

**Entwicklung eines humanen Cornea-Modells für die  
okulotoxische Sicherheitsprüfung:  
Charakterisierung der SV40-immortalisierten  
Endothel- und Keratocytenzelllinie**

**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

**Anna Katharina Manzer**

aus Rosenheim

Juni 2008

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

2. Gutachter: Frau PD Dr. Maria Engelke

Disputation am 01. Juli 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.

**Für**

**Mag. Pharm.**

**SIEGLINDE MANZER**

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas, die stete Gesprächsbereitschaft und ihre Motivationsfähigkeit. Ihre umfassende Unterstützung und wissenschaftliche Kompetenz haben diese Arbeit erst ermöglicht.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Privatdozentin Dr. Maria Engelke für die Überlassung des Cornea-Projektes, das Zurverfügungstellen der Zelllinien und ihres fachlichen Know-Hows sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Auch für das Erstellen des Zweitgutachtens bedanke ich mich herzlich.

Bei Herrn Dr. Simone Lombardi-Borgia bedanke ich mich ganz besonders für die Unterstützung bei der inhaltlichen Ausarbeitung und praktischen Durchführung meiner Doktorarbeit, die ohne seine richtungsweisenden Ideen und sein Engagement nicht entstanden wäre.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Michaela Zorn-Kruppa, Akademie für Tierschutz, München-Neubiberg, und meiner Kollegin Frau Judith Wanda Seeber für die Diskussionsbereitschaft und den steten Austausch neuer Erkenntnisse bezüglich des Cornea-Projekts. Herrn Dr. Bednarz, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, danke ich für das Zurverfügungstellen der primären Cornea-Endothelzellen.

Allen Mitgliedern der Arbeitskreise von Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting und Herrn Professor Dr. Burkhard Kleuser danke ich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, das freundschaftliche Arbeitsklima und die vielen gemeinsamen Unternehmungen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Katharina Küster für die gemeinsame Doktoranden-Zeit in Berlin und die langjährige Freundschaft, die daraus entstanden ist.

Bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern und meinen Schwestern Caroline und Felicitas möchte ich mich herzlich für die stete Unterstützung und den liebevollen Rückhalt während der gesamten Zeit bedanken.

**ORIGINALARBEITEN**

Manzer, A.K., Lombardi-Borgia, S., Seeber, J.W., Schäfer-Korting, M., Zorn-Kruppa, M., Engelke, M. 2008. *SV40-transformed human corneal keratocytes: Optimisation of serum-free culture conditions*. [eingereicht]

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*. ATLA. [im Druck]

**POSTER**

Manzer, A., Lombardi-Borgia, S., Schäfer-Korting, M., Engelke, M. *Characterization of two immortalized human corneal cell lines used for building a new organotypic corneal equivalent*. 13<sup>th</sup> MEGAT-Congress on Alternatives to Animal Experimentation, Linz (Österreich), 2.-4. Juni 2006.

Lombardi-Borgia, S., Manzer, A.K., Seeber, J.W., Engelke, M. *Characterisation of a new human corneal equivalent based on immortalised cell lines*. INVITOX, Ostende (Belgien), 2.-5. Okt. 2006

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

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*. I-SUP, Innovation for Sustainable Production, Brügge (Belgien), 22.-25. April 2008.

Engelke, M., Kleuser, B., Manzer A.K., Schäfer-Korting, M. *Invitrotrain: training courses on alternative test methods*. 5<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Berlin, 21.-25. Aug. 2005.

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, Berlin, 21.-25. Aug. 2005.

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b><i>EINLEITUNG</i></b> -----	<b>2</b>
<b>1.1</b>	<b>Aufbau und Funktion der humanen Cornea und ihrer Substrukturen.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>Die corneale Wundheilung unter besonderer Berücksichtigung der Phänotypen im Stroma.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3</b>	<b>Untersuchungsmethoden zur Vorhersage der okularen Toxizität .....</b>	<b>10</b>
1.3.1	Der Kaninchenaugen-Irritationstest nach Draize .....	11
1.3.2	Beschränkung des Einsatzes von Tierversuchen aufgrund der neuen EU-Gesetzgebung .....	12
1.3.3	Alternativmethoden zur Vorhersage der okularen Toxizität .....	16
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b><i>MATERIAL UND METHODEN</i></b> -----	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>25</b>
2.1.1	Geräte.....	25
2.1.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.3	Zelllinien.....	28
2.1.4	Nährmedien.....	28
2.1.4.1	Serumhaltige Aufzuchtmedien für die Zelllinien.....	28
2.1.4.2	Serumreduzierte und serumfreie Medien für die Zelllinien.....	29
2.1.4.3	Kulturmedien für primäre Zellen.....	31
2.1.5	Lösungen.....	31
2.1.5.1	Lösungen zur Zellkultivierung.....	31
2.1.5.2	Lösungen für die Herstellung der Stroma-Äquivalente .....	32
2.1.5.3	Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie.....	33
2.1.5.4	Lösungen für Zellyse und Proteinbestimmung.....	34
2.1.5.5	Lösungen für die Western Blot-Analyse.....	34
2.1.5.6	Lösungen für die Keratocyten-Isolierung aus dem Stromagel.....	36
2.1.5.7	Lösungen für Viabilitätsuntersuchungen .....	36
2.1.5.8	Lösungen der Testsubstanzen .....	36
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>37</b>
2.2.1	Kultivierung von Zelllinien.....	37
2.2.2	Kultivierung der Cornea-Äquivalente .....	39
2.2.3	Durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS) .....	41
2.2.3.1	Untersuchungen zur Proliferation und Nekrose von Epithelzellen und Keratocyten.....	41
2.2.3.2	Untersuchungen zur Proliferation von Keratocyten nach Stimulation mit TGFβ1 .....	42
2.2.3.3	Probenaufbereitung für die Durchflusszytometrie .....	42
2.2.3.4	Einstellung des Durchflusszytometers.....	43

2.2.4	Untersuchungen zum Membranwiderstand (TEER) .....	44
2.2.5	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen .....	44
2.2.5.1	Untersuchungen zur Kontaktinhibition der Endothel-Zelllinie EC.....	44
2.2.5.2	Untersuchungen zum Phänotyp der Keratocyten-Zelllinie HCK.....	46
2.2.6	Westernblot-Untersuchungen zur Myofibroblasten-Differenzierung der HCK .....	48
2.2.6.1	Untersuchung der $\alpha$ -SMA-Expression in verschiedenen Medien.....	48
2.2.6.2	Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der $\alpha$ -SMA-Expression .....	48
2.2.6.3	Untersuchung der $\alpha$ -SMA-Expression im Stroma-Äquivalent .....	49
2.2.6.4	Analyse der Protein-Expression.....	50
2.2.7	Untersuchung der Matrixkontraktion an Stroma-Äquivalenten .....	52
2.2.8	Untersuchungen zur Viabilität des EPI- und SE-Modells .....	52
2.2.8.1	ET <sub>50</sub> -Bestimmungen .....	52
2.2.8.2	Untersuchungen zur Toxizität von Fluorescein .....	54
2.2.8.3	Untersuchungen zur Regenerationsfähigkeit der Cornea-Modelle .....	55
2.2.9	Statistik.....	55
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> -----	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der Endothel-Zelllinie EC.....</b>	<b>58</b>
3.1.1	Einfluss verschiedener Kulturmedien auf die Proliferation der EC-Zelllinie.....	58
3.1.2	Untersuchungen zur Kontaktinhibition der EC-Zelllinie .....	60
3.1.3	Einfluss verschiedener Kulturmedien auf den Transmembranwiderstand der EC-Kultur .....	61
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung der Keratocyten-Zelllinie HCK.....</b>	<b>63</b>
3.2.1	Charakterisierung der HCK-Zelllinie in der Monolayerkultur auf Kunststoffzellkulturplatten ....	63
3.2.1.1	Einfluss verschiedener Kulturmedien auf die Proliferation der HCK-Zelllinie.....	63
3.2.1.2	Einfluss von TGF $\beta$ 1 auf die Proliferation der HCK-Zelllinie .....	64
3.2.1.3	Einfluss der unterschiedlichen Kulturbedingungen und TGF $\beta$ 1 auf den Phänotyp der HCK-Zelllinie.....	66
3.2.1.3.1	Organisation des Zytoskeletts in Abhängigkeit von Serum und TGF $\beta$ 1.....	67
3.2.1.3.2	Expression von Zelladhäsions-Proteinen in Abhängigkeit von Serum und TGF $\beta$ 1.....	68
3.2.1.3.3	Expression von $\alpha$ -SMA in Abhängigkeit von Serum und TGF $\beta$ 1 .....	73
3.2.1.3.4	Zeitabhängigkeit der Myofibroblasten-Differenzierung nach TGF $\beta$ 1-Stimulation .....	75
3.2.2	Charakterisierung der HCK-Zelllinie im Stroma-Gel .....	77
3.2.2.1	Einfluss von Typ I-Collagen auf den Phänotyp der HCK-Zelllinie.....	77
3.2.2.2	Kontraktion der Stroma-Äquivalente in Abhängigkeit vom Phänotyp der HCK-Zelllinie...	78
<b>3.3</b>	<b>Anwendung der Cornea-Modelle zur Bestimmung des Augenirritations-Potentials ausgewählter Modellsubstanzen .....</b>	<b>81</b>
3.3.1	Bestimmung der ET <sub>50</sub> für TritonX-100 0,3% am SE- und EPI-Modell .....	82
3.3.2	Bestimmung der ET <sub>50</sub> für TritonX-100 0,3% am SE-Modell mit zellfreiem Stroma.....	84
3.3.3	Bestimmung der ET <sub>50</sub> für Benzalkoniumchlorid (BAC) 0,1% am SE- und EPI-Modell .....	86
3.3.4	Beeinflussung der Gewebe-Viabilität durch Fluorescein.....	88

3.3.5	Wiederherstellung von Viabilität und Barriereeigenschaften des SE- und EPI-Modells nach Exposition mit TritonX-100 0,3%.....	89
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> -----	<b>93</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der Endothel-Zelllinie EC.....</b>	<b>93</b>
4.1.1	Einfluss der Kulturmedien auf die Proliferation der EC-Zelllinie.....	94
4.1.2	Untersuchungen zur Kontaktinhibition der EC-Zelllinie .....	94
4.1.3	Zusammenfassung und Fazit der EC-Charakterisierung .....	98
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der Keratocyten-Zelllinie HCK.....</b>	<b>98</b>
4.2.1	Charakterisierung der HCK in der Monolayerkultur.....	98
4.2.1.1	Charakterisierung des Phänotyps der HCK-Zelllinie unter serumhaltigen Kulturbedingungen .....	99
4.2.1.2	Charakterisierung des Phänotyps der HCK-Zelllinie unter serumfreien Kulturbedingungen .....	102
4.2.1.3	Charakterisierung der HCK-Zelllinie nach Stimulation mit TGF $\beta$ 1.....	104
4.2.1.4	Zusammenfassung und Fazit der HCK-Charakterisierung in der Monolayerkultur .....	108
4.2.2	Charakterisierung der HCK in der rekonstruierten Stroma-Matrix.....	109
4.2.2.1	Der Einfluss von Typ I-Collagen auf die $\alpha$ -SMA-Expression der HCK.....	109
4.2.2.2	Untersuchungen zur Stroma-Kontraktion.....	113
4.2.2.3	Zusammenfassung und Fazit der HCK-Charakterisierung in der rekonstruierten Stroma-Matrix .....	118
<b>4.3</b>	<b>Vergleichende Untersuchungen zum Augenirritations-Potential von Modellsubstanzen am Epithel- und Stroma-Epithel-Modell.....</b>	<b>118</b>
4.3.1	Viabilitäts-Untersuchungen am EPI- und SE-Modell mit TritonX-100.....	121
4.3.2	Viabilitäts-Untersuchungen am EPI- und SE-Modell mit Benzalkoniumchlorid (BAC).....	124
4.3.3	Vergleichende Untersuchungen zur Regenerationsfähigkeit der in vitro Cornea-Modelle nach Exposition mit TritonX-100.....	127
4.3.4	Fazit der vergleichenden Untersuchungen zum Augenirritations-Potential am Epithel- und Stroma-Epithel-Modell.....	129
<b>4.4</b>	<b>Rekonstruktion eines optimierten Kompletmodells der humanen Cornea und Ausblick .....</b>	<b>130</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> -----	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b> -----	<b>140</b>



**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth-muscle-actin (glattmuskuläres $\alpha$ -Aktin)
BAC	Benzalkoniumchlorid
BCOP	Bovine corneal opacity and permeability
BPE	Bovine pituitary extract (Rinderhypophysenextrakt)
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	Chorioallantois-Membran
CDK	Cyclin dependent kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
CKI	Cyclin dependent kinase inhibitor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	humane Cornea-Endothel-Zelllinie/ European Commission
ECETOC	European Centre for Toxicology and Ecotoxicology of Chemicals
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure
EEC	European Economic Community (Europäische Wirtschaftsgemeinschaft, EWG)
EGF	Epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPI-Modell	dreidimensionales Epithelmodell
ESAC	ECVAM Scientific Advisory Committee
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forwardscatter (Vorwärtsstreulicht)
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
HCE	humane Cornea-Epithel-Zelllinie
HCK	humane Keratocyten-Zelllinie
HCK <sub>o</sub>	HCK, an serumhaltiges Medium F99 5% adaptiert
HCK+Ca	HCK, an serumfreies KGM+Ca-Medium adaptiert

HCK+++	HCK, an serumfreies KGM+++-Medium adaptiert
hEGF	human epidermal growth factor (humaner epidermaler Wachstumsfaktor)
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HET-CAM	Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane
hFGF	human fibroblast growth factor (humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
HGF	Hepatocyte growth factor (Hepatocytenwachstumsfaktor)
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance
ICE	Isolated chicken eye (Alternativmethode am exzidierten Hühnerauge)
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
IL-1	Interleukin-1
INN	International nonproprietary name (internationaler markenfreier Name)
IRE	Isolated rabbit eye (Alternativmethode am exzidierten Kaninchenauge)
KBM	Keratinocytenbasalmedium
KGM	Keratinocyte growth medium (Keratinocytenwachstumsmedium)
KGF	Keratinocyte growth factor (Keratinocytenwachstumsfaktor)
LDH	Lactatdehydrogenase
MAS	Modified average score
MMP	Matrixmetalloproteinase
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PDGF	Platelet derived growth factor
PEG	Polyethylenglykol
PG	Proteoglycan
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
REACH	Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals
RT	Raumtemperatur
SD	Standard deviation (Standardabweichung)

SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
SE-Modell	Stroma-Epithel-Modell
SSC	Sidewardscatter (Seitwärtsstreulicht)
SV40	Simian virus
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$ (transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ )
TEER	Trans-epithelial electrical resistance (transepithelialer elektrischer Widerstand)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylenethyldiamin
TNF	Tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UNECE	United Nations Economic Commission for Europe
USEPA	United States Environmental Protection Agency

# **1 EINLEITUNG**

---

# 1 EINLEITUNG

Das menschliche Auge kann mit den verschiedensten Substanzen in Kontakt kommen, wobei die Exposition entweder beabsichtigt ist, wie beim Gebrauch von Kosmetika oder bestimmten Arzneistoffen, oder unbeabsichtigt erfolgt, wie beispielsweise beim Umgang mit Chemikalien. Einige dieser Produkte und Stoffe können nach dem Kontakt mit der Augenoberfläche leichte bis schwere Irritationsreaktionen hervorrufen, die mit objektiven Veränderungen (z.B. lokaler Rötung und Ödembildung) sowie subjektiven Empfindungen (z.B. Juckreiz und Schmerzen) einhergehen und im schlimmsten Fall zum Verlust des Augenlichts führen. In der Entwicklung von ophthalmologischen und kosmetischen Zubereitungen sowie in der toxikologischen Sicherheitsprüfung neuer chemischer Grundstoffe spielt deshalb die Beurteilung des Augenirritations-Potentials eine entscheidende Rolle. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Weiterentwicklung eines neuartigen Toxizitätsmodells zur Vorhersage des Irritationspotentials chemischer Substanzen am Auge.

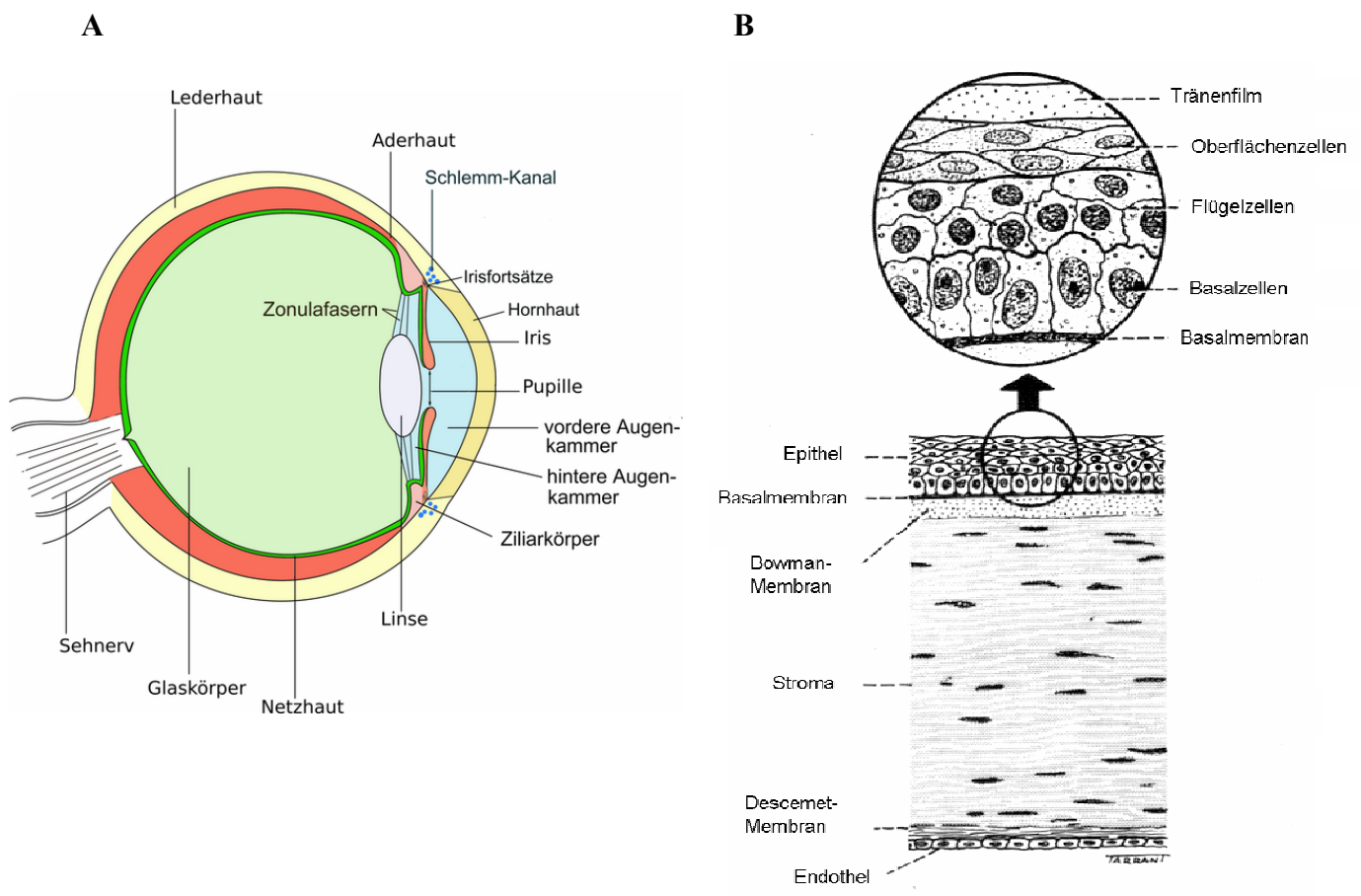
## 1.1 Aufbau und Funktion der humanen Cornea und ihrer Substrukturen

Um die Ergebnisse toxikologischer Studien am Auge verstehen zu können, müssen zunächst einige grundlegende Erkenntnisse zu diesem Organsystem vermittelt werden.

