

## **Kapitel 3: Material und Methoden**

### **3.1. Laborinventar**

#### **3.1.1. Gefäße**

- sterile Bechergläser zu 100ml, 150ml, 250ml, 400ml, 600ml und 1000ml
- Glasflaschen zu 500ml
- Zellkulturschalen 100x20mm Falcon® (Becton Dickinson Labware, USA)
- sterile 50 ml Plastikröhrchen Falcon® (Becton Dickinson Labware, USA)
- sterile 15 ml Zentrifugenröhrchen Falcon® (Becton Dickinson Labware, USA)
- steriles 150 ml Filter System (Corning®, NY, USA)
- 6, 12 und 24 Well Kulturschalen Falcon® (Becton Dickinson Labware, USA)
- Gefrieröhrchen (Nunc®, Wiesbaden, BRD)
- Zellkulturflaschen zu 50 und 250ml mit Verschlussbelüftungsfiter Falcon® (Becton Dickinson Labware, USA)
- Eppendorfröhrchen zu 0,5ml (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

#### **3.1.2. Instrumente**

- sterile Pinzetten
- Zellschaber (Corning®, NY, USA)
- sterile Einwegskalpelle No 10 (Feather Safety Razor co, LTD, Japan)
- Eppendorfpipetten (1000 µl, 100 µl, 10µl) mit sterilen Pipettenspitzen
- sterile Einmalpipetten (5ml, 10 ml) (Bibley Sterilin Ltd. UK)
- sterile Transfer-Pipetten 3,5ml (Sarstedt, BRD)

#### **3.1.3. Geräte**

- sterile Werkbank mit Laminar Flow Heraeus Hera Safe® (Heraeus, Hanau, BRD)
- Brutschrank (Heraeus, Hanau, BRD)
- Kühlschrank 4 °C
- Gefrierschrank –80 °C
- inverses Mikroskop mit Kamera Leica DM-IRB/E (Leica, Wetzlar, BRD)

- Fluoreszenzmikroskop mit Kamera Zeiss Axiophot (Zeiss, Jena, BRD)
- Zentrifuge Heraeus Function Line® (Heraeus, Hanau, BRD)
- Autoclaviergerät MELAG®
- Heißluftsterilisator Systec®
- Handstückzähler
- accu-jet® Pipettierhelfer (Brand GmbH, Wertheim, BRD)
- Neubauer – Zählkammer
- ELISA-Plattenreader anthos ht II
- Thermomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

### 3.2. Verbrauchslösungen

Kulturmedium mit 10 bzw. 20% FCS (K10% bzw. K20%)

- 90 bzw. 80 ml DMEM (GIBCO BRL, Paisley, Schottland)
- 2,5 ml HEPES gelöst in destilliertem Wasser bei pH 7,2 (Biochrom AG, Berlin, BRD)
- 1,0 ml Penicillin/ Streptomycin (Sigma, St.Louis, U.S.A.)
- 0,1 ml Gentamycin (GIBCO BRL, Paisley, GB)
- AmphotericinB 12,5 µl in einer Konzentration von 2,5µg/ml (PAA Laboratories GmbH, Pansching, Österreich)
- 10 bzw. 20 ml fetales Kälberserum (GIBCO BRL, Paisley, GB)

Einfriermedium

- 10 ml DMEM (GIBCO BRL, Paisley, Schottland)
- 1 ml FCS (GIBCO BRL, Paisley, GB)
- 1 ml DMSO (= Dimethylsulfoxid) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, BRD)
- 50µl Glukose
- 110µl Penicillin/ Streptomycin (Sigma, St.Louis, U.S.A.)

Pufferlösung PBS

- 8g Natriumchlorid
- 0,2g Kaliumchlorid
- 1,44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,24g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- 1000ml destilliertes Wasser

Karbonatpuffer (pH 9,6):

- 1,58985g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 2,94035g NaHCO<sub>3</sub>
- 1000ml destilliertes Wasser

### **3.3. Medikamentenlösungen**

- Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavon) (biomol, Hamburg, BRD)
- 5-FU (5-Fluorouracil) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, BRD)
- Suramin (hexasulfonierter Naphthylurea-Bestandteil) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, BRD)

10mg Pulver wurden nach Herstellerangaben jeweils mit 1ml DMSO (Genistein, 5-FU) bzw. PBS (Suramin) versetzt. Aus der entstandenen Stammlösung wurde durch eine Verdünnung 1:100 mit Kulturmedium eine Lösung der Konzentration 100µg/ml erstellt. Aus dieser Lösung wurden dann durch Verdünnungsschritte die weiteren Lösungen hergestellt (12,5µg/ml, 25µg/ml und 50µg/ml).

