 0,5 cm<sup>2</sup>. Somit konnte sowohl eine submerse Kultivierung der Zellen als auch ein Wachstum der Zellen an der Luft-Medium-Grenze gewährleistet werden.

Zur Rekonstruktion des Endothel-Monolayers wurde eine konfluente Kulturflasche an Endothelzellen trypsinisiert, abgestoppt und im frischen Wachstumsmedium mit

einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml resuspendiert. 500  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden auf die Filter pipettiert, die zuvor in 12-Loch-Platten mit je 500  $\mu$ l Wachstumsmedium eingesetzt worden waren. Das Endothel wurde sieben Tage lang kultiviert. Während dieser Zeit kam es zur Ausbildung eines Monolayers. Der Aufbau der Stroma-Matrix erfolgte nach Minami (Minami et al., 1993). Zunächst wurden  $1 \times 10^5$  trypsinierte und abzentrifugierte HCK-Zellen in 25  $\mu$ l FKS aufgenommen und jeweils 25  $\mu$ l F99-10x-Lösung und 25  $\mu$ l Puffer A-Lösung hinzugefügt. Daraufhin wurde diese Zellsuspension in 150  $\mu$ l Kollagenlösung (3,3 mg/ml) gut gemischt und zügig auf das Endothel aufgebracht. Der Gelierungsprozess erfolgte bei 37 °C innerhalb von 10 – 30 min. im Inkubator. Die Keratozyten verteilten sich dabei gleichmäßig im Gel. Nach 24 h wurden  $1 \times 10^5$  Epithelzellen, suspendiert in 250  $\mu$ l F99 Medium, auf die Oberfläche des Gels pipettiert. Zur Anheftung der Zellen wurde das Konstrukt für 1 h im Inkubator bei 37 °C belassen und danach mit 1 ml F99 Medium überschichtet. Das Gewebe wurde weitere 36 – 48 h bis zur Konfluenz der Epithelzellschicht kultiviert.

Zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels wurde das Konstrukt schließlich an der Grenzfläche zwischen Medium und Luft kultiviert. Zu diesem Zwecke wurde der Überschuss an Medium im Filtereinsatz abgesaugt und dieser unter sterilen Bedingungen in eine mit 0,9 ml F99 Medium gefüllte 6-Loch-Platte überführt. Das Gewebe wurde weitere 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt.

**Epithel-Modell.** Der Aufbau des reinen Epithel-Modells erfolgte in Analogie zum Zorn-Kruppa-Modell. Um die Differenzierung *in vitro* des Modells zu optimieren, wurden verschiedene Kultivierungsbedingungen, sowohl serumhaltige als auch serumfreie, getestet: Zunächst wurde eine konfluente Kulturflasche an adaptierten Epithelzellen trypsinisiert, abgestoppt und im jeweiligen Wachstumsmedium mit einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml resuspendiert. In die Filtereinsätze wurden 500  $\mu$ l dieser Zellsuspension pipettiert, die zuvor in 12-Loch-Platten mit je 500  $\mu$ l Wachstumsmedium eingesetzt worden waren. Nach Anheftung der Zellen, ca. 2 h später, wurde das Epithel mit 1 ml des entsprechenden Wachstumsmedium überschichtet. Das Gewebe wurde weitere 36 – 48 h bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels wurde wie

oben bereits beschrieben (2.3; *Komplett-Modell nach Zorn-Kruppa*) der Mediumspiegel abgesenkt. Folgende Medien kamen zum Einsatz:

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Serumhaltig</b>	
DMEM/F12+15%	DMEM / Ham's F12 (1:1); <b>15 % FKS</b> , 5 µg/ml Insulin, 10 ng/ml hEGF, 2 mM L-Glutamin; 1 % Antibiotika-Antimykotika-Lösung
DMEM/F12+5%	DMEM / Ham's F12 (1:1); <b>5 % FKS</b> , 5 µg/ml Insulin, 10 ng/ml hEGF, 2 mM L-Glutamin; 1 % Antibiotika-Antimykotika-Lösung
Adv+2%	Advanced DMEM / Ham's F12 (1:1); <b>2 % FKS</b> , 5 µg/ml Insulin, 10 ng/ml hEGF, 2 mM L-Glutamin; 1 % Antibiotika-Antimykotika-Lösung
<b>Serumfrei</b>	
KGM	Keratinocytenwachstumsmedium (KGM)
KGM+Ca	KGM; <b>0,5 mM CaCl<sub>2</sub></b>
KGM+HC	KGM; <b>0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 µg/ml Hydrocortison</b>
KGM+++	KGM; <b>0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 µg/ml Hydrocortison, 50 µg/ml Ascorbinsäure, 1,5 ng/ml Retinsäure</b>
CEM	Korneales Differenzierungsmedium Cambrex®

**Stroma-Epithel-Modell.** Um die Stabilität der Stromamatrix zu verbessern und ihre Kontraktilität zu reduzieren, wurde die Vernetzung des Kollagens mittels enzymatischer und chemischer Verfahren hin getestet. Die Methodik wurde in der Arbeitsgruppe von May Griffith am *Eye Institute* der Universität von Ottawa erlernt.

**Vernetzung mit Glutaraldehyd.** Für die Herstellung von drei Kollagen-Biomatrices wurden 800 µl der Kollagenlösung (3,48 mg/ml) mit 125 µl des Kollagenpuffers auf Eis gemischt und diese Mischung vorsichtig mit 10 – 15 µl 1N NaOH neutralisiert (pH 7,4). Unter ständigem Rühren wurden 62,5 µl 20 %iger Chondroitin-6-sulfat-Lösung in PBS hinzugefügt und sobald die eintretende Trübung verschwand, 12,5 µl Glutaraldehyd-Lösung (0,02 %ig bzw. 0,002 %ig) zugegeben. Der Vernetzungsreaktion fand 1 h unter Lichtausschluss auf Eis statt. Anschließend wurde tropfenweise 62,5 µl 20 % Glycin-Lösung in PBS ergänzt und das Kollagengemisch 1 h auf Eis gesetzt. Währenddessen wurden  $3 \times 10^5$  abtrypsinisierte Stromazellen in KGM+++-Medium aufgenommen, die

Zellsuspension in der vernetzten Kollagenmischung ohne Blasenbildung suspendiert und 250 µl auf die Nunc-Filtereinsätze pipettiert. Nach 1 h bei 37 °C im Inkubator wurde das Gel fest. Anschließend wurde die Kollagen-Biomatrix über Nacht mit Medium überschichtet. Nach 24 h wurden  $1 \times 10^5$  Epithelzellen auf die Oberfläche des Gels ausgesät.

**Vernetzung mit Transglutaminase.** Für die Herstellung von drei Kollagen-Biomatrices wurden 630 µl der Kollagenlösung (3,48 mg/ml) mit 100 µl des Kollagenpuffers vorsichtig und ohne Blasenbildung auf Eis gemischt. Unter ständigem Rühren wurden 2 µl DTT-Lösung (1 M in Aqua bidest) und 5 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung (1 M in Aqua bidest.) hinzugefügt und mit 10 – 15 µl 1N NaOH neutralisiert (pH 7,4). Die Kollagenmischung wurde mit 62,5 µl 20 %iger Chondroitin-6-sulfat-Lösung in PBS, 38,5 µl Zellsuspension ( $3 \times 10^5$  HCK-Zellen) und 20 µl Transglutaminase-Lösung (1 unit/ml) versetzt. Jeweils 250 µl dieser Kollagenmischung wurden auf die Nunc-Filtereinsätze pipettiert. Nach 1 h bei 37 °C im Inkubator wurde das Gel fest. Anschließend wurde die Kollagen-Biomatrix über Nacht mit Medium überschichtet. Nach 24 h wurden  $1 \times 10^5$  Epithelzellen auf die Oberfläche des Gels ausgesät.

### 2.4 Untersuchungen zur Zellproliferation an Epithelzellen mittels

#### Durchflußzytometrie

Das Prinzip des durchflußzytometrischen (FACS-) Verfahrens beruht auf der quantitativen Bestimmung fluoreszenzmarkierter Partikel. Nekrotische und spätapoptotische Zellen können auf diese Weise durch Färbung mit Propidiumiodid quantifiziert werden. Da diese Zellen ihre Membranintegrität verloren haben, können Substanzen wie Propidiumiodid (PI), die normalerweise von der Penetration in die Zelle ausgeschlossen sind, eindringen und interkalierend an die DNA binden. Diese Zellen sind anhand der Färbung mit PI detektierbar. HCE-Zellen wurden in einer Dichte von ungefähr  $1 \times 10^4$  Zellen/Loch in 12-Loch-Platten ausgesät und in den verschiedenen Medien (DMEM/F12+15%, DMEM/F12+5%, KGM, KGM+Ca, KGM+HC) 24 h bzw. 7 Tage lang kultiviert. Die Zellen wurden nach 2 h, 4 h, 6 h und schließlich nach 24 h bzw. nach 1, 2, 4 und 7 Tagen trypsinisiert und bei 270 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PI-Lösung (Endkonzentration 5 µg/ml) bei RT im Dunkeln resuspendiert und 5 min

inkubiert. Die angefärbten Zellen wurden anschließend mit dem Durchflußzytometer quantifiziert.

**Einstellung des Durchflußzytometers vor der Messung.** Am ersten Tag der Messung erfolgte zunächst für jedes Medium eine individuelle Einstellung des Zytometers nach Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC) und Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC). Anhand von viablen, ungefärbten Zellen wurde die Hauptzellpopulation ausgewählt und in den Fluoreszenz-Plot geschleust. Um hier nur tatsächlich angefärbte, nekrotische Zellen auch als solche zu erkennen, erfolgte zunächst eine Einstellung der FL2- und FL1-Achse mit einer ungefärbten Zellpopulation anhand ihrer Eigenfluoreszenzintensität. Dabei sollten sich möglichst alle Zellen im linken unteren Quadranten befinden. Zur Eingrenzung der Fluoreszenzemission von PI (575 nm, FL2) wurde anhand einer Probe mit angefärbten Zellen eine Angleichung von FL1 vorgenommen. Danach sollten sich alle PI-gefärbten, nekrotischen Zellen im linken oberen Quadranten befinden. Für die Quantifizierung der Zellen wurde pro Probe ein Messzeitraum von zwei Minuten gewählt. Erst nach den Grundeinstellungen des Durchflußzytometers konnten die Proben vermessen werden.

### 2.5 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Zur Charakterisierung des Einflusses der einzelnen Kultivierungsbedingungen, insbesondere des Zusatzes von FKS, auf das morphologische Erscheinungsbild der rekonstruierten Modelle erfolgten histologische Untersuchungen nach verschiedenen Tagen der Kultivierung. Dazu wurden Stenzen der Modelle ( $\varnothing = 6$  mm) entnommen und diese zum Transport bei 4 °C in Karnovsky-Lösung fixiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte im Elektronenmikroskopischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Proben wurden zunächst verschiedenen Waschschritten unterzogen, eine graduelle Entwässerungsprozedur folgte. Die Stenzen wurden anschließend in Kunstharz eingebettet (Eponereinbettung nach Luft (Luft, 1961)) und in 1 – 2  $\mu$ m Semidünnschnitte zerteilt. Der Färbung mit 1 % Toluidin / 1 % Pyronin G folgte eine histologische Beurteilung der Schnitte unter Blindbedingungen mittels Lichtmikroskopie.

### 2.6 Transelektronenmikroskopische Untersuchungen

Die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen dienen der Betrachtung struktureller Feinheiten, die durch die lichtmikroskopische Untersuchung nicht sichtbar gemacht werden konnten, insbesondere der Zell-Zellkontakte sowie der Matrix-Epithel-Grenzfläche. Dazu wurden Stenzen der Modelle ( $\varnothing = 6$  mm) entnommen und diese zum Transport bei 4 °C in Karnovsky-Lösung fixiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden am Institut für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin ausgeführt.

Die Präparate wurden für 20 h bei 4 °C in Karnovsky-Lösung immersionsfixiert und anschließend gründlich in 0,1 M Na-Kakodylat-Puffer gespült. Die Proben wurden für 2 h zur Nachfixierung in einer 1 %igen Osmiumtetroxid-Lösung inkubiert und durchliefen nachfolgend eine Blockkontrastierung in 5 %igem Uranylacetat. Die in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydrierten Präparate wurden in Epoxy-Harz eingebettet. Von den in Epon eingebetteten Probekörperchen wurden an einem Ultramikrotom Om U2 (Reichert, Wien) mit einem Glasmesser 1  $\mu$ m dicke Semidünnschnitte angefertigt, im Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgetragen. Die anschließende Färbung der Schnitte erfolgte mit einer 1 %igen Methyleneblau-Azur-II-Lösung nach Richardson (Romeis, 1989) und diente der lichtmikroskopischen Vororientierung, um geeignete Areale für die ultrastrukturelle Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop auswählen zu können. Die 50 bis 80 nm dicken Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser Histo-Diatome (Diatome AG, Bielefeld) an einem Ultramikrotom Ultracut E (Reichert-Jung, Heidelberg) angefertigt und anschließend auf beschichtete Kupfergitter (Agar Scientific, Stansted, GB) aufgezogen. Die Schnittkontrastierung erfolgte in einem Ultrastainer LKB 2168 (Leica, Wien) mit 5 %igem Uranylacetat und 3 %igem Bleicitrat nach der Methode von (Venable & Coggeshall, 1965). Die Ultradünnschnitte wurden an einem Transmissionselektronenmikroskop vom Typ EM 10 CR (Carl-Zeiss, Jena) untersucht und die Befunde fotografisch dokumentiert.

### 2.7 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

**Immunocytochemie:** Zur Charakterisierung der verschiedenen Epithelkulturen hinsichtlich ihrer Zell-Zellkontakte wurden die Zellen in speziellen Kulturgefäßen,

Lab-Tek™ II Chamber Slides, kultiviert. Die Einsaat der Epithelzellen erfolgte in einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$  pro Kammer. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS folgte die Fixierung mit 3,7 %iger Formaldehydlösung für 15 min. Daran schloss sich nach weiterem zweimaligen Waschen mit PBS die Permeabilisierung mit einer 0,1 % Triton X-100-Lösung für 5 min an. Die Zellen wurden wiederum zweimal mit PBS gewaschen und für 30 min mit der Blockierungslösung geblockt. Die Inkubation mit der primären Antikörperlösung (1:500 in 1 %iger BSA/PBS-Lösung) erfolgte für 30 min in einer feuchten Kammer. Zur Entfernung der überschüssigen Antikörperlösung wurden die Zellen wiederum dreimalig mit 1 %iger BSA/PBS-Lösung gewaschen und dann unter Lichtausschluss mit einer Sekundärantikörperlösung (1:500 in 1 %iger BSA/PBS-Lösung) 30 min lang inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Anti-Maus-IgG-Antikörper gekoppelt mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) verwendet. Die Konfluenz des Epithel-Monolayers wurde mit der Propidiumiodid (PI) -Zellkernfärbung verifiziert. Hierzu wurden die Zellen mit der PI-Lösung 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach dem letzten Färbeschritt wurden die Zellen abschließend dreimal mit PBS gewaschen. Nach 15 min Lufttrocknung wurden Deckgläschen mit 10  $\mu$ l Mowiol-Lösung auf den Lab-Tek™ II Chamber Slides fixiert und unter Lichtausschluss gelagert. Die Spezifität des Sekundärantikörpers wurde durch Weglassen des Primären überprüft. Die mikroskopische Aufnahme erfolgte am Olympus BX41, ausgestattet mit der Digitalkamera Nikon DXM1200 und AxioVision Software.

**Immunohistochemie.** Als Alternative zur Formalinfixierung bietet sich bei empfindlichen Antigenen die Gefriertechnik an. Ein schonendes und schnelles Einfrieren sind für eine gute Strukturhaltung essentiell. Die immunohistochemischen Untersuchungen wurden deshalb an Gefrierschnitten durchgeführt. Dazu wurden Gewebestücke von Kornea-Konstrukten in Tissue-Tek® O.C.T.™ überschichtet und in flüssigem Stickstoff vorgekühltem Isopentan schockgefroren. Proben, die nicht sofort geschnitten werden konnten, wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Im Kryostat (2800 Frigocut N, Reichert-Jung) wurden bei  $-25^\circ\text{C}$  10  $\mu$ m dicke Gefrierschnitte angefertigt, die auf SuperFrost® Plus GOLD Glasobjektträger angeschmolzen und 30 sek. bei Raumtemperatur getrocknet wurden. Für die Immunmarkierung wurden die Gefrierschnitte zunächst in  $4^\circ\text{C}$

kaltem Methanol 5 min lang fixiert, permeabilisiert und dann dreimal 10-minütig in eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 2 h in Blockierungslösung behandelt. Danach wurde dreimal in PBS gewaschen, die Schnitte mit einer Anti-Claudin Antikörper als Primärantikörper (1:1000 in 1 %iger BSA/PBS-Lösung) überschichtet und für 1 h in einer feuchten Kammer bei RT belassen. Zum Entfernen der überschüssigen Antikörperlösung wurden die Zellen wiederum dreimal PBS gewaschen und dann unter Lichtausschluss mit einer Sekundärantikörperlösung (1:500 in 1 %iger BSA/PBS-Lösung) 30 min lang inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper eingesetzt. Abschließend wurde wiederum dreimal mit PBS gewaschen. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde im letzten Färbeschritt 15 min mit PI-Lösung inkubiert und gewaschen. Zur Verzögerung des Ausbleicheffektes wurden die Schnitte mit 10 µl Mowiol-Lösung eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung erfolgt analog zur Immunocytochemie. Ein positiver Nachweis zeigte sich durch hellgrüne Lichtemission.

### **2.8 Proteindetektion mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot-Analytik**

**Extraktion zellulärer Proteine.** Epithelzellen wurden in einer Zelldichte von 10.000 – 20.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Sechslöchplatten eingesät. Zur Gewinnung des Zelllysats wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis in einem entsprechenden Volumen RIPA-Puffer für 20 min auf einem Schaukelschüttler inkubiert. Dem Puffer wurden vor jeder Lyse frisch die Proteasehemmer Aprotinin (10 mg/ml), Leupeptin (10 mg/ml), Pepstatin (10 mg/ml), Phenylmethylsulfonylfluorid (1 mM) sowie gegebenenfalls zur Detektion von phosphorylierten Proteinen Natriumorthovanadat (1 mM) zugegeben. Nach Überführung des Zelllysats in ein Eppendorfgefäß wurden die restlichen Zellbestandteile bei 4 °C und 10.000 g für 30 min abzentrifugiert. Aus den Überständen wurde der Proteingehalt bestimmt und die Proteindetektion durchgeführt.

**Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.** Die Quantifizierung des Proteingehalts der einzelnen Zelllysate erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Bradford (Bradford, 1976). An Protein gebundenes Coomassieblau bewirkt

einen Farbumschlag von braunrot nach braungrün, der bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt wird. Nach Aufnahme einer Eichgerade mit verschiedenen BSA-Konzentrationen (0 – 20 µg) erfolgte die Proteinbestimmung von 5 µl Lysat, welches zuvor in 95 µl Aqua bidest. verdünnt und mit 1 ml Bradford-Reagenz versehen wurde. Die Extinktionswerte der BSA-Konzentrationen wurden einer Regressionsanalyse unterzogen und der Proteingehalt der Proben anhand folgender Gleichung ermittelt:

$$F(x) = a+bx^c$$

wobei  $x = \mu\text{g BSA}$

$$F(x) = \text{Extinktion bei 595 nm}$$

Die Proteinmenge ergibt sich wie folgt:

$$\text{Protein } [\mu\text{g}] = [(f(x)-a)/b]^{1/c}$$

**SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).** Proteine wurden mit Hilfe von diskontinuierlicher SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt (Laemmli, 1970). Je kleiner die aufzutrennenden Proteine, desto höherprozentig wurde das Trenngel gewählt. Die aufzutragenden Proteinproben wurden im Verhältnis 2:1 mit dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert und 1 min bei 10.000 g und RT abzentrifugiert. Nach Auftragen der Proben unter 500 ml SDS-Laufpuffer wurde zunächst ein Strom von etwa 35 mA pro Gel angelegt bis die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Dann wurde der Stromfluss auf 55 mA pro Gel erhöht. Anhand der vorgefärbten Banden des Protein-Größenstandards und der Farbstoffbanden des SDS-Probenpuffers konnte der Zeitpunkt, bei der die Größenauftrennung der Proteinbanden ausreichend war, bestimmt, die Elektrophorese abgestoppt und durch Western Blot analysiert werden.

**Western Blot.** Um Proteine mit spezifischen Antikörpern zu detektieren, wurden sie nach der Auftrennung über SDS-PAGE auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen übertragen. Dazu wurde das Polyacrylamidgel nach Beendigung der Elektrophorese ebenso wie die auf Gelgröße zurechtgeschnittene und in Methanol hydrophobisierte PVDF-Membran für 10 min in Blotpuffer inkubiert. Dann wurden Gel und PVDF-Membran zwischen vier Gelblottingpapieren und zwei Schwämmen

eingespannt und in einen mit 1100 ml Blotpuffer gefüllten Tankblot eingebaut. Der Blottingvorgang lief entweder bei 100 mA bei RT über Nacht.

**Detektion eines Western Blots.** Um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran unter leichtem Schwenken 1 h bei 37 °C in 5 % Magermilchlösung in TBST-Puffer inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit TBST-Puffer für 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Behandlung mit dem Primärantikörper. Die Verdünnung war antikörperspezifisch und erfolgte in Aqua bidest., entweder für 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht auf dem Schaukelschüttler. Danach wurde die Lösung des Primärantikörpers entfernt und die Membran wiederholt dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Meerrettich Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (1:1000) in der Blocklösung für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer wurden die Antikörper-markierten Proteine mit dem Lumiglo-Kit® (New England Biolabs, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers detektiert. Die Bereiche, in denen der sekundäre Antikörper bindet, zeigten eine Chemolumineszenz, die bei Kontakt mit einem lichtempfindlichen Film in einer Expositionskassette eine Schwarzfärbung erzeugte. Für die Detektion von weiteren Proteinen wurden die Antikörper von der Membran durch Inkubation in 50 ml Strippuffer (50 mM Tris pH 6,8, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2 % SDS) bei 50 °C, 20 min entfernt und einem erneuten Immunoblot unterzogen.

### 2.9 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)

Um die Ausbildung der Barrierefunktion rekonstruierter Modelle mitzuverfolgen, wurde täglich der TEER bestimmt. Die Messung erfolgte mit einem Voltohmmeter (EVOMX) in Kombination mit einer speziell auf die verwendeten Nunc-Einsätze angepassten Kammer-Ringelektrode (EndOhm-12). Hierbei dient die obere Elektrode als Deckel und ermöglicht durch die Schließung des Stromkreises die Widerstandsmessung. Akkurate und reproduzierbare Messungen sind somit gewährleistet. Vor der Messung wurden die Elektroden nach der Desinfektion in 70 % Ethanol für 15 min in raumtemperiertem Messmedium (PBS) äquilibriert. Zur Widerstandsmessung wurde die Ringelektrode mit Messmedium gefüllt und der zu messende Filtereinsatz eingesetzt. Der TEER wurde wie folgt berechnet:

$$TEER = (R_{Probe} - R_{Nullwert}) \cdot A$$

TEER wird hierbei in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  angegeben, wobei  $R_{Probe}$  der gemessener Widerstand im Filtereinsatz mit Zellen in  $\Omega$ ,  $R_{Nullwert}$  der gemessener Widerstand im Filtereinsatz ohne Zellen in  $\Omega$  und  $A$  die Wachstumsfläche des Filtereinsatzes ( $0,5 \text{ cm}^2$ ) darstellt.

### 2.10 Messung der parazellulären Permeabilität

Mit Hilfe des Permeabilitätskoeffizienten, ähnlich den vorangegangenen TEER-Untersuchungen, kann das Maß der Ausbildung einer adäquaten epithelialen Barriere eingeschätzt werden. Da die Permeation einer hydrophilen Substanz einzig über die parazellulären Poren des Gewebes erfolgen kann, ist diese indirekt zur Beurteilung der tight junctions und damit der Barrierefunktion geeignet. Deswegen wurden Transport-Experimente mit parazellulär diffundierendem Fluorescein in Nunc-Filtereinsätzen durchgeführt. Die Epithelzellen wurden auf  $0,5 \text{ cm}^2$  großen Filtereinsätzen mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen in 12-Loch-Platten kultiviert. Nach 24 h wurden die Filtereinsätze in 6-Loch-Platten überführt und an der Luft-Medium-Grenze weiterkultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt. Die Experimente wurden 2 Tage nach dem Wechsel zur Kultivierung an der Luft-Mediums-Grenze gestartet. Die Konstrukte wurden dreimal mit  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -warmem PBS gewaschen und in 6-Loch-Platten überführt. Der TEER wurde gemessen. Auf der apikalen Zellseite (Donorkompartiment) wurden  $500 \mu\text{l}$  Fluorescein-Testlösung, auf der basolateralen Seite (Akzeptorkompartiment)  $900 \mu\text{l}$  Alcon BSS Plus<sup>®</sup> eingesetzt. Die Zellkulturplatten wurden bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Trockenschrank inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (15, 30, 45, 60, 90, 120 und 150 min) wurden Proben von jeweils  $400 \mu\text{l}$  aus der Akzeptorhälfte entnommen, und das fehlende Volumen wurde mit frischem Alcon BSS Plus<sup>®</sup> ergänzt. Das Vermessen der Proben erfolgte mit dem Fluoreszenzlesegerät. Hierzu wurden jeweils  $150 \mu\text{l}$  des Probenvolumens in schwarze Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen pipettiert. Die Messung erfolgte gegen Blindwerte im Multidetektion-Plattenlesegerät FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg) mit einem Exzitationsfilter von 490 nm und einem Emissionsfilter von 520 nm. Parallel zu den Proben wurden Referenzlösungen der entsprechenden Testsubstanzen vermessen, um entsprechende Kalibriergeraden zu erstellen.

**Datenanalytik.** Mit Hilfe der Kalibrierung wurde die permeierte Substanzmenge ermittelt. Dargestellt wurden kumulative Mengen permeierter Substanz, normiert auf die aufgetragene Menge im Verhältnis zur Zeit. Bei dieser Form der graphischen Darstellung ließ sich im linearen Abschnitt des Graphen, im so genannten steady state Bereich, ebenfalls die Steigung der Regressionsgerade berechnen, die als Flux  $J$  bezeichnet wird. Der Flux wird als die Menge Testsubstanz, die unter steady state Bedingungen eine Flächeneinheit pro Zeiteinheit passiert, definiert (Flynn et al., 1974). Desweiteren wurde der apparente Permeabilitätskoeffizient  $P_{app}$  als Permeationsparameter zur Bewertung der Ergebnisse hinzugezogen. Die Berechnung von  $P$  ist an folgende Bedingungen geknüpft:

Es müssen Sink-Bedingungen im System herrschen, um eine Freisetzungskinetik 0. Ordnung zu gewährleisten. D.h., es dürfen im Akzeptorkompartiment während der gesamten Versuchsdauer 10 % der Sättigungskonzentration der Testsubstanz nicht überschritten werden. Die Donorkonzentration  $C_0$  muss über den gesamten Versuchszeitraum als konstant angesehen werden. Diese Bedingungen wurden bei den nachfolgenden Permeationsstudien weitgehend erfüllt, so dass folgende Gleichung resultiert, in die nur der Flux und die aufgetragene Donorkonzentration  $C_0$  eingehen:

$$P_{app} = V \cdot (dc / dt) / A \cdot C_0$$

$P_{app}$  wird in cm/s angegeben, wobei  $V$  das Volumen des Akzeptorkompartiments (0,9 ml),  $A$  die Fläche der Filtermembran (0,5 cm<sup>2</sup>),  $C_0$  die Ausgangskonzentration der applizierten Substanz in  $\mu$ M und  $dc/dt$  die zunehmende Konzentration der Substanz im Rezeptormedium mit zunehmender Zeit darstellt.