Von toxikologischer Bedeutung für Augenirritations-Studien sind Cornea, Conjunctiva und Iris (Curren und Harbell, 1998). Das toxikologisch bedeutendste Gewebe ist die Cornea (Curren und Harbell, 1998), da ihr gleich zwei wichtige Funktionen zukommen: Die Hornhaut stellt zum einen eine wichtige mechanische und chemische Barriere dar, die den Eintritt von Fremdstoffen in das Augeninnere verhindert und dadurch eine Schutzfunktion auf das intraokulare Gewebe ausübt (Griffith, 2002, Hornof et al., 2005). Zudem bildet die Cornea das wichtigste optische Element des Auges, welches 75% der dioptrischen Leistung erbringt (Griffith, 2002). Die Augenhornhaut ist normalerweise transparent und ermöglicht dadurch einen ungehinderten Lichteintritt in das Auge sowie dessen Fokussierung auf die Retina. Eine corneale Trübung, die beispielsweise durch eine versehentliche Exposition mit stark irritierenden Substanzen hervorgerufen werden kann, schränkt die Passage des Lichtes ein, was die Sehleistung beeinträchtigt oder in schwerwiegenden Fällen zur Erblindung führt

(Curren und Harbell, 1998, Griffith, 2002). Obwohl die Augenlider der Cornea Schutz bieten, ist diese dennoch sehr anfällig für Verletzungen (Curren und Harbell, 1998).

**Anatomie der Cornea.** Die Cornea ist ein klares, avaskuläres Gewebe mit einem Durchmesser von durchschnittlich 12 mm sowie einer Dicke von durchschnittlich 520 µm, welches zirkulär durch den Limbus von der Sklera abgegrenzt ist. Die menschliche Augenhornhaut besteht, wie in Abb. 1 dargestellt, aus drei Gewebeschichten. Die Oberfläche und äußere Barriere zur Tränenflüssigkeit bildet ein geschichtetes Epithel, welches durch die Basalmembran vom collagenösen Stroma getrennt ist. Direkt unterhalb der Basalmembran befindet sich eine azelluläre Stromaschicht, die als Bowman-Membran bezeichnet wird. Ein einlagiges Endothel schirmt das Stroma von der anterioren Augenkammer und vom Kammerwasser ab. Stroma und Endothel werden durch eine spezialisierte, verstärkte Basallamina, die Descemet-Membran, verbunden (Fini, 1999, Hornof et al., 2005).



**Abbildung 1**

**A:** Anatomie des Auges und **B:** Aufbau der Cornea (Kanski, 2003)

**Aufbau und Funktionen des Stromas.** Das Stroma, welches 80 bis 90% des cornealen Gewebes darstellt, besteht hauptsächlich aus hydratisiertem Collagen und ist von Fibroblasten-ähnlichen Zellen, den Keratocyten, durchsetzt. Diese zelluläre Komponente macht jedoch nur 2-3% der Stroma- Masse aus (Griffith, 2002, Hornof et al., 2005, Kanski, 2003). Aufgrund seiner hydrophilen Struktur bildet das Stroma eine Penetrationsbarriere für lipophile Substanzen (Hornof et al., 2005, Kanski, 2003).

Hauptbestandteil des Stromas ist die Extrazelluläre Matrix (EZM), welche überwiegend aus verschiedenen Collagenen, Proteoglycanen und nicht-collagenösen Glycoproteinen/ Glukosaminoglycanen besteht, die miteinander auf spezifische Weise verknüpft sind. Die wichtigste Komponente der EZM sind lamellenförmig angeordnete Collagen-Fibrillen, die alle im gleichen Abstand zueinander liegen und damit die Transparenz der Cornea ermöglichen. Nur in den Rand-Regionen, an den Kontaktstellen zur Descemet-Membran, sind die Collagen-Fibrillen zufällig angeordnet und Bestandteil einer sehr dichten interfibrillären EZM, welche für eine erhöhte Faser-Stabilität in dieser Grenzflächenregion verantwortlich ist. Die Collagen-Fibrillen des humanen Stromas stellen stöchiometrisch genau definierte, heterodimere Komplexe aus Typ I und Typ V-Collagen (70% Typ I, 20% Typ V) dar, was ihnen einen sehr geringen Durchmesser verleiht. Auch Typ VI Collagen konnte im cornealen Stroma nachgewiesen werden sowie dessen Interaktion mit Proteoglycanen und Typ XIV Collagen (Fini, 1999, Griffith, 2002, Hassell et al., 1992, Hirsch et al., 2001).

Keratansulfat-Proteoglycane (-PG) sind die dominierenden Proteoglycane im cornealen Stroma, gefolgt von Dermatansulfat-PG und Chondroitinsulfat-PG (Griffith, 2002). Neben Decorin, Lumican, Keratocan und Osteoglycin sind dies dünne, filamentöse Strukturen, die als Brückenbildner zwischen den Collagen-Fibrillen fungieren, indem sie sich wie Stufen einer Leiter zwischen diese anlagern. Die Funktion der Proteoglycane besteht damit wahrscheinlich in der Regulation des interfibrillären Abstandes durch exakte Positionierung der Collagenfibrillen sowie in der Aufrechterhaltung der Dehnbarkeit und Reißfestigkeit der Fasern. Fibronectin ist ein weiteres Glycoprotein der Stroma-Matrix, welches Bindungsdomänen für Collagene und viele andere Bestandteile der EZM aufweist und grundlegend an zellulären Anhaftungs- und Migrations-Vorgängen, vornehmlich während der embryonalen Entwicklung, beteiligt ist (Griffith, 2002, Hassell et al., 1992, Hirsch et al., 2001).

Zwischen den Collagen-Lamellen des Stromas liegen die Keratocyten, eine Population ruhender, mesenchymaler Zellen mit sehr langsamer Replikation und abgeflachter, stellarer Morphologie. Obgleich diese Zellen in sehr geringer Anzahl im Stroma verteilt sind bilden sie

ein interzelluläres Netzwerk, da sie sich über dendritische Fortsätze, die Pseudopodien, aneinander heften und über Gap Junctions miteinander kommunizieren (Hasty und Hay, 1977). Eine wichtige Aufgabe der Keratocyten besteht in der Synthese der EZM des Stromas. Zudem enthalten sie Proteine, die zur Transparenz der Cornea beitragen, sogenannte „Kristalline“ (Fini, 1999, West-Mays und Dwivedi, 2006). Auf die Rolle der Keratocyten während der cornealen Wundheilung wird später im Text eingegangen.

Neben der regelmäßigen Anordnung der Collagen-Fibrillen stellt die exakte Einstellung und Aufrechterhaltung des Hydratisierungsgrades (75-80% Wasser) des Stromas die wichtigste Voraussetzung für die Transparenz der Cornea dar (Curren und Harbell, 1998). Die Regulierung der Hydratation ist die Aufgabe von zwei aktiven Zell-Lagen, dem Endothel auf der Kammerwasser-Seite der Cornea und dem Epithel, welches die äußere Barriere der Cornea darstellt. Beide Zellschichten wirken synergistisch und verhindern, dass Flüssigkeit ungehindert in die Cornea eindringen kann (Curren und Harbell, 1998).

**Aufbau und Funktionen des Endothels.** Das corneale Endothel ist eine Einzelschicht von abgeflachten, hexagonalen Zellen und stellt eine effektive Barriere zwischen Stroma und Kammerwasser dar (Griffith, 2002). Seine aktiven Ionen- und Flüssigkeits-Transportmechanismen sind von entscheidender Bedeutung für die Hydratation und Nährstoffversorgung der Cornea und damit für die Aufrechterhaltung der cornealen Transparenz (Hornof et al., 2005). Die konstante corneale Hydratation wird durch den sogenannten „pump-leak“-Mechanismus kontrolliert. Demnach strömt aufgrund eines negativen Druckgradienten Kammerwasser, zusammen mit Nährstoffen, durch das Endothel hindurch in das Stroma und wird durch einen aktiven Transportmechanismus des Endothels wieder in die äußere Kammer zurückgepumpt (Baum et al., 1984, Griffith, 2002, O'Neal und Polse, 1985). Erkrankungen oder Traumata, die zu einer Dysbalance des „pump-leak“-Mechanismus führen, können ein corneales Ödem und den Verlust der Transparenz zur Folge haben. Humane Cornea-Endothelzellen haben zudem ein sehr eingeschränktes Zellteilungspotential (Griffith, 2002). Wenn diese Zellen einen cytotoxischen Schaden erleiden, beispielsweise durch starke Irritantien, hat dies meist schwere Konsequenzen, wie z.B. dauerhafte Erblindung (Curren und Harbell, 1998).

**Aufbau und Funktionen des Epithels.** Das corneale Epithel ist ein mehrschichtiges, nicht-keratinisiertes, nicht-kornifiziertes Epithel. Es besteht aus fünf bis sieben Zellschichten und umfasst drei verschiedene Zelltypen (Griffith, 2002, Kanski, 2003). Dazu gehören zuunterst



die Basalzellen, säulenförmige, hochprismatische Epithelzellen, die einen Monolayer bilden und sich über Hemidesmosomen an die Basalmembran anhaften. Diese Basalschicht macht 35-45% der Gesamtdicke des Epithels aus. An die Basalzellschicht schließen sich zwei bis drei Lagen polygonaler „Flügelzellen“ an, die aus ehemaligen Basalzellen hervorgehen und zur Oberfläche hin zunehmend flacher werden. Die an den Tränenfilm angrenzende Schicht besteht aus zwei bis drei Zelllagen flacher Oberflächenzellen, den Apikal- oder Schuppenzellen, welche dicht mit Mikrovilli besetzt sind (Kanski, 2003). Diese Oberflächenzellen haften über Desmosomen aneinander und kommunizieren über Tight Junctions. Die Tight Junctions verleihen dem Epithel die wichtigste Barrierefunktion innerhalb der Cornea. Es stellt den limitierenden Faktor für die transcorneale Permeation hydrophiler Stoffe dar, die weder durch das Stroma noch durch das Endothel reguliert werden kann (Hornof et al., 2005). Zusätzlich zur Aufrechterhaltung der cornealen Hydratation verhindert das Epithel als physikalische Barriere den Eintritt von Fremdstoffen in das Auge (Curren und Harbell, 1998). Das Epithel kann sich nach einer oberflächlichen Verletzung durch Wiederaufnahme der Zellteilung oder durch zelluläre Migration vollständig und ohne Narbenbildung regenerieren (Curren und Harbell, 1998, Kanski, 2003).

## **1.2 Die corneale Wundheilung unter besonderer Berücksichtigung der Phänotypen im Stroma**

Bei einer Verletzung der Cornea kommt es zunächst innerhalb weniger Stunden zum programmierten Zelltod einer Keratocyten-Subpopulation im Stroma. Eventuell sind auch nekrotische Prozesse am initialen Verlust der Zellen in den oberen Stroma-Schichten beteiligt (Wilson et al., 1996). Die Apoptose der Keratocyten wird wahrscheinlich durch Cytokine wie IL-1 und TNF $\alpha$ , die vom geschädigten Epithel sezerniert werden, induziert (Wilson et al., 1996). Laut Fini und Stramer dient der programmierte Zelltod dem Schutz der Cornea vor unerwünschten Erneuerungs- oder Reparaturprozessen, welche Veränderungen in der Gewebestruktur und damit eine Beeinträchtigung der Transparenz zur Folge hätten, indem die daran beteiligten Zellen entfernt werden (Fini und Stramer, 2005).

Das Ausmaß, insbesondere die Tiefe der initialen Verletzung, determiniert die postapoptischen Reparaturmechanismen der Keratocyten im Stroma (West-Mays und Dwivedi, 2006) und stellt damit die Weichen für eine rein regenerative oder eine fibrotische, vernarbende Wundheilungsreaktion (Jester et al., 1998a).

**Regenerative Wundheilung.** Bei einer nur oberflächlichen Verletzung des Epithels folgt auf die Apoptose in den subepithelialen Schichten eine Repopulation des Stromas mit Keratocyten, ohne nachfolgende Trübung der Cornea (Moller-Pedersen et al., 1998, West-Mays und Dwivedi, 2006). Innerhalb der ersten 12 bis 24 Stunden beginnen dabei die Keratocyten, die der apoptotische Stroma-Region benachbart sind, zu proliferieren und die toten Zellen zu ersetzen (West-Mays und Dwivedi, 2006). Die für die Wiederaufnahme der Keratocyten-Proliferation verantwortlichen Faktoren sind bislang unbekannt. Eventuell spielt PDGF dabei eine Rolle, welches in der Basalmembran und in der Tränenflüssigkeit nachgewiesen wurde (Wilson et al., 2001). Nach einigen Tagen gehen Apoptose, Nekrose und Mitose zurück und ein relativ ruhender Zellstatus wird wiederhergestellt. Danach treten keine weiteren Veränderungen in den Keratocyten auf (Fini und Stramer, 2005, West-Mays und Dwivedi, 2006, Wilson et al., 2003, Zieske et al., 2001).

Ebenfalls nach 12 bis 24 Stunden ist eine Infiltration inflammatorischer Zellen ins Stroma zu beobachten. Gleichzeitig findet die Regeneration des Epithels durch proliferative und migratorische Prozesse statt. Intakte Epithelzellen wandern entweder zum Wundrand, um den Defekt zu schließen oder sie teilen sich, um neue Zellen zur Verfügung zu stellen. An der Regulation dieser Prozesse sind wahrscheinlich Cytokine sowie Wachstumsfaktoren wie EGF und HGF aus den Tränendrüsen beteiligt (Wilson et al., 1999, Zieske et al., 2000)

**Fibrotische Wundheilung.** Nach tiefgehenden Verletzungen der Cornea folgt auf die anfängliche Apoptose der Keratocyten die Umwandlung einer Subpopulation übriggebliebener Stroma-Zellen in einen aktivierten Reparatur-Phänotyp. Ungefähr sechs Stunden nach der Verletzung verlieren diese Keratocyten ihre ruhenden Eigenschaften, treten in den Zellzyklus ein und migrieren nach und nach zum Ort der Verletzung. Ihre Größe und ihr Organellen-Gehalt nehmen zu und sie beginnen, die morphologischen Charakteristika von Fibroblasten anzunehmen. Dazu zählen eine gestreckte, spindelförmige Gestalt, multiple Nucleoli und ein Verlust an cytoplasmatischen Granula (Fini und Stramer, 2005) sowie die Kondensation des intrazellulären Aktins zu parallel angeordneten Stressfasern, welche sich über fokalen Kontakte eng mit der EZM verbinden (Jester et al., 1994, Jester und Ho-Chang, 2003). Neben dem Verlust der für ruhende Keratocyten typischen dendritischen Morphologie sowie der interzellulär verbindenden Pseudopodien, kommt es zu Veränderungen der Genexpression, zum Beispiel einer verstärkten Synthese von Fibronectin und Matrixmetalloproteinasen (MMP), den Collagenasen. Die gesteigerte MMP-Expression wird für den folgenden strukturellen Umbau der EZM verantwortlich gemacht (Fini und Stramer,

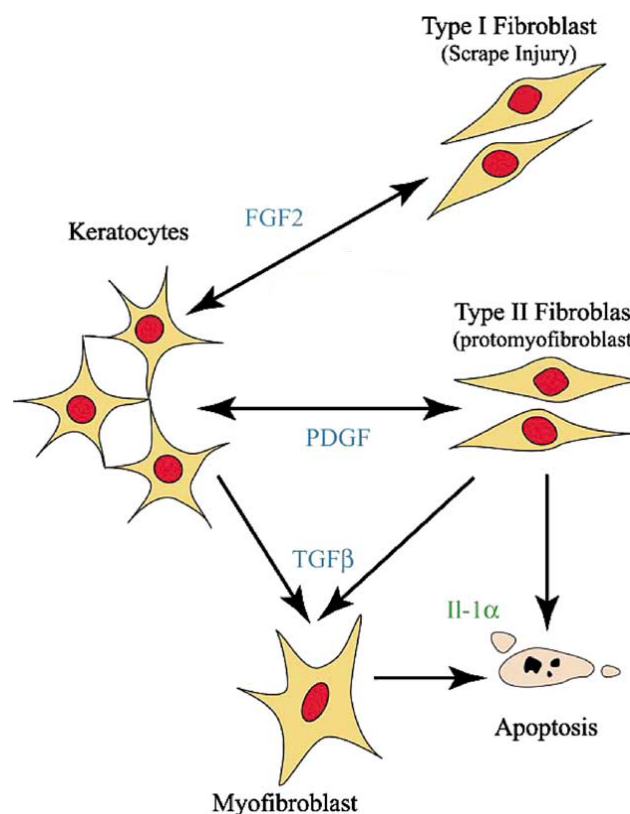
2005). Zudem ist die zelluläre Aktivierung mit einem Verlust der keratocytären Kristalline verbunden, was die Transparenz der Cornea beeinträchtigt (Jester et al., 1999b).

Die Differenzierung cornealer Keratocyten zum fibroblastoiden Phänotyp sowie die Steigerung der MMP-Expression werden vermutlich durch IL-1 $\alpha$  induziert, welches vom geschädigten Epithel exprimiert wird und nach einer Verletzung der Basalmembran in das Stroma abgegeben werden kann. Mit der Zeit erlangen die aktivierten Keratocyten die Kompetenz zur autokrinen IL-1 $\alpha$ -Synthese, was von West-Mays et al. als „IL-1 $\alpha$  feedback loop“ beschrieben wurde. Diese autokrine Komponente ermöglicht den Keratocyten bzw. Fibroblasten ein andauerndes Remodeling der EZM unabhängig vom epithelial sezernierten IL-1 $\alpha$  auch nach der Reepithelialisierung und einer Wiederherstellung der Basalmembran (West-Mays et al., 1995, West-Mays und Dwivedi, 2006).