### **3.4. Primärkultur**

#### **3.4.1. Probengewinnung**

Bei Schieloperationen wurden kleine Gewebeproben aus der während der Operation eröffneten Tenonkapsel von 6-14jährigen Patienten entnommen. Es wurden nur Gewebsüberschüsse verwendet, die sonst verworfen worden wären. Die Deklaration von Helsinki wurde eingehalten. Alle Patienten bzw. deren gesetzliche Vertreter gaben nach Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis. Die gewonnenen Proben (s. Tab. 5) wurden jeweils sofort in steriler PBS-Lösung in ein Asservatgefäß eingebracht und innerhalb von 2h weiterverarbeitet.

Patient	Geschlecht	Alter	Vorangegangene Augenoperationen	Allergien/ Entzündungen
P 1	M	6	-	-
P 2	W	6	-	-
P3	W	14	-	-
P4	W	9	Strabismus	Neurodermitis
P5	M	8	Strabismus	Konjunktivitis
P6	W	6	Strabismus	Konjunktivitis, Katzenhaarallergie

*Tab.5: Patientendaten zu den entnommenen Proben; P1-P3 bilden die Gruppe der nicht-aktivierten, P4-P6 die der aktivierten Tenonfibroblasten und damit einer Operations-Risikogruppe*

### **3.4.2. Anlegen der Primärkultur**

Die Proben wurden in eine Petrischale transferiert. Es erfolgte eine Zugabe von Collagenase TypIV 0,5% (Biochrom AG, Berlin, BRD). Danach wurden die Zellen 45 Minuten im Brutschrank bei 95%igen O<sub>2</sub>- und 5%igen CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft und 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben aus den Petrischalen entnommen, die Collagenase mit PBS ausgewaschen und das Probenstück mit einem Skalpell zerteilt. Jeweils zwei Probenstücke eines Patienten wurden in 6er Wells gegeben, mit Kulturmedium K20% bedeckt und wieder in den Brutschrank gestellt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle vier Tage. Nach 8 bis 10 Tagen wuchsen Tenonfibroblasten aus. Die Identifikation der Fibroblasten erfolgte anhand ihrer morphologischen Charakteristika: verzweigte Zellen mit elliptischem Zellkern. Es erfolgte eine Umstellung des Mediums auf Kulturmedium K10%. Nach 4 Wochen waren die Proben subkonfluent gewachsen und die erste Passage wurde durchgeführt.

### **3.4.3. Passage der Primärkultur**

Dazu wurde jedes Well der Kulturschale mit 1 ml PBS gespült und anschließend mit Accutase (PAA Laboratories GmbH, Pansching, Österreich) 10 Minuten im Brutschrank inkubiert, um die Zellen unter Schonung ihrer Oberflächenrezeptoren abzulösen. Unterstützt wurde der Ablösevorgang durch Schütteln und Klopfen der Kulturschale. Die

Suspension aus Zellen und Accutase wurde in einem Zentrifugenröhrchen mit der 10fachen Menge DMEM gesammelt und bei 1000 U/min und 15 °C 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Zellpellet in 1ml K10% resuspendiert. Die Bestimmung Zellzahl erfolgte mit der Neubauer - Zählkammer. Nach der dritten Passage wurden die Zellen bis zur Verwendung in den Versuchen eingefroren. Für die Versuche wurden nur die Zellen der Passagen 3 - 7 verwendet.

#### **3.4.4. Einfrieren von Zellen**

Die abgelösten Zellen wurden im Verhältnis 1:10 mit dem Einfriermedium versetzt. Jeweils 1,8ml wurden in Tiefgefriereröhrchen gegeben und bei 500 U/min 5min zentrifugiert. 1ml Überstand wurde abgenommen, danach wurden die Proben für 15 Minuten in den Kühlschrank gestellt, um anschließend bei -80°C im Gefrierschrank eingefroren zu werden.