### 2.11 Messung der Esteraseaktivität

Die Permeationsexperimente wurden wie unter 2.9 beschrieben durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten (15, 30, 45, 60, 90, 120 und 150 min) wurden Proben von jeweils 400  $\mu$ l aus der Akzeptorhälfte entnommen und bei -80 °C tiefgefroren, um die chemische Hydrolyse des Diacetats zu vermeiden. Das fehlende Volumen wurde mit frischem Alcon BSS Plus<sup>®</sup> ergänzt. Zur Bestimmung der Fluoreszenz wurden zweimal jeweils 150  $\mu$ l des Probenvolumens in schwarze Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen pipettiert. Die Messung erfolgte gegen Blindwerte im

Multidetektion-Plattenlesegerät FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg) mit einem Exzitationsfilter von 490 nm und einem Emissionsfilter von 520 nm.

### 2.12 Testung auf Gewebsregeneration

Die Regenerationsfähigkeit der Epithelmodelle wurde mittels TEER-Messungen getestet. Hierzu wurden auf die Oberfläche der Epithelmodelle 50 µl einer 0,01 %igen Benzalkoniumchlorid-Lösung bzw. einer 1 %igen SDS-Lösung aufgetragen und für 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Negativkontrolle erfolgte analog mit PBS. Nach Ende der Inkubation wurden die Testsubstanzen gründlich mit PBS abgespült, die Gewebe gewaschen und mindestens 15 min in PBS getränkt. TEER der so geschädigten Gewebe wurde, wie unter 2.7 beschrieben, ermittelt. Die Modelle wurden in mit Medium gefüllte 6-Loch-Platten überführt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für weitere 24 h bzw. 48 h inkubiert. TEER-Messungen erfolgten nochmals nach 24 h und 48 h. TEER-Werte der jeweiligen Testtage wurden auf die Negativkontrolle bezogen, um die prozentuale Regeneration der Gewebe darstellen zu können.

### 2.13 Statistik

**Datenpräsentation.** Sämtliche Ergebnisse sind als arithmetische Mittel (MW) angegeben. Als Maß für die Streuung wurde die Standardabweichung ( $\pm$  SD) oder der Standardfehler ( $\pm$  SEM) berechnet.

**ERGEBNISSE**

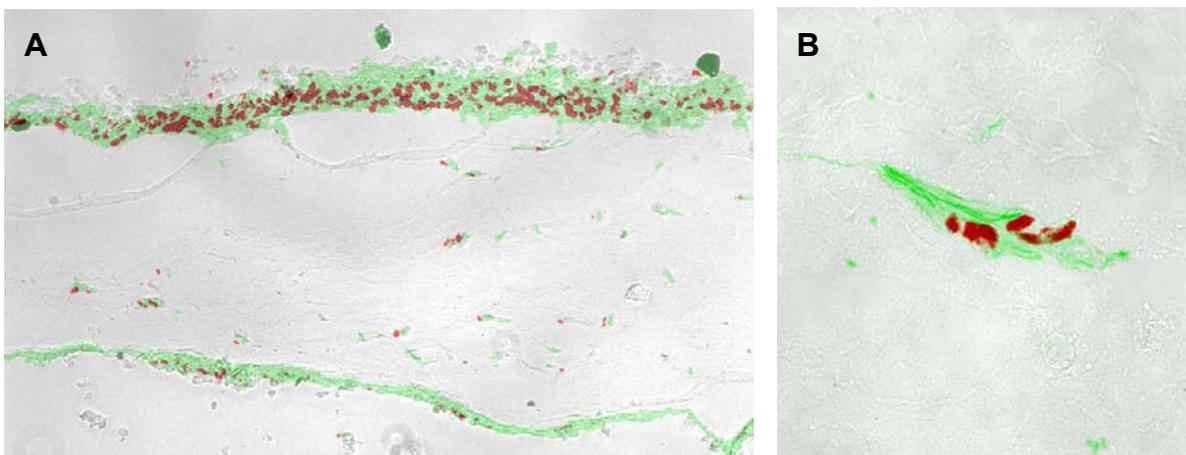
---

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Rekonstruktion des Zorn-Kruppa-Modells

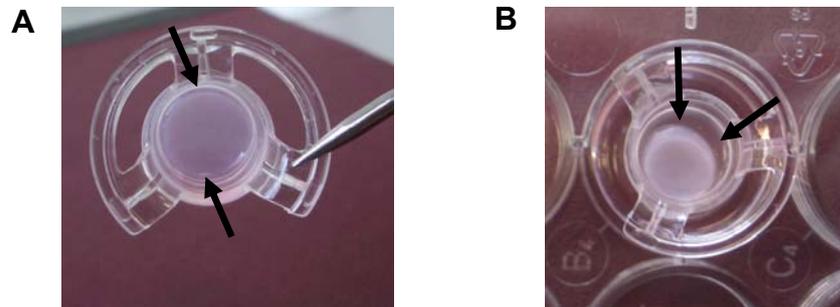
Zunächst wurde der Aufbau des Komplet-Modells der Kornea auf der Basis immortalisierter humaner Zelllinien (Engelke et al., 2004; Zorn-Kruppa et al., 2005; Zorn-Kruppa et al., 2004) am Institut für Pharmazie etabliert. Dieses dreidimensionale Modell ahmt die komplexe Morphologie der *in vivo*-Kornea nach: Eine mit Stromazellen populierte Biomatrix dient als Gerüst für das mehrschichtige Epithel- und das einschichtige Endothelgewebe.

**Morphologie des rekonstruierten Zorn-Kruppa-Modells.** Der Aufbau des Modells erfolgte in Transwell®-Membraneinsätzen. Die ausgesäten Endothelzellen haften gut auf dem mit Kollagen beschichteten Polycarbonatboden des Membraneinsatzes. Die Vitalität der Endothelzellen wurde durch das Aufbringen der Biomatrix nicht beeinträchtigt. Allerdings wurde eine Hyperproliferation der Endothelzellen beobachtet. Anders als bei der Kornea *in vivo* bildete sich keine einschichtige Zellschicht aus, sondern stets ein zwei- bis dreischichtiges Endothel. Das Stroma des Kornea-Konstrukts wurde von Lamellen aus parallel zueinander verlaufenden Kollagenfaserbündeln gebildet (Abb. 4A). Bereits nach wenigen Stunden breiteten sich die im Kollagen eingebetteten Stromazellen langgestreckt und spindelförmig aus (Abb. 4B).



*Abb. 4: (A) Vertikalschnitt durch die rekonstruierte Kornea. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung erfolgte bei 100-facher Vergrößerung, Oregon Green 488 Phalloidin- und Propidiumiodidfärbung. Um die parallel zueinander verlaufenden Kollagenfaserbündel der Biomatrix zu visualisieren, wurde eine lichtmikroskopische Aufnahme als Hintergrundebene eingefügt. (B) Vertikalschnitt durch die Biomatrix mit sich ausspreitenden Keratozyten. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme erfolgte bei 640-facher Vergrößerung, Oregon Green 488 Phalloidin- und Propidiumiodidfärbung.*

Abhängig von der Zellzahl kontrahierte sich das Gel stark. Die Biomatrix löste sich schon nach 24 h vom Rand des Filtereinsatzes und verkleinerte sich in ihrer Fläche. Die maximale Kontraktion war etwa nach vier bis fünf Tagen nach Ausgießen des Gels zu beobachten (*Abb. 5A und B*). Hohe Zellzahlen im Gel beschleunigten die Kontraktion erheblich.



*Abb. 5: Kontraktion der Konstrukte im Transwell<sup>®</sup>-Membraneinsätzen. Bereits 24 h nach Ausgießen (A) löste sich das Gel vom Einsatz. Nach weiteren 5 Tagen (B) war das Gel deutlich sichtbar geschrumpft. Die jeweilige Kontraktion ist mit Pfeilen gekennzeichnet.*

Auf die Biomatrix ausgesäte Epithelzellen zeigten eine gute Adhärenz und Proliferation auf der Geloberfläche. Innerhalb von 24 h bildete sich ein konfluent Monolayer (*Abb. 6A*). Erst bei der anschließenden Kultivierung an der Luft-Medium-Grenzfläche wuchsen die Epithelzellen auf dem Gel mehrschichtig. Lediglich der Zellverband fügte sich nur lose zusammen und Interzellularräume wurden sichtbar. Die klare Strukturierung in Basal-, Flügel- und Oberflächenzellen ging im Vergleich zum Originalgewebe verloren. Eine Bowman-Membran sowie eine Descemet-Membran fehlten ebenfalls.

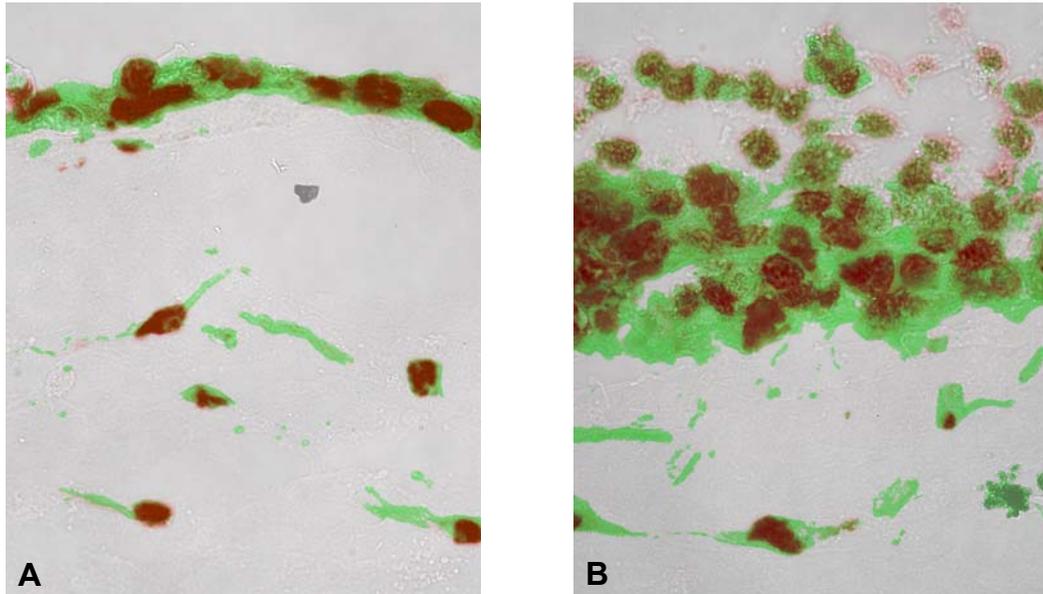


Abb. 6: (A) Vertikalschnitt durch den apikalen Bereich der rekonstruierten Kornea. Ausbildung eines konfluenten Monolayers 24 h nach Aussäen der Epithelzellen auf die Biomatrix. (B) Bei 10-tägiger Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze bildete sich ein lose zusammengefügtes mehrschichtiges Epithel. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme erfolgte bei 640-facher Vergrößerung, Oregon Green 488 Phalloidin- und Propidiumiodidfärbung.

### 3.2 Entwicklung und Charakterisierung des Epithel-Modells

Das Korneaepithel schützt das Augeninnere vor schädigende Umwelteinflüssen, indem es eine chemische und physikalische Barriere zur äußeren Luftumgebung ausbildet. Die Unversehrtheit dieses Gewebes ist deshalb eine wichtige Voraussetzung für die Funktionalität des optischen Apparates des Auges.

Da die histologischen Untersuchungen am Zorn-Kruppa-Modell in Hinblick auf die Differenzierung des Epithelgewebes weitere Optimierungsmöglichkeiten eröffneten, wurden in den folgenden Experimenten zunächst Epithelzellen und schließlich rekonstruierte Epithelgewebe detailliert untersucht und umfassend charakterisiert. Epithelzellen stellen die höchsten Ansprüche an ihre Kulturbedingungen bezüglich der Serumkonzentration, der Nährstoffe und der exogenen Faktoren. Deshalb wurden verschiedene Medien auf ihre Eignung hin getestet, den Aufbau eines mehrschichtigen, ausdifferenzierten und reich an Zell-Zell-Kontakten ausgestatteten Epithelgewebes zu induzieren.

Verglichen wurden serumhaltige und serumfreie Basalmedien. Das Standardkulturmedium für Epithelzellen wurde mit 5 % FKS (DMEM/F12+5%)

bzw. 15 % FKS (DMEM/F12+15%) supplementiert. Dem Advanced DMEM/Ham's F12 Medium (1:1) wurden 2 % FKS (Adv+2%) zugesetzt.

Das serumfreie Basalmedium (KGM) wurde ohne weitere Zusätze eingesetzt oder supplementiert mit Calciumchlorid (KGM+Ca), Calciumchlorid und Hydrocortison (KGM+HC) und Calciumchlorid, Hydrocortison, Ascorbin- und Retinolsäure (KGM+++).

#### **3.2.1 Einfluss verschiedener Medien auf die Adhärenzfähigkeit der Epithelzellen**

Für adhärenzte Zellen spielt neben der Oberflächenbeschaffenheit des entsprechenden Kulturgefäßes das AnwachsmEDIUM eine entscheidende Rolle. Um die Phase des Anwachsens zu verfolgen, wurde die Fähigkeit zur Anheftung an den Well-Boden in den ersten 24 h nach Aussaat der Zellen untersucht (*Abb. 7*).

Die in serumfreien Medium kultivierten Zellen zeigten einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf in den ersten 24 h ihrer Aussaat. Die Anzahl der angewachsenen Zellen vervierfachte sich innerhalb des Beobachtungszeitraums auf  $28255 \pm 102$  Zellzahl/cm<sup>2</sup> in KGM, auf  $25172 \pm 657$  Zellzahl/cm<sup>2</sup> in KGM+Ca und auf  $25381 \pm 440$  Zellzahl/cm<sup>2</sup> in KGM+HC. Vergleichbar mit diesen Ergebnissen präsentierte sich die Adhärenzfähigkeit der in DMEM/F12+15%-Medium ausgesäten Zellen. 24 h nach Aussaat der Zellen erreichten die HCE-Zellen einen Wert von  $27775 \pm 1935$  Zellzahl/cm<sup>2</sup>. Die in Adv+2%-Medium ausgesäten HCE-Zellen ließen die schlechteste Fähigkeit zur Anheftung am Well-Boden erkennen. Innerhalb der ersten 24 h konnte sich die Zellzahl nur von  $6887 \pm 116$  Zellzahl/cm<sup>2</sup> auf  $14102 \pm 2226$  Zellzahl/cm<sup>2</sup> verdoppeln. Da keine nennenswerten Unterschiede in der Aussaat-effizienz festgestellt werden konnten, wurden in den weiteren Versuchen die Zellen in ihrem jeweiligen Kulturmedium ausgesät. Die in Adv+2%-Medium kultivierten Zellen allerdings wurden aufgrund der geringen Anheftung in Adv+2%-Medium nach dem Trypsinierungsvorgang in DMEM/F12+15%-Medium aufgenommen und ausgesät.

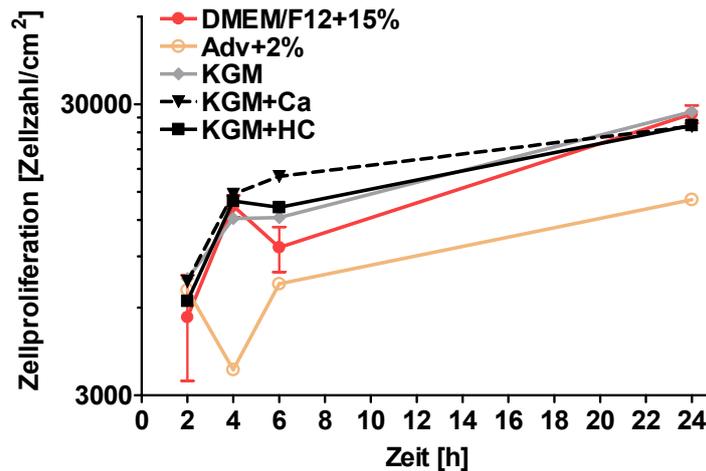


Abb. 7: Zelladhärenz der Epithelzellen innerhalb der ersten 24 h nach Aussaat in verschiedenen Medien. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 4$  Bestimmungen).

### 3.2.2 Vergleich des Wachstums der Epithelzellen in verschiedenen Kulturmedien

Um die Eignung der ausgewählten Medien zur Standardkultivierung und Vermehrung der adaptierten Zellen zu untersuchen, wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über einen Zeitraum von sieben Tagen hinweg bestimmt (Abb. 8).

Die besten Ergebnisse in Bezug auf das Wachstum wurden mit DMEM/F12-Medium erzielt, dem 15 % FKS zugegeben wurde. Nach sieben Tagen Kulturdauer hatte sich die Zellzahl nahezu verzehnfacht. Die Plateauphase wurde bis zu diesem Tag noch nicht erreicht. Der Anteil der nekrotischen Zellen stieg langsam auf 26 % am siebten Kultivierungstag an. Die Wachstumskurven der Epithelzellen, die in KGM bzw. KGM+Ca gezüchtet wurden, zeigten einen sehr ähnlichen Verlauf. In den ersten zwei Tagen verdreifachte sich die Zellzahl etwa, fiel dann aber wieder auf die doppelte Zellanzahl an Tag sieben ab. Dementsprechend ist der nekrotische Anteil der in KGM kultivierten Zellen auch am höchsten. Interessanterweise fiel der Anteil der nekrotischen Zellen im KGM+HC-Medium am geringsten aus (16 % nach sieben Tagen), vergleichbar ungefähr mit den im Adv+2%-Medium kultivierten Zellen (15 % nach sieben Tagen). Das Epithelzellwachstum im KGM+HC-Medium verdreifachte sich am ersten Tag und konnte dieses Niveau fast plateauartig über die restliche Kultivierungsdauer halten.

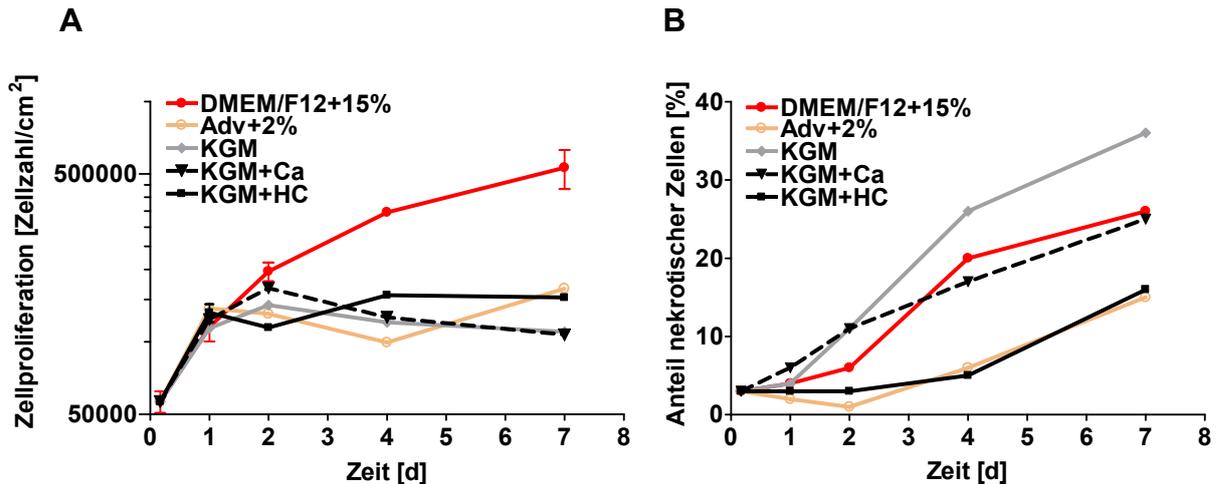


Abb. 8: (A) Zellproliferation der Epithelzellen über einen Zeitraum von sieben Tagen in verschiedenen Medien. (B) Anteil der nekrotischen Zellen während der untersuchten Proliferationsdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 4$  Bestimmungen).

### 3.2.3 Einfluss verschiedener Kulturmedien auf die Morphologie des Epithel-Modells

**Bestimmung der Anzahl der Zellschichten.** Da die Epithelzellen in den Monolayer-Kulturen in allen ausgewählten Medien proliferierten, wurde im Folgenden die Proliferation der Epithelgewebe in den verschiedenen Medien getestet. Für die Begutachtung des Wachstums wurde die Anzahl der ausgebildeten Zellschichten in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer herangezogen. Dazu wurden histologischen Schnittpräparate täglich ab dem Zeitpunkt der Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze angefertigt und lichtmikroskopisch ausgewertet (Abb. 9).

Die in serumhaltigen Medium (DMEM/F12+15%) kultivierten Modelle zeigten im Vergleich zu den serumfrei kultivierten Modellen eine starke Hyperproliferation. Nach acht Tagen waren bereits 13 Zellschichten aufgebaut, die sich bis zum 14. Tag der Kultivierung auf 28 Schichten erhöhten. Dagegen wurde bei den serumfrei kultivierten Modellen eine Zellschichtung beobachtet, die ungefähr den *in vivo*-Bedingungen entsprach (fünf Schichten nach acht Tagen und sieben bis acht Schichten nach 14 Tagen). Dabei zeigten die unterschiedlich supplementierten KGM-Medien nur marginale Unterschiede in der Anzahl der Zellschichten. Die in Adv+2% -Medium kultivierten Modelle entwickelten sich nur mäßig. Die maximale Anzahl von vier Zellschichten wurde erst nach 12 Kultivierungstagen erreicht.

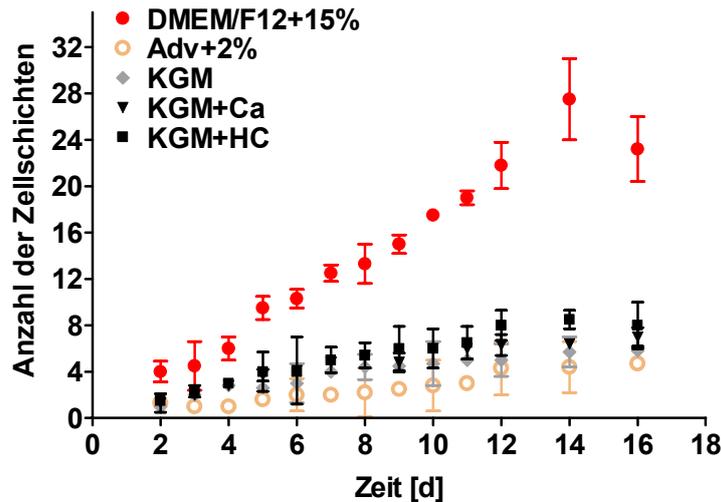


Abb. 9: Ausbildung der Zellschichten in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 4-6$ ). Von jedem Gewebe wurden drei Schnitte angefertigt.

### Vergleich der morphologischen Differenzierung in den verschiedenen Medien.

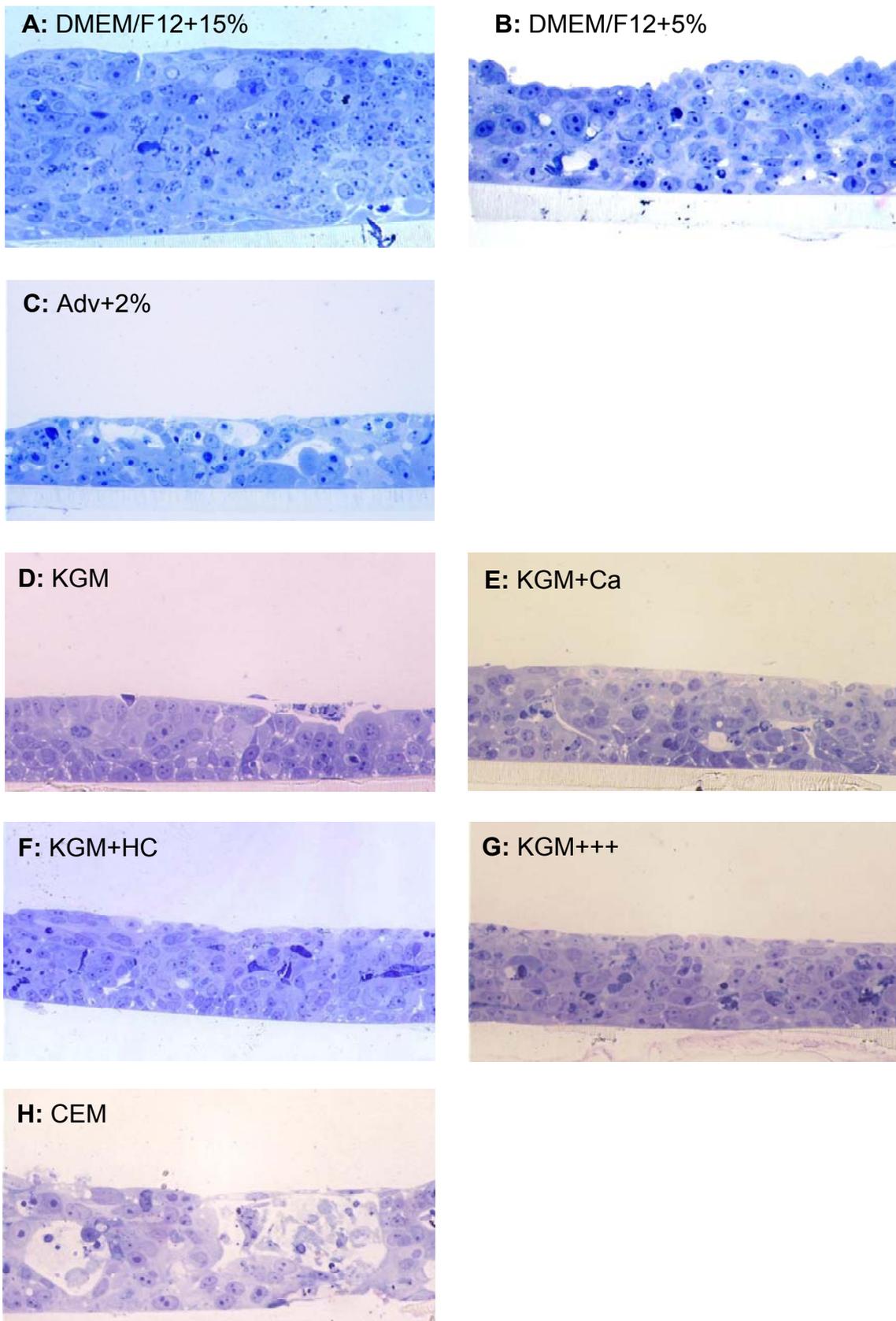
Ein weiteres wichtiges morphologisches Kriterium zum Vergleich der in unterschiedlichen Medien rekonstruierten Modelle und deren qualitativer Beurteilung ist die Differenzierung des Gewebes in Basal-, Flügel- und Oberflächenzellen. Die morphologische Bewertung erfolgte auf Basis der histologischen Erscheinungsbilder (Abb. 10).