Jester et al. postulieren die Beteiligung von mindestens zwei unterschiedlichen fibroblastoiden Phänotypen an der cornealen Wundheilung. Sogenannte Typ I Fibroblasten, die in vitro durch Wachstumsfaktoren wie FGF2 generiert werden können, sollen an nicht-fibrotischen Wundheilungsreaktionen beteiligt sein, wie sie nach einer oberflächlichen Verletzung des Epithels auftreten. Durch Synthese einer transparenten EZM unterstützen Typ I Fibroblasten vermutlich eine Regeneration des Gewebes ohne Trübung der Cornea (Jester und Ho-Chang, 2003, Moller-Pedersen et al., 1998). PDGF-modulierte Typ II Fibroblasten, sogenannte „Protomyofibroblasten“, stellen hingegen direkte Vorläufer des myofibroblastoiden Phänotyps dar. Sie sind wahrscheinlich an der fibrotischen Wundheilungsreaktion beteiligt, welche nach tiefgehenden Verletzungen des cornealen Gewebes auftritt und zu einer starken Trübung der Cornea sowie einer signifikanten Wundkontraktion führt (Jester et al., 2002, Jester und Ho-Chang, 2003).

Bei fortschreitender Wundheilung differenzieren einige Stroma-Zellen zu Myofibroblasten, einem dritten Phänotyp mit strukturellen und biologischen Eigenschaften, die zwischen denen von Fibroblasten und glattmuskulären Zellen liegen. Diese zuerst im Granulationsgewebe der Haut entdeckten Zellen entwickeln die typischen ultrastrukturellen und biochemischen Eigenschaften von Zellen der glatten Muskulatur, wie die Ausbildung von Mikrofilament-Bündeln und die Expression von intrazellulärem  $\alpha$ -smooth-muscle-Aktin ( $\alpha$ -SMA), einer Aktin-Isoform, die überwiegend im glatten Muskel vorkommt (Desmouliere et al., 1993, Desmouliere et al., 2005, Gabbiani et al., 1971, Gabbiani et al., 1972). Nur Myofibroblasten sind durch Bildung von  $\alpha$ -SMA charakterisiert, welches wahrscheinlich zu den kontraktile Eigenschaften dieses Phänotyps beiträgt (Jester et al., 1994, Jester et al., 1995c). Zudem sind myofibroblastoide Zellen für gewöhnlich größer als andere Fibroblasten und beinhalten mehr

Stressfasern und Fokale Adhäsionen (Fini und Stramer, 2005). Myofibroblasten werden mit einem hochgradig fibrotischen Wundheilungs-Phänotyp in Verbindung gebracht, der die Ablagerung von Reparaturtyp-EZM (Fibronectin), signifikante Hyperzellularität sowie starke Kontraktion des Wundheilungsgewebes und deshalb eine Trübung des Cornea-Gewebes verursacht (Fini, 1999, Fini und Stramer, 2005). Sobald die Ablagerung von Reparatursubstanz ihren Höhepunkt erreicht, verschwindet der fibrotische Phänotyp, vermutlich durch Apoptose oder Dedifferenzierung. Es kommt zu einem Rückgang von zunächst Myofibroblasten-, dann Fibroblasten-Markern. Auch die Zellzahl geht auf ein physiologisches Niveau zurück (Fini, 1999, Fini und Stramer, 2005, Jester et al., 2003). Myofibroblasten stellen dabei einen vollends reversiblen Phänotyp dar. Reparatur-Fibroblasten hingegen kehren mit der Zeit in einen scheinbar dedifferenzierten Zustand zurück und nehmen eine keratocytäre Morphologie an, biochemisch gesehen bleiben sie jedoch immer Fibroblasten (Fini, 1999, Fini und Stramer, 2005, Jester und Ho-Chang, 2003, Maltseva et al., 2001).



**Abbildung 2**

Schema der Keratocytendifferenzierung zu verschiedenen Phänotypen während der cornealen Wundheilung (aus Jester und Ho-Chang, 2003)

**Interaktion zwischen Epithel und Stroma während der cornealen Wundheilung.** Eine Schlüsselrolle für den Ablauf einer fibrotischen, zur Trübung führenden oder nicht-fibrotischen, rein regenerativen Wundheilung der Cornea spielt die Interaktion zwischen Epithel und Stroma. Die Konversion der Keratocyten und Fibroblasten zu Myofibroblasten wird ausschließlich durch TGF $\beta$  vermittelt. Dieser Wachstumsfaktor wird wiederum vom Epithel konstitutiv exprimiert, was aber nicht automatisch zu einer Differenzierung der Stromazellen führt, solange die Basalmembran des Epithels intakt ist (Fini und Stramer, 2005, Nishida et al., 1994, Nishida et al., 1995). Eine Abtragung des Epithels von der darunterliegenden Basalmembran führt, wie bereits beschrieben, in den darunterliegenden Stromazellen zur Apoptose und ermöglicht die einfache Erneuerung dieser Zellen durch Mitose ohne Anzeichen einer Hyperzellularität oder Fibronectin-Ablagerung. Nur wenn die epitheliale Verletzung von einer Penetration der Basalmembran begleitet ist, wird die fibrotische Wundheilungs-Antwort initiiert (Fini und Stramer, 2005, Nakamura, 2003, West-Mays und Dwivedi, 2006). Die epitheliale Basalmembran hat damit höchstwahrscheinlich eine primäre Kontrollfunktion für die Abgabe von TGF $\beta$  ins Stroma und agiert dadurch laut Fini et al. als sogenannter „Fibrose-Schalter“ („fibrotic switch“), der die Weichen für den regenerativen oder den fibrotischen Charakter der cornealen Wundheilungsreaktion stellt (Fini und Stramer, 2005). Die Tiefe der initialen Schädigung der Cornea, beispielsweise durch chemische Substanzen, spielt demnach eine entscheidende Rolle für die nachfolgenden Wundheilungsreaktionen und die Reversibilität der Verletzung.

### 1.3 Untersuchungsmethoden zur Vorhersage der okularen Toxizität

**Definition der Augen-Irritation und Korrosion.** Augenirritation ist die Konstellation aus einer reversiblen, strukturellen und inflammatorischen Beeinträchtigung der okularen Funktion, wogegen Augen-Korrosion eine irreversible Schädigung des okularen Gewebes bedeutet, die durch toxische Substanzen ausgelöst wird (Wilhelmus, 2001). In aktuellen Test-Richtlinien der OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) und USEPA (United States Environmental Protection Agency) ist die Augenirritation als „Induktion einer okularen Veränderung, die infolge der Applikation einer Testsubstanz auf die anteriore Oberfläche des Auges auftritt und die innerhalb von 21 Tagen voll reversibel ist“ definiert (OECD Test Guideline 405: „Eye Irritation“; (OECD, 1987)). Diese Definition entspricht der EU-Gefahrstoff-Klassifikation R36 für Substanzen mit moderatem

Augenirritations-Potential (R36: „reizt die Augen“; Richtlinie 67/548/EWG). Die OECD-Richtlinie 405 definiert zudem die Augenkorrosion als „Induktion einer okularen Gewebeschädigung oder eine schwerwiegende physikalische Beeinträchtigung des Sehvermögens als Folge der Applikation einer Testsubstanz auf die anteriore Oberfläche des Auges, welche innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht voll reversibel ist“ (OECD, 1987). Dies entspricht der EU-Klassifikation R41 für stark irritierende und korrosiv wirkende Chemikalien (R41: „Gefahr ernster Augenschäden“; Richtlinie 67/548/EWG; de Silva et al., 1997, Eskes et al., 2005, Huggins, 2003).

### **1.3.1 Der Kaninchenaugen-Irritationstest nach Draize**

Der konventionelle Test zur Untersuchung des Irritations- und Korrosions-Potentials von chemischen Substanzen ist der Kaninchenaugen-Irritationstest, der von Draize et al. 1944 entwickelt wurde (Draize et al., 1944). Der Draize-Test findet bis heute als internationaler Standard-Assay zur Untersuchung der akuten okularen Toxizität Verwendung und ist in der OECD Richtlinie 405 beschrieben (Eskes et al., 2005, OECD, 2002, Van Goethem et al., 2006). Die Methode basiert auf der Applikation der Testsubstanz in den Bindehautsack des Kaninchenauges und der nachfolgenden visuellen Evaluation der Schädigung von Cornea, Iris und Conjunctiva. Die verletzungsbedingten Veränderungen des Auges werden nach einer Stunde, 24, 48 und 72 Stunden sowie nach sieben Tagen aufgezeichnet. Die Exposition des Kaninchenauges gegenüber einer fremden Substanz kann Reaktionen hervorrufen, die von einer leichten Rötung der Conjunctiva, bis hin zu einer schwerwiegenden Verletzung der Cornea mit dem Verlust des Epithels, einer Zerstörung des darunterliegenden Stromas und dem Verlust des Sehvermögens reichen können (Vinardell und Mitjans, 2008). Art, Lokalisation und Schweregrad der Verletzungsreaktion werden durch numerische Scores klassifiziert und gewichtet (Wilhelmus, 2001), wobei die Cornea aufgrund ihrer vitalen Rolle für die Sehfähigkeit stärker in die Bewertung eingeht als Iris und Conjunctiva (Vinardell und Mitjans, 2008). Heute existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Systeme für die Klassifizierung der Schädigung des cornealen, iridialen und conjunctivalen Kompartiments in gesetzlichen Richtlinien (Eskes et al., 2005).

**Nachteile des Draize-Tests.** Seit den 60er Jahren wird der Draize-Test in zunehmendem Ausmaß aufgrund seiner schlechten Reproduzierbarkeit, der mangelnden Übertragbarkeit seiner Ergebnisse auf den Menschen und wegen der Verwendung lebender Tiere kritisiert

(Maurer et al., 2002). Für die Einschätzung des Irritations-Potentials chemischer Substanzen am Menschen ist die Relevanz der Augenirritations-Daten aus dem Tierversuch fraglich, da gravierende morphologische und biochemische Unterschiede zwischen dem menschlichen und dem Kaninchen-Auge bestehen (Curren und Harbell, 1998, Hornof et al., 2005, Huggins, 2003). Entscheidende Unterschiede zum Menschen bestehen beispielweise im Vorhandensein eines dritten, sich lateral über das Auge bewegenden Augenlids beim Kaninchen, in der niedrigen Blinzelrate des Tieres sowie seiner relativ geringe Produktion von Tränenflüssigkeit, was sich auf die Kinetik der Substanz-Drainage auswirkt. Morphologisch unterscheidet sich das Kaninchenauge zudem durch eine, im Vergleich zur Conjunctiva, größere corneale Oberfläche sowie durch einen größeren Bindehautsack vom menschlichen Auge. Dadurch kann am Kaninchenauge weit mehr Testmaterial appliziert werden, als es beim Menschen durch versehentliche Exposition möglich ist. Nicht zuletzt aufgrund der geringeren Schichtdicke seiner Cornea stellt das Kaninchen ein übermäßig sensitives Prädiktionsmodell für den Menschen dar (Curren und Harbell, 1998, Hornof et al., 2005, Vinardell und Mitjans, 2008).

Ein weiterer Nachteil des Draize-Tests ist dessen Variablenvielfalt, wodurch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, insbesondere für moderat irritierende Substanzen, beeinträchtigt wird. Dies betrifft sowohl die interindividuelle Variabilität zwischen Versuchstieren derselben Spezies als auch die Variabilität der Ergebnisse verschiedener Laboratorien oder verschiedener Prüfer (Eskes et al., 2005, Vinardell und Mitjans, 2008).

Da der Draize-Test den Tieren beträchtliches Unbehagen und Schmerzen bereiten kann, steht dieser nicht zuletzt aufgrund ethischer Aspekte stark unter Kritik (Eskes et al., 2005, Van Goethem et al., 2006).

### **1.3.2 Beschränkung des Einsatzes von Tierversuchen aufgrund der neuen EU-Gesetzgebung**

**Das Prinzip der „3 R“.** Im Jahre 1959 publizierten William Russell und Rex Burch "The Principles of Humane Experimental Technique", das die Forderung nach einem Ersatz von Tierversuchen durch alternative Testmethoden („Replacement“), einer Reduktion der Anzahl von Versuchstieren pro Experiment („Reduction“) sowie einer Verbesserung der Versuchsbedingungen enthält, um das Leid und den Schmerz der Versuchstiere auf ein Minimum zu beschränken („Refinement“; Russell und Burch, 1959). Das Leitbild der „3 R“ (Replacement, Reduction, Refinement) stellt seither einen wesentlichen Grundsatz aller

europäischen Forschungs-Leitlinien dar, die sich mit dem Gebrauch von Tieren in wissenschaftlichen Testverfahren und Experimenten befassen (Flecknell, 2002) und ging außerdem in die neue europäische Gesetzgebung mit ein.

**Richtlinie 86/609/EEC.** In der Europäischen Union ist der Schutz von Versuchstieren in der Richtlinie 86/609/EEC verankert mit dem Ziel, die Anzahl von Tieren, die für experimentelle oder anderen wissenschaftliche Zwecke verwendet werden, zu reduzieren („Replacement“). Die Richtlinie besagt, dass ein Tierversuch nicht durchgeführt werden darf, wenn eine Alternativmethode existiert (EEC, 1996). Auch die Umsetzung des „Refinement“- und „Reduction“-Prinzips ist in dieser Richtlinie gesetzlich verankert (Langley et al., 1999)

**Änderung der Kosmetikrichtlinie 76/768/EEC.** Die Forderung der Tierschutzorganisationen nach dem Einsatz alternativer Testmethoden für die Augenirritations-Testung sowie das wachsende öffentliche Interesse zwangen den Gesetzgeber zu weiterem Handeln, beispielsweise in Form der siebten Änderung der Kosmetikrichtlinie 76/768/EEC (Directive 2003/15/EC; EEC, 2003). Die europäische Richtlinie verbietet seit dem September 2004 Tierversuche an kosmetischen Endprodukten. Der Ministerrat bestimmte zudem ab 2009 ein Verbot von Tierversuchen für Kosmetikinhaltstoffe und ein Vermarktungsverbot von Kosmetikprodukten und deren Inhaltsstoffen, die außerhalb der EU an Tieren getestet wurden, sofern dafür in der EU validierte und anerkannte Alternativmethoden existieren.

**REACH.** Des Weiteren beschränkt die neue EU-Chemikaliengesetzgebung den Einsatz von Tierversuchen in Industrie und Wissenschaft insbesondere durch die im Juni 2007 in Kraft getretene Verordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals). Die Hauptziele von REACH sind neben der Verbesserung des Schutzes der menschlichen Gesundheit und der Umwelt vor chemikalienbedingten Risiken, der Förderung des freien Verkehrs chemischer Stoffe im Binnenmarkt und der Verbesserung von Wettbewerbsfähigkeit und Innovation innerhalb der EU auch die Förderung alternativer Testmethoden, um Tierversuche einzuschränken (EEC, 2006). Die Entwicklung der neuen Chemikalienverordnung wurde von dem bis dahin nicht hinreichend erfolgreichen Vorgehen beim Risikomanagement zahlreicher Chemikalien, insbesondere durch Informationslücken auf dem Gebiet der chemischen Altstoffe getrieben. Als „Altstoffe“ werden Chemikalien bezeichnet, die vor September 1981 in Verkehr gebracht wurden und für die bis dahin, aufgrund fehlender gesetzlicher Prüfvorschriften, keine umfassende Risikobewertung vorlag. REACH sieht eine Nachregistrierung, Risikobewertung und Zulassung dieser Stoffe vor. Die Risikobeurteilung von Chemikalien, die in der Vergangenheit nicht oder nicht ausreichend



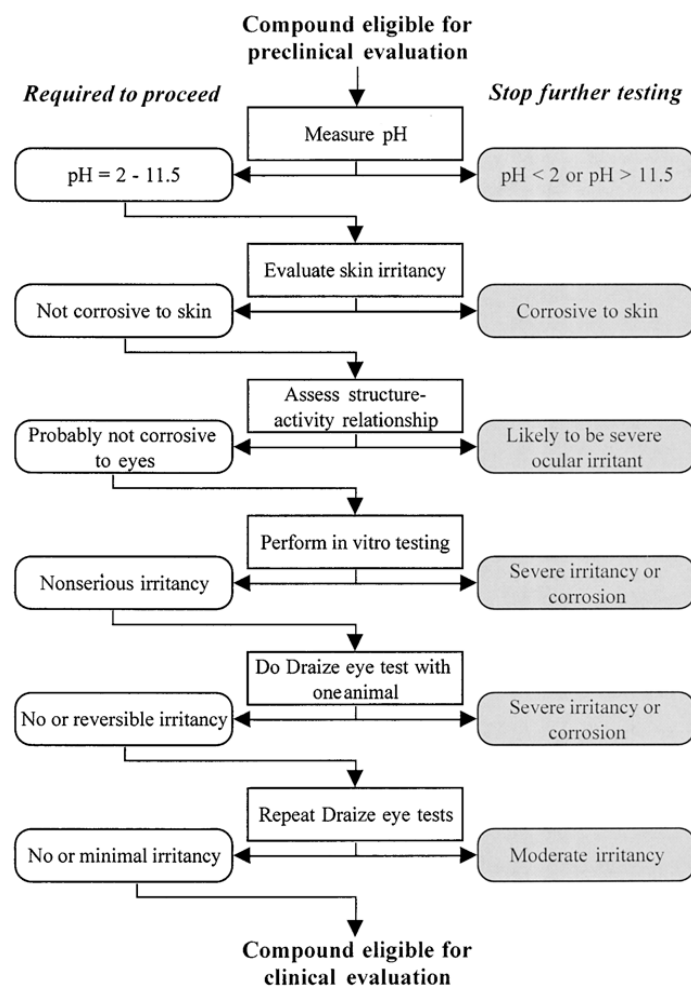
getestet wurden, erfordert jedoch zwangsläufig eine Vielzahl retrospektiver toxikologischer Untersuchungen. Die EU-Kommission sieht vor, ca. 300000 Chemikalien in den nächsten 15 Jahren nachträglich zu testen. Da für die meisten Toxizitätsbereiche keine ausreichend validierten Alternativmethoden zur Verfügung stehen, könnte die REACH-Verordnung, die auch zum Schutz der Versuchstiere erlassen wurde, gleichzeitig zu einem dramatischen Anstieg der Tierversuchs-Zahlen führen (Hofer et al., 2004). Folglich hat die Entwicklung und Evaluierung neuer in vitro Methoden für die Sicherheitsprüfung chemischer Substanzen in Industrie und Wissenschaft höchste Priorität.