#### **3.5. Zytotoxizitätsbestimmung mit dem Trypanblaufärbetest**

Der Versuch erfolgte zur Bestimmung der später zu verwendenden Höchstkonzentrationen der Medikamente. 12er-Wells wurden mit 10.000 Zellen pro Well bestückt und mit 350µl K10% pro Well angefütert. Nach 24h Adhäsionszeit erfolgte die Zugabe des jeweiligen Medikaments in einer Konzentration von 25µg/ml, 50µg/ml oder 100µg/ml jeweils für 24, 48 oder 72h. In der Kontrollgruppe erfolgte statt des Medikaments eine Zugabe von K10%. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen mit Accutase abgelöst, die entstandene Zellsuspension bei 1000 U/min 15min zentrifugiert und anschließend in 50µl DMEM resuspendiert. Jeweils 10µl Zellsuspension wurden mit 10µl Trypanblau 0,5% (w/v) in physiologischer Lösung (Biochrom AG, Berlin, BRD) vermischt. Von dieser Suspension wurden 10µl in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dabei zählten blau angefärbte Zellen als avital, ungefärbte Zellen als vital. Die Vitalität der jeweiligen Zellkultur wurde berechnet nach der Formel

$$\text{Lebende Zellen/Tote Zellen} \times 100 = \text{Vitalität der Zellkultur in Prozent.}$$

Zellkulturen mit einer Vitalität größer 90% wurden als frei von zytotoxischen Effekten betrachtet. Alle Experimente wurden als Triplikat durchgeführt.

### 3.6. Chemotaxis im Transwell (nach Occleston et al.<sup>(82)</sup>)

In 6er Wells wurden 50.000 Zellen pro Well ausgesät, die für 24 h adhärirten. Anschließend erfolgte die Medikamentenzugabe für 3 Tage bzw. K10% als Kontrolle. Nach 3 Tagen wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Ein Transwell besteht aus einer oberen und einer unteren Kammer. In die obere Kammer eines 24er Transwells mit Polykarbonatmembran 6,5mm und Porendurchmesser 8µm (Corning Costar®, NY, USA) wurden 8.000 lebende Zellen in DMEM (100µl insgesamt) eingefüllt.

In die untere Kammer des Transwells wurden 600µl K20% als Chemoattraktant bzw. DMEM als Kontrolle gegeben. Nach 3h Adhäsionszeit im Brutschrank wurden die oberen Kammern in die Wells mit dem Chemoattraktant gesetzt und inkubierten weitere 16h im Brutschrank. Anschließend wurden die Transwells entnommen und dreimal in Färbeküvetten mit PBS-Lösung gewaschen (s. Abb.9), mit 400µl Ethanol 100Vol.-% (Herbeta-Arzneimittel, Berlin) 5 min fixiert, dann 5 min in saures Hämatoxylin nach Ehrlich (Dr. K. Hollborn und Söhne, Leipzig) eingetaucht und schließlich 10 min in Leitungswasser gespült.

Zur Bestimmung der gewanderten Zellen wurde die obere Seite des Transwells mit einem Q-Tip abgewischt. Anschließend wurde die Membran mit einem Skalpell ausgeschnitten, auf einen Objektträger überführt und mit Immu-Mount (Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, USA) eingedeckt. Da jeweils nur eine geringe Zahl von Zellen gewandert war, wurden alle Zellen auf einer Membran mit dem Mikroskop bei 1.000facher Vergrößerung in Ölimmersion ausgezählt. Die Versuche wurden jeweils als Triplikat durchgeführt.