Epithelzellen, die in DMEM/F12-Medium mit 15 % FKS kultiviert wurden, zeigten wie bereits im Proliferations-Assay unter 3.2.3 beschrieben, eine Hyperproliferation. Das Epithel wuchs gleichmäßig und schnell in die Höhe. Die Oberflächenzellen flachten während der Migration zum apikalen Pol deutlich ab (Abb. 10A). Die Modelle, welche in mit 5 % FKS supplementiertem Kulturmedium wuchsen, gediehen langsamer. Die acht bis neun übereinander geschichteten Zelllagen offenbarten eine einheitliche polygonale, würfelformartige Zellstruktur (Abb. 10B). Das in Adv+2%-Medium kultivierte Gewebe wies einen sehr unregelmäßigen und losen Aufbau der einzelnen Schichten auf, verbunden mit großen Interzellularspalten. (Abb. 10C).

Die serumfrei kultivierten Modelle hingegen resultierten in einer der normalen Kornea-Morphologie ähnlichen Mehrschichtigkeit (fünf bis sieben Epithellagen nach zehn Tagen). Allerdings wurden Unterschiede besonders in der Oberflächenstruktur und den Zell-Zell-Kontakten sichtbar. Epithelzellen, die in KGM gezüchtet wurden, behielten ihre würfelförmige Gestalt über alle

Zellschichten (*Abb. 10D*), während ein klarer Differenzierungsprozess von der Basalmembran ausgehend hin zur Oberfläche bei den in KGM+Ca, KGM+HC und KGM+++ kultivierten Modellen erkennbar wurde. Die polygonalen Basalzellen wurden zur Oberfläche hin zunehmend flacher. Indes wurden eine starke Vakuolisierung und das Auftreten zahlreicher Interzellularspalten in Modellen beobachtet, die in KGM-, KGM+Ca-, KGM-HC- und CEM-Medium kultiviert wurden.

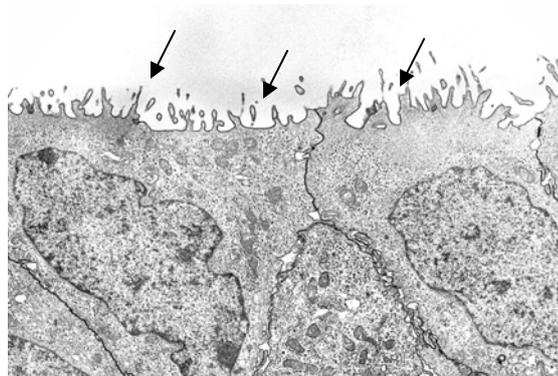
Unter den KGM+++-Kulturbedingungen wurden die besten morphologischen Ergebnisse erzielt. Die Epithelzellen wuchsen in einem soliden Zellverband und differenzierten in einer ausgeprägten Zellschichtung über fünf bis sieben Lagen hin. Die Oberflächenzellen waren schuppenartig abgeplattet und wiesen alle Zellkerne auf. Die mittleren Zellschichten, die so genannten Flügelzellen, waren miteinander eng verzahnt, so dass nur feine Interzellularspalten übrig blieben (*Abb. 10G*). Mittels konfokaler Lasermikroskopie wurde eine Dicke des gesamten Konstrukts von 50 µm ermittelt (Ergebnisse hier nicht dargestellt), die der humaner kornealer Epithelien (50-70 µm) entspricht (Hornof et al. 2005). Die Kultivierung des Epithel-Modells in der Zusammensetzung des KGM+++-Mediums vermochte demnach die *in vivo*-Verhältnisse realistisch widerzuspiegeln und alle weiteren Versuche wurden, sofern nicht anders angegeben, mit den KGM+++-Modellen durchgeführt.



*Abb. 10: Histologische Erscheinungsbilder von Vertikalschnitten durch verschiedene Epithel-Modelle nach 10-tägiger Kultivierung in den einzelnen Medien. Von jedem Gewebe wurden 3 Schnitte angefertigt und jeweils repräsentative Stellen fotografiert. Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung.*

**Oberflächendifferenzierung. Spezialisierung des apikalen Pols.** Um die Oberflächenstruktur und eine eventuelle Polarisierung des kornealen Epithels zu untersuchen, wurden transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, die die Analyse der Ultrastruktur erlauben.

Die apikale Oberfläche der KGM+++-Modelle war mit einem dichten Muster von Microvilli und Microplacae bedeckt, das charakteristisch für die Oberfläche eines mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel ist. Bei den immortalisierten Epithelzellen handelt es sich demnach um polarisiert wachsende Zellen, die eine klare Unterscheidung zwischen basolateraler und apikaler Seite zulassen (Abb.11).



*Abb. 11: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der apikalen Oberfläche eines KGM+++-Modells. Pfeile weisen auf die zahlreichen Microvilli hin. Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte bei 5000-facher Vergrößerung.*

#### **3.2.4 Einfluss verschiedener Kulturmedien auf die Barriereigenschaften des Epithel-Modells**

**Vergleichende Widerstandsmessungen.** Die Ausbildung einer adäquaten epithelialen Barriere ist ein entscheidendes Merkmal für die Güte der rekonstruierten Epithelgewebe und ein direkter Hinweis auf ein elektrisch dichtes bzw. engmaschiges Gewebe.

Um den Einfluss serumhaltiger und serumfreier Kulturbedingungen auf die Barrierefunktion der Modelle zu untersuchen, wurde täglich der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) der in verschiedenen Medien kultivierten Epithel-Modelle bestimmt. Die Messungen begannen jeweils mit der vollständigen Konfluenz der Epithelzellen in den entsprechenden Medien. Der zeitliche Verlauf des TEER in serumhaltigen und serumfreien Medien ist in Abhängigkeit der Zeit

dargestellt. Die serumhaltig kultivierten Modelle, supplementiert mit 5 % oder 15 % FKS, zeigten einen fast identischen Kurvenverlauf. Der elektrische Widerstand stieg langsam und kontinuierlich auf einen TEER-Wert von  $629 \pm 8 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (DMEM/F12+15%) bzw.  $718 \pm 88 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (DMEM/F12+5%) nach 14 Tagen Kultivierungsdauer an. Die TEER-Wert der mit Adv+2%-Medium behandelten Gewebe entwickelte sich die ersten vier Tage in ähnlicher Weise, stieg aber bis zum 14. Tag nur noch geringfügig auf  $264 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  an.

Dahingegen konnte ein deutlich anderer TEER-Verlauf in serumfrei kultivierten Modellen beobachtet werden. Mit Ausnahme der in CEM-Medium kultivierten Modelle stieg der TEER nach Erreichen der Konfluenz sprunghaft an und erreichte bereits am dritten Tag des Kulturverlaufs einen Plateau-Wert (KGM  $614 \pm 91 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ; KGM+Ca  $1062 \pm 77 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ; KGM+HC  $968 \pm 35 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ; KGM+++  $1025 \pm 119 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). Dieser Wert blieb mit Schwankungen bis zum 11. Tag erhalten, um dann wiederum auf einen TEER-Wert von  $471 \pm 15 \Omega \cdot \text{cm}^2$  in KGM,  $590 \pm 29 \Omega \cdot \text{cm}^2$  in KGM+Ca,  $968 \pm 88 \Omega \cdot \text{cm}^2$  in KGM+HC sowie  $683 \pm 92 \Omega \cdot \text{cm}^2$  in KGM+++-Medium abzusinken. Die höchsten TEER-Werte wurden bei den mit KGM+HC behandelten Modellen ermittelt. Der TEER-Wert am dritten Tag stieg kontinuierlich bis zum 11. Tag auf  $1396 \pm 31 \Omega \cdot \text{cm}^2$  an. Einen deutlich langsameren Anstieg des TEER, verbunden mit großen Standardfehlern und einem Einbruch des Widerstands am achten und neunten Tag, ergaben die Messungen der in CEM-Medium gezüchteten Gewebe. Sie erreichten einen maximalen TEER von  $986 \pm 285 \Omega \cdot \text{cm}^2$  an Tag 12 des Kulturverlaufes.

Die in Adv+2%- und DMEM/F12+5%-Medium kultivierten Gewebe wurden aufgrund ihrer geringen TEER-Werte und den nicht zufriedenstellenden morphologischen Erscheinungsbildern in den folgenden Versuchen nicht weiter untersucht.

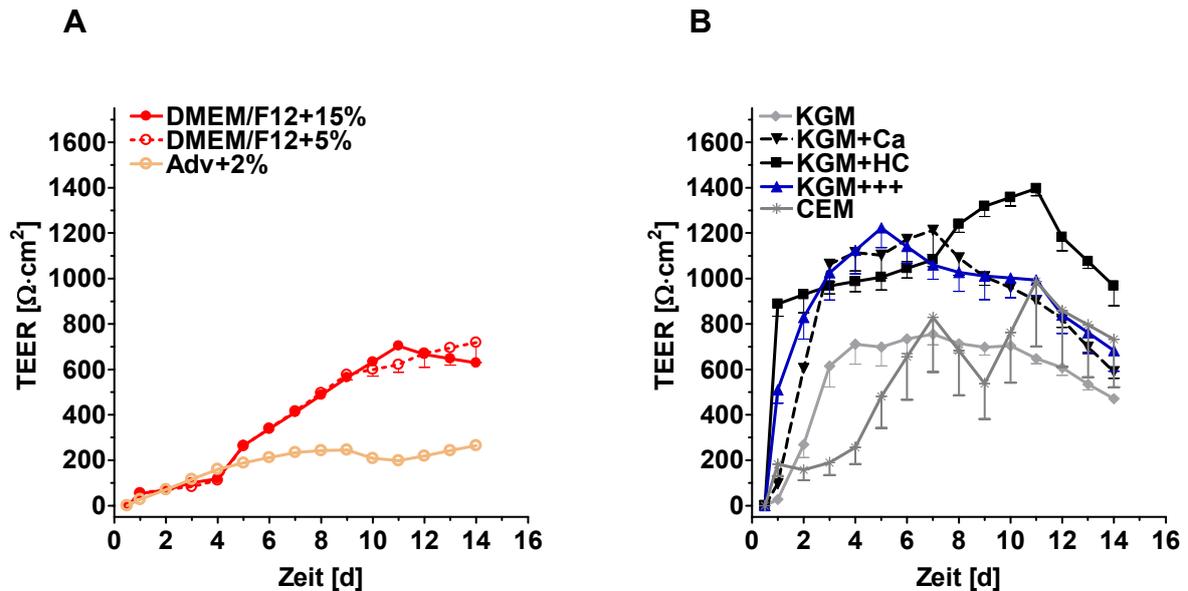


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf des TEER in serumhaltig (A) und serumfrei (B) kultivierten Geweben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (je  $n = 12$  Gewebe).

**Vergleichende Permeationsuntersuchungen.** Um die besseren Barriereigenschaften der serumfrei kultivierten im Vergleich zu den serumhaltig kultivierten Konstrukten zu verifizieren, wurde ein weiterer Parameter, die Permeation des Fluorescein, hinzugezogen. In einer kombinierten Messung zu den angegebenen Zeitpunkten im Kulturverlauf wurde der TEER sowie der apikal-basolaterale Flux von Fluorescein, bzw. der apparente Permeabilitätskoeffizient  $P_{app}$  bestimmt.

**Fluorescein-Permeation.** Die verschiedenen Konstrukten zeigen deutliche Permeabilitätsunterschiede für das Modellsubstrat Fluorescein (Abb. 13). Für die serumhaltig kultivierten Modelle konnte eine erhöhte Permeabilität während des zweiten, dritten und fünften Kultivierungstags an Luft-Medium-Grenze beobachtet werden. Die Permeabilität am neunten Tag war für alle Konstrukte ähnlich. Die KGM+HC-Modelle sowie die KGM+++-Modelle wiesen während der ersten sieben Kultivierungstage eine deutlich bessere Barriere für Fluorescein auf. Die Permeabilität des KGM+HC-Modells bzw. des KGM+++-Modells war am dritten Tag gegenüber dem DMEM/F12+15%-Modell um den Faktor 3,2 bzw. 2,2 erniedrigt. Am fünften Tag ergab sich eine um den Faktor 1,8 bzw 1,9 erniedrigte Permeabilität des KGM+HC- respektive des KGM+++-Modells.

Das Permeationsprofil des CEM-Modells unterlag großen Schwankungen. Die Permeabilität ist im Vergleich zu den serumfreien Kulturen deutlich erhöht und sinkt erst auf eine mit den anderen Modellen vergleichbaren Wert am neunten Kultivierungstag ab.

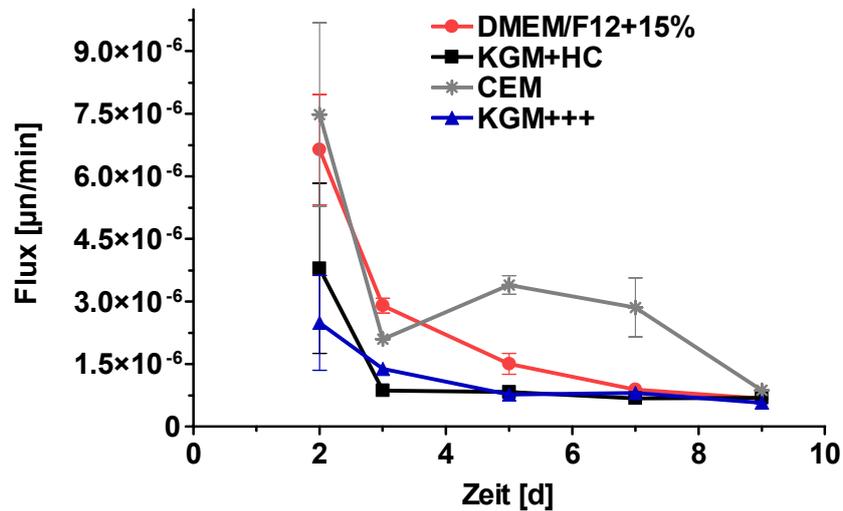


Abb. 13: Vergleich der Fluorescein-Permeation über einen Kultivierungszeitraum von neun Tagen durch verschiedene Epithelmodelle: DMEM/F12+15%-, KGM+HC-, KGM+++-, sowie CEM-Modelle. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 3$  unabhängige Versuche), jeder Versuch wurde 2-fach durchgeführt.

**Korrelation zwischen TEER und Fluorescein-Permeation.** Wie in Abbildung 14 A zu sehen ist, ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen TEER und Fluorescein-Permeation ( $r^2 = 0,773$ ;  $p < 0,1 \%$ ) (Sachs, 1992).

Die Permeabilität sank zunächst stetig mit steigendem Widerstand ab (Abb. 14B). Ab einem TEER-Wert von ca.  $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$  war keine Verbesserung der Permeationsbarriere mehr zu erkennen. Der apparente Permeabilitätskoeffizient nahm bei Widerstandsänderungen von  $293 \Omega \cdot \text{cm}^2$  bis  $1214 \Omega \cdot \text{cm}^2$  lediglich im Bereich von  $2,55 \times 10^6 \text{ cm/s}$  auf  $1,73 \times 10^6 \text{ cm/s}$  ab (Abb. 14B)

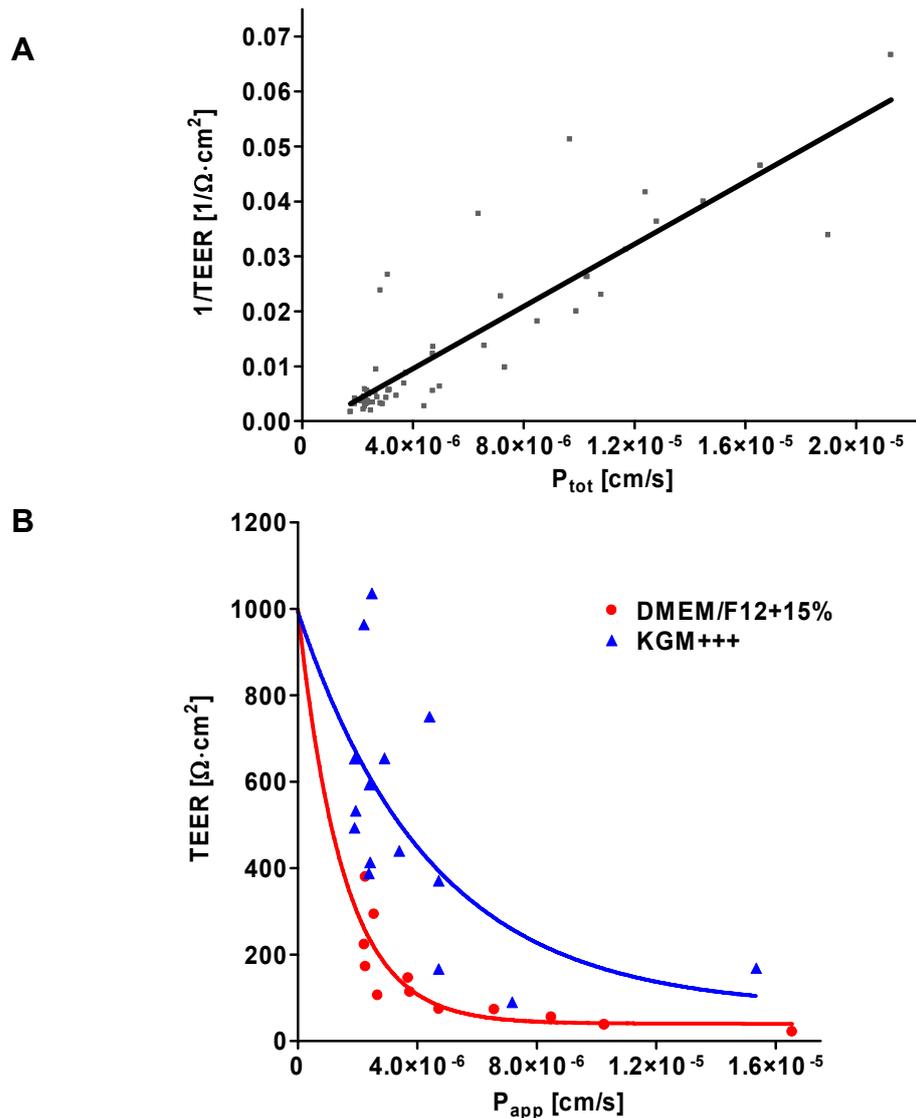


Abb. 14: (A) Korrelation des TEER-Kehrwerts und des apparenten Permeabilitätskoeffizient  $P_{app}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte von  $n = 4$  (KGM+++ -Modell) bzw.  $n = 3$  (DMEM/F12+15%-, CEM-, KGM+HC-Modell) unabhängigen Versuchen, jeder Versuch wurde 2-fach durchgeführt. (B) TEER-Werte in Abhängigkeit des apparenten Permeabilitätskoeffizient  $P_{app}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte von  $n = 3$  (DMEM/F12+15%-, CEM-, KGM+HC-, KGM+++ -Modell) unabhängigen Versuchen, jeder Versuch wurde 2-fach durchgeführt.

**Immunzytochemische Untersuchungen der tight junctions.** Tight junctions bilden interzelluläre Verbindungen zwischen Epithelzellen. Sie schließen Lücken zwischen den Zellen und schränken somit die parazelluläre Diffusion auch von niedermolekularen Substanzen wie Fluorescein stark ein. Für die Barrierefunktion des kornealen Epithels sind sie essenziell. In den apikalen Epithelschichten vermögen sie über 60 % des kompletten kornealen Widerstandes aufzubauen, die Werte werden mit  $3,3 \pm 1,5 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Klyce, 1972) respektive  $7,5 \pm 0,2 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Marshall & Klyce, 1983) angegeben.

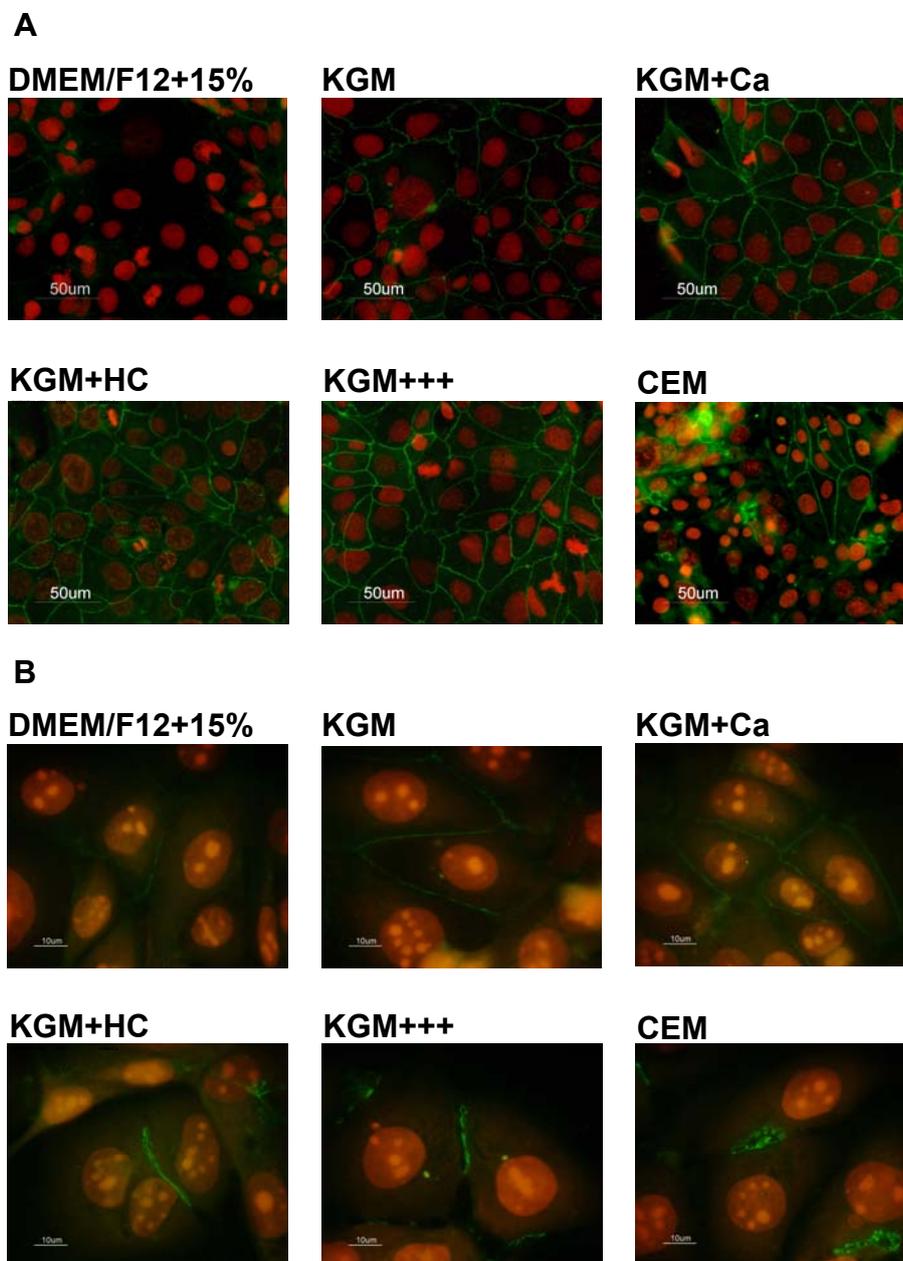
Tight junctions umzirkeln in Form einer abdichtenden Zone (Zonula occludens) die Zellen. Da tight junctions als Linien und Netze besonders gut im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen sind, wurden zunächst die in unterschiedlichen Medien kultivierten Epithel-Monolayer auf die zelluläre Lokalisation des Membranproteins ZO-1, ein tight junction-assoziiertes Protein, hin getestet.

Da Epithelzellen nur bei Kontakt untereinander tight junctions ausbilden können, wurden die Zellkulturen täglich phasenkontrastmikroskopisch beurteilt. Erst bei einem klar erkennbaren konfluenten Zellrasen aus morphologisch ausdifferenzierten Epithelzellen erfolgten die weiteren Arbeitsschritte. Die Konfluenz wurde zusätzlich durch Anfärbung der Zellkerne mit Hilfe von Propidiumiodid sichergestellt. Der Zeitpunkt der Konfluenz variierte trotz konstanter Zellzahl pro Fläche bei Einsaat je nach Kulturbedingung um einige Tage, da sich die Wachstumsgeschwindigkeiten der Zellen in den einzelnen Nährmedien stark unterschieden (*siehe hierzu 3.2.2*). Im Durchschnitt waren die HCE-Zellen ab dem vierten Tag nach Einsaat konfluent.

Die Immunfluoreszenz zeigte eine deutlich reduzierte Expression von ZO-1 bei dem serumhaltig kultivierten Modell im Vergleich zu den serumfrei kultivierten Modellen (*Abb. 15A und B*). Auch das in reinem KGM-Medium gezüchtete Gewebe, das ohne jegliche Zusätze auskommen musste, ließ nur eine schwache Fluoreszenz erkennen. Dagegen war in den serumfreien Medien KGM+Ca, KGM+HC sowie KGM+++ eine stark grüne randständige Fluoreszenz der Epithelzellen detektierbar. Diese Lokalisation entspricht der räumlichen Verteilung der tight junctions in der Zellperipherie. Das bedeutet, dass ZO-1 bei bestehendem Zellkontakt in einer ausdifferenzierten HCE-Zellkultur im Bereich der tight junctions lokalisiert ist. Eine deutlich diffusere Fluoreszenz ließ sich in den CEM-kultivierten Zellkulturen erkennen. Das netzartig fluoreszierende Erscheinungsbild der Zellkultur trat nur lückenhaft auf. ZO-1 war nicht mehr in der Zellmembran, sondern intrazellulär lokalisiert.