**Abgestufte Teststrategie für die Augenirritations-Testung im Rahmen von REACH.** Die Risikobeurteilung von Stoffen umfasst unter anderem deren potentiell irritierenden und korrosiven Eigenschaften, die vor allem Haut und Auge betreffen. Zahlreiche Studien wurden bis heute durchgeführt, um eine Teststrategie zu entwickeln, welche den Ersatz des Draize-Tests in der okularen und dermalen Sicherheitsprüfung ermöglicht. Während einige Alternativmethoden zur Beurteilung der dermalen Korrosivität und Phototoxizität regulatorisch anerkannt und in der Council Directive 67/548/EEC (Annex V) verankert sind - wie der 3T3 NRU Phototoxizitäts-Tests (OECD Test Guideline 432; EEC, 2004b, OECD, 2004b), der EpiSkin<sup>TM</sup>- und EpiDerm<sup>TM</sup>-Haut-Korrosivitäts-Assay (OECD Test Guideline 431; EEC, 2004a, OECD, 2004a) sowie der Rattenhaut-TER-Korrosivitäts-Test (OECD Test Guideline 430; EEC, 2004a, OECD, 2004c) - gilt dies bis heute nicht bezüglich der Haut- und Augen-Irritation. Eine alleinige Alternative zum Draize-Test fehlt (ECVAM, 2007, Spielmann und Liebsch, 2001, Vinardell und Mitjans, 2008, Wilhelmus, 2001).

Um im Sinne der „3 R“ die Anzahl der Versuchstiere zu reduzieren und das Leid der Tiere auf ein Mindestmaß zu reduzieren sieht die aktuelle OECD-Richtlinie 405 zur Testung des akuten Augenirritations- und Korrosionspotentials chemischer Substanzen eine abgestufte Teststrategie vor, worin der Draize-Test lediglich den letzten Schritt einer neun-stufigen Untersuchungskaskade darstellt (OECD, 1987). Der Test am lebenden Kaninchen darf im Rahmen dieser Teststrategie nicht durchgeführt werden, wenn aufgrund der Daten aus ex vivo- und in vitro-Untersuchungen oder durch Extrapolation der pH-Werte mit schweren Läsionen zu rechnen ist (Abb. 3). An erster Stelle dieses Stufenplans steht die Einordnung der chemischen Verbindungen anhand einer Literatur-Recherche, welche die physikochemischen und toxikologischen Daten verwandter Substanzen einschließt. Diese Informationen sollen zudem zur Vorhersage Substanzgruppen-spezifischer Struktur-Wirkungs-Beziehungen genutzt werden, welche die zweite Stufe der Teststrategie darstellt. An dritter Stelle steht die

Einschätzung der physikochemischen Substanzeigenschaften und der chemischen Reaktivität durch Messung des pH-Werts. Die folgenden Schritte des Stufenplans umfassen eine in vitro- und ex-vivo Test-Batterie, welche nach jedem Untersuchungs-Schritt eine Bedarfs-Abschätzung für weitere Tests vorsieht. Nur wenn die Ergebnisse all dieser Versuchsreihen negativ sind, muss eine in vivo Untersuchung am Kaninchenauge vorgenommen werden, um mild und moderat irritierende Substanzen zu klassifizieren (de Silva et al., 1997, Eskes et al., 2005, Hofer et al., 2004, Huggins, 2003, OECD, 2002, Wilhelmus, 2001).

Obleich demnach Untersuchungen zur schweren, irreversiblen okularen Schädigung (Korrosion) bereits routinemäßig anhand alternativer, teilweise validierter in vitro Testsysteme durchgeführt werden können, existiert keine in vitro Methode für die Vorhersage des moderaten bis leichten Augenirritations-Potentials chemischer Substanzen (Hofer et al., 2004). Eine neue in vitro Methode muss entwickelt werden, um diese Lücke zu schließen.



**Abbildung 3**

Vereinfachter Stufenplan für die okulare Toxizitätstestung unter Berücksichtigung der „3 R“ (Wilhelmus, 2001)

### 1.3.3 Alternativmethoden zur Vorhersage der okularen Toxizität

Die bestehenden Alternativmethoden für die Augenirritations-Testung umfassen ex vivo-Assays und organotypische Toxizitäts-Modelle, Gewebe- und Zellkultursysteme sowie physikochemische Tests. Auf Letztere soll im Folgenden jedoch nicht eingegangen werden.

**Ex vivo Modelle und organotypische Methoden.** Zu den ex vivo Augenirritations-Tests zählt der Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP)-Assay an der isolierten Rinder-Cornea (Gautheron et al., 1992), der Isolated Rabbit Eye (IRE)-Test (Burton, 1972, Jones et al., 2001) sowie der Isolated Chicken Eye-Test (ICE) (Prinsen und Koeter, 1993, Prinsen, 1996), an isolierten Kaninchen- und Hühneraugen. Ein Beispiel für eine organotypische Alternativmethode ist der HET-CAM Test (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane) an der Chorioallantois-Membran (CAM) des bebrüteten Hühnereis. Diese von Blutgefäßen durchzogene, schmerzempfindliche Membran stellt ein Modell zur Untersuchung des toxischen Effekts von Substanzen auf die Conjunctiva des Auges dar (Luepke, 1985). Testsubstanzen werden auf die CAM aufgebracht und die nachfolgenden Reaktionen wie morphologische Gefäßveränderungen, Einblutungen oder Vasoaktivität beobachtet. Die Untersuchungen finden am neunten bzw. zehnten Tag der Bebrütung, d.h. vor dem Schluss des Neuralrohres statt. Da der Embryo in diesem Stadium noch kein Schmerzempfinden entwickelt hat, wird der HET-CAM Test nicht als Tierversuch eingestuft (Eskes et al., 2005). Obwohl noch nicht endgültig validiert, wurden zunächst alle vier organotypischen Modelle von verschiedenen Europäischen Aufsichtsbehörden, auch in Deutschland, im Rahmen abgestufter Teststrategien zur Identifizierung und Klassifizierung sehr stark irritierender Substanzen, entsprechend der EU Klassifikation R41 („severely irritating to the eye“/ „Gefahr ernster Augenschäden“) anerkannt (Eskes et al., 2005). Auf Grundlage einer retrospektiven ICCVAM Validierungs-Studie empfiehlt die Europäische Kommission/ ECVAM/ ESAC seit April 2007 jedoch nur noch den BCOP-Test sowie den ICE-Test zur Identifizierung potentiell korrosiver und schwer irritierender Substanzen im Rahmen einer abgestuften Teststrategie (ECVAM, 2007).

Während die Ergebnisse der soeben genannten Alternativmethoden für stark irritierende Substanzen gut mit den in vivo Daten aus dem Draize-Test korrelieren, sind sie wenig geeignet, mild irritierende Stoffe, entsprechend der EU Klassifikation R36, zu identifizieren. Zur Zeit befinden sich acht weitere in vitro Modelle in der Evaluierung durch das ECVAM, die den Test am lebenden Kaninchen vollständig ersetzen sollen (Curren und Harbell, 1998, Debbasch et al., 2005, ECVAM, 2007, Eskes et al., 2005).

**Zellkulturmodelle der Cornea.** Eine zweite Gruppe alternativer Augenirritations-Modelle bilden rekonstruierte Zellkulturmodelle der Cornea. Der Augenirritations-Score des Draize-Tests leitet sich zu beinahe 80% von cornealen Effekten ab (Xu et al., 2000). Somit erscheinen für die Vorhersage der Augenirritation insbesondere solche in vitro Modelle geeignet, welche die morphologische Struktur und Toxizitätsantwort der Cornea nachempfinden (Doucet et al., 2006). Diese sind neben diversen Monolayerkulturen epithelialer Zellen, dreidimensionale Gewebemodelle des cornealen Epithels sowie sogenannte „full-thickness“- Modelle, die den komplexen, mehrschichtigen Aufbau der Cornea nachbilden. Im Gegensatz zu ex vivo Modellen stellen solche Zellkulturmodelle hochdefinierte Systeme dar, in denen einzelne Parameter und Versuchsbedingungen gezielt variiert werden können. Die an rekonstruierten Geweben gewonnenen Resultate sind zudem meist besser reproduzierbar als solche von ex vivo-Studien mit exzidiertem tierischem Gewebe, da weniger interindividuelle Variationen auftreten. Hinzu kommt, dass sich bei Verwendung humaner Zelllinien speziesspezifische Übertragbarkeitsprobleme vermeiden lassen (Hornof et al., 2005).

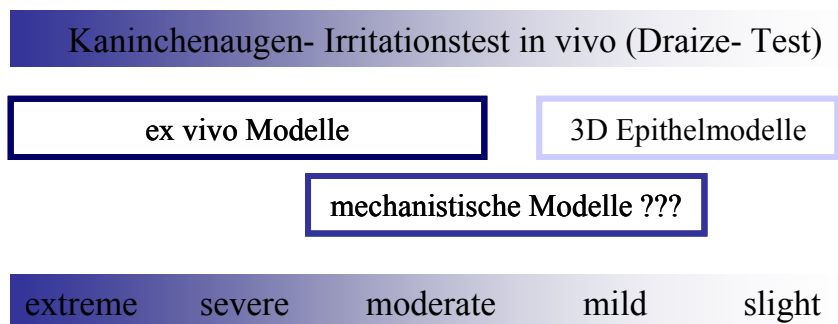
**Dreidimensionale Epithelmodelle.** Derzeit existieren drei kommerziell erhältliche Zellkulturmodelle des cornealen Epithels für die Untersuchung der in vitro-Toxizität verschiedenster chemischer Substanzen und kosmetischer Inhaltsstoffe am Auge. Dazu gehören das EpiOcular<sup>TM</sup> Modell der MatTek Corporation (Ashland, MS, USA), das HCE<sup>TM</sup> Modell der Firma SkinEthik (Nice, Frankreich) und das Clonetics Human Epithelial Model (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, USA). Zudem existiert das Firmen-interne HCE-T Modell von Gillette (Gillette, Maryland, USA).

Mit Ausnahme des EpiOcular<sup>TM</sup> Modells, welches aus primären Humanhaut-Keratinocyten rekonstruiert wird, bestehen diese Modelle aus immortalisierten humanen Epithelzellen, die durch Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze in Zellkultureinsätzen ein mehrlagiges, nicht-verhornendes Epithel ausbilden, welches morphologisch der cornealen Barriere des menschlichen Auges ähnelt. Als Endpunkte für die Augenirritations-Testung werden dabei die MTT-Metabolisierungskapazität, die LDH- oder Cytokin-Freisetzung sowie Veränderungen der Genexpression, Fluorescein-Permeabilität oder Histologie herangezogen.

Prävalidierungsstudien zur Eignung des SkinEthik HCE<sup>TM</sup> Modells zur Vorhersage des Augenirritations-Potentials chemischer Substanzen zeigten eine gute Übereinstimmung zwischen den in vitro Ergebnissen und den Toxizitätsdaten aus dem Draize-Test (Doucet et al., 2006, Van Goethem et al., 2006). Das EpiOcular<sup>TM</sup> Modell und das Gillette HCE-T

Modell wurden bereits formellen Validierungsstudien zur Vorhersage des Augenirritations-Potentials verschiedener Tenside unterzogen (Eskes et al., 2005). Beide Epithelmodelle zeigten sich geeignet für die Abstufungen des Irritationspotentials im Bereich der moderaten bis sehr milden Augenirritation. Insbesondere ein "sub-Draize-mildness- Testing", also eine Evaluierung des Augenirritations-Potentials ultra-milder Produkte -"mild, milder, and mildest"- ist anhand dieser Modelle möglich. Bislang ist jedoch keines dieser Epithelmodelle von ECVAM validiert (Debbasch et al., 2005, Doucet et al., 2006, Eskes et al., 2005, Van Goethem et al., 2006). Ein weiteres dreidimensionales Epithelmodell wurde von Osborne et al. als „Tissue Equivalent-Assay“ beschrieben, welcher die Untersuchung okularer Irritationsreaktionen an einem Gewebemodell aus kokultivierten humanen Epithelzellen und Fibroblasten der Haut vorsieht (Osborne et al., 1995).

In der Regel führt die Verwendung der dreidimensionalen Epithelmodelle tendenziell zu einer Überbewertung des toxischen Potentials vieler Substanzen (Eskes et al., 2005). Obgleich die genannten rekonstruierten Epithelmodelle für die Einstufung im Bereich des leichten Augenirritations-Potentials geeignet sind, ist fraglich, ob diese Testsysteme auch toxische Reaktionen im Bereich der schweren Augenirritation differenzieren können, da diese auf Veränderungen des Stroma-Kompartiments basieren (Eskes et al., 2005, Maurer et al., 2002). Somit existiert bislang kein in vitro Modell, das die Lücke zwischen der milden und der moderaten bis mäßig starken Augenirritation schließen kann (Abb. 4).



**Abbildung 4**

Abstufungen des Schweregrades okularer Irritationsreaktionen und mögliche Strategien zur Identifizierung

**Mechanistische Toxizitäts-Modelle.** Damit eine Alternativmethode toxizitätsbedingte Reaktionen des Auges in vivo mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhersagen kann, muss eine mechanistische Korrelation zwischen der in vitro Methode und dem Tierversuch bestehen

(Frazier, 1994). Laut Jester et al. könnte solch eine mechanistische Komponente in der Tiefe der initialen Verletzung liegen, da ungeachtet des Vorgangs, der zur Schädigung des Cornea-Gewebes führt, das Ausmaß und die Tiefe der anfänglichen Verletzung der wesentliche Faktor ist, der die Folgen der Irritationsreaktion vorherbestimmt (Jester et al., 1996b, Jester et al., 1998a, Jester et al., 1998b, Maurer und Jester, 1999).

Untersuchungen mit Tensiden unterschiedlichen Irritationspotentials mittels nicht-invasiver konfokaler Mikroskopie am Kaninchenauge *in vivo* ergaben signifikante, quantifizierbare Unterschiede in der Fläche und Tiefe der initialen cornealen Verletzung. Allgemein beeinflussten leicht irritierende Substanzen nur die Oberfläche des cornealen Epithels. Milde und moderate Irritantien beeinträchtigten vornehmlich das Epithel und obere Schichten des Stromas, während stark irritierende Stoffe bis in tiefere stromale Schichten und bis zum Endothel vordrangen und damit die Cornea in ihrer gesamten Tiefe schädigten (Maurer et al., 1997). Die Messung der Verletzungstiefe durch Untersuchung der Cytotoxizität als mechanistische Basis eines *in vitro*-Modells bietet sich demnach als Basis für einen *in vitro*-Assay zur Vorhersage der okulotoxischen Reaktion an. Das Testprotokoll sollte so modifiziert werden, dass die Tiefe der initialen Verletzung berücksichtigt werden kann (Jester et al., 1998a, Maurer et al., 2002). Demnach können Testmatrices, die lediglich aus einem Zell-Monolayer oder einer Zellsuspension bestehen, nicht die gesamte Spannweite an Irritationsreaktionen vorhersagen (Maurer et al., 1998a, Maurer et al., 1998b).

Als mechanistisches Toxizitätsmodell das alle toxischen Schweregrade, von mild bis schwerwiegend irritierend, abbilden kann, eignet sich vielmehr ein full-thickness-Modell der humanen Cornea. Die Erwartung einer allgemein verbesserten *in vivo*/ *in vitro*-Korrelation sowie verbesserte Wachstumsbedingungen für corneale Zellen in Cokultur führten bereits zur Entwicklung organotypischer full-thickness Modelle der Cornea durch schrittweise Rekonstruktion von Endothel, Stroma und Epithel auf Zellkultureinsätzen.

**Full-thickness-Modelle der Cornea.** Das erste Kompletmodell der Cornea wurde von Minami et al. aus primären bovinen Endothelzellen, Keratocyten und Epithelzellen unter Einbeziehung einer Collagen-Matrix geschaffen. Ziel war es, die Differenzierung und Proliferation cornealer Zellen sowie die Pathogenese cornealer Erkrankungen *in vitro* zu untersuchen (Minami et al., 1993). Ein weiteres bovines Corneamodell aus einer Epithelschicht und einer collagenösen Stroma-Komponente, jedoch ohne Einbeziehung des Endothels, wurde von Parnigotto et al. rekonstruiert und auf seine Eignung zur Einstufung des Augenirritations-Potentials verschiedener Detergenzien untersucht (Parnigotto et al., 1998).

Ein anderes full-thickness-Modell beruhte auf tierischen Zellen verschiedener Spezies, primären Epithelzellen und Keratocyten des Kaninchens sowie einer immortalisierten Maus-Endothelzelllinie (Zieske et al., 1994).

Germain et al. rekonstruierten das erste humane Cornea-Äquivalent durch Kultur primärer humaner Epithelzellen auf einer künstlichen Stroma-Matrix aus Collagen und primären Keratocyten. Jedoch fehlte auch hier die basale Endothelzellschicht (Germain et al., 1999, Germain et al., 2000). Das erste humane Komplett-Modell der Cornea aus Epithel, Stroma und Endothel, wurde von Griffith et al. mittels immortalisierter, humaner Cornea-Zelllinien entwickelt. Auch die Verbesserung der mechanischen Stabilität der künstlichen Stroma-Matrix durch Glutaraldehyd-Crosslinking bedeutete einen Fortschritt. Die fertigen Gewebe glichen der humanen Cornea in allen wichtigen physiologischen und morphologischen Eigenschaften und bildeten, neben ihrer Eignung als Toxizitäts-Modelle, die Basis für die darauffolgende Entwicklung implantierbarer Cornea-Äquivalente (Griffith et al., 1999). Derselben Arbeitsgruppe gelang es zudem, ein künstliches Cornea-Gewebe mit funktionaler Innervierung durch Tissue-Engineering herzustellen, welches sowohl als toxikologisches in vitro-Modell als auch für die Transplantation geeignet zu sein scheint (Suuronen et al., 2004). Weitere full-thickness-Modelle aus primären bovinen (Tegtmeyer et al., 2004) sowie primären porcinen Cornea-Endothel-, Stroma- und Epithelzellen (Reichl und Muller-Goymann, 2003) wurden für in vitro-Studien zur transcornealen Permeation rekonstruiert. Eines dieser Permeationsmodelle stellt das HCC-Modell (Human cornea construct) dar, ein organotypisches, humanes Komplettmodell der Cornea, das schrittweise aus einer SV40-immortalisierten Endothelzelllinie (HENC), primären Keratocyten in einer Typ I Collagen-Matrix und einer ebenfalls SV40-transfizierten Epithelzelllinie (CEPI 17 CL 4) in Transwell-Inserts rekonstruiert wurde (Reichl et al., 2004). Permeationsuntersuchungen an dem bovinen sowie dem humanen full-thickness-Modell mit drei Modellsubstanzen ergaben eine leicht erhöhte Permeabilität dieser künstlichen Konstrukte im Vergleich zu exzidierten Schweine-Hornhäuten (Reichl et al., 2004).