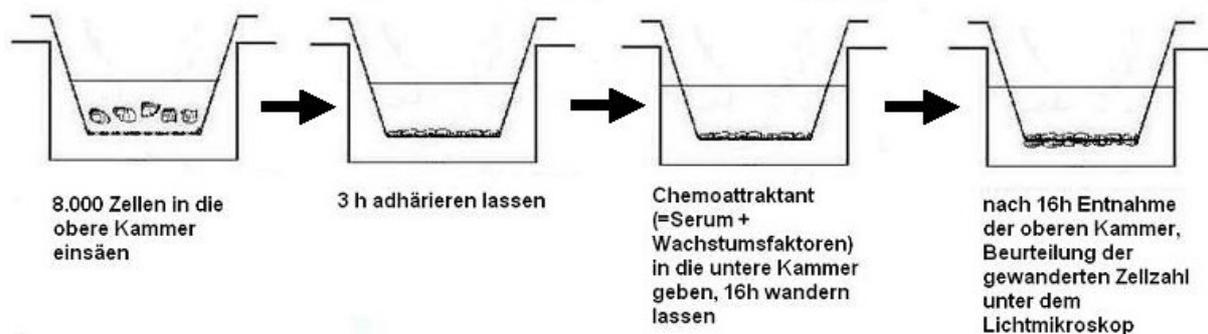


Abb.9: Übersicht über die Durchführung des Transwell-Migrationsversuchs

### **3.7. Proliferationsbestimmung durch Zellzählung** (nach Khaw et al. <sup>(51)</sup>)

In 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen wurden je 5.000 Tenonfibroblasten/cm<sup>2</sup> ausgesät und mit drei ml K10% angefüllt. Nach 24h Adhäsionszeit wurden die bei der Zytotoxizitätsbestimmung ermittelten Höchstkonzentrationen der Medikamente bzw. K10% als Kontrolle für jeweils 72h zugegeben. Nach 72h wurde die jeweilige Medikamentenlösung entfernt und die Zellkultur dreimal mit PBS gewaschen. Zweimal pro Woche erfolgte ein Mediumwechsel mit K10%. Zu den Nachbeobachtungszeiten am 3., 6., 9., 15., 21. und 28. Tag nach der Medikamentenzugabe wurden in jeder Kulturflasche jeweils fünf vorher ausgewählte Areale mit dem inversen Phasen-Kontrastmikroskop ausgezählt. Jedes Areal umfasste eine Fläche von 0,25 cm<sup>2</sup>. Alle Versuche wurden als Triplikat durchgeführt.

### **3.8. Bestimmung der Fibronectinexpression durch ELISA** (nach Kottler et al. <sup>(59)</sup>)

Jeweils 20.000 Zellen pro Well wurden in 24er Wells ausgesät und adhären 24h. Anschließend erfolgte die Medikamentenzugabe bzw. K10% als Kontrolle. Nach drei Tagen wurde der Überstand abgesaugt und bei -80°C eingefroren. Die Wells wurden dreimal mit PBS gespült, anschließend erfolgte die Zugabe von K10%. Auf die gleiche Weise wurden die Überstände an Tag 6,9,15, 21 und 28 gewonnen.

Zur Verarbeitung der Überstände wurden high-binding 96er Wells (Corning Costar®, NY, USA) mit polyklonalem Rabbit-Ak (DakoCytomation, Dänemark) bedeckt (gelöst 1:1000 in 0,1M Karbonatpuffer pH 9,6, je 100µl/Well) und bei 4°C in den Kühlschrank gestellt. Nach 24h wurden die Wells dreimal mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit PBS und bovinem Serumalbumin (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., USA) in einer Konzentration von 1% (PBS-BSA) bei Raumtemperatur geblockt.

Zum Vergleich mit den Proben wurde eine Verdünnungsreihe mit menschlichem Fibronectin aus Plasma (Biochrom, Berlin, BRD) erstellt (1000ng/ml, 500 ng/ml, 250ng/ml, 143 ng/ml, 71,5ng/ml, 35,75ng/ml, 18ng/ml, 9ng/ml, 4,5ng/ml, 2,2 ng/ml). Die Verdünnung erfolgte mit PBS-BSA. Die weitere Verarbeitung der Verdünnungsreihe verlief wie bei den Proben.

Die gewonnenen Überstände wurden im Thermomixer aufgetaut und durchmischt. Anschließend wurden sie mit PBS-BSA verdünnt (Kontrolle 1:400,

Medikamentenproben 1:100). Jeweils 100µl wurden in die Wells mit dem 1. Antikörper gegeben und inkubierten 2h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Wells abgeklopft und dreimal mit PBS und 0,1% Tween20 (PBS-T) gewaschen.