Die Ergebnisse der Immunzytochemie bestätigen demnach die vorangegangenen biophysikalischen Untersuchungen der Barriereigenschaften und zeigen, dass die Intensivität sowie die Verteilung des Proteins in den verschiedenen Kulturmedien mit der Ausprägung der epithelialen Barrierefunktion korrelieren. Neben der Detektion des membrangebundenen ZO-1 mittels Fluoreszenzmikroskopie sollte

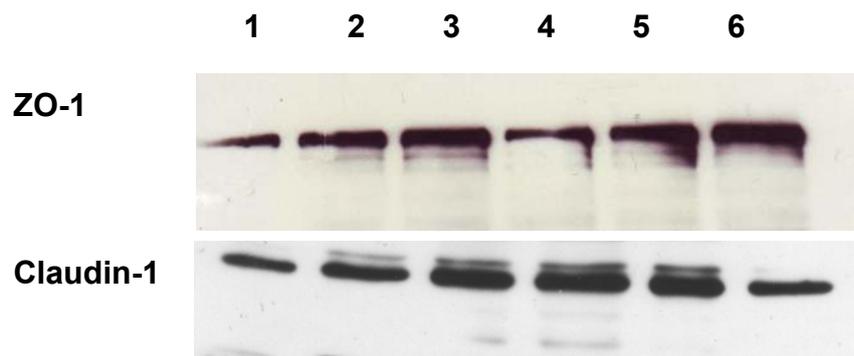
geprüft werden, ob sich der Gesamtgehalt an ZO-1 in der Zelle ändert. So erfolgte die ZO-1-Bestimmung zusätzlich aus dem Zelllysat der Epithelzellen mittels Western Blot-Analytik.



**Abb. 15:** Indirekte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von ZO-1 in Epithel-Zellkulturen und zwei Vergrößerungen (A) und (B): DMEM/F12+15%, KGM, KGM+Ca, KGM+HC, KGM+++, CEM. Mittels Propidiumiodid-Färbung wurde der konfluente Zellrasen visualisiert. Zwei unabhängige Wiederholungen des Experiments zeigten die gleichen Ergebnisse.

**Western Blot-Analytik, ZO-1.** Zur Verifizierung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde eine Western Blot-Analyse aus den jeweiligen Zelllysaten der HCE-Zellkulturen durchgeführt. Die fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen konnten dabei weitestgehend bestätigt werden. Es zeigte sich, dass die serumhaltige Kultivierung (DMEM/F12+15%) die ZO-1 Expression deutlich reduzierte (*Abb. 16, Bande 1*). Western Blots der KGM-Zellkulturen ließen auf eine im Vergleich dazu höhere Proteinexpression schließen, die nochmals durch die Kultivierung der HCE-Zellen im KGM+Ca-, KGM+++ und CEM-Medium gesteigert werden konnte (*Abb. 16, Banden 3, 5 und 6*).

**Western Blot-Analytik, Claudin-1.** Auch das transmembranale Adhäsionsprotein Claudin-1 wurde bei serumhaltiger (DMEM/F12+15%) – im Vergleich zu serumfreier Kultivierung – wenig gebildet (*Abb. 16, Bande 1*). Die Claudin-1 Expression konnte in KGM+Ca, KGM+HC und KGM+++ (*Abb. 16, Banden 3, 4 und 5*) deutlich gesteigert werden.

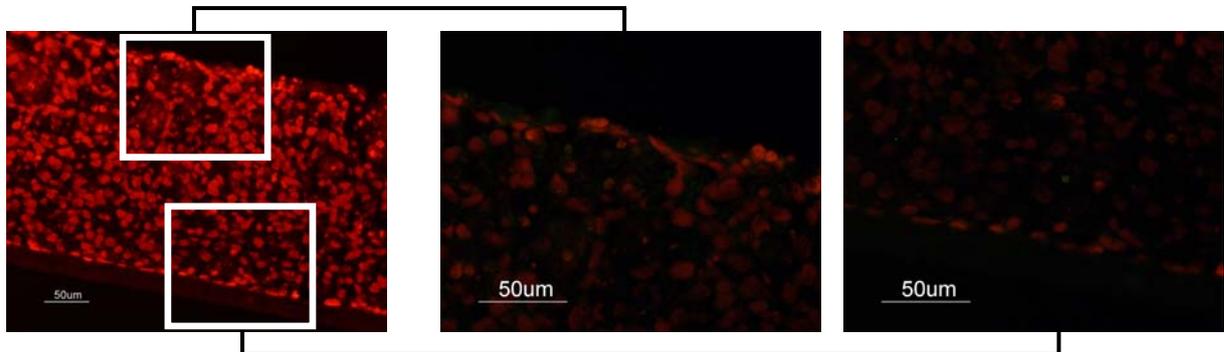


*Abb. 16: Einfluss der verschiedenen Kulturmedien auf den Gesamtgehalt an ZO-1 und Claudin-1 in den konfluenten HCE-Zellkulturen, 1 DMEM/F12+15%, 2 KGM, 3 KGM+Ca, 4 KGM+HC, 5 KGM+++ und 6 CEM. Zwei unabhängige Wiederholungen des Experiments zeigten die gleichen Ergebnisse.*

**Immunohistochemie.** Der Nachweis des tight junctions-assoziierten Proteins Claudin-1 erfolgte immunhistochemisch. Untersucht wurde das Auftreten von Claudin-1 sowohl bei serumhaltig kultiviertem Gewebe als auch bei serumfrei gezüchtetem Epithelkonstrukt (KGM+Ca-Modell). Die in DMEM/F12+15%-Medium kultivierten Modelle zeigten keine Färbung im Fluoreszenzmikroskop für den Claudin-1-Antikörper (*Abb. 17*). Dahingegen wurden besonders die basalen Schichten des serumfrei gezüchteten Modells (KGM+Ca) durch den Claudin-1-Antikörper angefärbt. Tight junctions waren als grün eingefärbtes Band sichtbar. Im apikalen Gewebekonstrukt wurde Claudin-1 nicht detektiert.

Bei allen Untersuchungen zeigte die Referenz ohne primären Antikörper keinen positiven Nachweis auf Claudin-1.

#### DMEM/F12+15%



#### KGM+Ca

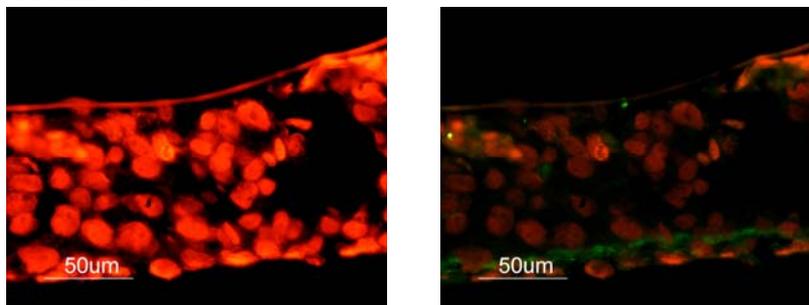
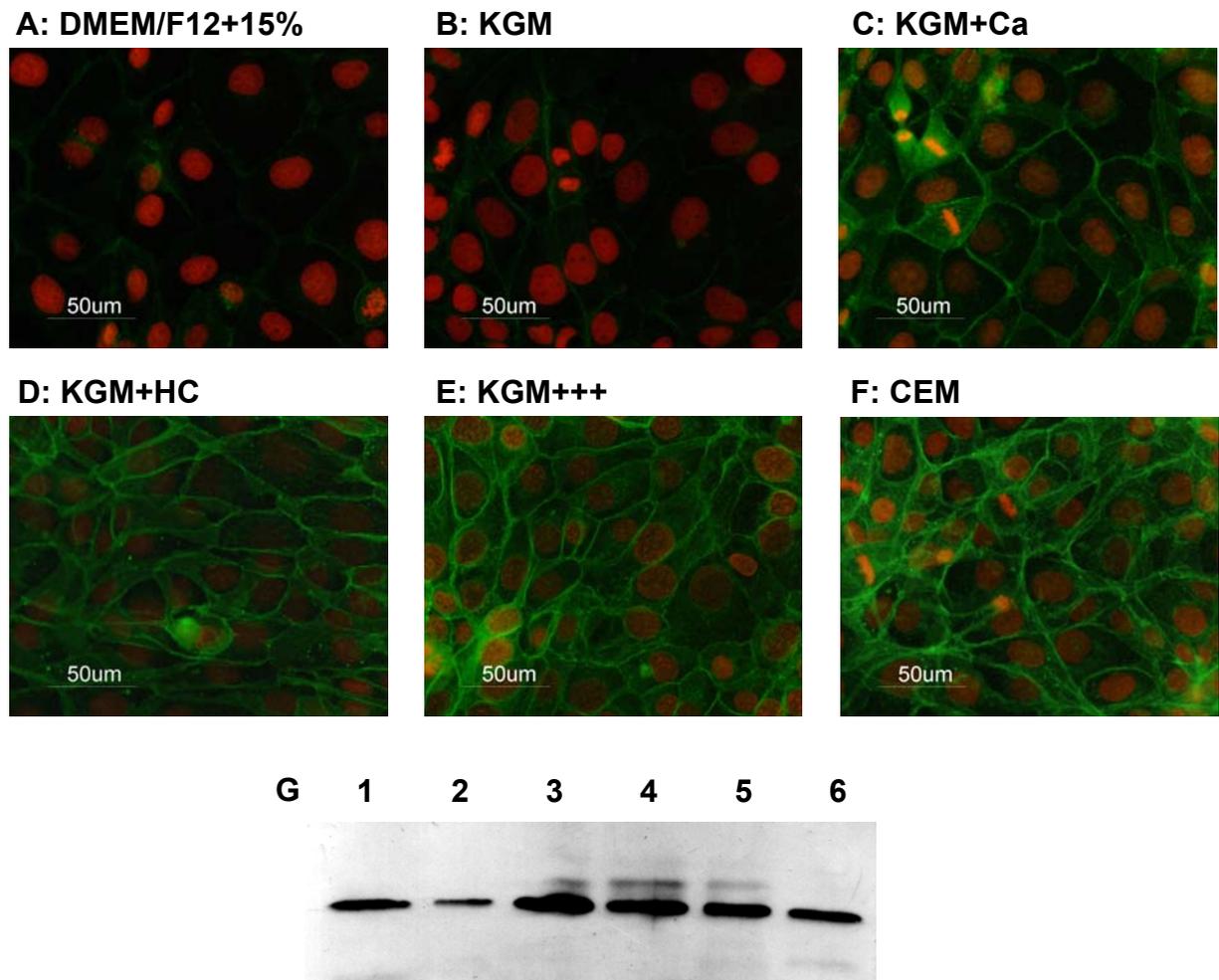


Abb. 17: Indirekte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von Claudin-1 in DMEM/F12+15%-Gewebe und KGM+Ca-Gewebe. Mittels Propidiumiodid-Färbung wurde das intakte Epithelgewebe visualisiert. Zwei unabhängige Wiederholungen des Experiments zeigten die gleichen Ergebnisse. Die Negativkontrollen zeigten keine Fluoreszenz.

**Immunzytochemische Untersuchungen und Western Blot-Analytik der adherens junctions und Desmosomen.** Neben den tight junctions gibt es noch weitere Strukturen, die Zellen miteinander verbinden und zum sogenannten Verbindungskomplex (junctional complex) gehören. Sie werden als adherens junctions und Desmosomen bezeichnet und sind für einen stabilen Zellverband unabdingbar. Diesen Adhäsionsverbindungen gemeinsam ist das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Transmembranprotein E-Cadherin, welches über Ankerproteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden ist. Deshalb war es von Interesse, die Auswirkungen der Kulturmedien auch auf die E-Cadherin-Expression sowie dessen Verteilung in den HCE-Zellkulturen hin zu testen.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die in serumhaltigem Medium, ebenso wie in reinem KGM-Medium kultivierten Zellen kaum E-Cadherin exprimierten. Eine starke Zunahme der Fluoreszenz konnte für die KGM+Ca-,

KGM+HC-, KGM+++ und CEM-Medien beobachtet werden und mittels Immunoblot-Analytik weitestgehend bestätigt werden.



**Abb. 18:** Indirekte Fluoreszenzfärbung zur Detektion von E-Cadherin in unterschiedlich kultivierten Epithel-Zellkulturen: (A) DMEM/F12+15%, (B) KGM, (C) KGM+Ca, (D) KGM+HC, (E) KGM+++, (F) CEM, bei gleichzeitiger Propidiumiodid-Färbung, um die einheitliche Kultivierung eines konfluenten Zellrasens zu bestätigen. (G) Western Blot 1 DMEM/F12+15%, 2 KGM, 3 KGM+Ca, 4 KGM+HC, 5 KGM+++ und 6 CEM. Zwei unabhängige Wiederholungen des Experiments zeigten die gleichen Ergebnisse.

**Ultrastrukturelle Analyse der Zell-Zell-Kontakte.** Transmissionselektronenmikroskopische Bilder vermitteln detaillierte Einblicke in die Formierung interzellulärer Verbindungen, die wie bereits erwähnt für Zusammenhalt, Haftung und Starrheit epithelialer Strukturen sorgen. Um den Aufbau der Zell-Zell-Kontakte nicht nur in der Zellkultur sondern auch direkt im rekonstruierten Gewebe

charakterisieren zu können, wurden deshalb elektronenmikroskopische Aufnahmen der KGM+++-Modelle angefertigt.

Die Aufnahmen zeigten die punktförmige Verknüpfungen der Epithelzellen im apikalen Bereich der tight junctions, an denen wiederum Aktinfilamente des Zytoskeletts befestigt waren (*Abb. 19B*) Die Epithelzellen sind eng miteinander verbunden und versiegeln regelrecht das Gewebe zur äußeren Umgebung hin. Den Zonulae occludentes (tight junctions) folgten die Zonulae adherentes (adherens junctions) und Maculae adherentes (Desmosomen) (*Abb. 19C*). Die Elektronen-mikroskopie bestätigte die immunzytochemischen und biophysikalischen Ergebnisse des intakten Aufbaus einer kornealen Barriere der KGM+++-Modelle.

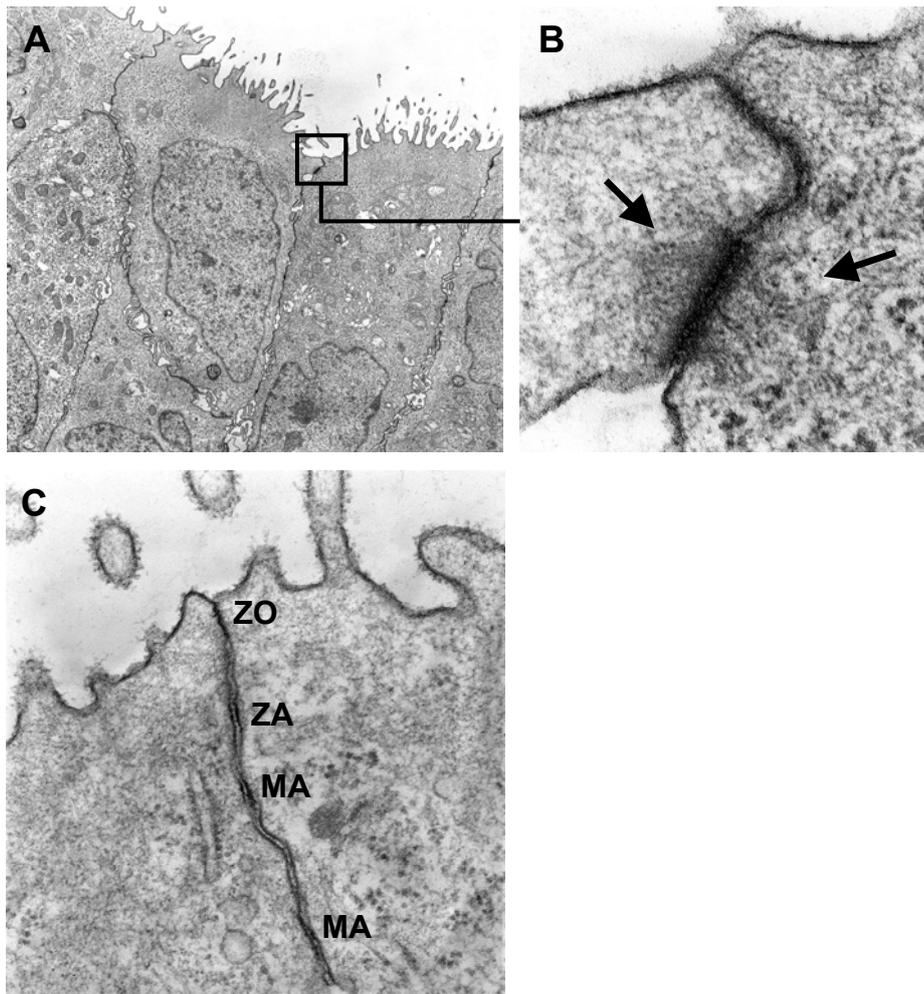


Abb. 19: Elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild der apikalen Zone des KGM+++-Modells nach 11-tägiger Kultivierungsdauer an der Luft-Medium-Grenze. Die Oberfläche (A) ist mit zahlreichen Microvilli besetzt und leistenförmige Kontaktstellen zwischen den Zellmembranen sind sichtbar (5000-fache Vergrößerung). Der Ausschnitt (B) fokussiert einen Tight junction-Komplex, der über Membranproteine mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts der Zelle verknüpft ist (Pfeile) (80000-fache Vergrößerung). Die Interzellulärverbindungen in (C) setzen sich zusammen aus einer Tight junction (ZO) gefolgt von einer Adherens junction (ZA) und Punktdesmosomen (MA) (50000-fache Vergrößerung).

### 3.2.5 Charakterisierung der Metabolisierungsaktivität

Die Bestimmung der Esteraseaktivität der HCE-Zellen erfolgte nach einer Methode von Baker et al. (Baker et al., 1993) mit Modifizierung der Substratkonzentration. Dabei wurde Fluoresceindiacetat (FD) als farbiges Esterasesubstrat eingesetzt. Das Ausmaß der enzymatischen Hydrolyse des Diacetats (farblos) durch die zellulären Esterasen wurde anhand der Diffusion des Fluoresceins (gelb) in das Akzeptorkompartiment visualisiert und photometrisch vermessen.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Permeation von Fluorescein und seinem Diacetat-Derivat (Abb. 20). Fluoresceindiacetat wurde während der gesamten Versuchsdauer in einer konstanten Umsatzrate metabolisiert und konnte die parazelluläre Hürde in größerem Ausmaß als Fluorescein überwinden. Zu den Zeitpunkten der ersten beiden Probenentnahmen, nach 15 und 30 min, diffundierten aus dem Fluorescein-Donorkompartiment jeweils fast 50 % weniger Fluorescein ins Akzeptormedium (0,06 % bzw. 0,11 % nach 15 min und 0,52 % bzw. 0,95 % nach 30 min). Dieser starke Unterschied in den Permeationsraten blieb im weiteren Versuchverlauf erhalten. Nach 150 min permeierten ca. 30 % mehr Fluorescein ausgehend vom Diacetat im Donorkompartiment (8,33 % nach 150 min in der Kontrolle, respektive 11,61 %). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Fluoresceindiacetat im KGM+++-Modell zunächst die lipophile Zellmembran überwindet, durch Esterasen im intrazellulär zu Fluorescein hydrolysiert wird, aufgrund des Konzentrationsgradienten wiederum aus der Zelle diffundiert und über transzelluläre Poren ins Akzeptormedium gelangt.

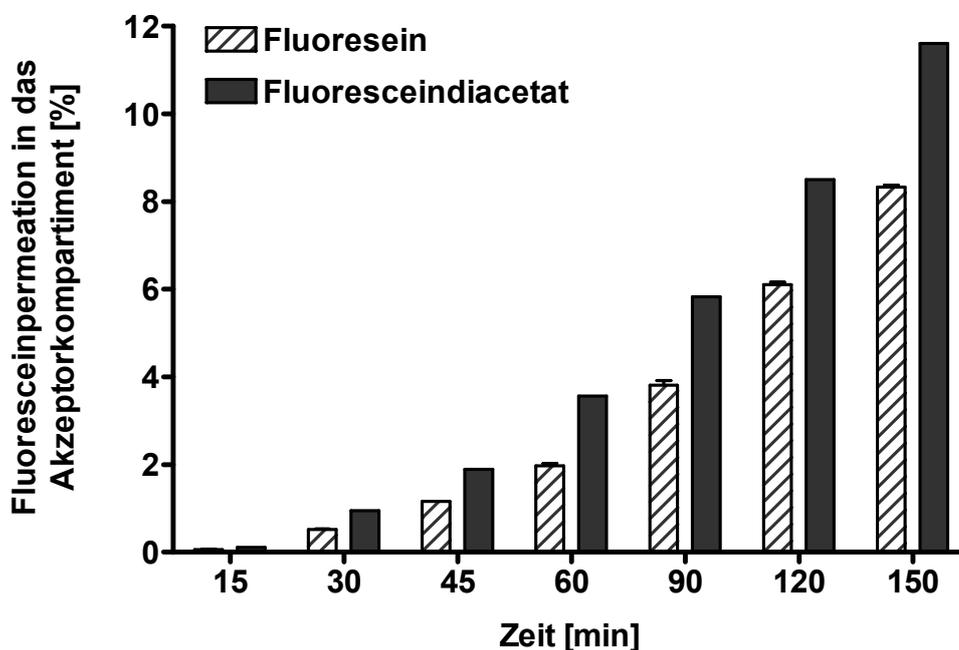


Abb. 20: Umsatz von Fluoresceindiacetat zu Fluorescein während der Inkubation mit Fluoresceindiacetat im KGM+++-Modell nach 11 Tagen Kultivierungsdauer in Abhängigkeit von der Zeit. Als Vergleich diente die zunehmende Fluoresceinkonzentration im Akzeptormedium bei Fluorescein-Applikation. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 3$  verschiedenen Geweben, jeweils durchgeführt als Doppelbestimmung.

### 3.2.6 Gewebsregeneration

Die Gewebe, die der nicht irritierenden Substanz (BAC 0,01 %) ausgesetzt wurden, stellten ihre Barriereigenschaften zu 90 % der Kontrolle nach 48 h der Regeneration wieder her. Die Exposition mit einer leicht irritierenden Substanz (SDS 1 %) resultierte dagegen in einer weniger substantiellen, aber immer noch darstellbaren Regeneration von 35 % bezogen auf die Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt. Für beide Testsubstanzen waren die Ergebnisse der Regeneration nach 72 h (nicht dargestellt) ähnlich derer nach 48 h, was darauf hindeutet, dass keine weitere Gewebsregeneration in diesem Zeitfenster stattfand. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die TEER-Bestimmung als sensitiver Endpunkt in der Vorhersage und Unterscheidung von nicht und leicht irritierenden Substanzen des kornealen Epithels eignen könnte (Abb. 21).

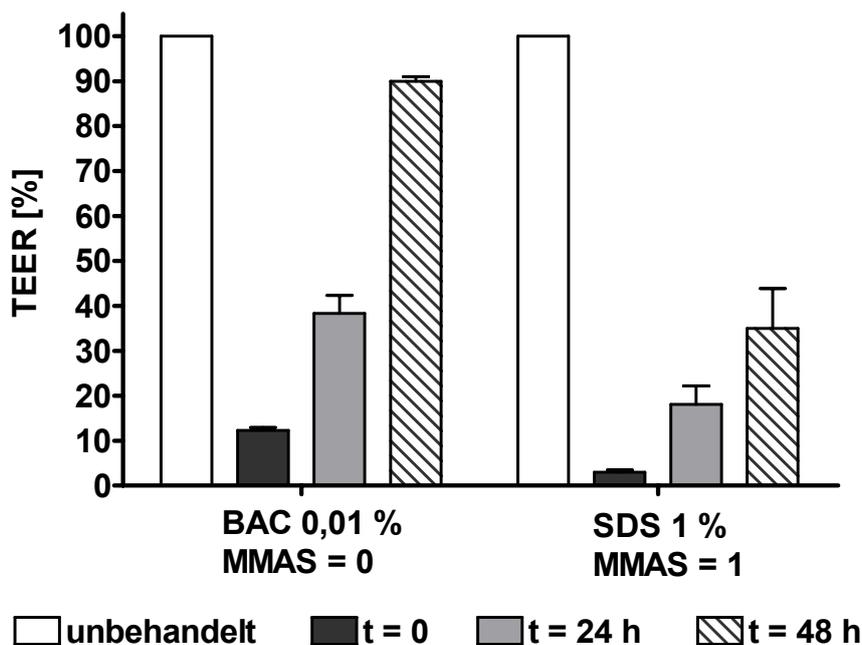


Abb. 21: Effekte der Exposition einer nicht und einer leicht irritierenden Substanz auf die Barriereigenschaften des KGM+++-Modells. Dargestellt sind die TEER-Werte unmittelbar vor und nach der Exposition ( $t = 0$ ) und 24 h bzw. 48 h (Regeneration) später. Die Ergebnisse wurden auf den TEER der unbehandelten Konstrukte (100 %) normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (Doppelbestimmung von  $n = 3$  Gewebe).

### 3.3 Entwicklung und Charakterisierung des Stroma-Epithel-Modells

Nach der Rekonstruktion des reinen Epithelmodells und dessen ausführlicher Charakterisierung hinsichtlich der Zelldifferenzierung, der Morphologie sowie der Barrierefunktion sollte im nächsten Schritt das rekonstruierte Epithel um das Gerüst der Biomatrix ergänzt werden. Die Erweiterung des Epithelmodells um diese wesentliche Komponente der humanen Hornhaut könnte ein wertvolles Instrument darstellen, um an dem Gewebe humanen Ursprungs Ergebnisse zu erarbeiten, deren Übertragbarkeit auf die Situation im Körper weniger limitiert ist, als bei einfachen Zellkultursysteme oder reinen Epithelmodellen. Das Stroma-Epithel-Modell verspricht deshalb eine höhere Aussagekraft bezüglich der Vorhersage von Persistenz respektive Reversibilität eines Augenschadens sowie der transkornealen Permeation von Ophthalmika (Li et al., 2005).

Die Rekonstruktion dieser Matrix stellt hohe Anforderungen: So dient die Matrix als Gerüst für die Epithel- und Endothelzellschicht, zudem sollte sie eine geringe Lichtabsorption und Streuung aufweisen. Außerdem muss sich die Matrix durch eine entsprechende Festigkeit auszeichnen, um einem Transfer, zum Beispiel in eine Franz-Zelle, Stand halten zu können (Duan et al., 2006).

**Stabilisierung der Biomatrix.** Die ersten Versuche zum Aufbau einer Gelmatrix im Zorn-Kruppa-Modells erwiesen sich als problematisch, wie unter 3.1. beschrieben. Bereits 24 h nach Ausgießen des Gels trat eine Kontraktion ein, die ihren Höhepunkt an Tag vier bis fünf erreichte. Deshalb wurde zunächst versucht, die Gelmatrix durch Quervernetzung der Kollagenfibrillen zu stabilisieren und so einer frühzeitigen Kontraktion des Gels entgegenzuwirken. Der aktuellen Forschung entsprechend wurde die Methodik der Glutaraldehyd-Vernetzung eingesetzt, bei der eine Mischung aus Kollagen und Chondroitin-6-sulfat mit Glutaraldehyd versetzt wurde. Die Keratozyten wurden in dieser Lösung suspendiert, der Gelierungsprozeß trat über eine pH-Wert Verschiebung bei 37 °C ein. Dieser Prototyp einer biosynthetischen Kornea-Matrix sollte eine sehr gute morphologische und physiologische Übereinstimmung mit der menschlichen Kornea zeigen. Allerdings reduzierte die Vernetzung die Viabilität der Keratozyten im Vergleich zur Viabilität der Keratozyten in unvernetzten Gelen erheblich (*Abb. 22*): Die flügelartigen Fortsätze der Keratozyten fehlten, nur mehr vereinzelte Zellen bildeten die charakteristische spindelförmige Gestalt im Gel aus.