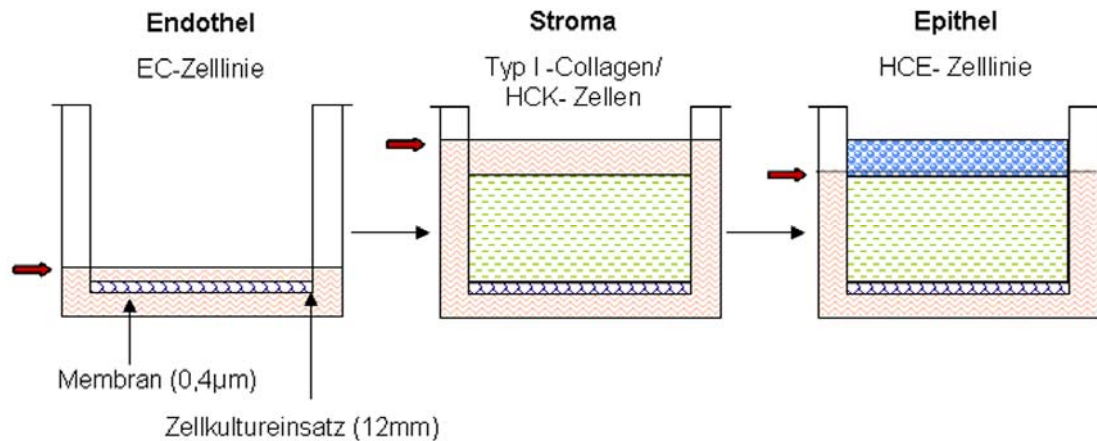
**Das humane Cornea-Äquivalent nach Zorn-Kruppa.** Die vorliegende Arbeit basiert auf einem weiteren organotypischen Modell der humanen Cornea, welches von Zorn-Kruppa und Engelke aus drei SV40-immortalisierten Zelllinien des cornealen Endothels, Stromas und Epithels entwickelt wurde. Dieses Cornea-Äquivalent stellt neben dem Modell von Griffith et al. das bislang einzige humane, vollständig immortalisierte full-thickness-Modell der menschlichen Augenhornhaut dar. Die zur Rekonstruktion des Cornea-Epithels verwendete,

immortalisierte Epithelzelllinie HCE wurde ursprünglich von Araki-Sasaki et al. durch Transfektion mit einem rekombinanten, das „large T-antigen“ enthaltenden SV40-Vektorplasmid etabliert (Araki-Sasaki et al., 1995). Die humane Endothelzelllinie EC wurde von Bednarz et al. ebenfalls durch SV40-Transfektion immortalisiert (Bednarz et al., 2000). Beide Zelllinien wurden bereits in Monolayer-Kultur als in vitro-Modelle zur Untersuchung der Cytotoxizität chemischer Substanzen und Inhaltsstoffe von Ophthalmologika verwendet (Huhtala et al., 2003, Mertens et al., 2002, Saarinen-Savolainen et al., 1998).

Um erstmals zu einer stabilen Keratocyten-Zelllinie zu gelangen, wurden von Zorn-Kruppa et al. primäre Keratozyten aus Spenderhornhäuten isoliert und mit einem ebenfalls die Gensequenz für das „large T-antigen“ beinhaltenden SV40-Vektorkonstrukt erfolgreich transfiziert (Zorn-Kruppa et al., 2004). Auch ein Monolayer-Modell dieser HCK-Zelllinie eignete sich zur Vorhersage der cytotoxischen Wirkung von Chemikalien auf die Zellen des cornealen Stromas (Zorn-Kruppa et al., 2004).

Die schrittweise Rekonstruktion des Zorn-Kruppa-Modells erfolgte in Zellkultur-Membran-Einsätzen mit einem Durchmesser von 12 mm in 12-Lochplatten, beginnend mit der Züchtung des Endothels. Darauf folgend wurde ein Stroma-Äquivalent durch Einbettung der immortalisierten Keratocyten in eine Typ I-Collagen-Matrix geschaffen. Die äußerste Schicht bildete das Epithel, welches durch Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze zur Differenzierung in mehrere Zellschichten angeregt werden konnte (Abb. 5). Zur Rekonstruktion der einzelnen Gewebeschichten wurden verschiedene, serumhaltige Kulturmedien verwendet. Die Morphologie des Zorn-Kruppa-Modells ähnelte dem Aufbau der humanen Cornea. Insbesondere das Stroma-Kompartiment zeigte eine organotypische, gleichbleibend homogene Verteilung der inkorporierten HCK-Zellen, welche sich bereits kurz nach der Einbettung über dendritische Fortsätze vernetzten und sich parallel zur Membran der Zellkultureinsätze anordneten. Auch eine Rekonstruktion der Cornea in umgekehrter Schichtung, mit dem Epithel zuunterst und dem Endothel auf dem Stroma, zeigte Erfolg (Engelke et al., 2004, Zorn-Kruppa et al., 2005).





**Abbildung 5**

Schematische Darstellung der schrittweisen Rekonstruktion des humanen Cornea-Äquivalents nach Zorn-Kruppa et al. aus drei SV40-immortalisierten humanen Zelllinien. Die Blockpfeile zeigen die Mediumgrenze an.

#### 1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung des humanen Cornea-Äquivalents nach Zorn-Kruppa hinsichtlich des Kulturmediums. Bislang wurden alle drei Zelllinien in unterschiedlichen, serumhaltigen Wachstumsmedien kultiviert, die sich insbesondere in der Komplexität ihrer Zusammensetzung unterschieden. Die Vereinigung der HCE-, HCK- und EC-Zelllinie in einem „full-thickness“-Cornea-Konstrukt erforderte die Entwicklung eines gemeinsamen, möglichst serumfreien Mediums, welches nicht nur die Viabilität der Zelllinien gleichermaßen fördern, sondern auch morphologische und funktionelle Besonderheiten der entsprechenden primären Gewebe erhalten oder schaffen sollte. Dazu mussten auch die einzelnen Zelllinien in Abhängigkeit vom Kulturmedium, insbesondere von Serumgehalt, morphologisch und funktionell charakterisiert werden.

Die Endothelzelllinie EC wurde auf ihre Fähigkeit zur interzellulären Kontaktinhibition hin untersucht, welche bei Erlangen der zellulären Konfluenz die Voraussetzung zur Ausbildung und Aufrechterhaltung eines organotypischen Endothel-Monolayers darstellt (Joyce et al., 2002).

Die Keratocyten-Zelllinie HCK sollte sowohl in der Monolayer-Kultur auf Kunststoffoberflächen als auch nach Einbettung in die collagenöse Stroma-Matrix phänotypisch und funktionell, in Abhängigkeit von Serum und Wachstumsfaktoren charakterisiert werden. Insbesondere sollte die Transformation der HCK in fibrotische

Phänotypen nach Stimulation mit TGF $\beta$  untersucht werden, um die Eignung der Zelllinie als Bestandteil eines mechanistischen Wundheilungsmodells zu evaluieren. Durch Analyse der stromalen Matrix-Kontraktion wurden zudem die kontraktile Eigenschaften der Collagen-inkorporierten HCK in Abhängigkeit vom Phänotyp geprüft. Zudem sollte eine Lösung für das Problem der unerwünschten Kontraktion des Stroma-Äquivalents bei der Rekonstruktion des Zorn-Kruppa-Modells gefunden werden.

So sollte letztendlich durch serumfreie Rekonstruktion eines komplexen, mehrschichtigen Cornea-Äquivalents ein Toxizitätsmodell zur Vorhersage des Irritationspotentials chemischer Substanzen am Auge geschaffen werden. Die zusätzliche Rekonstruktion eines einfachen dreidimensionalen Epithelmodells sollte vergleichende Cytotoxizitätstests ermöglichen, um den Bedarf für die Komplexität des mehrschichtigen Modells zu überprüfen. Durch Viabilitätsuntersuchungen mittels MTT-ET<sub>50</sub>-Assay nach der Exposition mit cytotoxischen Modellsubstanzen sollte die Sensitivität/ Robustheit sowie die Regenerationsfähigkeit der beiden Modelle vergleichend untersucht werden.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

---

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Agagel Standard	Biometra, Göttingen
Autoklav	Guwina Hofmann, Berlin
Brutschränke HeraCell®	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer FACS-Calibur	Becton & Dickinson, Heidelberg
Software CellQuest	
Software WinMDI	
Elektrophoresekammern	Biometra, Göttingen
ELISA-Reader Fluostar Optima	BMG Labtech, Offenburg
ENDOHM-12™ TEER-Messkammer	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Entwicklungskassette	Kodak, München
EVOMX™ TEER-Voltohmmeter	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Feinwaage AK160	Mettler, Gießen
Filtrationseinheit Millipore®	Millipore-Waters, Eschborn
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX41	Olympus, Hamburg
Digitalkamera Nikon DXM1200	Nikon, NY, USA
Bildbearbeitungssoftware Axiovision 3.1.3	Carl-Zeiss, Jena
Kühlschrank -80°C HeraFreeze®	Heraeus, Hanau
Neubauer- Zählkammer (0,0025 mm <sup>2</sup> /0,1 mm)	Carl-Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 135	Carl-Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 40	Carl-Zeiss, Jena
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Nürnberg
Pipetten Eppendorf Reference®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy®	Integra Bioscience, Fernwald
Schüttler Titramax 100	Heidolph, Kehlheim
Schüttler Duomax 1030	Heidolph, Kehlheim
Schüttler mit Inkubationshaube EB-TH10	Edmund Bühler, Tübingen
Stereomikroskop Olympus SZX12	Olympus, Hamburg
Digitalkamera ColorView IIIu	Olympus, Hamburg
Bildanalyse-Software cell^A	Olympus, Hamburg
Sterilarbeitsbank HearsaSafe®	Heraeus, Hanau
Tank-Blot	Biometra, Göttingen
Thermoblock TB 1	Biometra, Göttingen
UV-Photometer GeneRay	Biometra, Göttingen
Vakuumgerät Vacuboy®	Integra Biosciences, Fernwald
Vakuum-Pumpe Universal Vacuum System	Savant, Bethesda, MD
Vortex-Gerät ReaxTop	Heidolph, Kehlheim
Wasserbad DC10-P5/U	Haake, Karlsruhe
Wasser-Deionisierungsanlage Milli-Q®	Millipore-Waters, Eschborn
Zentrifugen	
Megafuge® 1.0R	Heraeus, Hanau

Eppendorf 5415 C

Eppendorf, Hamburg

**2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien**

Acrylamid/Bisacrylamid 40 %, 29:1	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Advanced DMEM/F12	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Amphotericin B	Cambrex BioScience, Walkersville, MD
Antibiotika-Antimykotika-Lösung	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Anti-Maus-IgG-Antikörper, FITC-gekoppelt	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Anti-Maus-IgG-Antikörper, Indocarbocyanin (Cy3)- gekoppelt	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG-Antikörper, HRP-gekoppelt	New England Biolabs, Frankfurt
Aprotinin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Ascorbinsäure	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Benzalkoniumchlorid (BAC)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Boviner Hypophysenextrakt (BPE)	Cell Systems, St. Katharinen
Bradford Reagenz	Biometra, Göttingen
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub>	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Collagen Typ I (Rattenschwanz)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Collagenase aus Clostridium histolyticum, Typ XI	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Coomassieblau	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Desoxycholinsäure	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR International, Darmstadt
Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
DMEM/F12 (1:1) mit Glutamax <sup>TM</sup>	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
F12 Nutrient Mixture Ham (Ham's F12) mit L-Glutamin	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Einmalkanülen (0.8/ 80 mm)	VWR International, Darmstadt
Einmalküvetten, reduziert	VWR International, Darmstadt
Einmalspritzen (Braun Injekt 5 ml und 20 ml)	VWR International, Darmstadt
Endothelial-SFM Basal Growth Medium	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Eisessig	Merck, Darmstadt
Epidermaler Wachstumsfaktor, human (hEGF)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Eppendorfgefäße Safe-Lock (0,5, 1,5, 2 ml)	VWR International, Darmstadt
Ethanol	VWR International, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen, Falcon	VWR International, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Fibroblasten-Wachstumsfaktor, human (hFGF-basic)	Biochrom, Berlin
Filme, Kodak X-OMAT, XAR-5	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Filmentwickler	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Filmfixierer	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Filterpapier, Æ 10 cm	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Fluorescein	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Gentamicinsulfat	Biochrom, Berlin

L-Glutamin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Glycin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco BRL, Karlsruhe
Humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF)	Cell Systems, St. Katharinen
Hydrocortison	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Insulin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Keratinocyten- Medium (KGM), Bulletkit:	Cambrex BioScience, Walkersville, MD
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Keratinozytenbasalmedium (KBM)</li> <li>▪ Supplements zur Herstellung von KGM <ul style="list-style-type: none"> <li>- Amphotericin B</li> <li>- boviner Hypophysenextrakt (BPE)</li> <li>- epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF)</li> <li>- Gentamicinsulfat</li> <li>- Hydrocortison</li> <li>- Insulin</li> </ul> </li> </ul>	
Kaliumchlorid, KCl	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Leupeptin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
LumiGlo <sup>®</sup> Chemilumineszenz Reagenz	New England Biolabs, Frankfurt
Medium 199 mit Earle's Salzen und L-Glutamin	Invitrogen/ Gibco, Karlsruhe
Monoklonaler $\alpha$ -SMA-Antikörper (IgG Maus)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Monoklonaler Actin (C2)-Antikörper (IgG Maus)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A.
Monoklonaler p27 <sup>Kip1</sup> -Antikörper (IgG Maus)	DakoCytomation, Glostrup, DK
Monoklonaler Ki-67-Antikörper (IgG Maus)	DakoCytomation, Glostrup, DK
Monoklonaler Connexin-43-Antikörper (IgG Maus)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Monoklonaler Vinculin-Antikörper (IgG Maus)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Monoklonaler $\beta$ -Catenin-Antikörper (IgG Maus)	BD Biosciences, Pharmingen
Mowiol	Calbiochem, Bad Soden/Ts
Natriumazid	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid, NaCl	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumfluorid, NaF	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumhydrogenphosphat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat, $\text{NaHCO}_3$	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumhydroxid, NaOH	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumorthovanadat, $\text{Na}_3\text{VO}_4$	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Nonidet P-40	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Objektträger (Lab-Tek <sup>TM</sup> II-Borosilikatdeckglas-Nalgene 4-Kammerobjektträger)	Nunc, Roskilde, DK
Oregon Green <sup>®</sup> 488 Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe
Parafilm <sup>®</sup>	M Brand GmbH + Co., Wertheim
Paraformaldehyd	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Pepstatin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Transfermembran	Millipore, Eschborn
Propidiumiodid-Lösung 1mg/ml (PI)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen

Proteingrößenmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Retinolsäure	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
RNAse A	Qiagen, Hilden
Salzsäure, konzentriert	VWR Merck, Darmstadt
Serumalbumin vom Rind, Fettsäure-frei (BSA)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Skalpelle	Hammacher, Solingen
Sterilfilter Minisart <sup>®</sup> , 0,22 µm	Sartorius, Göttingen
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Berlin
Target Retrieval Solution, pH9	DakoCytomation, Glostrup, DK
N,N,N,N-Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Biometra, Göttingen
Transformierender Wachstumsfaktor β1 (TGFβ1)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Tris Base	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Tris-HCl	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	ICN, Eschwege
Zellkulturflaschen TPP (25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup> )	Biochrom, Berlin
Zellkultureinsätze 10mm, 0,4µm Polycarbonatmembran	Nunc, Roskilde, DK
Zellkultureinsätze 10mm, 0,4µm Anapore <sup>®</sup> -Membran	Nunc, Roskilde, DK
Zellkulturplatten TPP, (6-, 12-, 24-, 96-Loch)	Biochrom, Berlin
Zellkulturschalen TPP, 10 cm	Biochrom, Berlin
Zellschaber	Renner, Dannstadt
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	Biochrom, Berlin
Ziegenerum	DakoCytomation, Glostrup, DK

### 2.1.3 Zelllinien

Humane Endothelzelllinie (EC)	Universitäts-Augenklinik Hamburg Eppendorf
Humane Keratocyten-Zelllinie (HCK)	Universität Bremen, Zentrum für Humangenetik
Humane Epithelzelllinie (HCE)	Division of Ophthalmology, Kinki Central Hospital, Hyogo, Japan

Alle drei Zelllinien wurden uns freundlicherweise vom Zentrum für Humangenetik der Universität Bremen zur Verfügung gestellt.

### 2.1.4 Nährmedien

#### 2.1.4.1 Serumhaltige Aufzuchtmedien für die Zelllinien

##### **Aufzuchtmedium für die Endothelzelllinie EC: Medium F99 4%**

Die Kultivierung der EC-Zellen erfolgte in Medium F99 4%, einer 1:1-Mischung von Medium 199 und F12 Nutrient Mixture Ham (Ham's F12) mit 4% FKS und 1% Antibiotika-Antimykotika-Lösung.

**Aufzuchtmedium für die Keratocyten-Zelllinie HCK: Medium F99 5%**

Die Kultivierung der HCK-Zellen erfolgte in Medium F99 5%, welches in seiner Zusammensetzung bis auf den höheren FKS-Anteil von 5% dem EC-Medium entsprach.

**Aufzuchtmedium für die Epithelzelllinie HCE: Medium DMEM/F12 15%**

Die Aufzucht der HCE-Zellen erfolgte in DMEM/F12 15%, einer 1:1 Fertigmischung von Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) und F12 Nutrient Mixture Ham (Ham's F12) mit folgenden Zusätzen:

5 µg/ml	Insulin (10 mg/ml)
10 ng/ml	hEGF
15%	FKS
1%	Antibiotika-Antimykotika-Lösung

**2.1.4.2 Serumreduzierte und serumfreie Medien für die Zelllinien****Adv + 2%-Medium**

Die Proliferation der EC sowie der Phänotyp der HCK wurden unter anderem unter serumreduzierten Bedingungen in Advanced DMEM/F12-Medium mit den folgenden Zusätzen untersucht:

2%	FKS
5 µg/ml	Insulin
10 ng/ml	EGF
2 mM	L-Glutamin
1% (v/v)	Antibiotika-Antimykotika-Lösung

**KGM-Medium**

Um die Proliferation der EC im serumfreien Milieu zu untersuchen, wurden diese in KGM-Medium ausgesät. Die Herstellung erfolgte aus Keratinozyten-Basalmedium (KBM, 0,15 mM Calcium) durch Zugabe folgender Substanzen:

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

**KGM+Ca-Medium**

HCK wurden an dieses Medium zunächst für mehrere Passagen adaptiert um anschließend Untersuchungen zu Proliferation und Phänotyp unter serumfreien Bedingungen vorzunehmen. KGM+Ca wurde zudem für die Rekonstruktion des serumfreien Stroma-Äquivalents verwendet. Die Herstellung erfolgte durch Zugabe von 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> zum bereits beschriebenen KGM-Medium.

**KGM+++ -Medium**

Das KGM+++ -Medium diene zur Rekonstruktion des serumfreien Epithel (EPI)- und Stroma-Epithel (SE)-Modells. Aufgrund dessen wurde auch die Proliferation der HCK in diesem Medium untersucht. Als Basis diene das KGM-Medium, dem folgende Substanzen zugesetzt wurden:

- 5 mM CaCl<sub>2</sub>
- 1 µg/ml Hydrocortison
- 50 mg/ml Ascorbinsäure
- 1,5 ng/ml Retinolsäure

	<u>EC-Zelllinie</u>	<u>HCK-Zelllinie</u>	<u>HCE-Zelllinie</u>
<u>serumhaltig</u>			
<b>Medium F99 4%</b>	+		
<b>Medium F99 5%</b>		+	
<b>Medium DMEM/F12 15%</b>			+
<u>serumreduziert</u>			
<b>Adv + 2%-Medium</b>	+	+	
<u>serumfrei</u>			
<b>KGM-Medium</b>	+		
<b>KGM+Ca-Medium</b>	+	+	
<b>KGM+++ -Medium</b>		+	+

**Tabelle 1**

Übersicht über die serumhaltigen und serumfreien Medien, die für die Aufzucht und Aussaat der drei Zelllinien verwendet wurden.