Der zweite Antikörper, ein peroxidasekonjugierter polyklonaler Rabbit Anti-Human Fibronectin/HRP AK (DakoCytomation, Dänemark), wurde 1:4000 mit PBS-T verdünnt. Jeweils 100µl wurden in die Wells gegeben und inkubierten 1h bei Raumtemperatur. Dann wurden die Proben dreimal mit PBS-T gewaschen. Nach dem Abklopfen wurde ein Entwickler (DakoCytomation, Dänemark) für 15min hinzugefügt. Die Entwicklung erfolgte im Dunkeln und wurde durch n-normale Schwefelsäure gestoppt. Die dabei entstandene Färbungsintensität wurde im Plattenreader ausgelesen (Absorption bei 450 nm, Hintergrund bei 650 nm). Die Bestimmung der Fibronektinkonzentration erfolgte durch graphische Auftragung auf logarithmischem Papier. Die Versuche wurden jeweils als Triplikat durchgeführt.

### **3.9. Transdifferenzierung und Immunocytochemie** (Transdifferenzierung nach Meyer-Ter-Vehn et al.<sup>(72)</sup>, Immunocytochemie nach Maltseva et al.<sup>(67)</sup>)

Je 10.000 Zellen pro Kammer wurden auf fibronectinbeschichteten Objektträgern (Biocoat®, Becton Dickinson Labware, USA) ausgesät und adhärirten 24h. Dann wurde für drei Tage K10% zugegeben, das mit verschiedenen Konzentrationen von TGFβ-1 (Sigma®, St. Louis, USA) (2, 5, 25 oder 50ng/ml) angereichert war. Dabei konnten jeweils 53 – 58 % der Zellen umgewandelt werden. Daher wurden für die weiteren Versuche jeder Medikamentenlösung 2ng/ml TGFβ-1 zugegeben. Nach drei Tagen Inkubation wurden die Kammern abgelöst, die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen und 10min in 4°C-kaltem Aceton gekühlt und bis zur immunocytochemischen Färbung eingefroren.

Zur Färbung wurden die Objektträger mit Aceton angefeuchtet und anschließend dreimal in PBS-T gewaschen. Zur Blockierung wurde für 30 min Goat-Serum (Santa Cruz Biotechnology) zugegeben, das in einer feuchten Kammer einwirkte. Anschließend wurde das Blockadeserum abgeklopft und ein Cy3-markierter monoklonaler α-SMA-Antikörper (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, BRD) (Verdünnung 1:100 mit PBS-B) hinzugefügt, der 120 min in einer feuchten Kammer bei Verdunklung

bei Raumtemperatur inkubierte. Anschließend wurden die Objektträger dreimal in PBS gespült und es erfolgte die Kernfärbung mit DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid) (Verdünnung 1:200 mit PBS). Dann wurden die Objektträger dreimal in PBS-Küvetten gewaschen und mit Immu-Mount eingedeckt. In jeder Objektkammer wurden 5 Areale ausgewählt und in ihnen das Verhältnis der  $\alpha$ -SMA-positiven zu  $\alpha$ -SMA-negativen Zellen bestimmt. Alle Versuche wurden jeweils als Triplikat durchgeführt.

### **3.10. Statistik**

Die graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism® Version 4.02 vom 17. Mai 2004 (GraphPad Software, San Diego, CA). Die statistischen Analysen wurden mit Microsoft Excel und GraphPad Prism® durchgeführt. Verwendet wurden der Student's t-Test für verbundene Stichproben zum Vergleich der Ergebnisse zweier Messungen an denselben Patienten, die Bonferoni-Korrektur zur Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers und die einfaktorielle ANOVA (analysis of variance). Das Signifikanzniveau nach Bonferoni-Korrektur für Proliferation und Fibronectinproduktion lag bei  $p < 0,001$  und für Migration und Transformation bei  $p < 0,008$ .

## **Kapitel 4. Ergebnisse**

### **4.1. Zytotoxizität**

5-FU und Suramin zeigten auch nach 72h Inkubation in allen verwendeten Konzentrationen keine Zytotoxizität. Deshalb wurden sie für die weiteren Experimente in einer Konzentration von jeweils 100  $\mu\text{g/ml}$  bei einer Einwirkdauer von 72h verwendet.

Genistein hatte bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$  nach 48h und 72h eine große Zahl trypanblaupositiver Zellen. Bei einer Einwirkdauer von 24h trat hingegen keine