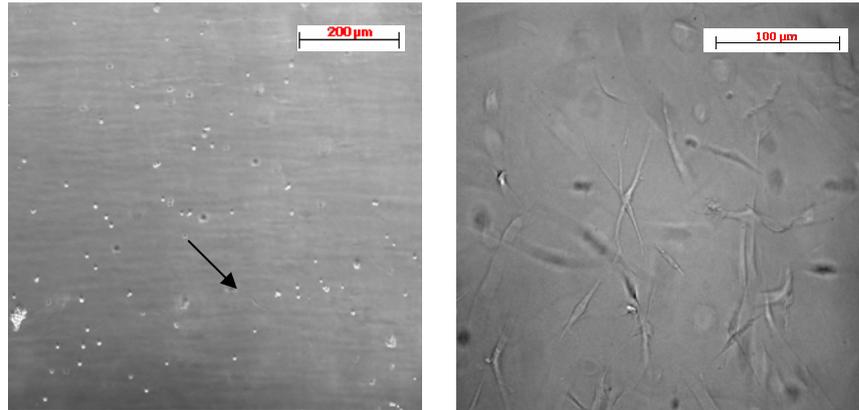


Abb. 22: (A) Viabilität der Keratozyten im vernetzten und (B) unvernetzten Gel (Thermogel) nach fünf Tagen. Die fehlende Ausstreckung der Keratozyten im Gel (A) deutete auf eine starke Abnahme der Viabilität der Zellen hin. Vereinzelt zeigten sich noch die flügelartigen Fortsätze der Keratozyten (Pfeil).

**Stabilisierung nach Griffith.** Griffith et al. nutzen zwei verschiedene Methoden zur Kollagenvernetzung, die Fähigkeit der Transglutaminase (TG) zur Vernetzung von Proteinen, aber auch die bereits erwähnte Glutaraldehyd (GA)-Technik (Griffith et al., 1999; Suuronen et al., 2004a). Diese Verfahren wurden hinsichtlich der Gelkontraktion und der Viabilität der in die Matrix eingebetteten Keratozyten mit unbehandelten Gelen (Thermogelen) verglichen. An acht Tage alten Kulturen ergab die visuelle Beurteilung der Gele, dass mittels GA-Vernetzung die größte Festigkeit erreicht wurde. Im Vergleich zu den GA-Gelen, zeigten die TG-Gele eine leichte Reduktion der Gesamtfläche, die aus einer Kontraktion der Kollagenränder resultierte. Bei den Thermogelen wurde ein komplettes Zusammenziehen des Kollagens beobachtet, das die Gesamtstruktur des Gels kaum mehr erkennen ließ.

Durch die Live-Dead-Staining Methode wurde weiterhin die Überlebensfähigkeit der Stromazellen in den verschiedenen Gelen untersucht (Abb. 23). Die Stromazellen der unbehandelten Gele zeigten eine gleichbleibende Viabilität von 86 % am zweiten und 87 % am achten Tag bei geringer Gelfestigkeit. Fast annähernd so gute Überlebensraten wiesen die Stromazellen in den mittels TG vernetzten Gelen auf, nämlich 81 % am zweiten sowie am achten Tag. Deutlich geringere Viabilitätsraten allerdings wurden in GA-vernetzten Gelen beobachtet. Nach zwei Tagen überlebten im 0,02 %igem GA-Gel 56 % bzw. im 0,002 %igem GA-Gel 59 % der Keratozyten. Allerdings erholten sich die Stromazellen bei weiterer Kultur der Gele rasch. Die fibroblastenartige Fortsätze deuteten auf ein

intaktes Stromamilieu hin. Nach acht Tagen waren 71 % der Zellen im 0,02 %igem GA-Gel und 72 % im 0,002 %igem GA-Gel vital.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die Stroma-Epithel-Modelle mittels GA 0,02 % vernetzt, da diese Methodik zur besten Gelfestigkeit führte und ein zufrieden stellendes Viabilitätsergebnis lieferte.

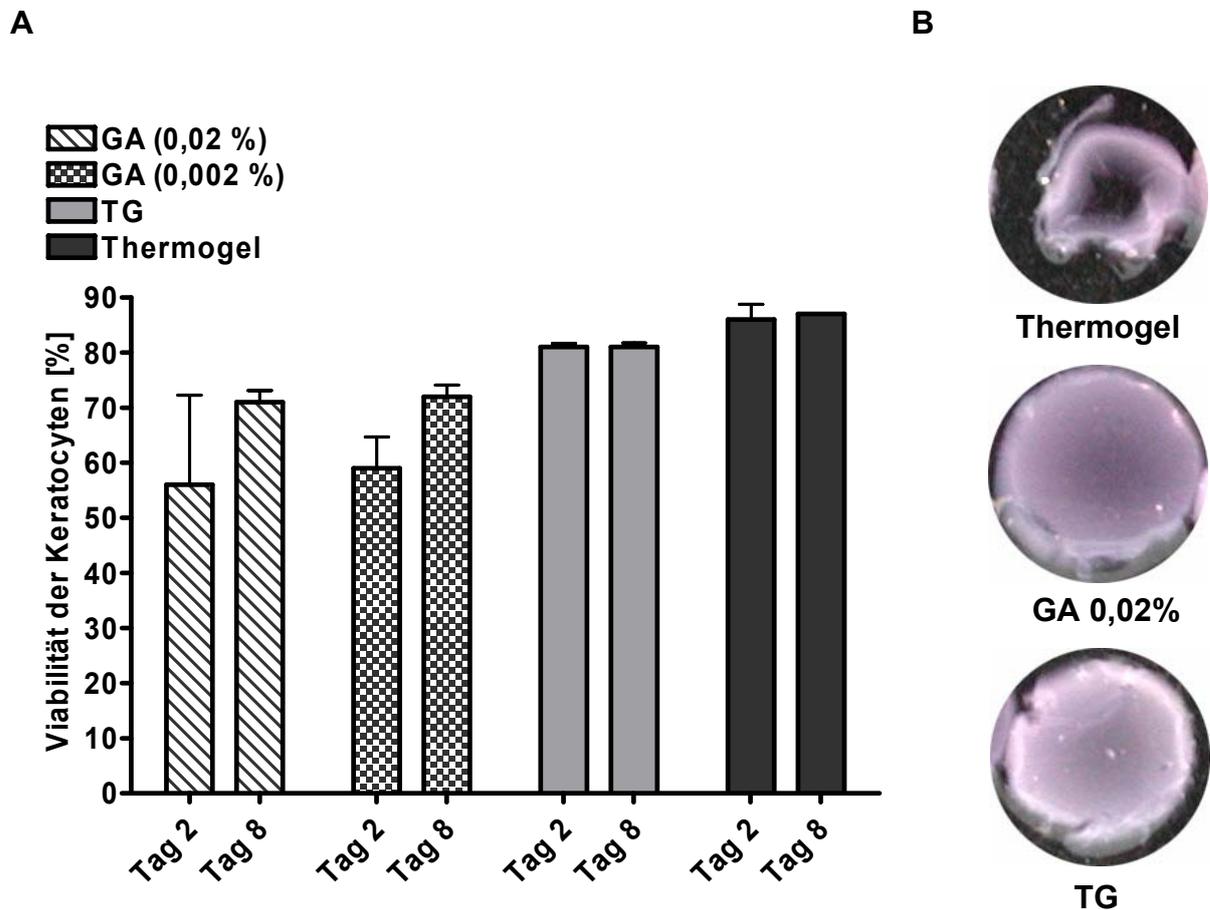


Abb. 23: (A) Vergleich der Viabilität von Keratocyten am zweiten und achten Tag nach Herstellung der Matrix: GA (0,02 %)-Gel, GA (0,00 2%)-Gel, TG-Gel und Thermogel. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 10$  Kollagenmatrices). (B) Aufnahmen der Matrices nach acht Tagen: Thermogel, GA (0,02 %)-Gel und TG-Gel.

**Detektion von Basallamina und Bowman-Schicht.** Hemidesmosomen sind Zellstrukturen in Zellmembranen, die eine Verbindung zwischen Zellen und der Basallamina herstellen. Genau wie Desmosomen dienen sie der Stabilisierung der kornealen Epithelzellen und sind intrazellulär mit den Intermediärfilamenten verknüpft, jedoch verbinden sie nicht verschiedene Zellen miteinander, sondern verknüpfen die basale Oberfläche der Epithelzellen mit der darunterliegenden Basallamina.

Die Basallamina ist eine homogene Schicht der extrazellulären Matrix, welche die Epithel-Zellschicht stabilisiert. Die unterhalb der Epithelschicht liegende Basallamina ist nur im Elektronenmikroskop sichtbar und setzt sich aus einer hell erscheinenden Lamina lucida und einer sich dunkel darstellenden Lamina densa zusammen. Unter der Basallamina folgt ein dichtes Netzwerk von retikulären Fibrillen, welches die Bowman-Schicht bildet (Abrams et al., 2002; Alberts et al., 2002).

Diese Strukturen konnten in den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen am Stroma-Epithel-Modell gefunden werden. Zahlreiche Hemidesmosomen erschienen als punktförmige, elektronendichte Strukturen an der Zellmembran der basalen Epithelzellschicht. Die anschließende Basallamina, die sich als Band zwischen Epithel und Stroma erstreckt, setzte sich aus der Lamina lucida nahe der basalen Plasmamembran der Epithelzellen und der benachbarten Lamina densa zusammen. Die Lamina densa ist in *Abbildung 24A* und *B* mit einem Stern markiert. Sie setzte sich in die Bowman-Schicht fort, die in der Übersichtsaufnahme in *Abbildung 24C* dargestellt ist. Das anschließende Stroma ist im unteren Bildsegment zu sehen. Die unterschiedliche Organisation der kollagenen Fibrillen in der Bowman-Schicht im Vergleich zu der im Stroma war gut erkennbar. Während im Stroma die kollagenen Fibrillen in flachen Lamellen gestapelt waren, bildeten sie in der Bowman-Schicht ein dichtes Geflechtwerk.

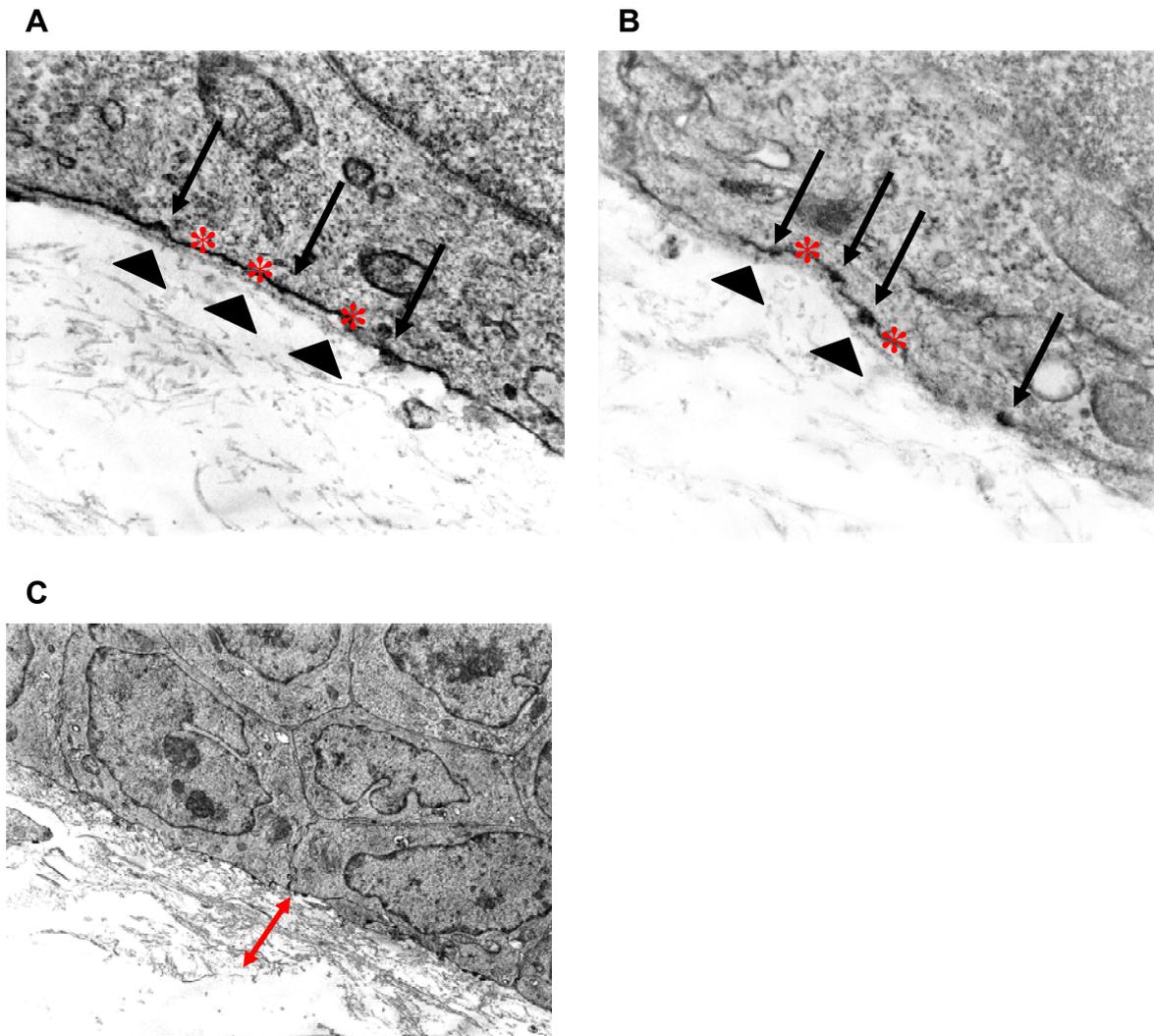


Abb. 24: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Grenzfläche zwischen Stroma und Epithel des KGM+++-Modells. (A/B) Zahlreiche Hemidesmosomen sind als dunkle Punkte (Pfeile) zu erkennen. Die Lamina lucida (rote Sterne) und Lamina densa (Pfeilspitzen) sind in Abbildung A/B gekennzeichnet. (C) Die Bowman-Schicht zeigt sich als enges Kollagenfibrillengeflecht (roter Abstandspfeil). Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte A/B bei 40000-facher Vergrößerung und B bei 5000-facher Vergrößerung.

**DISKUSSION**

---

## **4 DISKUSSION**

Für die Entwicklung einer *in vitro*-Alternative zur Bestimmung der Okulotoxizität stellt das Kornea-Epithel eine hervorragende Zielstruktur dar. Es bildet die Barriere des vorderen Augenabschnitts aus und schützt das Auge vor eindringenden Substanzen aus der äußeren Umgebung (Daston & Freeberg, 1991; Doane et al., 1978; Hackett & McDonald, 1991).

Der angestrebten Entwicklung und Charakterisierung dieses *in vitro*-Modells ging zunächst eine Optimierung des Kulturmediums voraus. Die Morphologie wurde anhand licht- und elektronenmikroskopischer Erscheinungsbilder beurteilt. Die Barriereigenschaften wurden mittels biophysikalischer Messungen ermittelt. Die Expression von tight junctions- und adherens junctions-assoziierten Proteinen wurde sowohl immunzyto- als auch immunhistochemisch untersucht und durch Western Blot-Analytik verifiziert. Somit konnte die optimale Zusammensetzung des Nährmediums identifiziert werden, mit Hilfe dessen die Nachahmung der *in vivo*-Bedingungen realistisch gelang. Schließlich erfolgte – unter Berücksichtigung der während des Forschungsaufenthaltes in Ottawa erworbenen Erkenntnisse hinsichtlich der Quervernetzung des Kollagens – der Aufbau eines Stroma-Epithel-Modells.

### **4.1 Einfluss der Kulturmedien auf die Morphologie**

Korneale Epithelzellen stellen hohe Anforderungen an ihre Kulturbedingungen. Sie gelten als äußerst empfindlich gegenüber Adaptationsvorgängen und beanspruchen neben der hohen Serumkonzentration von 15 % FKS weitere Zusätze wie Insulin und hEGF (Araki-Sasaki et al., 1995; Bertolero et al., 1986; Lechner et al., 1984). Die Notwendigkeit des Zusatzes von FKS bei der Epithel-Rekonstruktion unter Verwendung der Araki-Sasaki-Zelllinie wurde besonders durch Toropainen et al. betont (Toropainen et al., 2001). Im Gegensatz dazu gelang es sowohl Kahn et al. als auch Offord et al. humane korneale Epithel-Zelllinien serumfrei zu kultivieren (Kahn et al., 1993; Offord et al., 1999). Anstelle hoher Serumkonzentrationen setzten sie das KGM-Medium unter Zusatz von Rinderhypophysenextrakt (BPE) ein. Sowohl Kruse et al. als auch Chang et al.

beobachteten sogar, dass hohe FKS-Konzentrationen die Zellproliferation sowie die Zelldifferenzierung kornealer Epithel-Kaninchenzellen hemmten (Chang et al., 2000; Kruse & Tseng, 1991; Kruse & Tseng, 1993). Zudem wurde vermehrt von einer besseren Zelldifferenzierung in serumfreiem Milieu von humanen bzw. lapinen Epithelzellen berichtet (Castro-Munozledo et al., 1997; Kruszewski et al., 1997). Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen und aufgrund des Ziels, ein einfach reproduzierbares Modell zu etablieren, wurde die Verwendung von FKS als Zusatz zum Aufzuchtmedium der Modelle in Frage gestellt. Weiterhin sollten im Rahmen des Dissertationsvorhabens weitere Zusätze für die Supplementierung des serumfreien Mediums zur Testung kommen: Calciumchlorid, Hydrocortison, Retinol- und Ascorbinsäure. Diese sollten bezüglich ihres Einflusses auf die Differenzierung der Epithelzellen untersucht werden.

Als serumfreie Alternative wurde das kommerziell erhältliche Medium KGM ausgewählt, da dieses bereits erfolgreich zur Kultivierung von immortalisierten humanen kornealen Epithelzellen eingesetzt wird (Offord et al., 1999). Das CEM-Medium gilt als Weiterentwicklung des KGM-Mediums der Firma Lonza, speziell für das korneale Epithelgewebe, und wurde ebenfalls untersucht.

Das Advanced DMEM/F12-Medium, welches laut Hersteller die zeitaufwendige Zelladaptation überflüssig macht und außerdem eine Erniedrigung der Serumkonzentration von bis zu 10 % ermöglicht, wurde als mögliche serumhaltige Alternative zum DMEM/F12-Medium getestet. Es wurde dem DMEM/F12-Medium entsprechend supplementiert, allerdings mit nur 2 % FKS versetzt.

### **Einfluss des Serums auf Proliferation und Differenzierung.**

Überraschenderweise proliferierten die adaptierten HCE-Zellen in serumfreiem Medium – allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß als bei FKS-Zusatz. Als interessanten Nebeneffekt ließ sich eine um 50 % reduzierte Nekroserate beobachten (Abb. 8). Berücksichtigt man auch die Zahl der gebildeten Zellschichten (Abb. 9) sowie die histologischen Erscheinungsbilder der unterschiedlich kultivierten Modelle (Abb. 10), lieferten serumfreie Kulturen wiederum zufriedenstellende Ergebnisse.

Die unter Zusatz von 15 % FKS gezüchteten Konstrukte wiesen eine starke Hyperproliferation auf (Abb. 8), wobei die Zellen in den einzelnen Schichten gleichmäßig differenzierten und an der Oberfläche des Gewebes zunehmend abflachten (Abb. 10 A). Die hohe Anzahl der Zellschichten entsprach jedoch den *in*

*vivo*-Bedingungen nicht. Die Reduktion der Serumkonzentration auf 5 % senkte zwar die Proliferationsgeschwindigkeit (*Abb. 8*), resultierte aber in einer unzureichenden Zelldifferenzierung. Die HCE-Zellen erschienen von einheitlich polygonaler Form (*Abb. 10 B*), die keine weitere Spezialisierung der Zellen vermuten ließ, wie später durch TEER-Messungen bestätigt wurde. Das in Advanced DMEM/F12 kultivierte Gewebe mit einem Zusatz von 2 % FKS ließ deutliche Entzündungsreaktionen im Gewebe selbst erkennen. Zahlreiche intra- und interzelluläre Vakuolen der lebenden HCE-Zellen traten auf und ließen den Zellverband, der sich zudem aus nur vier bis fünf Zellschichten zusammensetzte, recht lose erscheinen. Zusätzlich wurden interzelluläre Kristallablagerungen vermutet (*Abb. 10 C*). Wiederum unterstützten die Ergebnisse der anschließenden TEER-Untersuchungen die histologische Auswertung und führten dazu, dass das Advanced DMEM/F12-Medium als ungeeignet für die Kultivierung des Epithel-Konstrukts eingestuft und bei den folgenden Permeationsuntersuchungen nicht weiter in Betracht gezogen wurde.

Unter Einsatz von serumfreien Medien zeigte sich dagegen eine angemessene Zellschichtung von fünf bis sieben Schichten, die dem humanen kornealen Epithelgewebe entspricht.

### **Bedeutung von Calciumchlorid, Hydrocortison, Ascorbin- und Retinolsäure.**

Allerdings offenbarten die histologischen Schnitte von entsprechenden Kulturen unter serumfreien Bedingungen deutliche Unterschiede in der Zelldifferenzierung und der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Die in reinem KGM-Medium gezüchteten Konstrukte zeigten keine Abflachung der Oberflächenzellen hin zum apikalen Pol des Gewebes (*Abb. 10 D*). Um diese Zelldifferenzierung zu erreichen, bedurfte es des Zusatzes von Calciumchlorid zum KGM-Medium. Dieses Phänomen wurde erstmalig in primären Keratinozyten-Kulturen beobachtet (Hawley-Nelson et al., 1980; Hennings et al., 1980) und später auch für Kulturen der HaCaT-Zelllinie (Breitkreutz et al., 1993) berichtet. Ähnliche Beobachtungen beschrieben weitere Autoren für korneale Epithelzellen ausführlich: Serumfreie Kulturen lapiner und porciner kornealer Epithelzellen (Castro-Munozledo et al., 1997; Hackworth et al., 1990) differenzierten erst in Anwesenheit hoher Calciumkonzentrationen von 0,5 mM. Der positive Einfluss hoher Calciumkonzentrationen auf die Zelldifferenzierung humaner kornealer

Epithelzellen wurde erstmals von Ward et al. beobachtet und von Offord et al. bestätigt (Offord et al., 1999; Ward et al., 1997).

In einem weiteren Schritt wurde dem KGM+Ca-Medium Hydrocortison hinzugefügt. Mittels dieser Supplementierung konnten Zeichen einer Entzündungsreaktion im Epithel unterdrückt werden (Rarey et al., 1991). Die Vakuolisierung der HCE-Zellen sowie die besonders im apikalen Gewebe auftretenden Interzellularräume konnten verhindert werden. Allerdings traten weiterhin leichte Interzellulärspalten in den Basazellschichten des Epithels auf (*Abb. 10 F*).

Dieses Problem konnte durch den Zusatz von Ascorbin- und Retinolsäure zum Medium behoben werden. Durch die Kombination dieser Zusätze bildeten sich zahlreiche Zell-Zell-Kontakte über das gesamte Gewebe hin aus, die in einer Abnahme der Interzellulärspalten in den basalen Zellschichten resultierte. Der Zellverband des Gewebes erschien deutlich kompakter (*Abb. 10 G*). Da Retinol in hoher Konzentration im humanen Tränenfilm vorhanden ist (Nezzar et al., 2007; Ubels & MacRae, 1984), welcher das Epithel permanent umspült, lag eine Supplementierung des Mediums mit Retinolsäure nahe. Wie schon lange bekannt und hinreichend untersucht, ist Retinolsäure für die intakte Struktur und Funktion der Kornea essentiell (Sommer & Davidson, 2002; Wilson et al., 1953). Ein Mangel an Retinolsäure verursacht eine abnormale Differenzierung des vorderen Augenabschnitts, die zu Keratinisierung, Ulzeration und Metaplasie führen kann (Hatchell & Sommer, 1984; Macsai et al., 1998). Direkte Effekte der Retinolsäure auf das humane Kornea-Epithel sind eine verminderte Apoptoserate sowie zunehmende Zelldifferenzierung (Serbecic & Beutelspacher, 2005a; Serbecic & Beutelspacher, 2005b; Tong et al., 1990; Tseng & Farazdaghi, 1988) – Effekte, die während der Kultivierung der HCE-Zellen in KGM+++-Medium in Form zunehmender Zell-Zell-Verbindungen ebenfalls beobachtet wurden (*Abb. 10 G*).

Auch eine hohe Ascorbinsäurekonzentration ist im Kammerwasser zu finden. Sie beträgt ca. 100 µg/ml und ist damit doppelt so hoch wie die Ascorbinsäurekonzentration des Plasmas. Ascorbinsäure nimmt Einfluss auf Zellteilungs- und Differenzierungsprozesse. Diese Effekte werden bislang kontrovers diskutiert. So wurden antiproliferative (Knorr et al., 1996) bzw. zelltoxische (Wunderlich et al., 1992) als auch proliferationsfördernde (Liso et al., 1984) Effekte auf humane korneale Epithelzellen beschrieben. In dieser Arbeit

konnte gezeigt werden, dass sich Vitamin C positiv auf die Zelldifferenzierung bzw. die Gewebsarchitektur auswirkt, indem es maßgeblich am Aufbau von Zell-Zell-Kontakten im Epithel-Konstrukt beteiligt ist (*Abb. 10 G*).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Zusammensetzung des KGM+++Mediums zu Konstrukten führte, die das morphologische Erscheinungsbild des kornealen Epithelgewebes *in vivo* am ähnlichsten nachahmte. Die hohe Calciumkonzentration sowie der Zusatz der Ascorbin- und Retinolsäure unterstützten nicht nur die Differenzierung in die einzelnen Zelltypen (Basal-, Flügel- und Oberflächenzellen), sondern wirkten sich auch positiv auf die Gesamtarchitektur des rekonstruierten Epithels aus. Mit Hilfe des Glucocorticoid-Zusatzes wurden die Anzeichen einer Entzündungsreaktion im Gewebe erfolgreich unterdrückt.

**Ultrastrukturelle Analyse.** Die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen lieferten eindrucksvolle Ergebnisse, die gut mit den vorangegangenen Studien über die tight junctions-Formierung übereinstimmten und darüber hinaus wichtige Informationen über den Aufbau der Zell-Zell-Kontakte in basalen Zellschichten lieferten.

Zahlreiche ultrastrukturelle Merkmale der humanen Kornea (Klyce & Beuerman, 1988; Nichols et al., 1983) konnten in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen der KGM+++-Modelle wiedergefunden werden, die auf eine weitgehende Differenzierung dieses *in vitro*-Gewebes schließen lassen und eine bemerkenswerte Ähnlichkeit mit der humanen kornealen Oberfläche illustrieren (Mackay et al., 1991). Im apikalen Bereich der seitlichen Zellmembran erkennbare tight junction-Strukturen stellten einen sehr engen Kontakt zwischen den Membranen benachbarter Zellen her (*Abb. 19 A*). Deutlich sichtbar waren ebenfalls die Ankerstrukturen für Intermediärfilamente (*Abb. 19 B*), mit denen die Zelle eine Verbindung zwischen der Zellmembran und dem Zytoskelett herstellt und die dem Formerhalt der Zelle dient. Die Oberfläche der äußersten Zellen war typischerweise durch Microplicae sowie Microvilli vergrößert (*Abb. 11*).