### 2.1.4.3 Kulturmedien für primäre Zellen

#### Kulturmedium für primäre Endothelzellen

Die frisch aus Spenderhornhäuten isolierte Endothelzellen wurden in human Endothelial-SFM Basal Growth Medium mit folgenden Zusätzen kultiviert und ausgesät:

10 ng/ml	hFGF-basic
10 ng/ml	hEGF
5%	FKS

#### Kulturmedium für primäre Fibroblasten

Die immunocytochemischen Untersuchungen an den frisch aus Vorhaut isolierten Fibroblasten fanden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit folgenden Zusätzen statt:

2 mM	Glutamin
10 %	FKS
50 ng/ml	Amphotericin B
20 µg/ml	Gentamicinsulfat

### 2.1.5 Lösungen

#### 2.1.5.1 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.

##### Antibiotikallösung

50 µg/ml	Gentamicinsulfat
2,5 µg/ml	Amphotericin B

in PBS

##### Antibiotika-Antimykotika-Lösung (Invitrogen/Gibco)

10000 U/ml	Penicillin
------------	------------

10000 µg/ml Streptomycin  
25 µg/ml Amphotericin B  
in 0.85% NaCl-Lösung

**Trypsin-EDTA-Lösung**

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

**Einfriermedium (doppelt konzentriert)**

30% FKS  
20% DMSO  
50% Kulturmedium

**2.1.5.2 Lösungen für die Herstellung der Stroma-Äquivalente**

**Rekonstruktionspuffer A**

2,2 g NaHCO<sub>3</sub>  
4,77 g HEPES  
in 100 ml NaOH 0,05N

**Collagenlösung**

3 mg Typ I-Rattenschwanz-Collagen  
10 ml Essigsäure 0,1% pH3

Die Essigsäure wurde nach der pH-Einstellung steril filtriert und dem Collagen zugegeben  
Diese Mischung wurde vor Gebrauch für mindestens 12 Stunden ohne Rühren bei 4°C unter  
Lichtausschluss stengelassen.

**Zehnfach konzentriertes F99 Basalmedium (F99 10x Mix)**

Zur Herstellung des zehnfach konzentrierten F99-Mediums wurde die ursprünglich für die  
Herstellung von einem Liter vorgesehene Menge an pulverförmigem Medium 199 sowie  
dieselbe Menge Ham's F12 in jeweils 100 ml Aqua bidest gelöst. Diese beiden Konzentrate

wurden 1:1 gemischt, steril filtriert und anschließend zur Rekonstruktion der serumhaltigen Stroma-Gele verwendet.

### 2.1.5.3 Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie

#### Blocklösung IHC

2%	Ziegenserum
1%	BSA
0,1%	Triton X-100
0,05%	Tween 20
0,05%	NaN <sub>3</sub>
in 0,01 M	PBS

#### Primärer Antikörper-Verdünnungspuffer IHC

1%	BSA
0,05%	NaN <sub>3</sub>
0,01 M	PBS

#### Sekundärer Antikörper-Verdünnungspuffer IHC

0,01 M	PBS
0,05%	NaN <sub>3</sub>

#### PI Counterstain-Lösung IHC (1 µg/ml PI und 10 µg/ml RNase A)

2 µl	PI-Stammlösung (1 mg/ml in Aqua bidest)
20 µl	RNase A Stammlösung (1 mg/ml in PBS)
ad 2 ml PBS	

Vor Gebrauch wurde diese Lösung 1:10 mit PBS verdünnt

#### Mowiol-Lösung (pH 7,4)

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

### 2.1.5.4 Lösungen für Zellyse und 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

### 2.1.5.5 Lösungen für die Western Blot-Analyse

#### Trenngelpuffer (pH 8,8)

1,88 M	Tris
30%	HCl 1M

in Aqua bidest.

#### Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,5 M	Tris
48%	HCl 1M

in Aqua bidest.

**Laufpuffer (pH 8,3)**

14,4 mg/ml Glycin

3,02 mg/ml Tris

1 mg/ml SDS

in Aqua bidest.

**Blotpuffer (pH 8,3)**

14,4 g/ml Glycin

3,0 g/ml Tris

in Aqua bidest.

**Trenngel (Polyacrylamid 10%)**

10 µl Temed

60 µl Ammoniumpersulfat

3,0 ml Acrylamid/Bisacrylamid 40%

2,4 ml Trenngelpuffer

1,2 ml SDS-Lösung (1%)

5,4 ml Aqua bidest.

**Sammelgel (Polyacrylamid 5%)**

4 µl Temed

20 µl Ammoniumpersulfat

0,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid 40%

0,8 ml Sammelgelpuffer

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

### **2.1.5.6 Lösungen für die Keratocyten-Isolierung aus dem Stromagel**

#### **Collagenase-Stammlösung**

2,5 mg            Collagenase aus Clostridium histolyticum, Typ XI  
ad 1 ml PBS

#### **Trypsin-Stammlösung**

0,5% Trypsin in PBS

Die Collagenverdauungs-Lösung wurde kurz vor der Verwendung frisch durch Mischen der Collagenase-Stammlösung mit Trypsin-Stammlösung im Verhältnis 10:1 auf Eis hergestellt.

### **2.1.5.7 Lösungen für Viabilitätsuntersuchungen**

#### **MTT-Stammlösung**

5 mg            Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid (MTT)  
ad 1 ml Aqua bidest.

Diese Lösung wurde steril filtriert und bei -20°C unter Lichtausschluss gelagert. Für Viabilitätsuntersuchungen wurde diese Stammlösung 1:5 zu einer Endkonzentration von 1mg/ml mit KGM+Ca-Medium verdünnt.

### **2.1.5.8 Lösungen der Testsubstanzen**

TGFβ1 wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,1% BSA in 4 mM HCl/PBS gelöst und aliquotiert bei -80 °C gelagert.

TritonX-100 wurde in Aqua bidest auf eine Konzentration von 0,3% verdünnt, steril filtriert und bei 2-8°C in Glasflaschen gelagert.

Benzalkoniumchlorid wurde in einer Konzentration von 0,1% in Aqua bidest gelöst, ebenfalls steril filtriert und bei 2-8°C gelagert.

Fluorescein wurde zu einer Endkonzentration von 10mM in Aqua bidest gelöst, steril filtriert und bei -20°C lichtundurchlässig gelagert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

**Humane Endothelzelllinie (EC).** Die EC wurden in mit 4% (v/v) FKS und 1% (v/v) Antibiotika-Antimykotika-Lösung versetztem Medium F99 (Medium F99 4%) in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Zur Verbreiterung und Aussaat wurden die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und für ca. 3 min mit Trypsin/EDTA (0,05%/ 0,02% w/v) behandelt. Dazu wurden 2 ml der Trypsin-Lösung zu den Zellen pipettiert, durch Schwenken der Flasche gleichmäßig über die Kultur verteilt und der Überschuss sofort durch Absaugen entfernt. Nach dem Ablösen der EC vom Flaschenboden wurden diese in 10 ml des 4% FKS-haltigen Kulturmediums aufgenommen, wobei die Enzymreaktion durch den Serumgehalt des Mediums gestoppt wurde. Diese Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 5 ml Medium F99 4% resuspendiert und ein 1 ml Aliquot in eine neue mit 29 ml Medium befüllte Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) ausgesät.

Die Passagierung erfolgte lediglich alle zwei Wochen im Verhältnis 1:5, um eine Kontaktinhibition der Endothelzellen zu ermöglichen.

Zum Einfrieren wurden  $1 \times 10^6$ -  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml Medium F99 4% aufgenommen, vorsichtig mit dem gleichen Volumen EC-Einfriermedium gemischt und in ein eisgekühltes Kryoröhrchen pipettiert. Um ein langsames Durchfrieren zu gewährleisten, wurden die Zellen in Zellstoff verpackt und für mindestens 24 Stunden bei -80°C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Die Reaktivierung erfolgte durch schnelles Auftauen der Zellen im auf 37°C vorgeheizten Wasserbad. Die Zellsuspension wurde sofort nach dem Erwärmen in eine mit 10 ml Medium F99 4% befüllte Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) überführt. Nach 24 Stunden musste ein Mediumwechsel vorgenommen werden, um restliches DMSO zu entfernen.



Eine Adaption an serumreduzierte oder serumfreie Kulturbedingungen war bei den EC aufgrund mangelnder Proliferation nicht möglich.

**Humane Keratocyten-Zelllinie (HCK).** Als Keratocyten-Standardmedium diente das mit 5% FKS und 1% (v/v) Antibiotika-Antimykotika-Lösung supplementierte Medium F99 (Medium F99 5%). Die Zellen wurde bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% bis zur Konfluenz kultiviert. In diesem Stadium wurden die HCK mit PBS gewaschen, für ca. eine Minute mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/ 0,02% w/v) behandelt und wie für die EC bereits beschrieben im Verhältnis 1:5 passagiert. Auch das Einfrieren und Auftauen erfolge analog.

Zudem wurde eine Adaption der HCK an folgende serumfreie Medien vorgenommen: Keratinocytenwachstumsmedium mit 0,5mM CaCl<sub>2</sub> (KGM+Ca-Medium) sowie Keratinocytenwachstumsmedium mit folgenden Zusätzen: 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 µg/ml Hydrocortison, 50 mg/ml Ascorbinsäure und 1,5 ng/ml Retinolsäure (KGM+++ -Medium).

Die Adaption erfolgte durch wiederholtes Umsetzen der Zellen in KGM+Ca-, bzw. KGM+++ -Medium, wobei der ersten Passage nach Wechsel des Mediums noch jeweils 1% FKS zugesetzt wurde.

Für alle Experimente wurden HCK der Passagen P30 bis P40 verwendet, die für mindestens 10 und maximal 15 Passagen unter den genannten serumfreien Bedingungen kultiviert worden waren.

<b>HCKo</b>	in Medium F99 5% kultivierte HCK
<b>HCK+Ca</b>	an KGM+Ca-Medium adaptierte HCK
<b>HCK+++</b>	an KGM+++ -Medium adaptierte HCK

**Tabelle 2**

**Bezeichnung der an unterschiedliche Wachstumsmedien adaptierten HCK in der fortlaufenden Arbeit**

**Humane Epithelzelllinie (HCE).** DMEM/F12-Medium mit 15% FKS, 5 µg/ml Insulin, 10 ng/ml, 2 mM L-Glutamin und 1% Antibiotika-Antimykotika-Lösung (DMEM/F12 + 15%) wurde als Standard-Medium für die HCE-Kultivierung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) verwendet. Wie bei den Keratocyten erfolgte die Umsetzung nach Erreichen der Konfluenz im Verhältnis 1:5, wobei bei den HCE eine bis zu 15-minütige Behandlung mit Trypsin/EDTA (0,05%/ 0,02% w/v) zum Ablösen der Zellen vom

Flaschenboden nötig war. Die Passagierung sowie das Einfrieren und Reaktivieren der Zellen erfolgte wie bereits bei den EC beschrieben.

In Analogie zu den HCK wurden auch die HCE durch wiederholtes Passagieren an KGM+++<sup>-</sup>Medium adaptiert.

### 2.2.2 Kultivierung der Cornea-Äquivalente

Die dreidimensionalen, organotypischen Gewebeäquivalente der humanen Cornea wurden in Nunc<sup>®</sup> 10 mm Zellkultureinsätzen mit Polycarbonat- bzw. Anapore<sup>®</sup>-Membran (0,4 µm Porengröße) auf Eis gefertigt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in 6-Loch-Platten kultiviert.

Die Rekonstruktion der verschiedenen Modelle beruhte auf dem humanen Cornea-Äquivalent von Zorn-Kruppa et al., einem dreischichtigen „Full-thickness“-Modell der Cornea aus einem Endothel der EC-Zelllinie, einem Stroma-Äquivalent mit eingelagerten HCK sowie dem aufgelagerten mehrschichtigen Epithel der HCE-Zelllinie (Zorn-Kruppa et al., 2005).

**Rekonstruktion des Stroma-Äquivalents.** Für die Rekonstruktion der serumhaltigen Stroma-Äquivalente wurden pro Zellkultureinsatz  $1 \times 10^5$  HCKo in 25 µl FKS resuspendiert, 25 µl zehnfach konzentriertes F99 Basalmedium (F99 10x Mix) sowie 25 µl Rekonstruktionspuffer A, bestehend aus 2,2 g NaHCO<sub>3</sub> und 4,77 g HEPES-Puffer in 100 ml 0,05 N NaOH, zugegeben und mit 150 µl einer essigsäuren Lösung von Typ I-Rattenschwanz-Collagen (3 mg/10 ml) vermischt. Diese Keratocyten-Collagen-Suspension wurde möglichst quantitativ in einen Zellkultureinsatz überführt und bis zur vollständigen Polymerisation des Collagens für ca. eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

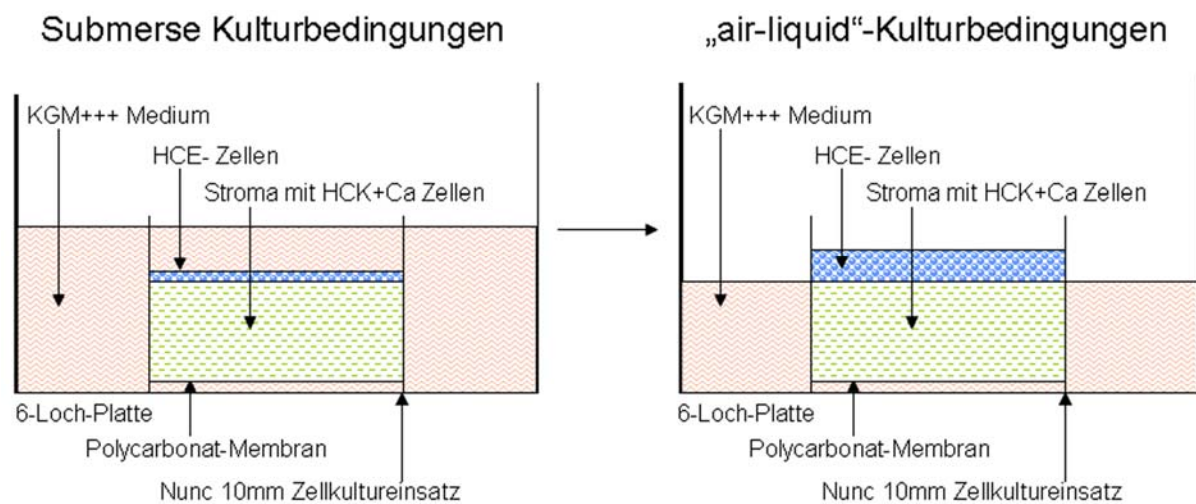
Für die Nachbildung der serumfreien Stroma-Äquivalente wurde der Anteil an FKS und F99 10x Mix durch 50 µl KGM+Ca-Medium mit  $1 \times 10^5$  HCK+Ca substituiert.

Die fertigen Stroma-Gele wurden in Medium F99 5% bzw. KGM+Ca-Medium submers kultiviert.

**Rekonstruktion des Epithel-Modells (EPI-Modell).** Für die Kultivierung des einfachen Epithelmodells (EPI-Modell) wurden  $1 \times 10^5$  adaptierte HCE in 500 µl KGM+++<sup>-</sup>Medium suspendiert und direkt auf die Polycarbonat-Membran eines 10 mm-Zellkultureinsatzes ausgesät. Bis zum Erreichen der Konfluenz wurden die HCE durch Zugabe von 2 ml KGM+++<sup>-</sup>Medium auf der Außenseite des Kultureinsatzes bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> submers kultiviert. Anschließend wurde das überstehende Medium dekantiert sowie das umgebende

Medium abgesaugt und der Flüssigkeitsspiegel auf der Außenseite des Zellkultureinsatzes durch Zugabe von 0,9 ml frischem KGM+++ -Medium soweit abgesenkt, dass die Differenzierung des Epithels an der Luft-Medium-Grenze induziert wurde. Unter den so geschaffenen „air-liquid-Bedingungen“ wurden die Modelle für 14 Tage bei täglichem Mediumwechsel kultiviert, was zur Ausbildung eines organotypischen, mehrschichtigen Epithels führte. Für Versuche wurden lediglich EPI-Modelle verwendet, deren TEER-Werte zwischen 400 und 600 Ohm/cm<sup>2</sup> lagen.

**Rekonstruktion des Stroma-Epithel-Modells (SE-Modell).** Dieses vereinfachte „Full-thickness“-Modell wurde durch Kombination des serumfreien, HCK+Ca in KGM+Ca-Medium enthaltenden Stroma-Äquivalents mit dem ebenfalls serumfreien EPI-Modell konstruiert. Hierzu wurden nach vollständiger Polymerisation des Stroma-Gels  $1 \times 10^5$  HCE in 500 µl KGM+++ -Medium auf die Collagen-Oberfläche pipettiert und durch kurzes Schütteln bei 150 rpm gleichmäßig verteilt. Dieses Konstrukt wurde für einen Tag mit KGM+++ -Medium bedeckt inkubiert um den Epithelzellen ein vollständiges Anwachsen sowie das Erreichen der Konfluenz zu ermöglichen. Analog zum EPI-Modell wurde abschließend der umgebende Mediumspiegel auf „air-liquid“-Niveau abgesenkt und über 14 Tage bei täglichem Mediumwechsel beibehalten.



**Abbildung 6 Kultivierung des SE-Modells.**

Bis zum Anwachsen der HCE auf der Stroma-Oberfläche und dem Erreichen der Konfluenz wird der Zellkultureinsatz komplett mit Medium bedeckt. Damit HCE zum mehrschichtigen Epithel differenzieren können, müssen sie an der Luft-Medium-Grenze wachsen. Dazu wird der Mediumspiegel auf „air-liquid“-Niveau abgesenkt.

### 2.2.3 Durchflusszytometrische Untersuchungen (FACS)

#### 2.2.3.1 Untersuchungen zur Proliferation und Nekrose von Epithelzellen und Keratocyten

Im Hinblick auf das Ziel, ein gemeinsames, möglichst serumfreies Kulturmedium für alle drei Zelllinien zu finden, wurde die Proliferation dieser Zellen in unterschiedlichen Medien mittels Durchflusszytometrie untersucht. Um zudem den Anteil der nekrotischen Zellen in der Kultur zu bestimmen, wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) angefärbt. PI interkaliert stöchiometrisch in den DNA-Doppelstrang und kann ausschließlich nekrotische oder spätapoptotische Zellen anfärben, deren Membranintegrität verlorengegangen ist. Im FACS-Diagramm wurden nekrotische Zellen daher im Bereich der roten PI-Fluoreszenz detektiert. Gesunde Zellen schließen aufgrund ihrer intakten Cytoplasmamembran PI aus und konnten deshalb im farblosen Bereich des FACS-Diagramms nachgewiesen und quantifiziert werden.