Unterhalb der tight junctions waren die für das humane Kornea-Epithel typischen Adhäsions-Verbindungen erkennbar, adherens junctions und Desmosomen (*Abb. 19 C*). Diese Zell-Zell-Kontakte sind für die Stabilisierung des Zellverbundes bzw. Gewebes gegenüber Zug- und Scherkräften unerlässlich (Sugrue & Zieske, 1997).

Darüber hinaus konnten weitere wichtige Merkmale identifiziert werden wie Kernmembran, Mitochondrien, Golgi-Körper und endoplasmatisches Retikulum; die Nachahmung des *in vivo*-Gewebes durch Kultivierung der HCE-Zelllinie in KGM+++-Medium sollte demzufolge viel versprechende Ergebnisse in der weiteren Charakterisierung liefern.

### 4.2 Einfluss der Kulturmedien auf die Barriere

**Auswirkungen auf den elektrischen Widerstand des Epithels.** Das korneale Epithel bildet die limitierende Barriere der transkornealen Permeation (Amemiya, 2000). Dafür verantwortlich zeigen sich im Wesentlichen die obersten Zellschichten des Epithels (Amemiya, 2000; Anderson et al., 1993; Sasaki et al., 1999; Sugrue & Zieske, 1997), die durch tight junctions miteinander verbunden sind und auf diese Weise den Stofftransport in tiefer liegende Regionen des Auges begrenzen. Auf diese undurchlässigen Zell-Zell-Verbindungen des apikalen Gewebebereichs ist auch der hohe elektrische Widerstand des Epithels zurückzuführen, durch den die Barriere eines rekonstruierten Epithels maßgeblich bestimmt wird (Cereijido et al., 1993; Goodenough, 1999; Hamalainen et al., 1997; McLaughlin et al., 1985; Wang et al., 1993). Die Bestimmung des Widerstandes über dem Epithelgewebe ist deshalb eine sinnvolle, zerstörungsfreie Methode, um die Integrität eines rekonstruierten Epithels schnell und einfach einzuschätzen (Burgalassi et al., 2004; Maurice, 1984). Die Gewebsarchitektur bleibt durch die Messung unversehrt.

Der über serumfrei kultivierten KGM+++-Modellen ermittelte TEER-Wert betrug 900-1200  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , ungefähr ein Zehntel des TEER-Wertes exzidierter Kaninchen-Kornea (*Abb. 12 B*). Aber überraschenderweise erwies er sich als ungefähr doppelt so hoch wie die in der Literatur beschriebenen TEER-Werte anderer *in vitro*-Modelle: 400-600  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Ward et al., 1997), 400-800  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Toropainen et al., 2001) und 400-500  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Mohan et al., 2003). Der Zusatz von Calciumchlorid, Hydrocortison und Ascorbin- sowie Retinolsäure zum KGM-Medium beeinflusst offenbar nicht nur die Morphologie der Konstrukte positiv, sondern bewirkte auch die Ausbildung wesentlicher Strukturmerkmale der Zell-Zell-Kontakte innerhalb des Gewebes. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen an rekonstruierten Geweben anderer Autoren überein, zum Beispiel die starke Widerstandssteigerung bei *in vitro*-Modellen der Blut-Hirn-

Schranke als Folge einer Anreicherung des Kulturmediums mit Hydrocortison (Hoheisel et al., 1998).

Die serumhaltig kultivierten Modelle hingegen bildeten ein elektrisch durchlässigeres Gewebe aus. Die TEER-Werte betrug 600-700  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , obwohl das DMEM/F12+15%-Modell mehr als sechsfach so viele Zellschichten aufwies (*Abb. 12 A*). Demnach sollte die Entwicklung der tight junction-Komplexe, die sich typischerweise in den oberen Zellschichten befinden (McLaughlin et al., 1985; Sugrue & Zieske, 1997), durch Serum gehemmt werden.

**Ausbildung der tight junctions.** Die Fähigkeit, der an verschiedene Medien adaptierten immortalisierten HCE-Zellen zur Ausbildung von tight junctions, wurde anhand der Expression und Lokalisation der tight junction-assoziierten Proteine ZO-1 in Zellmonolayern und Claudin-1 in Multilayern geprüft. Sowohl ZO-1 als auch Claudin-1 wurden in Rattenkornea und Monolayern humaner kornealer Epithelzellen (Yi et al., 2000) sowie in humaner Kornea nachgewiesen (Ban et al., 2003a; Ban et al., 2003b).

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen TEER-Werte der serumhaltig und serumfrei kultivierten Modelle durch eine veränderte Expression des ZO-1 in den Zellmonolayern hervorgerufen wurde. Serumhaltige Kulturen exprimierten kaum ZO-1 (*Abb. 15*). Im Gegensatz dazu exprimierten die serumfreien KGM-Ca-, KGM-HC- und KGM+++-Monolayer-Kulturen, die hohe Calciumkonzentrationen enthielten, ZO-1 (*Abb. 15*) und zeigten das für ZO-1 typische netzartige Expressionsmuster entlang den Zellmembranen (Ban et al., 2003a; Ban et al., 2003b) was sich in den TEER-Werten der entsprechenden Modelle widerspiegelte. Im CEM-Medium exprimierten die Zellen zwar ZO-1, jedoch wurde es hauptsächlich interzellulär nachgewiesen (*Abb. 15*). Möglicherweise ist dies der Grund für den relativ geringen und zwischen den einzelnen Konstrukten hoch variablen TEER (300-800  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) der Modelle. Die histologischen Befunde der CEM-Modelle ergaben wie bereits erwähnt eine schwere Abweichung von der normalen Morphologie der Kornea mit nekrotischen Zellen und zahlreichen Interzellularräumen (*Abb. 10 H*). Als Konsequenz wurde das kommerziell erhältliche, speziell für die Kultivierung von Kornea-Epithelzellen entwickelte Medium, als ungeeignet für den Aufbau eines Multilayers eingestuft.

Am komplexen Aufbau der tight junctions sind außer den membranassoziierten Proteinen, deren bekanntester Vertreter ZO-1 ist, stellvertretend zum Nachweis

ausgewählt wurde, transmembranale Proteine beteiligt. Das Transmembranprotein Claudin-1 beispielsweise wurde durch Ban et al. erstmals in humanem kornealen Epithel als wesentlicher Bestandteil der tight junctions nachgewiesen (Ban et al., 2003b) und trägt ebenso wie ZO-1 zur Aufrechterhaltung der parazellulären Barriere der Epithelien bei (Van Itallie & Anderson, 2006; Yu, 2003). In den serumhaltig kultivierten Konstrukten ließen sich, in Übereinstimmung mit der ZO-1-Exprimierung bzw. den TEER-Ergebnissen, keine Claudin-1-Antikörper anfärben (*Abb. 17*). Interessanterweise wurde das transmembranale Protein in den basalen Zellschichten der KGM+Ca-Modelle gefunden (*Abb. 17*). Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Ban et al. überein, die das Protein in den basolateralen sowie sehr schwach in den apikalen Regionen des humanen kornealen Epithels identifizierten (Ban et al., 2003b).

Folglich wird der Aufbau von tight junction-Komplexen, die für die intakte Barrierefunktion des kornealen Epithels unerlässlich sind, durch die serumhaltige Kultivierung gehemmt.

Generell sei noch anzumerken, dass Claudin-1 fast ausschließlich in den basalen Zellschichten des KGM+Ca-Konstrukts vorlag (*Abb. 17*). Dies stimmt mit den publizierten Daten überein (Ban et al., 2003b; Yi et al., 2000), wirft aber dennoch einige Fragen auf, die ebenfalls durch andere Autoren formuliert wurden (Langbein et al., 2002; Sugrue & Zieske, 1997): In diesen Schichten befinden sich nämlich keine tight junctions; immunhistochemische Nachweise für Occludine fielen negativ aus. Dies lässt vermuten, dass Claudin-1 an weiteren Zellstrukturen beteiligt sein könnte, was in zukünftigen Studien geprüft werden sollte.

**Fluorescein-Permeation.** Ferner wurde die Permeabilität der Konstrukte für ein ophthalmologisches Standarddiagnostikum bestimmt. Mit Hilfe des Permeabilitätskoeffizienten von Fluorescein, ähnlich den vorangegangenen TEER-Untersuchungen, kann der Grad der Ausbildung einer adäquaten epithelialen Barriere abgeschätzt werden (Maurice & Singh, 1986). Da die Permeation der hydrophilen Substanz einzig parazellulär erfolgen kann, ist diese zur Beurteilung der tight junctions und damit der Barrierefunktion geeignet (Tchao, 1988; Toropainen et al., 2003).

Eine intakte Barrierefunktion ist nicht nur als möglicher Endpunkt im Rahmen von Toxizitätsprüfungen, sondern auch bei der Permeation von Wirkstoffen aus Arzneiformen zur Anwendung am Auge bedeutsam. Für diese stellt die Kornea die

Hauptbarriere dar (Burstein & Anderson, 1985; Doane et al., 1978). Aus diesem Grunde sind bei der Entwicklung neuer ophthalmologischer Wirkstoffe und Zubereitungen derselben *in vitro*-Untersuchungen zur transkornealen Arzneistoffabsorption unerlässlich. Solche Tests an rekonstruierten Epithel-Modellen (Toropainen et al., 2001; Toropainen et al., 2003) sowie an Kornea-Modellen aus bovinen Zellen (Reichl & Müller-Goymann, 2001; Reichl & Müller-Goymann, 2003) und humanen Zellen (Reichl et al., 2005) mittels Fluorescein bzw. Arzneistoffen zeigten, dass die rekonstruierten Gewebe adäquate *in vitro*-Modelle zur Erfassung einfacher Permeationsvorgänge an der humanen Kornea sind. Somit war es von großem Interesse, im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens, die Eignung des optimierten Epithel-Modells auf seine Absorption von Fluorescein als Modellsubstanz für hydrophile Arzneistoffe zu testen.

Anhand der Permeationskoeffizienten können verschiedene Modelle direkt miteinander verglichen und die Übereinstimmung mit der *in vivo*-Situation begutachtet werden. Die Fluorescein-Permeationskoeffizienten werden wie folgt angegeben:  $0,12 \pm 0,03 \times 10^{-6}$  cm/s, Kaninchen-Kornea (Becker et al. 2008);  $0,25 \pm 0,01 \times 10^{-6}$  cm/s, C-HCE-Modell (Becker et al., 2008)  $0,37 \pm 0,26 \times 10^{-6}$  cm/s, humane Kornea (Becker et al., 2008);  $0,75 \pm 0,22 \times 10^{-6}$  cm/s, HCE-Modell (Toropainen et al., 2003);  $6,96 \pm 0,55 \times 10^{-6}$  cm/s, S-HCE-Modell (Becker et al., 2008). Der für das KGM+++-Modell ermittelte Permeationskoeffizient betrug  $1,9 \pm 0,02 \cdot 10^{-6}$  cm/s bzw.  $2,2 \pm 0,02 \cdot 10^{-6}$  cm/s für das DMEM/F12+15%-Modell nach neuntägiger Kulturdauer (Abb. 14). Generell kann man feststellen, dass die rekonstruierten Gewebe, einschließlich des KGM+++-Modells, durchlässiger für hydrophile Substanzen als die entsprechenden *in vivo*-Gewebe sind – entsprechendes gilt auch für die menschliche Haut und dessen *in vitro*-Modelle (Schäfer-Korting et al., 2008; Schäfer-Korting et al., 2006). Lediglich die Permeation über das C-HCE-Modell (Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz) stimmte gut mit der für humane Kornea ermittelten Permeabilität überein, die TEER-Werte des C-HCE-Modells sind entsprechend hoch ( $1500-1700 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ; siehe 1.3; *Immortalisierte Zellkulturen des kornealen Epithels*). Das HCE-Modell wies eine um den Faktor 2,0, das KGM+++-Modell um den Faktor 5,1, das DMEM/F12+15%-Modell um den Faktor 6,0 und das S-HCE-Modell (SkinEthic Laboratories, Nizza, Frankreich) um den Faktor 18,8 erhöhte Permeabilität im

Vergleich zur humanen Kornea auf. Das KGM+++-Modell weist somit eine bessere Permeationsbarriere auf als das serumhaltig kultivierte DMEM/F12+15%-Modell und das kommerziell erhältliche S-HCE-Modell. Da für den hydrophilen Farbstoff eine transzelluläre Permeation nicht in Frage kommt, zeichnet sich das KGM+++-Modell durch schlechter ausgebildete tight junctions und daraus resultierenden Poren im Konstrukt aus als das HCE-Modell, das C-HCE-Modell und die humane Kornea. Ob das Modell in diesem Zustand für *in vitro*-Permeationsstudien einsetzbar ist, bleibt weiteren Prüfungen zur Porosität des Gewebes und transzellulären Permeation vorbehalten (*siehe auch 4.3*).

**Zusammenhang zwischen elektrischem Widerstand und Fluoresceinpermeabilität.** Der elektrische Widerstand eines epithelialen Zellmonolayers setzt sich aus einzelnen, durch die tight junctions jeder Zelle des Monolayers verkörperten individuellen elektrischen Widerständen zusammen und kann somit modellhaft als ein Schaltkreis zahlloser parallel geschalteter Einzelwiderstände angesehen werden (Claude, 1978; Madara & Dharmasathaphorn, 1985). In einem derartigen parallelen Widerstandsnetzwerk dominieren Komponenten mit niedrigem Widerstand den Gesamtwiderstand des Netzwerkes, auch wenn diese in nur geringer Anzahl vorhanden sind. Folglich reduzieren nicht voll entwickelte tight junctions in einem epithelialen Zellmonolayer den elektrischen Gesamtwiderstand des Zellmonolayers deutlich (Goodenough, 1999). Die mit Hilfe von Fluorescein ermittelte Permeabilität eines Multilayers reflektiert dagegen die Summe der einzelnen parazellulären Stoffflüsse zwischen den Einzelzellen, die durch undichte tight junctions in nur geringem Maße beeinflusst wird. Folglich waren bei insgesamt hohem TEER-Niveau – wie beispielsweise beim KGM+++-Modell der Fall – große TEER-Änderungen durch nur geringfügige Änderungen des parazellulären Flusses gekennzeichnet (Nakamura et al., 2007).

Es wurde trotzdem eine Linearität zwischen den Kehrwerten des TEER und dem apparenten Permeationskoeffizienten deutlich: Geringer Widerstand über dem Gewebe korrelierte mit hoher Permeabilität (*Abb. 14 A*).

Da die Permeabilität der Epithel-Modelle ab einem Schwellenwert von ungefähr  $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$  kaum mehr abnahm (*Abb. 14 B, dargestellt für DMEM/F12+15%- und KGM+++-Modelle*), könnte anhand dieses Wertes eventuell ein Qualitätsparameter für die Integrität der Konstrukte definiert werden. Dies wäre für

die Herstellung der Epithel-Modelle im Industriemaßstab für Toxizitätsstudien von großer Wichtigkeit.

### 4.3 Esteraseaktivität

Das korneale Epithel ist metabolisch aktiv. Die Enzymausstattung besteht hauptsächlich aus Esterasen, Aminopeptidasen Aldo-Keto-Reduktasen und N-Acetyltransferasen (Harris et al., 1992; Lee et al., 1986). Deshalb werden zahlreiche ophthalmologische Wirkstoffe für eine bessere Penetration bzw. zur Stabilisierung (bei Instabilität) als Esterprodrug eingesetzt. Dies gilt für Prostaglandin-Derivate (z.B. Latanoprost), Dipivefrin, Corticoid-Ester, Aciclovir- und Ganciclovir-Ester sowie Mycophenolatmofetil (Anand & Mitra, 2002; Bertelmann et al., 2003; Tirucherai et al., 2002). Diese Prodrugs werden bei der transkornealen Passage zum Teil durch zelluläre Esterasen in ihre freie Wirkform überführt. Damit ergab sich die Fragestellung, ob das optimierte Epithel-Modell neben ähnlichen Barriereigenschaften auch eine ähnliche Enzymausstattung wie das die humane Kornea besitzt, um bei *in vitro*-Permeationsuntersuchungen von Esterprodrugs valide Daten zu liefern.

Daten zur kornealen Esteraseaktivität stammen aus zahlreichen Untersuchungen am Kaninchen- oder Schweineauge aber auch an kornealen Epithelzelllinien des Kaninchens (Babiola et al., 2001; Lee, 1983; Lee et al., 1982; Nakamura et al., 1993; Toropainen et al., 2003). Die Untersuchung am humanen Korneaepithel-Modell von Toropainen et al. (HCE-Modell) mit Fluoresceindiacetat ergab eine ähnliche Esteraseaktivität von HCE-Modell und Kaninchenkornea (Toropainen et al., 2003). Ferner hydrolysierte das humane Kornea-Konstrukt (HCC) Hydrocortisonacetat. Die Spaltung erfolgte vorzugsweise im mehrschichtigen Epithelgewebe. Die Umsatz- sowie Permeationsrate des HCC für Hydrocortisonacetat war an der exzidierten porcinen Hornhaut ähnlich (Reichl et al., 2004; Reichl et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung des Fluoresceindiacetat, das durch Esteraseeinwirkung in das farbige Fluorescein umgesetzt wird, das Epithel-Modell charakterisiert. Im Akzeptormedium fand sich nach 150 min eine um fast 30 % höhere Konzentration an Fluorescein als bei der Applikation von nicht verestertem Fluorescein. Demnach ist das Epithel-Modell metabolisch aktiv (*Abb. 20*). Esterasen setzten Fluoresceindiacetat zu Fluorescein intrazellulär um.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Toropainen et al. berichtet (Toropainen et al., 2003). Dieses Ergebnis lässt durchaus die Annahme zu, dass das Epithel-Modell, trotz der vergleichsweise hohen Permeabilitätsrate, sich für Prodrug-Studien eignen würde.

Indes muss beachtet werden, dass verschiedene Esterase-Isoenzyme existieren, deren Expression von Zellpassage zu Zellpassage und bei Konstrukten verschiedener Chargen variieren kann. Außerdem ist es nicht möglich, anhand dieser Ergebnisse eine quantitative Aussage über die Esterase-Aktivität zu treffen. Darüber hinaus war es nicht möglich, die Werte aufgrund fehlender Vergleichsstudien in Humangewebe in Relation mit der *in vivo*-Kornea zu setzen. Weiterführende Studien bezüglich der Enzymausstattung des Modells wären deshalb dringend erforderlich. Mit diesem Dissertationsvorhaben konnten diesbezüglich nur orientierende Ergebnisse erhoben werden.

### 4.4 Gewebsregeneration

Die unter 4.2 dargestellten Zusammenhänge von TEER und Fluorescein-Permeabilität wurden erstmals von Ward et al. beschrieben, die mittels MTT-Test, TEER und Fluorescein-Permeabilität das Ausmaß der Toxizität von SDS, BAC, EtOH und ISO am rekonstruierten Epithel-Modell (HCE-T-Modell) testeten: TEER-Messungen sprachen deutlich sensibler auf toxische Effekte an als die metabolische Aktivität der Mitochondrien und die Fluoresceinpermeabilität (Ward et al. 1997). Als Ursache für diesen Sachverhalt wurde allerdings nicht das Modell eines parallelen Widerstandsnetzwerks, in dem Komponenten mit niedrigem Widerstand den Gesamtwiderstand des Netzwerkes dominieren (*siehe 4.2; Zusammenhang zwischen TEER und Fluoresceinpermeabilität*), diskutiert. Vielmehr wurde die Ablagerung einer toten Epithelzellschicht an der Oberfläche der Konstrukte erwogen. Die einzelnen Zellen sollten Fluorescein binden oder anderweitig die Penetration in tiefer gelegene Gewebekompartimente verhindern. Da die Unterscheidung zwischen schwach augenreizenden Potenzial und Abwesenheit von augenreizenden Eigenschaften von besonderem Interesse bei der Entwicklung von Alternativmethoden ist (*siehe 1.4*), erfolgte in dieser Arbeit die Beurteilung der Gewebsschädigung durch BAC 0,01 % und SDS 1 % mittels TEER-Bestimmung – eine wesentlich empfindlichere und darüber hinaus

zerstörungsfreie und weniger fehleranfällige Messmethode als die Bestimmung der Fluoresceinpermeabilität.

Die Messungen zeigten einen deutlichen Unterschied in der Gewebsregeneration der behandelten Konstrukte. Bei Behandlung mit BAC in nicht-auge-reizender Konzentration (0,01 %) erfolgte nach 48 h eine fast 90 %ige Wiederherstellung des TEER-Wertes der Barrierefunktion. Hingegen zeigten die mit SDS (1 %) behandelten Gewebe, eine Konzentration, die im Draize MMAS als schwach augenreizend eingestuft wurde, eine Regeneration von nur 35 % (Abb. 21).

In Hinblick auf die bevorstehenden Toxizitätsprüfungen sollte die TEER-Messung somit eine hinreichend sensible Messmethode darstellen, anhand derer ein Endpunkt für die okuläre Irritationsbestimmung definiert werden kann. Außerdem lässt die unterschiedliche Regeneration der behandelten Gewebe annehmen, dass dieser Endpunkt zwischen nicht-auge-reizenden und leicht augen-reizenden Substanzen zu unterscheiden vermag.

Es ist allerdings unverzichtbar, noch weitere Epithel-Modelle, vor allem aber weitere Testsubstanzen hinsichtlich ihres Irritationspotential zu testen. Es könnte dann ein Prädiktionsmodell aufgrund einer umfangreicheren Datenbasis entwickelt werden.

### 4.5 Rekonstruktion des Stroma-Epithel-Modells

Die Basallamina grenzt als homogene Schicht das Kornea-Epithel von der darunter liegenden Stroma-Matrix ab. Es handelt sich dabei um eine spezialisierte extrazelluläre Matrix, welche als stabilisierende Schicht unter der Epithel-Zellschicht dazu dient, dass die Zellen des Epithels nicht auseinander gleiten. Außerdem geht man davon aus, dass die Basallamina für die Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung bedeutsam ist (Yurchenco & Schittny, 1990). Die Basallamina ist nur im Elektronenmikroskop sichtbar und setzt sich aus einer hell erscheinenden Lamina lucida und einer sich dunkel darstellenden Lamina densa zusammen. Unter der Basallamina folgt die Bowman-Schicht, ein dichtes Netzwerk von retikulären Fibrillen und Proteoglykanen. Die Bowman-Schicht ist ebenso wie die Basallamina unabdingbar für die Erhaltung der Epithelstruktur. Einmal verletzt heilt sie nur unter Narbenbildung wieder aus.

Der genaue Mechanismus, der zum Aufbau der Bowman-Schicht und der Basallamina führt, ist derzeit weitgehend unbekannt. Es wird angenommen, dass

beide Schichten ein Produkt der Epithelzellen darstellen. Die Syntheserate der Membrankomponenten soll durch die in der Matrix eingebetteten Stromazellen stimuliert werden (Ohji et al., 1994). Allerdings könnten auch die Stromazellen eventuell selbst in der Lage sein, entsprechende Membrankomponenten zu synthetisieren (Marinkovich et al., 1993; Suuronen et al., 2005). Ob auch Endothelzellen am Aufbau der Basallamina und Bowman-Schicht beteiligt sind, ist bisher unklar (Zieske et al., 1994). Diskutiert wurde ebenfalls die Stimulation der Epithelzellen zur Synthese von Kollagen Typ VII durch Nervenzellen (Baker et al., 1993; Suuronen et al., 2004b).

Differenziertes Epithelgewebe kann *in vitro* Basalmembran-Komponenten wie Laminin, Kollagen Typ IV, Fibronectin und Proteoglykane synthetisieren. Die Formierung einer Grenzschicht zwischen Epithel und Biomatrix einschließlich der Hemidesmosomen und Intermediärfilamente war bei *in vitro* rekonstruierten Korneas allerdings nur ausnahmsweise nachweisbar (Zieske et al., 1994). Kontrovers werden die Voraussetzungen für die Bildung einer Basalmembran diskutiert. Zieske et al. beobachteten die Basalmembran-Konfiguration nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Kornea-Endothelzellen. Somit fordern sie die aufwendige Gewebs-Rekonstruktion aus allen drei Kornea-Zelllinien (Zieske et al., 1994). Wissenschaftler von SkinEthic hingegen konnte an ihrem kommerziell erhältlichen kornealen Epithel-Modell elektronenmikroskopisch eine durchgehende Basalmembran nachweisen, obwohl es sich hierbei ausschließlich um eine reine Epithelzellen-Kultur handelt. Aufgrund dieser kontroversen Meinungen sollte im Rahmen des Dissertationsvorhabens das Stroma-Epithel-Modell auf die Anwesenheit einer Basalmembran hin untersucht und das Postulat von Zieske et al. kritisch hinterfragt werden.

Die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass im Stroma-Epithel-Modell, dessen Kollagen mittels GA vernetzt wurde, eine durchgehende Basallamina formiert wurde, die sich aus einer hell erscheinenden Lamina lucida und einer sich dunkel darstellenden Lamina densa zusammensetzte (Abb. 24 A/B). Ebenso sichtbar war die angrenzende azelluläre Bowman-Schicht, die aus einer dicht gepackten Schicht von Kollagenfasern bestand (Abb. 24 C). Diese Ergebnisse widerlegen die von Zieske et al. geforderte Kokultivierung der drei Zelltypen als Voraussetzung zur Synthese einer Basallamina. Die für das KGM+++-Modell gewählten Kulturbedingungen stimulierten die Epithel- und

Stromazellen bereits ausreichend zur Synthese von essentiellen Matrix- und Basallaminakomponenten. Calciumchlorid und Retinolsäure unterstützten die Ausdifferenzierung der entsprechenden Zelltypen hervorragend. Der Zusatz der Ascorbinsäure retardiert die zelluläre Degradation der Matrix und stimuliert gleichzeitig die Kollagensynthese. Der Versuch, die Zusammensetzung des humanen Tränenfilms bzw. Kammerwassers möglichst gut nachzuahmen, bewahrt demnach nicht nur die Integrität und Funktionalität der epithelialen Barrierefunktion des reinen Epithel-Modells, sondern eröffnet womöglich den ersten großen Schritt hin zu einem komplexen Kornea-Modell mit dessen Hilfe die *in vivo*-Situation vollständiger abgebildet werden kann. Ob dieses Modell aber tatsächlich für Toxizitätsprüfungen, Wundheilungs- und Permeationsstudien oder zu Transplantationszwecken einsetzbar ist, bleibt weiteren Prüfungen und Vergleichsstudien mit exzidierten tierischen oder humanen Korneas vorbehalten. Zudem muss für jedes Einsatzgebiet geprüft werden, ob ein derart komplexes Modell dem reinen Epithel-Modell tatsächlich überlegen ist.

### 4.6 Ausblick

Die Resultate dieser Arbeit lassen hoffen, dass sich das vorgestellte Epithel-Modell zu einer vollwertigen Alternative für den Draize-Test ausbauen lässt. Neben der noch ausstehenden Validierung dieses Testsystems bietet es sich an, die Methode bei der Weiterentwicklung in verschiedener Hinsicht zu komplettieren und zu verfeinern.

Unbestritten ist die bei Epithel-Modellen im Vergleich zu exzidiertem Augenmaterial schlechter ausgeprägte Barrierefunktion, doch könnte dies über ein Prädiktionsmodell auszugleichen sein. Aus diesem Grunde wäre es wünschenswert, eine Vielzahl von anderen spezifischen zellulären Reaktionen für die Bestimmung der okularen Irritationswirkung heranzuziehen. Durch eine Kombination verschiedener Parameter ließe sich eine größere Bandbreite der Zellschädigung erfassen und das Prädiktionsmodell entsprechend genauer gestalten. Beispielsweise könnten über die Freisetzung spezifischer Enzyme/Zytokine, die typischerweise als Reaktion auf eine Gewebsschädigung durch die Epithelzellen synthetisiert werden, Augenirritationen bestimmt werden. Denkbar ist auch, den Grad der Schädigung des *in vitro*-Epithels nach Exposition mit einer Testsubstanz über die Änderung der Transparenz zu ermitteln, wie dies

bereits erfolgreich beim BCOP-Test am Rinderauge praktiziert wird (Merrill et al., 2006; Ubels et al., 2004). Schließlich könnten auch Viabilitätsuntersuchungen am Epithelmodell mittels MTT-, WST-1-, Neutralrot-, Lactatdehydrogenase- oder Sulforhodamin B-Bestimmung Aufschluss über die zytotoxische Wirkung der jeweiligen Testsubstanz geben.

Weiterhin wäre es interessant, aufbauend auf die bereits durchgeführten Experimente zur Charakterisierung der Permeationsbarriere mittels Fluorescein, das Permeationsverhalten weiterer Stoffe, die zur Anwendung am menschlichen Auge kommen, zu untersuchen. Möglicherweise könnte dieses Modell dann auch zur Vorhersage der transkornealen Permeation von Arzneistoffen aus Zubereitungen zur Anwendung am Auge eingesetzt werden.

Ergänzend zu den in dieser Arbeit durchgeführten Metabolisierungsuntersuchungen mit Fluoresceindiacetat könnte außerdem die Expression der beteiligten CYP-450-Isoenzyme in dem verwendeten Epithel-Modell auf mRNA-Ebene mittels real-time RT-PCR untersucht werden, um genauere Aussagen über die Enzymausstattung des Modells treffen zu können.

Schließlich ist es auch vorstellbar, das *in vitro*-Modell in der pharmakologischen Forschung einzusetzen. Beispielsweise erscheint es denkbar, anhand der Produktion von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren die Wundheilung zu bestimmen. Eine besondere Herausforderung ist, ein innerviertes Modell der Kornea zu rekonstruieren. Die Hornhaut ist von sensiblen Nervenästen des Nervus ophthalmicus innerviert, die als lebenswichtiges Warnsystem für die Kornea fungieren. Für die Wundheilung ist die Interaktion zwischen Nervenzellen und Stroma- bzw. Epithelzellen bedeutsam (Suuronen et al. 2004a; Suuronen et al., 2004b). Der genaue Mechanismus könnte an einem innervierten Modell erforscht werden. Hinzu kommt, dass Veränderungen der Hornhautneurologie zu einer Vielzahl von Augenerkrankungen führen, deren Entstehung und Heilung realitätsnah an einem innervierten Modell studiert werden könnten.

Abschließend wäre außerdem mittels TEER-Messung oder Fluorescein-Permeation zu klären, ob und in welchem Umfang die Stroma-Matrix Einfluss auf Barriereigenschaften des kultivierten Stroma-Epithel-Modells nehmen. Interessant für den Einsatz des Stroma-Epithel-Modells zu Permeationszwecken sind ferner Untersuchungen, bei denen die Anreicherung oder die

Verteilungsvorgänge von Wirkstoffen in den verschiedenen Strukturen der Kornea im Fokus stehen.

Angesichts der in Deutschland und weltweit nicht bedarfsdeckenden Spenderaugenhornhäute ist es außerdem von großer Bedeutung, die Entwicklung einer dreidimensionalen organotypischen Kornea voranzutreiben, die als Transplantat eingesetzt werden kann. Ob ein gezüchtetes Korneaäquivalent in absehbarer Zeit für die regenerative Therapie zur Verfügung stehen wird, hängt davon ab, ob es gelingen wird, ein Biopolymer zu entwickeln, das als Stromaäquivalent über lange Jahre eine hinreichende Transparenz und dadurch das uneingeschränkte Sehen ermöglichen kann und ob sich transformierte Korneazellen eines Transplantats an die Verhältnisse *in vivo* anzupassen vermögen, ohne nachteilige Erscheinungen beim Träger hervorzurufen. Von der Lösung dieser Fragen werden in den nächsten Jahren die Fortschritte bei der Kultivierung von Korneaäquivalenten zu Transplantationszwecken abhängen.

## **ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY**

---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Tierversuche werden für das Screening von potentiellen Arzneistoffen, sowie Industriechemikalien und – bis Ende 2008 – auch zur Untersuchung von Inhaltsstoffen von Kosmetika hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und toxikologischen Unbedenklichkeit eingesetzt. Noch heute ist der in den 1940er Jahren entwickelte Kaninchen-Augen-Irritationstest nach Draize fester Bestandteil der Teststrategie innerhalb der OECD-Prüfrichtlinie 405 zur okulotoxischen Sicherheitsprüfung neuer Substanzen. Der Draize-Test bedeutet nicht nur eine hohe Belastung für das Tier, vielmehr wurde auf internationalen Symposien und in zahlreichen Publikationen darauf hingewiesen, dass die Aussagekraft dieses Tests eingeschränkt ist. Obwohl in den letzten Jahren mit der Ausweitung von Tierersatzverfahren erhebliche Fortschritte erzielt wurden, existiert bis heute keine wissenschaftlich validierte und auf OECD-Ebene anerkannte Alternativmethode zum Draize-Test, die eine Vorhersage von schwach augenreizendem Potenzial (R36) oder der Abwesenheit augenreizender Eigenschaften zulässt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher versucht, das humane Kornea-Epithel – die wichtigste Barrierschicht des vorderen Augenabschnitts – auf der Basis von humanen immortalisierten Zellkulturen als Alternative zum Draize-Test zu rekonstruieren. Der Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf die Gewebsdifferenzierung und auf die Ausbildung einer adequaten Barrierefunktion wurde untersucht. Neben der Hyperproliferation des Epithels konnte ein hemmender Effekt des Serumzusatzes zum Nährmedium auf die Differenzierung des mehrschichtigen Kornea-Epithels gezeigt werden. In den apikalen Gewebsschichten konnten immunzytochemisch und -histochemisch keine Zell-Zell-Kontakte wie tight junctions und adherens junctions, und in den tiefergelegenen Zellschichten ebenfalls keine Desmosomen nachgewiesen werden. Demnach bildete sich die Barrierefunktion nur unzureichend aus. Im Gegensatz dazu entwickelten serumfreie Kulturen, die mit hoher Konzentration an Calciumchlorid sowie Hydrocortison, Retin- und Ascorbinsäure supplementiert wurden, ein differenziertes, etwa 50 µm dickes Epithelgewebe (KGM+++-Modell). Die Epithelzellen wuchsen in einem soliden Zellverband und differenzierten in einer ausgeprägten Zellschichtung über fünf bis sieben Lagen hin. Oberflächenzellen waren schuppenartig abgeplattet und wiesen

alle Zellkerne auf. Flügelzellen waren eng miteinander verzahnt, Interzellularräume traten nur vereinzelt auf. Aufgrund der Ausbildung ausreichender Zell-Zell-Kontakte ergab sich ein hohes elektrisches Widerstandsniveau, das die serumhaltigen Kulturen um mehr als ein Drittel überstieg. Weiterhin konnte anhand der Permeabilität hydrophilen Fluoresceins nachgewiesen werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Permeabilität und epithelalem elektrischem Widerstand (TEER) bestand. Bei zunehmenden TEER-Werten sank die Fluoresceinpermeation. Des Weiteren konnte eine Esteraseaktivität des Epithel-Modells nachgewiesen werden, welche den Einsatz des Modells bei Permeationsstudien möglich erscheinen lässt. Außerdem konnten ein deutlicher Unterschied in der Gewebsregeneration nach Applikation von nicht-augeizenden (Benzalkoniumchlorid) und schwach augeizenden (Natriumlaurylsulfat) Detergenzien mittels TEER-Messung gezeigt werden. In Hinblick auf die bevorstehenden Toxizitätsprüfungen sollte die TEER-Messung somit eine hinreichend sensible Messmethode darstellen, anhand derer ein Endpunkt für die okulare Toxizitätsbestimmung zur Unterscheidung nicht-augeizender und leicht augeizender Substanzen definiert werden könnte. Schließlich wurde das Epithel-Modell um eine mittels Glutaraldehyd vernetzte Stromamatrix ergänzt. Durch die ultrastrukturelle Analyse der Zell-Matrix-Grenzschicht konnte erstmals die Ausbildung einer zusammenhängenden Basalmembran sowie der angrenzenden Bowman-Schicht für ein humanes *in vitro*-Konstrukt ohne korneale Endothelzellbeteiligung nachgewiesen werden.

### SUMMARY

The human cornea, and in particular the corneal epithelium, provides a transparent barrier for the passage of numerous potentially harmful substances and protects the intraocular tissues. In addition, the epithelium limits the access of exogenous applied pharmaceutical products into the eye. To this day, both the potential eye irritating effects of chemicals and the permeation behaviour of ophthalmologic medications are studied in animal experiments. The new declaration in the course of the harmonisation of the European chemicals legislation (REACH) and the 7<sup>th</sup> amendment of the cosmetic guideline encourage the research into the development and validation of alternative methods which could provide the same level of information as obtained by animal experiments. Until now, several alternative eye irritation tests have been validated and gained regulatory acceptance within the test strategy according to OECD Test Guideline 405. However, despite several efforts for many years, the Draize rabbit eye test could not have been replaced completely and none of the described alternative methods allow the classification of moderate to mild irritants. Hence, establishing non-animal methods for the prediction of eye corrosion/irritation is still one of the challenges for the assessment of potentially harmful substances.

In the present work an SV40-immortalised human corneal epithelial cell line (HCE) was characterised with respect to its suitability to serve as a model to study both the eye irritation potential of chemicals and the permeation of pharmaceuticals. For this reason different commercialised serum-containing and serum-free media were tested on HCE cells in order to assess the effects of serum and other supplements on different cellular characteristics such as growth, morphology and barrier properties. In detail, epithelial multilayers were subjected to histology for the evaluation of tissue morphology and cell proliferation. Barrier functions were investigated by measuring transepithelial electrical resistance (TEER) as well as the permeation of the hydrophilic marker fluorescein. Since barrier function in the normal cornea is maintained by tight junctions (zonulae occludentes) in the apical corneal epithelium, the expression of ZO-1 as a marker molecule for the presence of tight junctions was studied. The formation of tight-junctions was further investigated using transmission electron micrographs (TEM).

The epithelium of native human cornea comprises five to seven cell layers of defined cellular morphology. It could be shown that high concentrations of serum interfered with cellular differentiation and proliferation. Epithelia cultivated in serum containing medium showed hyperproliferation (approximately 15 cell layers after 14 days). Under serum-free culture conditions the layer morphology was comparable to the *in vivo* situation (five to seven layers after 14 days), but cell-cell contacts and the outermost surface varied with the composition of the supplements. Best morphology was achieved using KGM+++-medium; epithelial cells stratified without intercellular spaces and vacuolisation, similar to normal human epithelium *in vivo*. Ultra-structural quality of the KGM+++-models, as studied by TEM, revealed typical corneal features such as surface cell microvilli and intercellular adhesive junctions (numerous tight junctions, and desmosomes). In accordance to TEM results, models cultured serum-free developed a tighter barrier function which was confirmed by measuring its TEER values and tight junction-related proteins. Moreover, KGM+++-models were less permeable for fluorescein than cultured serum-containing. With decreasing TEER values, the permeability of fluorescein increased in linear correlation. Finally, in the context of this work, a first important step towards the application of the epithelium model as a tool for ocular drug permeation was undertaken: The esterase activity was detected, the KGM+++-model showed metabolic activity (i.e. fluorescein diacetate was converted to free fluorescein). Furthermore, it was possible to expand the epithelium-model by a cross-linked collagen matrix embedded with stromal cells. A basement membrane zone, which comprised numerous hemi-desmosomes, as well as a defined lamina densa, a lamina lucida and a Bowman's layer, consisting of irregularly-arranged collagen fibres, could be defined.

Our results revealed that both morphology and barrier function of the epithelial constructs were comparable to human donor corneas when serum-free media were supplemented with calcium, ascorbic acid, retinoic acid and hydrocortisone. Under these conditions, the artificial epithelium based on serum-free HCE cultures reflects a valid model for mimicking the natural ocular surface.

## **LITERATURVERZEICHNIS**

---

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abrams, G. A., E. Bentley, P. F. Nealey & C. J. Murphy: Electron microscopy of the canine corneal basement membranes. *Cells Tissues Organs* 2002, **170**, 251-7.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter: Molecular Biology of the Cell. Garland Science, New York, 2002.
- Amemiya, T.: The eye and nutrition. *Jpn J Ophthalmol* 2000, **44**, 320.
- Anand, B. S. & A. K. Mitra: Mechanism of corneal permeation of L-valyl ester of acyclovir: targeting the oligopeptide transporter on the rabbit cornea. *Pharm Res* 2002, **19**, 1194-202.
- Anderson, J. M., M. S. Balda & A. S. Fanning: The structure and regulation of tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 1993, **5**, 772-8.
- Angst, B. D., C. Marozzi & A. I. Magee: The cadherin superfamily. *J Cell Sci* 2001, **114**, 625-6.
- Araki-Sasaki, K., Y. Ohashi, T. Sasabe, K. Hayashi, H. Watanabe, Y. Tano & H. Handa: An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995, **36**, 614-21.
- Atkinson, K. A., J. H. Fentem, R. H. Clothier & M. Balls: Alternatives to ocular irritation testing in animals. *Lens Eye Toxic Res* 1992, **9**, 247-58.
- Babiola, M., F. Wilhelm & C. Schoch: In vitro corneal permeation of unoprostone isopropyl (UI) and its metabolism in the isolated pig eye. *J Ocul Pharmacol Ther* 2001, **17**, 159-72.
- Baker, K. S., S. C. Anderson, E. G. Romanowski, R. A. Thoft & N. SundarRaj: Trigeminal ganglion neurons affect corneal epithelial phenotype. Influence on type VII collagen expression in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993, **34**, 137-44.
- Balls, M.: Animal experimentation and the Three Rs: the need for hard heads and soft hearts and to confront the Three "I"s. *Altern Lab Anim* 2007, **35**, 547-8.
- Balls, M., N. Berg, L. H. Bruner, R. D. Curren, O. de Silva, L. K. Earl, D. Esdaile, J. H. Fentem, M. Liebsch, Y. Ohno, M. K. Prinsen, H. Spielmann & A. P. Worth: Eye irritation testing: The way forward. *ALTA* 1999, **27**, 53-77.
- Balls, M., A. M. Goldberg, J. H. Fentem, C. L. Broadhead, R. L. Burch, M. F. Festing, J. M. Frazier, C. F. Hendriksen, M. Jennings, M. D. van der Kamp, D. B. Morton, A. N. Rowan, C. Russell, W. M. Russell, H. Spielmann, M. L. Stephens, W. S. Stokes, D. W. Straughan, J. D. Yager, J. Zurlo & B. F. van Zutphen: The three Rs: the way forward: the report and recommendations of ECVAM Workshop 11. *Altern Lab Anim* 1995, **23**, 838-66.
- Ban, Y., L. J. Cooper, N. J. Fullwood, T. Nakamura, M. Tsuzuki, N. Koizumi, A. Dota, C. Mochida & S. Kinoshita: Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. *Exp Eye Res* 2003a, **76**, 735-43.
- Ban, Y., A. Dota, L. J. Cooper, N. J. Fullwood, T. Nakamura, M. Tsuzuki, C. Mochida & S. Kinoshita: Tight junction-related protein expression and distribution in human corneal epithelium. *Exp Eye Res* 2003b, **76**, 663-9.
- Barraquer, J. & J. Rutllan: Mikrochirurgie der Kornea - Ein Atlas und Textbuch. Enke-Verlag, Stuttgart, 1991.

- Becker, U., C. Ehrhardt, M. Schneider, L. Muys, D. Gross, K. Eschmann, U. F. Schaefer & C. M. Lehr: A comparative evaluation of corneal epithelial cell cultures for assessing ocular permeability. *Altern Lab Anim* 2008, **36**, 33-44.
- Bednarz, J., M. Teifel, P. Friedl & K. Engelmann: Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand* 2000, **78**, 130-6.
- Bertelmann, E., S. Knapp, P. Rieck, S. Keipert, C. Hartmann & U. Pleyer: [Transcorneal-paracorneal penetration route for topical application of drugs to the eye. Mycophenolate mofetil as a model substance]. *Ophthalmologe* 2003, **100**, 696-701.
- Bertolero, F., M. E. Kaighn, R. F. Camalier & U. Saffiotti: Effects of serum and serum-derived factors on growth and differentiation of mouse keratinocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* 1986, **22**, 423-8.
- Boxberger, H. J.: Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur - Einführung in Grundlagen und Techniken. WILEY-VCH Verlag GmbH, 2006.
- Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, **72**, 248-54.
- Brechue, W. F. & T. H. Maren: pH and drug ionization affects ocular pressure lowering of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993, **34**, 2581-7.
- Breitkreutz, D., H. J. Stark, P. Plein, M. Baur & N. E. Fusenig: Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extracellular Ca<sup>2+</sup>. *Differentiation* 1993, **54**, 201-17.
- Brown, R. C. & T. P. Davis: Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke* 2002, **33**, 1706-11.
- Burgalassi, S., D. Monti, A. Brignoccoli, O. Fabiani, C. Lenzi, A. Pirone & P. Chetoni: Development of cultured rabbit corneal epithelium for drug permeation studies: a comparison with excised rabbit cornea. *J Ocul Pharmacol Ther* 2004, **20**, 518-32.
- Burstein, N. L. & J. A. Anderson: Corneal penetration and ocular bioavailability of drugs. *J Ocul Pharmacol* 1985, **1**, 309-26.
- Burton, A. B., M. York & R. S. Lawrence: The in vitro assessment of severe eye irritants. *Food Cosmet Toxicol* 1981, **19**, 471-80.
- Campbell, D. A., R. D. Schoenwald, M. W. Duffel & C. F. Barfknecht: Characterization of arylamine acetyltransferase in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991, **32**, 2190-200.
- Cartwright, T. & G. P. Shah: Culture media. In: *Basic cell culture. A practical approach*. Ed.: J. M. Davis. Oxford University Press, Oxford, 2002, pp. 57-89.
- Castro-Munozledo, F., C. Valencia-Garcia & W. Kuri-Harcuch: Cultivation of rabbit corneal epithelial cells in serum-free medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997, **38**, 2234-44.
- Cereijido, M., L. Gonzalez-Mariscal, R. G. Contreras, J. M. Gallardo, R. Garcia-Villegas & J. Valdes: The making of a tight junction. *J Cell Sci Suppl* 1993, **17**, 127-32.
- Cereijido, M., L. Shoshani & R. G. Contreras: Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and

- epithelial polarity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000, **279**, G477-82.
- Chang, J. E., S. K. Basu & V. H. Lee: Air-interface condition promotes the formation of tight corneal epithelial cell layers for drug transport studies. *Pharm Res* 2000, **17**, 670-6.
- Chien, D. S., H. Bundgaard & V. H. Lee: Influence of corneal epithelial integrity on the penetration of timolol prodrugs. *J Ocul Pharmacol* 1988, **4**, 137-46.
- Claude, P.: Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol* 1978, **39**, 219-32.
- Daston, G. P. & F. E. Freeberg: Ocular Irritation Testing. In: *Dermal and Ocular Toxicology*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, pp. 509-539.
- Dey, S., J. Patel, B. S. Anand, B. Jain-Vakkalagadda, P. Kaliki, D. Pal, V. Ganapathy & A. K. Mitra: Molecular evidence and functional expression of P-glycoprotein (MDR1) in human and rabbit cornea and corneal epithelial cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, **44**, 2909-18.
- Direktive 2003/15/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Februar 2003 zur Änderung der Richtlinie 76/768/EWG des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über kosmetische Mittel.
- Doane, M. G., A. D. Jensen & C. H. Dohlman: Penetration routes of topically applied eye medications. *Am J Ophthalmol* 1978, **85**, 383-6.
- Doucet, O., M. Lanvin, C. Thillou, C. Linossier, C. Pupat, B. Merlin & L. Zastrow: Reconstituted human corneal epithelium: a new alternative to the Draize eye test for the assessment of the eye irritation potential of chemicals and cosmetic products. *Toxicol In Vitro* 2006, **20**, 499-512.
- Draize, J. H., G. Woodward & H. O. Calvery: Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Pharmacol Exp Ther* 1944, **82**, 377-390.
- Duan, D., B. J. Klenkler & H. Sheardown: Progress in the development of a corneal replacement: keratoprostheses and tissue-engineered corneas. *Expert Rev Med Devices* 2006, **3**, 59-72.
- Eder, C., E. Falkner, S. Nehrer, U. M. Losert & H. Schoeffl: Introducing the concept of the 3Rs into tissue engineering research. *Altex* 2006, **23**, 17-23.
- Engelke, M., J. Patzke, S. Tykhonova & M. Zorn-Kruppa: Assessment of ocular irritation by image processed quantification of cell injury in human corneal cell cultures and in corneal constructs. *Altern Lab Anim* 2004, **32**, 345-53.
- Engelmann, K., M. Bohnke & P. Friedl: Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988, **29**, 1656-62.
- Expert Panel Report: Evaluation of the Current Validation Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants (March 2005).
- Falkner, E., H. Appl, C. Eder, U. M. Losert, H. Schoffl & W. Pfaller: Serum free cell culture: the free access online database. *Toxicol In Vitro* 2006, **20**, 395-400.
- Filenius, S., T. Tervo & I. Virtanen: Production of fibronectin and tenascin isoforms and their role in the adhesion of human immortalized corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, **44**, 3317-25.
- Flynn, G. L., S. H. Yalkowsky & T. J. Roseman: Mass transport phenomena and models: theoretical concepts. *J Pharm Sci* 1974, **63**, 479-510.
- Freshney, R. I.: Induction of differentiation. In: *Culture of animal cells*. Ed.: 2nd. Alan R. Liss, Inc., New York, 1987.

- Freshney, R. I. & M. G. Freshney: Culture of immortalized cells. Wiley-Liss, New York, 1996.
- Friedenwald, J. S., W. F. Hughes & H. Herrmann: Acid-base tolerance of the cornea. *Arch. Ophthalmol.* 1944, **31**, 279-283.
- Friedrich, I., S. Reichl & C. C. Muller-Goymann: Drug release and permeation studies of nanosuspensions based on solidified reverse micellar solutions (SRMS). *Int J Pharm* 2005, **305**, 167-75.
- Garrod, D. R., A. J. Merritt & Z. Nie: Desmosomal adhesion: structural basis, molecular mechanism and regulation (Review). *Mol Membr Biol* 2002, **19**, 81-94.
- Geerling, G., J. T. Daniels, J. K. Dart, I. A. Cree & P. T. Khaw: Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, **42**, 948-56.
- George, A. J., C. V. Arancibia-Carcamo, H. M. Awad, R. M. Comer, Z. Fehevari, W. J. King, M. Kadifachi, T. Hudde, C. Kerouedan-Lebosse, F. Mirza, H. Barbaros Oral, S. A. Rayner, P. H. Tan, E. Tay & D. F. Larkin: Gene delivery to the corneal endothelium. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **162**, S194-200.
- Germain, L., F. A. Auger, E. Grandbois, R. Guignard, M. Giasson, H. Boisjoly & S. L. Guerin: Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology* 1999, **67**, 140-7.
- Germain, L., P. Carrier, F. A. Auger, C. Salesse & S. L. Guerin: Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? *Prog Retin Eye Res* 2000, **19**, 497-527.
- Goodenough, D. A.: Plugging the leaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**, 319-21.
- Goskonda, V. R., M. A. Khan, C. M. Hutak & I. K. Reddy: Permeability characteristics of novel mydriatic agents using an in vitro cell culture model that utilizes SIRC rabbit corneal cells. *J Pharm Sci* 1999, **88**, 180-4.
- Griffith, M., R. Osborne, R. Munger, X. Xiong, C. J. Doillon, N. L. Laycock, M. Hakim, Y. Song & M. A. Watsky: Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 1999, **286**, 2169-72.
- Gumbiner, B.: Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol* 1987, **253**, C749-58.
- Hackett, R. B. & T. O. McDonald: Eye Irritation. In: *Dermatotoxicology*. Eds.: F. N. Marzulli and H. I. Maibach, 1991, pp. 749-815.
- Hackworth, L. A., F. Faraji-Shadan, S. T. Schuschereba & P. D. Bowman: Serum-free culture of porcine and rabbit corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* 1990, **9**, 919-23.
- Halbert, C. L., G. W. Demers & D. A. Galloway: The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* 1991, **65**, 473-8.
- Hamalainen, K. M., K. Kananen, S. Auriola, K. Kontturi & A. Urtti: Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva, and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997, **38**, 627-34.
- Harris, D., J.-H. Liaw & J. R. Robinson: Routes of delivery: case studies: ocular delivery of peptide and protein drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1992, 331-339.
- Hatchell, D. L. & A. Sommer: Detection of ocular surface abnormalities in experimental vitamin A deficiency. *Arch Ophthalmol* 1984, **102**, 1389-93.