#### Aussaat und Kultivierung der Zellen

**Endothelzellen.** Die EC wurden in einer Konzentration von  $8,5 \times 10^4$ /ml/Loch im Standard-EC-Medium (Medium F99 4%) in sechs 24-Loch-Platten ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dem Anwachsen der Zellen wurde das EC-Medium in jeweils zwei 24-Loch-Platten gegen 1 ml Advanced DMEM/F12 Medium mit 2% FKS 5 µg/ml Insulin, 10 ng/ml EGF, 2 mM L-Glutamin und 1% (v/v) Antibiotika-Antimykotika-Lösung (Adv + 2%-Medium), bzw. gegen serumfreies Keratinocytenwachstumsmedium (KGM-Medium) ausgetauscht. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich, wobei immer nur die Hälfte des Medium- Volumens pro Loch, d.h. 500 µl, ausgetauscht wurde.

**Keratocyten.** Jeweils zwei 24-Loch-Platten wurden parallel mit HCKo in F99 5%-Medium, HCK+Ca in KGM+Ca-Medium und HCK+++ in KGM+++ -Medium in einer Konzentration von  $5 \times 10^3$ /ml/Loch ausgesät und unter den bereits genannten Bedingungen kultiviert. In der ersten Woche wurde das Medium einmal, in der zweiten und ggf. dritten Woche jeden zweiten Tag gewechselt, wobei hier jedesmal das komplette Volumen durch frisches Medium ersetzt wurde.

### **2.2.3.2 Untersuchungen zur Proliferation von Keratocyten nach Stimulation mit TGFβ1**

Die TGFβ-Isoformen spielen eine wichtige Rolle im Frühstadium der kornealen Wundheilung, da sie die Proliferation, Migration und Differenzierung von Epithelzellen und Keratocyten beeinflussen (Carrington et al., 2006). Hier wurde zunächst der Einfluss von TGFβ1 in einer Konzentration von 2 ng/ml auf die Proliferation von HCKo und HCK+Ca mittels Durchflusszytometrie untersucht.

#### **Aussaat und Kultivierung der Zellen**

Dieser Versuch wurde sowohl mit HCKo unter serumhaltigen (in Medium F99 5%) als auch parallel mit HCK+Ca unter serumfreien Bedingungen (in KGM+Ca-Medium) durchgeführt. Für jedes Medium wurden vier 24-Loch-Platten mit  $5 \times 10^3$  Zellen/ml/Loch subkonfluent ausgesät und unter den bereits genannten Bedingungen inkubiert. Direkt nach dem Anwachsen der Zellen wurden jeweils zwei 24-Loch-Platten pro Medium mit TGFβ1 in einer Endkonzentration von 2 ng/ml stimuliert. Dazu wurden zunächst in jedes Loch exakt 1,9 ml des entsprechenden Mediums vorgelegt und 100 µl einer TGFβ1-Verdünnung der Konzentration 40 µl/ml hinzugefügt. Parallel dazu wurde in den unstimulierten 24-Loch-Platten ein Mediumwechsel mit 2 ml Medium/Loch durchgeführt. Die Zellzahl-Bestimmung erfolgte täglich über einen Zeitraum von neun Tagen. Während dieser Versuchsperiode fand kein Mediumwechsel statt.

#### **2.2.3.3 Probenaufbereitung für die Durchflusszytometrie**

Pro Tag und Medium wurde in vier Lochs der 24-Loch-Platte die Zellzahl bestimmt ( $n = 4$ ). Dazu mussten die Zellen vom Plattenboden gelöst und möglichst quantitativ in FACS-Röhrchen überführt werden. Jedes Loch wurde mit 1 ml PBS gewaschen und mit 200 µl Trypsin/EDTA-Lösung so lange bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert, bis sich alle Zellen abgelöst hatten. Das vollständige Loslösen des Zellrasens vom Flaschenboden wurde durch leichtes Klopfen an den Seiten der 24-Loch-Platte beschleunigt und mikroskopisch kontrolliert.

Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 500 µl serumhaltigem EC- bzw. HCKo-Standard-Medium beendet und das komplette im Loch befindliche Volumen von 700 µl in ein eisgekühltes FACS-Röhrchen überführt. Um so wenig Zellen wie möglich zu verlieren, wurde

jedes Loch mit 500 µl Medium nachgewaschen und diese Lösung mit der Zellsuspension im FACS-Röhrchen vereinigt. Die Proben wurden bis zur Messung auf Eis gelagert.

Um den nekrotischen Anteil der Zellen zu bestimmen, wurde vor der FACS-Untersuchung eine PI-Lösung (1 mg/ml) 1:10 in PBS verdünnt (1 µg/ 10 µl) und 60 µl dieser Lösung zu jedem Probenröhrchen mit 1,2 ml Inhalt gegeben, um eine Endkonzentration von 5 µg/ml zu erhalten. Sofort nach PI-Zugabe wurde die Zellsuspension auf dem Vortex-Schüttler vorsichtig durchmischt und bis zur Messung für mindestens drei Minuten auf Eis inkubiert. Alle Arbeitsschritte ab der PI-Zugabe fanden im Dunkeln statt. Direkt vor der Messung wurde jede einzelne Probe nochmals gevortext.

Alle Zellen, die innerhalb von zwei Minuten durch die Durchflusszelle gelangten, wurden anschließend mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer und der Software CellQuest quantifiziert. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels WinMDI Software.

Die Versuche wurden mindestens zweimal unabhängig wiederholt. Die einzelnen Messungen erfolgten als vierfach-Bestimmung.

#### **2.2.3.4 Einstellung des Durchflusszytometers**

Am ersten Tag der Messung erfolgte zunächst für jedes Medium eine individuelle Einstellung des Zytometers nach Größe (Forwardscatter, FSC) und Granularität (Sidewardscatter, 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-Achsen mit einer ungefärbten Zellpopulation anhand ihrer Eigenfluoreszenzintensität. Danach sollten sich möglichst alle Zellen im linken unteren Quadranten befinden. Zur Eingrenzung der Fluoreszenzemission von PI (575 nm, FL-2) wurde anhand einer Probe mit angefärbten Zellen eine Angleichung von FL1 vorgenommen. Danach sollten sich möglichst alle PI-gefärbten, nekrotischen Zellen im linken oberen Quadranten befinden. Für die Quantifizierung der Zellen wurde pro Probe ein Messzeitraum von zwei Minuten gewählt.

## 2.2.4 Untersuchungen zum Membranwiderstand (TEER)

**HCE.** HCE sind in der Lage, über Zell-Zell-Verbindungen, sog. Tight Junctions, eine dichte Epithelschicht auszubilden. Werden diese Zellen auf Zellkultureinsätze ausgesät, bildet sich ein elektrischer Widerstand über der Einsatz-Membran.

Die Messung dieses transepithelialen elektrischen Widerstands (transepithelial electrical resistance, TEER) diente dazu, die zeitabhängige Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels bei der Rekonstruktion des EPI-Modells zu verfolgen. Die Bildung mehrerer Zelllagen ging mit der Zunahme der Gewebs-Integrität und damit des elektrischen Widerstandes einher.

**EC.** Zudem wurden die bereits beschriebenen FACS-Untersuchungen zur Proliferation der EC in verschiedenen Medien sowie die Untersuchungen zur Kontaktinhibition an diesen Zellen durch parallele TEER-Messungen in Zellkultureinsätzen unterstützt.

**Messung der TEER.** Zur Widerstandsbestimmung wurde der jeweilige Membraneinsatz in eine mit 2,2 ml des entsprechenden Mediums befüllte EndOhm-12 Messkammer eingebracht. Diese Messkammer inkorporiert sowohl am Boden als auch am Verschlusszylinder ein Paar konzentrisch angeordneter Ag/AgCl-Elektroden. Um den Spannungskreislauf zu schließen, wurden 300 µl Medium in den Einsatz auf die Zellen pipettiert und der Verschlusszylinder auf die Messkammer gesetzt. Die Messung erfolgte mit dem EVOM Widerstands-/ Spannungsmessgerät. Für jede Probe wurden drei Werte pro Messung aufgezeichnet.

## 2.2.5 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

### 2.2.5.1 Untersuchungen zur Kontaktinhibition der Endothel-Zelllinie EC

Die Fähigkeit der EC, durch Kontaktinhibition einen organotypischen Monolayer zu bilden, wurde über zwei Wochen immunocytochemisch untersucht. An den Tagen eins, sieben und vierzehn nach der Aussaat wurden die Zellen mittels monoklonaler Antikörper auf Expression der Zellkern-Marker Ki-67 und p27<sup>KIP1</sup> getestet.

Ki-67 ist ein Kernprotein, welches in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> und M) hochgradig exprimiert wird, aber beim Übergang in den nicht-proliferativen Zustand (G<sub>0</sub>-Phase) rasch degradiert wird.

P27<sup>KIP1</sup>, ebenfalls ein Kernprotein, ist ein Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen, dessen erhöhte Expression in Endothelzellen die Arretierung in der G<sub>1</sub>-Phase vermittelt, welche durch Kontaktinhibition ausgelöst wird.

Die Visualisierung der primären Antikörper Anti-Ki-67- und Anti-P27<sup>KIP1</sup> erfolgte mit einem grün fluoreszierenden, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelten sekundär-Antikörper.

Zusätzlich wurden die Zellkerne mit PI rot angefärbt.

Als Kontrolle dienten primäre humane Endothelzellen, die uns freundlicherweise von Herrn Dr. Bednarz aus der Universitäts-Augenklinik Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt wurden.

### **Aussaat und Kultivierung der Zellen**

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden die EC auf 4-Kammer-Objektträger in einer Dichte von  $7,5 \times 10^4$ /Kammer in 1 ml F99 4%-Medium ausgesät.

Parallel dazu wurden die primären Endothelzellen in derselben Konzentration in 1 ml human Endothelial-SFM Basal Growth Medium, welchem FKS (5%), hFGF (10 ng/ml) und hEGF (10 ng/ml) zugesetzt waren, auf Objektträger gesät. Jeden dritten Tag fand ein Mediumwechsel statt, bei dem jeweils 500 µl Medium ausgetauscht wurden.

### **Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung**

Zunächst wurden das Medium aus den Kammern des Objektträgers durch Auskippen entfernt und die Zellen zweimal vorsichtig mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Plastik-Kammern vom Glas-Objektträger entfernt. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4% Paraformaldehyd-Lösung in PBS für exakt 15 min bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal in PBS gewaschen.

Aufgrund der Paraformaldehyd-Fixierung war es nötig, eine Epitopen-Wiedergewinnung durchzuführen. Hierzu wurde ein Wasserbad auf 95°C bis 100°C vorgeheizt. Jeder Objektträger wurde in ein separates, 5 ml vorgewärmte „Target Retrieval Solution pH 9“ enthaltendes, Färbebehältnis überführt und für exakt zehn Minuten im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden die Objektträger in den Behältnissen für 10 bis 20 min in Eiswasser abgekühlt und zweimal mit PBS gewaschen.

Um einer unspezifischen Bindung von IgG vorzubeugen, wurden die Zellen in jeder Kammer mit 100 µl Block-Lösung IHC für 20 min bei RT geblockt und anschließend erneut zweimal mit kaltem PBS gewaschen.



Danach erfolgte die Inkubation der fixierten Zellen mit 40 µl des primären Antikörpers für 30 min bei RT. Zuvor waren der monoklonale Maus-Antikörper Anti-KI-67 mit primärem Antikörper-Verdünnungspuffer IHC im Verhältnis 1/107,5, der ebenfalls monoklonale Maus-Antikörper Anti-p27<sup>KIP1</sup> Clone SX53G8 im Verhältnis 1/25 verdünnt worden. Die Negativkontrolle wurde nur mit Verdünnungspuffer behandelt.

Zur Visualisierung der Primärantikörper wurden alle Zellen mit einem Anti-Maus-IgG-Antikörper, gekoppelt mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (1/100 in sekundärem Antikörper-Verdünnungspuffer IHC) für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Um nichtgebundenen primären und sekundären Antikörper möglichst vollständig zu entfernen, wurde der Objektträger nach jedem Schritt dreimal für eine Minute in 1%iger BSA/PBS-Lösung gewaschen.

Anschließend wurden die Zellkerne durch 15-minütige Inkubation mit 80 µl verdünnter PI-Lösung (0,1 µg/ml PI und 1 µg/ml RNase A) im Dunkeln rot fluoreszierend markiert. Dazu musste jedes Mal frisch die PI Counterstain-Lösung IHC hergestellt werden, indem 2 µl einer PI Stammlösung (1 mg/ml in Aqua bidest) und 20 µl RNase Stammlösung (1 mg/ml in PBS) mit PBS auf 2 ml verdünnt wurden. Diese IHC-Lösung wurde anschließend durch nochmaliges 1:10 Verdünnen mit PBS auf eine Endkonzentration von 0,1 µg/ml PI und 1 µg/ml RNase A eingestellt.

Nach dem letzten Färbeschritt wurden die Zellen abschließend dreimal mit PBS gewaschen und 15 min an der Luft getrocknet.

Der Objektträger wurde mit 40 µl Mowiol-Lösung benetzt, mit einem Deckgläschen abgedeckt und unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert.

Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Olympus BX41, welche mit der Digitalkamera Nikon DXM1200 und AxioVision Software ausgestattet war.

### **2.2.5.2 Untersuchungen zum Phänotyp der Keratocyten-Zelllinie HCK**

Der Phänotyp der HCK mit und ohne Stimulation durch TGFβ1 wurde sowohl in serumhaltigem Medium F99 5% als auch unter serumfreien Kulturbedingungen in KGM+Ca-Medium untersucht.

Die cytochemische Färbung mit Oregon Green<sup>®</sup> 488 Phalloidin diente der Visualisierung von F-Aktin in der Zelle, was Rückschlüsse auf die Organisation des Zytoskeletts zuließ.

Antikörpern gegen die Junction-Proteine Connexin-43, Vinculin und  $\beta$ -Catenin wurden zur Unterscheidung des aktivierten und ruhenden Phänotyps eingesetzt.

Die Expression von  $\alpha$ -SMA als spezifischen Marker für den Myofibroblasten-Phänotyp wurde ebenfalls mit einem spezifisch gegen dieses Protein gerichteten Antikörper untersucht. Als Kontrolle wurde die  $\alpha$ -SMA-Expression zudem in primären Vorhaut-Fibroblasten gezeigt.

### **Aussaat und Stimulation der Zellen**

HCKo und HCK+Ca wurden in einer mittleren Dichte von  $3 \times 10^4$  HCKo/Kammer, bzw.  $5 \times 10^4$  HCKCa/Kammer auf 4-Kammer-Objektträger ausgesät und teilweise nach dem Anwachsen für drei Tage mit TGF $\beta$ 1 (2 ng/ml) stimuliert. Die immunocytochemische Untersuchung erfolgte stets bei einer Zelldichte von etwa 80%.

Die primären Fibroblasten wurden in einer Dichte von  $3 \times 10^4$ /Kammer in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% FKS, 2 mM Glutamin, 50 ng/ml Amphotericin B und 20  $\mu$ g/ml Gentamicinsulfat ausgesät und analog zu den immortalisierten Zellen kultiviert bzw. stimuliert.

### **Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung**

Zunächst wurden die Zellen auf den Objektträgern wie bereits beschrieben zweimal in eiskaltem PBS gewaschen, in 4% Paraformaldehyd für zehn Minuten fixiert und nach zweimaligem Waschen durch Zugabe von TritonX-100 0,1% für fünf Minuten bei RT permeabilisiert. Die Zellen wurden wiederum zweimal mit PBS gewaschen und für 30 min mit Blocklösung IHC bei RT geblockt.

Die Blocklösung wurde danach lediglich abgekippt und die Zellen mit jeweils 80  $\mu$ l/Kammer der folgenden primär-Antikörper-Lösungen inkubiert:

Anti- $\beta$ -Catenin (1:700 in primärem Antikörper-Verdünnungspuffer IHC) für 20 min, Anti-Vinculin (1:400) und Anti-Connexin-43 (1:6000) für jeweils eine Stunde sowie Anti- $\alpha$ -SMA (1:100) für 30 min.

Zur Entfernung der überschüssigen Antikörperlösungen wurden die Zellen dreimal für 5 min mit 1%iger BSA/PBS-Lösung gewaschen und dann unter Lichtausschluss mit 80  $\mu$ l einer Sekundärantikörperlösung (1:125 in sekundärem Antikörper-Verdünnungspuffer IHC) 30 min lang inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde, wie bereits bei den EC beschrieben, ein FITC-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper verwendet. Auch die Zellkerne wurden wie bereits beschrieben mit PI Counterstain-Lösung markiert. Schloss sich allerdings eine Färbung mit Oregon Green<sup>®</sup> 488 Phalloidin an, das ebenfalls im grünen Bereich fluoresziert, wurden die

primär-Antikörper alternativ mit einem rot fluoreszierenden, Indocarbocyanin 3 (Cy3)-gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper (1/125 in sekundärem Antikörper-Verdünnungspuffer IHC) visualisiert. In diesem Fall wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS für 20 min unter Lichtausschluss mit 80 µl einer Oregon Green 488 Phalloidin-Lösung (0,85 µM) inkubiert.

Nach dem letzten Färbeschritt wurden die Zellen abschließend einmal mit Triton-X 100 (0,01% in PBS) und dreimal mit PBS gewaschen. Nach 15 min Lufttrocknung wurde jeder Objektträger wie bereits beschrieben mit Mowiol bedeckt, ein Deckgläschen aufgesetzt und im Dunkeln gelagert. Die mikroskopische Aufnahme erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Olympus BX41, welches mit der Digitalkamera Nikon DXM1200 und AxioVision Software ausgestattet war.

## **2.2.6 Westernblot-Untersuchungen zur Myofibroblasten-Differenzierung der HCK**

### **2.2.6.1 Untersuchung der $\alpha$ -SMA-Expression in verschiedenen Medien**

Das Ausmaß der Myofibroblastendifferenzierung unter serumhaltigen und serumfreien Kulturbedingungen wurde durch Westernblot-Analyse der  $\alpha$ -SMA-Expression bestimmt. Dazu wurden sowohl HCKo als auch HCK+Ca in einer mittleren Dichte von  $1,5 \times 10^5$  HCKo/Loch, bzw.  $2,5 \times 10^5$  HCK+Ca/Loch im entsprechenden Medium auf 6-Loch-Platten gesät und nach dem Anwachsen teilweise mit TGF $\beta$ 1 (2 ng/ml) stimuliert. Nach drei Tagen wurden die Zellen lysiert und der Proteinanalyse unterzogen.

### **2.2.6.2 Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der $\alpha$ -SMA-Expression**

Die zeitabhängige Expression von  $\alpha$ -SMA nach Stimulation mit TGF $\beta$ 1 wurde unter serumhaltigen und serumfreien Kulturbedingungen an sieben aufeinander folgenden Tagen durch Westernblot-Analyse bestimmt.