- Hawley-Nelson, P., J. E. Sullivan, M. Kung, H. Hennings & S. H. Yuspa: Optimized conditions for the growth of human epidermal cells in culture. *J Invest Dermatol* 1980, **75**, 176-82.
- Hennings, H., D. Michael, C. Cheng, P. Steinert, K. Holbrook & S. H. Yuspa: Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 1980, **19**, 245-54.
- Hernandez-Quintero, M., R. Garcia-Villegas & F. Castro-Munozledo: Differentiation-dependent increases in lactate dehydrogenase activity and isoenzyme expression in rabbit corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2002, **74**, 71-82.
- Hofer, T., I. Gerner, U. Gundert-Remy, M. Liebsch, A. Schulte, H. Spielmann, R. Vogel & K. Wettig: Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. *Arch Toxicol* 2004, **78**, 549-64.
- Hoheisel, D., T. Nitz, H. Franke, J. Wegener, A. Hakvoort, T. Tilling & H. J. Galla: Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **244**, 312-6.
- Hornof, M., E. Toropainen & A. Urtti: Cell culture models of the ocular barriers. *Eur J Pharm Biopharm* 2005, **60**, 207-25.
- Hosoya, K., Y. Horibe, K. J. Kim & V. H. Lee: Nucleoside transport mechanisms in the pigmented rabbit conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998, **39**, 372-7.
- Huang, H. S., R. D. Schoenwald & J. L. Lach: Corneal penetration behavior of beta-blocking agents II: Assessment of barrier contributions. *J Pharm Sci* 1983, **72**, 1272-9.
- Huggins, J.: Alternatives to animal testing: research, trends, validation, regulatory acceptance. *Altex* 2003, **20**, 3-61.
- Huhtala, A., P. Alajuuja, S. Bungalassi, P. Chetoni, H. Diehl, M. Engelke, M. Marselos, D. Monti, P. Pappas, M. F. Saettone, L. Salminen, M. Sotiropoulou, H. Tahti, H. Uusitalo & M. Zorn-Kruppa: A collaborative evaluation of the cytotoxicity of two surfactants by using the human corneal epithelial cell line and the WST-1 test. *J Ocul Pharmacol Ther* 2003, **19**, 11-21.
- Huhtala, A., M. Mannerstrom, P. Alajuuja, S. Nurmi, T. Toimela, H. Tahti, L. Salminen & H. Uusitalo: Comparison of an immortalized human corneal epithelial cell line and rabbit corneal epithelial cell culture in cytotoxicity testing. *J Ocul Pharmacol Ther* 2002, **18**, 163-75.
- ILSI TCAAT: Replacing the Draize eye irritation test: Scientific background and research needs. In: *J. Toxicol. Cutaneous Ocul. Toxicol.* ILSI Technical Committee on Alternatives to Animal Testing, 1996, pp. 211-234.
- Kahn, C. R., E. Young, I. H. Lee & J. S. Rhim: Human corneal epithelial primary cultures and cell lines with extended life span: in vitro model for ocular studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993, **34**, 3429-41.
- Kaluzhny, Y., L. Thornton, P. Hayden, H. Kandarova & M. Klausner: Expanded utilization of the EPIOCULAR™ human tissue model for ocular irritation testing. *6th World Congress on Alternatives and Animal Use*. Tokyo, 2007.
- Kawazu, K., A. Oshita, T. Nakamura, M. Nakashima, N. Ichikawa & H. Sasaki: Transport of acebutolol through rabbit corneal epithelium. *Biol Pharm Bull* 2006, **29**, 846-9.
- Klausner, M., J. Sheasgreen, J. Kubilus & P. Hayden: Long term reproducibility of EPIOCULAR™, a three-dimensional tissue culture model of the human

- corneal epithelium. *Society of Toxicology Annual Meeting*. New Orleans, LA, 2005.
- Klyce, S. D.: Electrical profiles in the corneal epithelium. *J Physiol* 1972, **226**, 407-29.
- Klyce, S. D. & R. Beuerman: Structure and function of the cornea. In: *The Cornea*. Eds.: H. E. Kaufman and B. A. McDonald. Churchill Livingstone, New York, 1988, pp. 3-54.
- Knorr, M., K. Wunderlich, K. P. Steuhl & H. J. Thiel: [Effect of heparin and ascorbic acid on growth behavior of cultivated corneal epithelial cells of the rabbit]. *Ophthalmologe* 1996, **93**, 275-8.
- Kruse, F. E. & S. C. Tseng: A serum-free clonal growth assay for limbal, peripheral, and central corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991, **32**, 2086-95.
- Kruse, F. E. & S. C. Tseng: Proliferative and differentiative response of corneal and limbal epithelium to extracellular calcium in serum-free clonal cultures. *J Cell Physiol* 1992, **151**, 347-60.
- Kruse, F. E. & S. C. Tseng: Serum differentially modulates the clonal growth and differentiation of cultured limbal and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993, **34**, 2976-89.
- Kruszewski, F. H., T. L. Walker & L. C. DiPasquale: Evaluation of a human corneal epithelial cell line as an in vitro model for assessing ocular irritation. *Fundam Appl Toxicol* 1997, **36**, 130-40.
- Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, **227**, 680-5.
- Langbein, L., C. Grund, C. Kuhn, S. Praetzel, J. Kartenbeck, J. M. Brandner, I. Moll & W. W. Franke: Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur J Cell Biol* 2002, **81**, 419-35.
- Lechner, J. F., A. Haugen, I. A. McClendon & A. M. Shamsuddin: Induction of squamous differentiation of normal human bronchial epithelial cells by small amounts of serum. *Differentiation* 1984, **25**, 229-37.
- Lee, V. H.: Esterase activities in adult rabbit eyes. *J Pharm Sci* 1983, **72**, 239-44.
- Lee, V. H., L. W. Carson, S. D. Kashi & R. E. Stratford, Jr.: Metabolic and permeation barriers to the ocular absorption of topically applied enkephalins in albino rabbits. *J Ocul Pharmacol* 1986, **2**, 345-52.
- Lee, V. H., D. S. Chien & H. Sasaki: Ocular ketone reductase distribution and its role in the metabolism of ocularly applied levobunolol in the pigmented rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1988, **246**, 871-8.
- Lee, V. H., K. W. Morimoto & R. E. Stratford, Jr.: Esterase distribution in the rabbit cornea and its implications in ocular drug bioavailability. *Biopharm Drug Dispos* 1982, **3**, 291-300.
- Li, Y., J. Liu, D. Pan & A. J. Hopfinger: A study of the relationship between cornea permeability and eye irritation using membrane-interaction QSAR analysis. *Toxicol Sci* 2005, **88**, 434-46.
- Liso, R., G. Calabrese, M. B. Bitonti & O. Arrigoni: Relationship between ascorbic acid and cell division. *Exp Cell Res* 1984, **150**, 314-20.
- Luft, J. H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 1961, **9**, 409-14.
- Lüpke, N. P.: Toxikologisch-pharmakologische Prüfmöglichkeiten am bebrüteten Hühnerrei. In: *Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen*. Ed.: H. Schöffl. Springer Verlag, Wien, New York, 1992.

- Mackay, M., I. Williamson & J. Hastewell: Cell biology in epithelia. *Adv Drug Deliv Rev* 1991, **7**, 313-338.
- Macasai, M. S., S. Agarwal & E. Gamponia: Bilateral corneal ulcers in primary vitamin A deficiency. *Cornea* 1998, **17**, 227-9.
- Madara, J. L. & K. Dharmasathaphorn: Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer. *J Cell Biol* 1985, **101**, 2124-33.
- Maidowsky, W.: Anatomie des Auges (Mit einer Einführung in die allgemeine Zellen- und Gewebslehre). Neues Optikerjournal Heinz Postenrieder Pforzheim, 1980.
- Mannermaa, E., K. S. Vellonen & A. Urtti: Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. *Adv Drug Deliv Rev* 2006, **58**, 1136-63.
- Marinkovich, M. P., D. R. Keene, C. S. Rumberg & R. E. Burgeson: Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. *Dev Dyn* 1993, **197**, 255-67.
- Marshall, W. S. & S. D. Klyce: Cellular and paracellular pathway resistances in the "tight" Cl<sup>-</sup>-secreting epithelium of rabbit cornea. *J Membr Biol* 1983, **73**, 275-82.
- Maurice, D. & T. Singh: A permeability test for acute corneal toxicity. *Toxicol Lett* 1986, **31**, 125-30.
- Maurice, D. M.: The Cornea and Sclera. In: *The Eye*. Ed.: H. Davson. Academic Press, Orlando, FL, 1984.
- McLaughlin, B. J., R. B. Caldwell, Y. Sasaki & T. O. Wood: Freeze-fracture quantitative comparison of rabbit corneal epithelial and endothelial membranes. *Curr Eye Res* 1985, **4**, 951-61.
- Merrill, J., K. Hamernik, L. M. Schechtman, W. Stokes & M. Wind: ICCVAM Progress in Evaluating In Vitro Test Methods for Identifying Severe Ocular Irritants/Corrosives. *Altex* 2006, **23 Suppl**, 246-9.
- Meyer, L., J. Bednarz, C. C. Muller-Goymann & S. Reichl: [Esterase activity of human organotypic cornea construct (HCC) as in vitro model for permeation studies]. *Ophthalmologe* 2005, **102**, 971-80.
- Minami, Y., H. Sugihara & S. Oono: Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993, **34**, 2316-24.
- Mohan, R. R., D. E. Possin, R. R. Mohan, S. Sinha & S. E. Wilson: Development of genetically engineered tet HPV16-E6/E7 transduced human corneal epithelial clones having tight regulation of proliferation and normal differentiation. *Exp Eye Res* 2003, **77**, 395-407.
- Muir, C. K.: Opacity of bovine cornea in vitro induced by surfactants and industrial chemicals compared with ocular irritancy in vivo. *Toxicol Lett* 1985, **24**, 157-62.
- Murphy, C. J., S. Campbell, K. Araki-Sasaki & C. F. Marfurt: Effect of norepinephrine on proliferation, migration, and adhesion of SV-40 transformed human corneal epithelial cells. *Cornea* 1998, **17**, 529-36.
- Nakamura, M., E. Shirasawa & M. Hikida: Characterization of esterases involved in the hydrolysis of dipivefrin hydrochloride. *Ophthalmic Res* 1993, **25**, 46-51.
- Nakamura, T., M. Yamada, M. Teshima, M. Nakashima, H. To, N. Ichikawa & H. Sasaki: Electrophysiological characterization of tight junctional pathway of rabbit cornea treated with ophthalmic ingredients. *Biol Pharm Bull* 2007, **30**, 2360-4.

- Nezzar, H., F. Chiambaretta, G. Marceau, L. Blanchon, B. Faye, P. Dechelotte, D. Rigal & V. Sapin: Molecular and metabolic retinoid pathways in the human ocular surface. *Mol Vis* 2007, **13**, 1641-50.
- Nichols, B., C. R. Dawson & B. Togni: Surface features of the conjunctiva and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983, **24**, 570-6.
- Nieder Korn, J. Y., D. R. Meyer, J. E. Ubelaker & J. H. Martin: Ultrastructural and immunohistological characterization of the SIRC corneal cell line. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990, **26**, 923-30.
- Nishida, T.: Chapter 1. In: *Cornea*. Krachmer, J. H., St. Louis, Mosby, 1997.
- North-Root, H., F. Yackovich, J. Demetrulias, M. Gacula, Jr. & J. E. Heinze: Prediction of the eye irritation potential of shampoos using the in vitro SIRC cell toxicity test. *Food Chem Toxicol* 1985, **23**, 271-3.
- OECD. (2002) Test Guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Adopted on 24th April 2002.
- Offord, E. A., N. A. Sharif, K. Mace, Y. Tromvoukis, E. A. Spillare, O. Avanti, W. E. Howe & A. M. Pfeifer: Immortalized human corneal epithelial cells for ocular toxicity and inflammation studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, **40**, 1091-101.
- Ohji, M., N. SundarRaj, J. R. Hassell & R. A. Thoft: Basement membrane synthesis by human corneal epithelial cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994, **35**, 479-85.
- Powers, M. J., L. Amenuvor, P. Rodin & S. A. Hauber: A Human Corneal Epithelial Culture Model for Evaluation of Ocular Irritation and Barrier Properties.
- Powers, M. J., A. L., P. Rodin & J. Darner: Evaluation of Human Corneal Epithelial Response to Xenobiotic Compounds Using an In Vitro Cell Culture Model. *ARVO*, 2007.
- Prausnitz, M. R. & J. S. Noonan: Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. *J Pharm Sci* 1998, **87**, 1479-88.
- Prinsen, M. K. & H. B. Koeter: Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Food Chem Toxicol* 1993, **31**, 69-76.
- Ranta, V. P., M. Laavola, E. Toropainen, K. S. Vellonen, A. Talvitie & A. Urtti: Ocular pharmacokinetic modeling using corneal absorption and desorption rates from in vitro permeation experiments with cultured corneal epithelial cells. *Pharm Res* 2003, **20**, 1409-16.
- Rarey, K. E., P. J. Lohuis & W. J. ten Cate: Response of the stria vascularis to corticosteroids. *Laryngoscope* 1991, **101**, 1081-4.
- REACH-Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission.
- Reichl, S., J. Bednarz & C. C. Muller-Goymann: Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol* 2004, **88**, 560-5.

- Reichl, S., S. Dohring, J. Bednarz & C. C. Muller-Goymann: Human cornea construct HCC-an alternative for in vitro permeation studies? A comparison with human donor corneas. *Eur J Pharm Biopharm* 2005, **60**, 305-8.
- Reichl, S. & C. C. Muller-Goymann: [Development of an organotypic corneal construction as an in vitro model for permeability studies]. *Ophthalmologe* 2001, **98**, 853-8.
- Reichl, S. & C. C. Muller-Goymann: The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm* 2003, **250**, 191-201.
- Reinhardt, C.: Sind Tierversuche vertretbar? Beiträge zum Verantwortungsbewusstsein in den biomedizinischen Wissenschaften. In: *Zürcher Hochschulforum*. Verlag der Fachvereine Zürich, Zürich, 1990.
- Ricker, H. A., P. J. Neal, J. Kubilus & M. Klausner: Initial characterization of a new model for ocular irritancy testing. *In Vitro Cell & Devel. Biol.* 1994.
- Robertson, D. M., L. Li, S. Fisher, V. P. Pearce, J. W. Shay, W. E. Wright, H. D. Cavanagh & J. V. Jester: Characterization of growth and differentiation in a telomerase-immortalized human corneal epithelial cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005, **46**, 470-8.
- Rocha, E. M., D. A. Cunha, E. M. Carneiro, A. C. Boschero, M. J. Saad & L. A. Velloso: Insulin, insulin receptor and insulin-like growth factor-I receptor on the human ocular surface. *Adv Exp Med Biol* 2002, **506**, 607-10.
- Rohen, J. W.: Funktionelle Anatomie der Kornea, Episklera und Konjunktiva. In: *Das äussere Auge: Hauptreferate der XXXI. Essener Fortbildung für Augenärzte*. Eds.: A. Kampik and F. Grehn. Enke-Verlag, Stuttgart, 1996.
- Rojanasakul, Y., L. Y. Wang, M. Bhat, D. D. Glover, C. J. Malanga & J. K. Ma: The transport barrier of epithelia: a comparative study on membrane permeability and charge selectivity in the rabbit. *Pharm Res* 1992, **9**, 1029-34.
- Romeis, B.: Mikroskopische Technik. Verlag Urban und Schwarzenberg, München, 1989.
- Ross, M., J. Rohen, E. Lütjen-Drecoll & G. Kaye: Atlas der Histologie. Ullstein Mosby GmbH, Berlin, 1995.
- Rowan, A.: The Draize test: Political and Scientific issues. *Cosmet Tech* 1981, **3**, 32-48.
- Russell, W. M. S. & R. L. Burch: The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London, 1959.
- Saarinen-Savolainen, P., T. Jarvinen, K. Araki-Sasaki, H. Watanabe & A. Urtti: Evaluation of cytotoxicity of various ophthalmic drugs, eye drop excipients and cyclodextrins in an immortalized human corneal epithelial cell line. *Pharm Res* 1998, **15**, 1275-80.
- Sachs, L.: Angewandte Statistik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1992, pp. 540.
- Saito, Y., Y. Yoshida, T. Akazawa, K. Takahashi & E. Niki: Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J Biol Chem* 2003, **278**, 39428-34.
- Sakanaka, K., K. Kawazu, K. Nishida, J. Nakamura, M. Nakashima, T. Nakamura, A. Oshita, N. Ichikawa & H. Sasaki: Transport of timolol and tilisolol in rabbit corneal epithelium. *Biol Pharm Bull* 2006, **29**, 2143-7.
- Santos, N. C., J. Figueira-Coelho, J. Martins-Silva & C. Saldanha: Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 2003, **65**, 1035-41.

- Sasaki, H., K. Yamamura, T. Mukai, K. Nishida, J. Nakamura, M. Nakashima & M. Ichikawa: Enhancement of ocular drug penetration. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1999, **16**, 85-146.
- Schafer-Korting, M., U. Bock, W. Diembeck, H. J. Düsing, A. Gamer, E. Haltner-Ukomadu, C. Hoffmann, M. Kaca, H. Kamp, S. Kersen, M. Kietzmann, H. C. Korting, H. U. Krachter, C. M. Lehr, M. Liebsch, A. Mehling, C. Müller-Goymann, F. Netzlauff, F. Niedorf, M. K. Rubbelke, U. Schafer, E. Schmidt, S. Schreiber, H. Spielmann, A. Vuia & M. Weimer: Reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the validation study. *Altern Lab Anim* 2008, **36**, 161-187.
- Schafer-Korting, M., U. Bock, A. Gamer, A. Haberland, E. Haltner-Ukomadu, M. Kaca, H. Kamp, M. Kietzmann, H. C. Korting, H. U. Krachter, C. M. Lehr, M. Liebsch, A. Mehling, F. Netzlauff, F. Niedorf, M. K. Rubbelke, U. Schafer, E. Schmidt, S. Schreiber, K. R. Schroder, H. Spielmann & A. Vuia: Reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the German prevalidation study. *Altern Lab Anim* 2006, **34**, 283-94.
- Schneider, A. I.: Entwicklungen zu einem In vitro-Corneamodell im Hinblick auf eine Alternative zum Draize-Test. In: *Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik*, Stuttgart, 1997.
- Schneider, A. I., K. Maier-Reif & T. Graeve: Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999, **35**, 515-26.
- Schroedel, A.: Die Rolle des fetalen Kälberserums in Zellkulturmedien. *Biologie in unserer Zeit* 2007, **37**, 289-289.
- Schultz, G., N. Chegini, M. Grant, P. Khaw & S. MacKay: Effects of growth factors on corneal wound healing. *Acta Ophthalmol Suppl* 1992, 60-6.
- Schultz, G., P. T. Khaw, K. Oxford, S. MaCauley, G. Van Setten & N. Chegini: Growth factors and ocular wound healing. *Eye* 1994, **8 (Pt 2)**, 184-7.
- Scuderi, A. C., G. M. Paladino, C. Marino & F. Trombetta: In vitro toxicity of netilmicin and ofloxacin on corneal epithelial cells. *Cornea* 2003, **22**, 468-72.
- Serbecic, N. & S. C. Beutelspacher: Anti-oxidative vitamins prevent lipid-peroxidation and apoptosis in corneal endothelial cells. *Cell Tissue Res* 2005a, **320**, 465-75.
- Serbecic, N. & S. C. Beutelspacher: Vitamins inhibit oxidant-induced apoptosis of corneal endothelial cells. *Jpn J Ophthalmol* 2005b, **49**, 355-62.
- Sharpe, R.: The Draize test--motivations for change. *Food Chem Toxicol* 1985, **23**, 139-43.
- Sommer, A. & F. R. Davidson: Assessment and control of vitamin A deficiency: the Annecy Accords. *J Nutr* 2002, **132**, 2845S-2850S.
- Spangler, B. D.: Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 1992, **56**, 622-47.
- Speckmann, E. J. & W. Wittkowski: Bau und Funktion des menschlichen Körpers. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1994.
- Spielmann, H., S. Kalweit, M. Liebsch, T. Wirnsberger, I. Gerner, E. Bertram-Neis, K. Krauser, R. Kreiling, H. G. Miltenburger, W. Pape & W. Steiling: Validation study of alternatives to the Draize Eye Irritation Test in Germany: Cytotoxicity Testing and HET-CAM Test with 136 industrial chemicals. *Toxicol In Vitro* 1993, **4**, 505-510.

- Spielmann, H. & M. Liebsch: Lessons learned from validation of in vitro toxicity test: from failure to acceptance into regulatory practice. *Toxicol In Vitro* 2001, **15**, 585-90.
- Stratford, R. E., Jr. & V. H. Lee: Ocular aminopeptidase activity and distribution in the albino rabbit. *Curr Eye Res* 1985, **4**, 995-9.
- Sugrue, S. P. & J. D. Zieske: ZO1 in corneal epithelium: association to the zonula occludens and adherens junctions. *Exp Eye Res* 1997, **64**, 11-20.
- Suuronen, E. J., C. R. McLaughlin, P. K. Stys, M. Nakamura, R. Munger & M. Griffith: Functional innervation in tissue engineered models for in vitro study and testing purposes. *Toxicol Sci* 2004a, **82**, 525-33.
- Suuronen, E. J., M. Nakamura, M. A. Watsky, P. K. Stys, L. J. Muller, R. Munger, N. Shinozaki & M. Griffith: Innervated human corneal equivalents as in vitro models for nerve-target cell interactions. *Faseb J* 2004b, **18**, 170-2.
- Suuronen, E. J., H. Sheardown, K. D. Newman, C. R. McLaughlin & M. Griffith: Building in vitro models of organs. *Int Rev Cytol* 2005, **244**, 137-73.
- Tak, R. V., D. Pal, H. Gao, S. Dey & A. K. Mitra: Transport of acyclovir ester prodrugs through rabbit cornea and SIRC-rabbit corneal epithelial cell line. *J Pharm Sci* 2001, **90**, 1505-15.
- Talluri, R. S., S. Katragadda, D. Pal & A. K. Mitra: Mechanism of L-ascorbic acid uptake by rabbit corneal epithelial cells: evidence for the involvement of sodium-dependent vitamin C transporter 2. *Curr Eye Res* 2006, **31**, 481-9.
- Tchao, R.: Trans-epithelial permeability of fluorescein in vitro as an assay to determine eye irritants. In: *Alternative Methods in Toxicology. Progress in In Vitro Toxicology*. Ed.: G. A.M. Mary Ann Liebert, New York, 1988, pp. 271-283.
- Tegtmeyer, S., I. Papantoniou & C. C. Muller-Goymann: Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm* 2001, **51**, 119-25.
- Tegtmeyer, S., S. Reichl & C. C. Muller-Goymann: Cultivation and characterization of a bovine in vitro model of the cornea. *Pharmazie* 2004, **59**, 464-71.
- Tierschutzbericht. Kabinettvorlage, 2007.
- Tirucherai, G. S., C. Dias & A. K. Mitra: Corneal permeation of ganciclovir: mechanism of ganciclovir permeation enhancement by acyl ester prodrug design. *J Ocul Pharmacol Ther* 2002, **18**, 535-48.
- Tong, P. S., N. N. Horowitz & L. A. Wheeler: Trans retinoic acid enhances the growth response of epidermal keratinocytes to epidermal growth factor and transforming growth factor beta. *J Invest Dermatol* 1990, **94**, 126-31.
- Toropainen, E., M. Hornof, K. Kaarniranta, P. Johansson & A. Urtti: Corneal epithelium as a platform for secretion of transgene products after transfection with liposomal gene eyedrops. *J Gene Med* 2007, **9**, 208-16.
- Toropainen, E., V. P. Ranta, A. Talvitie, P. Suhonen & A. Urtti: Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, **42**, 2942-8.
- Toropainen, E., V. P. Ranta, K. S. Vellonen, J. Palmgren, A. Talvitie, M. Laavola, P. Suhonen, K. M. Hamalainen, S. Auriola & A. Urtti: Paracellular and passive transcellular permeability in immortalized human corneal epithelial cell culture model. *Eur J Pharm Sci* 2003, **20**, 99-106.
- Tseng, S. C. & M. Farazdaghi: Reversal of conjunctival transdifferentiation by topical retinoic acid. *Cornea* 1988, **7**, 273-9.

- Ubels, J. L., J. A. Ditlev, D. P. Clousing & P. L. Casterton: Corneal permeability in a redesigned corneal holder for the bovine cornea opacity and permeability assay. *Toxicol In Vitro* 2004, **18**, 853-7.
- Ubels, J. L. & S. M. MacRae: Vitamin A is present as retinol in the tears of humans and rabbits. *Curr Eye Res* 1984, **3**, 815-22.
- van der Valk, J., D. Mellor, R. Brands, R. Fischer, F. Gruber, G. Gstraunthaler, L. Hellebrekers, J. Hyllner, F. H. Jonker, P. Prieto, M. Thalen & V. Baumans: The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro* 2004, **18**, 1-12.
- Van Goethem, F., E. Adriaens, N. Alepee, F. Straube, B. De Wever, M. Cappadoro, S. Catoire, E. Hansen, A. Wolf & P. Vanparys: Prevalidation of a new in vitro reconstituted human cornea model to assess the eye irritating potential of chemicals. *Toxicol In Vitro* 2006, **20**, 1-17.
- Van Itallie, C. M. & J. M. Anderson: Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 2006, **68**, 403-29.
- Venable, J. H. & R. Coggeshall: A Simplified Lead Citrate Stain For Use In Electron Microscopy. *J Cell Biol* 1965, **25**, 407-8.
- Wang, Y., M. Chen & J. M. Wolosin: ZO-1 in corneal epithelium; stratal distribution and synthesis induction by outer cell removal. *Exp Eye Res* 1993, **57**, 283-92.
- Ward, S. L., W. T.L. & D. S.D.: Evaluation of chemically induced toxicity using an in vitro model of human corneal epithelium. *Toxicol in Vitro* 1997, **11**, 121-139.
- Ward, S. L., T. L. Walker, F. H. Kruszewski & L. C. DiPasquale: Human corneal epithelial cultures and cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995, **36**, 2335-6.
- Weil, C. S. & R. A. Scala: Study of intra- and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. *Toxicol Appl Pharmacol* 1971, **19**, 276-360.
- Wilhelmus, K. R.: The draize eye test. *Surv Ophthl* 2001, **45**, 493-515.
- Wilson, J. G., C. B. Roth & J. Warkany: An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat* 1953, **92**, 189-217.
- Wunderlich, K., M. Knorr, P. C. Dartsch, H. P. Steuhl & H. J. Thiel: [Ascorbic acid. Cytotoxic effect on cultivated bovine lens epithelium cells]. *Ophthalmologe* 1992, **89**, 313-8.
- Yi, X., Y. Wang & F. S. Yu: Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41**, 4093-100.
- Yu, A. S.: Claudins and epithelial paracellular transport: the end of the beginning. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003, **12**, 503-9.
- Yurchenco, P. D. & J. C. Schittny: Molecular architecture of basement membranes. *Faseb J* 1990, **4**, 1577-90.
- Zieske, J. D., G. Bukusoglu, M. A. Yankauckas, M. E. Wasson & H. T. Keutmann: Alpha-enolase is restricted to basal cells of stratified squamous epithelium. *Dev Biol* 1992, **151**, 18-26.
- Zieske, J. D., V. S. Mason, M. E. Wasson, S. F. Meunier, C. J. Nolte, N. Fukai, B. R. Olsen & N. L. Parenteau: Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction. *Exp Cell Res* 1994, **214**, 621-33.

- Zorn-Kruppa, M., S. Tykhonova, G. Belge, J. Bednarz, H. A. Diehl & M. Engelke: A human corneal equivalent constructed from SV40-immortalised corneal cell lines. *Altern Lab Anim* 2005, **33**, 37-45.
- Zorn-Kruppa, M., S. Tykhonova, G. Belge, H. A. Diehl & M. Engelke: Comparison of human corneal cell cultures in cytotoxicity testing. *Altex* 2004, **21**, 129-34.