Wie bereits beschrieben wurden HCKo und HCK+Ca in einer mittleren Dichte in Medium F99 5% bzw. KGM+Ca-Medium auf 6-Loch-Platten gesät und nach dem Anwachsen mit TGF $\beta$ 1 in einer Endkonzentration von 2 ng/ml stimuliert. Dazu wurden 4 ml Medium/Loch vorgelegt und jeweils 1 ml einer TGF $\beta$ 1-Lösung (10 ng/ml Medium) zugegeben. Dieses recht große Flüssigkeitsvolumen war nötig, da während des Versuchszeitraums von einer Woche kein Mediumwechsel vollzogen werden durfte. Pro Tag und Medium wurden die Zellen in

zwei der Löcher lysiert und die Lysate bis zum Tag der Westernblot-Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen.

### **2.2.6.3 Untersuchung der $\alpha$ -SMA-Expression im Stroma-Äquivalent**

Der Einfluss von Typ I-Collagen auf die Myofibroblastendifferenzierung der HCK wurde anhand des serumhaltigen und serumfreien Stroma-Modells untersucht. Dazu wurden die Modelle nach dreitägiger Vorinkubation mit TGF $\beta$ 1 stimuliert und für weitere drei Tage bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurden die im Stroma inkorporierten Keratocyten durch Collagenase-Verdauung aus dem Collagengel herausgelöst, lysiert und der Westernblot-Analyse auf  $\alpha$ -SMA unterzogen. Parallel dazu wurden dieselben Zellen als Kontrolle in 6-Loch-Platten ausgesät und den Konstrukten analog behandelt.

Bei der Versuchsdurchführung wurde darauf geachtet, dass die Zelldichte in der Stroma-Matrix mit der Aussaat-Dichte der Monolayerkultur auf Kunststoff-Lochplatten vergleichbar war.

**Stimulation der Keratocyten im Stroma.** Es wurden sowohl serumhaltige als auch serumfreie Stroma-Äquivalente in 10 mm Zellkultureinsätzen rekonstruiert, wobei hier die doppelte Gelmenge mit  $1 \times 10^6$  HCKo bzw.  $1 \times 10^6$  HCKCa verwendet wurde. Die Zellzahl musste im Vergleich zum Original-Konstrukt um den Faktor 10 erhöht werden, um nach der Zell-Lyse eine für die Westernblot-Analyse ausreichend große Proteinmenge zu erhalten. Die Modelle wurden einzeln in 6-Loch-Platten platziert und für drei Tage im entsprechenden Medium submers kultiviert. Am Tag vier wurde nach einem Mediumwechsel die Hälfte der Konstrukte mit TGF $\beta$ 1 stimuliert, indem der Wachstumsfaktor dem frischen, das Konstrukt umgebenden Medium in einer Konzentration von 2 ng/ml zugesetzt wurde.

**Isolierung der Keratocyten aus dem Stroma-Gel.** Für die Collagen-Verdauung wurde zunächst eine 10:1 Mischung aus Collagenase (2,5 mg/ml in PBS) und Trypsin (0,5% in PBS) hergestellt. Die Stroma-Konstrukte wurden aus den Zellkultureinsätzen herausgelöst und in jeweils 2 ml der Verdauungs-Lösung in 50 ml Zellkulturröhrchen bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf dem Schüttler inkubiert, bis sich die Collagen-Matrix vollständig zersetzt hatte. Die so entstandene Keratocytensuspension wurde bei  $300 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 min zentrifugiert und zweimal in eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend der Westernblot-Analyse auf  $\alpha$ -SMA unterzogen.

### 2.2.6.4 Analyse der Protein-Expression

#### Zellyse mit RIPA-Puffer

Zur Gewinnung des Zellysats wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und nach Zugabe des Lysepuffers auf Eis für 5 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 Abschaben der Zellen von der Lochplatte und Überführung des Zellysats in ein Eppendorfgefäß wurden die restlichen Zellbestandteile bei 4 °C und 10.000 g für 30 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden direkt für die Westernblot-Analyse verwendet.

#### Proteinbestimmung

Die Quantifizierung des Proteingehalts der einzelnen Zellysate erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Bradford. Dabei bewirkt an Protein gebundenes Coomassieblau einen Farbumschlag von braunrot nach braungrün, der bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt wird. Anhand verschiedener BSA-Konzentrationen (0-20 µg) wurde eine Standardkurve bei 595 nm erstellt. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung von 5 µl Lysat, welches zuvor in 95 µl Aqua bidest verdünnt und mit 1 ml Bradford-Reagenz versehen worden war. Anhand der Extinktionswerte der BSA-Konzentrationen wurde eine Standardkurve durch Regressionsanalyse ermittelt und der Proteingehalt der Proben anhand folgender Gleichung bestimmt:

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

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

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

Die Proteinmenge ergibt sich wie folgt:

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

#### Probenaufbereitung der Proteinlysate

Für die Western Blot-Analyse wurden die, einer Proteinmenge von 5-20 µg äquivalenten Volumina des Lysats im Verhältnis 2:1 mit dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer vermischt, dem zuvor das reduzierende Agens Dithiothreitol (DTT) zur Spaltung der Disulfidbrücken zugesetzt worden war. Um die Proteine zu denaturieren wurden die Proben

anschließend für 2,5 min auf 95°C erhitzt und entweder direkt für die Gelelektrophorese verwendet oder für die Analyse zu einem späteren Zeitpunkt bei -80°C gelagert.

### **SDS-Gelelektrophorese**

Die Proben wurden unter denaturierten und reduzierenden Bedingungen anhand ihres Molekulargewichts in 7,5-12,5%igen Polyacrylamid-Trenngelen aufgetrennt. Diesen waren 5%ige Polyacrylamid-Sammelgele vorgeschaltet. Die Elektrophorese fand bei 35 mA im Sammelgel und bei 55 mA im Trenngel in einer mit 500 ml Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer statt.

### **Westernblot-Analyse**

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden zur Immundetektion auf Polyvinyliden-difluorid (PVDF)-Membranen übertragen, die zunächst zur Gewährleistung eines optimalen Transfers mit Methanol hydrophobisiert und zusammen mit dem Gel in Blotpuffer equilibriert worden waren.

Der Transfer erfolgte in einem mit 1100 ml Blotpuffer gefüllten Tankblot bei 100 mA über Nacht. Im Anschluss wurde die Membran zur Absättigung der unspezifischen Bindungen eine Stunde durch Schütteln in einer 5%igen Magermilchlösung in TBST bei 37°C geblockt und danach dreimal mit TBST-Puffer für 5 min bei RT gewaschen. Zur spezifischen Markierung des Zielproteins erfolgte die Behandlung mit einer 4000fachen Verdünnung des primären, monoklonalen Antikörpers gegen  $\alpha$ -SMA (Anti- $\alpha$ -SMA) in Aqua bidest für eine Stunde bei RT auf dem Schaukelschüttler. Danach wurde die Lösung des Primärantikörpers entfernt und die Membran erneut dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion durch Inkubation mit einem 1:1000 verdünnten, Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten, Anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper in Blocklösung für eine Stunde bei RT.

Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer wurden die Antikörper-markierten Proteine mit einem Lumineszenzfarbstoff (Verdünnung 1:20) sowie Peroxid-Lösung (Verdünnung 1:20) aus dem Lumiglo-Kit<sup>®</sup> nach Angaben des Herstellers detektiert. Die Bereiche, in denen der sekundäre Antikörper gebunden worden war, zeigten eine Chemolumineszenz, die einen lichtempfindlichen Film in einer Expositionskassette bei Kontakt schwarz färbte.

## 2.2.7 Untersuchung der Matrixkontraktion an Stroma-Äquivalenten

Analog zur Untersuchung der  $\alpha$ -SMA-Expression im Stroma-Äquivalent wurde die Fähigkeit der in das Stroma eingebetteten HCK untersucht, abhängig von ihrem Differenzierungsstatus die sie umgebende Gelmatrix zu kontrahieren.

Wie bereits beschrieben wurden dazu serumhaltige sowie serumfreie Modelle nach dreitägiger Vorinkubation mit TGF $\beta$ 1 stimuliert und für weitere drei Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Tag sechs wurden an einem Olympus SZX12 Stereomikroskop mit ColorView IIIu Digitalkamera Photos der kontrahierten Gele erstellt und mit der zugehörigen cell<sup>A</sup> Bildanalyse-Software digital verarbeitet.

Die Quantifizierung der individuellen Gel-Fläche erfolgte mithilfe der AxioVision Software von Zeiß, wobei hier die Fläche in Pixel<sup>2</sup> ausgewertet wurde.

Die jeweilige Kontraktion errechnete sich aus der Fläche des kontrahierten Gels im Verhältnis zur Durchschnittsfläche der unstimulierten serumfreien KGM+Ca-Gele, welche keine Kontraktion aufwiesen:

$$\text{Gelkontraktion}[\%] = 100 - \left( \frac{\text{Fläche}(\text{kontrahiertes Gel}) \times 100}{\text{MWFlächen}(\text{KGM} + \text{Ca Gele} - \text{TGF}\beta)} \right)$$

Jedes Matrixkontraktions-Experiment wurde viermal unabhängig durchgeführt, wobei pro Versuch zwei bis sechs Stroma-Gele ausgewertet wurden. Der Mittelwert der Matrixkontraktion wurde für jeden Versuchsdurchgang nach der Formel für das gewichtete arithmetische Mittel berechnet:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n \omega_i \times x_i}{\sum_{i=1}^n \omega_i}$$

## 2.2.8 Untersuchungen zur Viabilität des EPI- und SE-Modells

### 2.2.8.1 ET<sub>50</sub>-Bestimmungen

Um die Verletzungsantwort des einfachen EPI-Modells mit der des komplexeren SE-Modells zu vergleichen, wurden beide Modelle gegenüber zwei Modellsubstanzen mit bekanntem Irritationspotential, 0,3% TritonX-100 und 0,1% Benzalkoniumchlorid (BAC) exponiert.

Anschließend wurde die Gewebe-Viabilität anhand eines MTT-Reduktionsassays ermittelt und als Endpunkt die sogenannte „ET<sub>50</sub>“ ermittelt. Dieser Endpunkt ist als diejenige Expositionsdauer in Minuten definiert, welche in den behandelten Konstrukten eine Reduktion des MTT-Metabolismus um 50% zur Folge hat.

Die Versuchsbedingungen der im Folgenden beschriebenen MTT ET<sub>50</sub>-Untersuchungen orientieren sich an der Versuchsvorschrift des EpiOcular<sup>TM</sup>-Augen-Irritations-Assays (Stern et al., 1998).

**Vorbereitung der Gewebe.** Für jeden Versuchsdurchgang wurden die EPI- und SE-Modelle wie unter 2.2.2 beschrieben in 10 mm Zellkultureinsätzen rekonstruiert und zur Reifung für 14 Tage in KGM+++Medium kultiviert. Vor Versuchsbeginn wurden die Konstrukte nach Absaugen des Mediums zweimal mit PBS auf der Außenseite des Kultureinsatzes gewaschen. Für jedes Expositions-Zeitintervall wurden drei der Konstrukte in eine eigene, mit 0,9 ml KGM+Ca-Medium/Loch befüllte 6-Loch-Platte überführt.

**Exposition der Gewebe für die ET<sub>50</sub>-Bestimmung.** Zu sechs verschiedenen Zeitpunkten wurde die Oberfläche von jeweils drei Geweben mit 100 µl TritonX-100 0,3%, bzw. BAC 0,1% benetzt und für die festgelegte Expositionsdauer bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Jeder Applikationszeitpunkt wurde so gewählt, dass nach dem Ende der Exposition alle Konstrukte gleichzeitig dem MTT-Test unterzogen werden konnten. Die Wahl der individuellen Expositionsintervalle orientierte sich bei jedem Versuch an dem für die Testsubstanz zu erwartenden ET<sub>50</sub>-Wert. Jeweils drei Konstrukte pro Charge wurden über den maximalen Zeitraum mit 100 µl Aqua bidest inkubiert, um einen Negativkontrollwert - entsprechend einer Ausgangs-Viabilität von 100% - zu erhalten.

Am Ende der Exposition wurde die Testsubstanz aus den Zellkultureinsätzen abgekippt und die Modelle durch dreimaliges Befüllen und Dekantieren der Einsätze mit PBS gewaschen. Anschließend wurde jedes Konstrukt für zehn Minuten in 5 ml vorgewärmtem KGM+Ca-Medium bei 37°C getränkt, um eventuell absorbiertes Testmaterial vollständig zu entfernen.

**MTT-Reduktionsassay.** Während dieser zehnmütigen Postinkubation wurde eine 24-Loch-Platte entsprechend der Anzahl der Konstrukte mit 300 µl MTT-Lösung (1 mg/ml in KGM+Ca-Medium)/Loch befüllt. Nach dem Entfernen des Mediums aus den Zellkultureinsätzen durch Dekantieren, wurden alle Gewebe unter Lichtausschluss gleichzeitig in diese MTT-Platte überführt und anschließend für drei Stunden bei 37°C und



5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss wurden die Konstrukte aus der 24-Loch-Platte entfernt, durch dreimaliges Waschen mit PBS, wie bereits beschrieben, von restlicher MTT-Lösung befreit und kurz auf Papier getrocknet. Die Formazan-Extraktion erfolgte in Isopropanol über Nacht im Dunkeln bei RT. Hierzu wurden die Modelle in 24-Loch-Platten überführt und mit 2 ml Isopropanol überschichtet. Die Lochplatte wurde mit Parafilm versiegelt, um die Verdampfung des Lösungsmittels zu verhindern. Am folgenden Tag wurde das Formazan-Extrakt aus jedem Zellkultureinsatz in das entsprechende Loch dekantiert und durch wiederholtes auf- und ab-pipettieren durchmischt. Pro Einsatz wurden drei 200 µl Aliquots der Lösung in eine 96-Loch-Platte überführt und die Absorption mit einem Fluostar Optima Platerreader bei 570 nm gemessen. Als Leerwert diente Isopropanol.

**Bestimmung der ET<sub>50</sub>.** Zunächst wurde für jeden Expositionszeitraum anhand der Absorptionsdaten die Gewebe-Viabilität der einzelnen Konstrukte nach folgender Formel berechnet:

$$Viabilität[\%] = 100 \times \left( \frac{Absorption(\text{behandeltesKonstrukt})}{Absorption(\text{Negativkontrolle})} \right)$$

Die Mittelwerte der Viabilitätsdaten wurden anschließend linear gegen die entsprechenden Expositionszeiten aufgetragen. Der Kurvenverlauf wurde durch nichtlineare Regression ermittelt. Der als ET<sub>50</sub> bezeichnete Zeitpunkt wurde durch Interpolation der Zeitdaten an dem Punkt der Regressionskurve berechnet, an dem die Gewebe-Viabilität im Vergleich zur Negativkontrolle um 50% gesunken war.

### 2.2.8.2 Untersuchungen zur Toxizität von Fluorescein

Um eine Aussage zum Irritationspotential von Fluorescein treffen zu können, welches bei Seeber et al. für Penetrationsstudien am EPI- und SE-Modell verwendet wurde (Seeber et al. 2008), erfolgte die Untersuchung der Viabilität mittels MTT-Test nach Exposition mit dem genannten Stoff. In jedem Versuchsdurchgang wurden drei EPI- bzw. SE-Modelle mit 100 µl Fluorescein (10 mM) sowie jeweils drei Modelle mit 100 µl Aqua bidest als Negativkontrolle für 150 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Rekonstruktion und Vorbereitung der Konstrukte sowie Exposition und MTT-Reduktionsassay wurden nach derselben Methodik wie die ET<sub>50</sub>-Bestimmungen durchgeführt.

### 2.2.8.3 Untersuchungen zur Regenerationsfähigkeit der Cornea-Modelle

Zuletzt wurde vergleichend untersucht, inwiefern EPI- und SE-Modelle in der Lage waren, sich nach einer Schädigung durch TritonX-100 0,3% über zwei Tage hinweg zu regenerieren. Die Viabilität wurde an jeweils einem Drittel der Gewebe sofort nach Exposition, nach 24 und nach 48 Stunden mittels MTT-Reduktionsassay untersucht. Als Negativkontrolle dienten mit Aqua bidest behandelte Gewebe.

Zunächst wurden 18 EPI-Modelle sowie 18 SE-Modelle, wie bereits bei den  $ET_{50}$ -Untersuchungen beschrieben, für die Chemikalien-Exposition vorbereitet. Die Exposition mit 100  $\mu$ l TritonX-100 0,3% erfolgte an den EPI-Modellen für drei Minuten und an den SE-Modellen für neun Minuten. Diese Inkubationszeiten entsprachen der zuvor anhand der  $ET_{50}$ -Werte ermittelten  $ET_{80}$  des jeweiligen Modell-Typs. Als Kontrolle wurde die Hälfte der Konstrukte des jeweiligen Typs parallel mit Aqua bidest behandelt.

Am Ende der Exposition wurde die Testsubstanz aus den Zellkultureinsätzen abgekippt und wie bereits bei den  $ET_{50}$ -Untersuchungen beschrieben, mit PBS gewaschen. Auch die zehnmütige Postinkubation zur Entfernung von evtl. anhaftender Testsubstanz sowie die folgenden Viabilitätsuntersuchungen erfolgten analog:

Jeweils drei der mit TritonX-100 behandelten Gewebe sowie drei Kontroll-Gewebe wurden direkt nach der Exposition dem MTT-Reduktionsassay unterzogen. Die restlichen Konstrukte wurden in neue, 0,9 ml frisches Kulturmedium/Loch enthaltende 6-Loch-Platten transferiert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> rekultiviert. Nach 24 und 48 Stunden fand an jeweils drei dieser Gewebe ebenfalls die Viabilitätsbestimmung mittels MTT-Assay statt.

### 2.2.9 Statistik

Die FACS-Untersuchungen wurden als Vierfachbestimmungen durchgeführt wobei jeder Versuch zweifach wiederholt wurde. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden mindestens als Zweifachbestimmungen vorgenommen und mindestens dreifach wiederholt. Westernblot-Untersuchungen wurden mindestens dreifach mit jeweils zwei Protein-Proben durchgeführt.

Die  $ET_{50}$ -Bestimmungen wurden mit jeweils drei Gewebe-Proben pro Zeitintervall vorgenommen und mindestens zweifach wiederholt.

Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte (MW) angegeben. Als Maß für die Genauigkeit wurde die Standardabweichung vom Mittelwert ( $MW \pm SD$ ) berechnet.

Das Matrixkontraktions-Experiment wurde dreimal wiederholt, aufgrund der verschiedenen Stichprobengrößen wurden hier der gewichtete arithmetische Mittelwert und die gewichtete Standardabweichung nach oben genannter Formel berechnet.

### **3    ERGEBNISSE**

---

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Charakterisierung der Endothel-Zelllinie EC

##### 3.1.1 Einfluss verschiedener Kulturmedien auf die Proliferation der EC-Zelllinie

Wichtigste Voraussetzung für die ursprünglich geplante Optimierung des Zorn-Kruppa-Modells der humanen Cornea war die Etablierung eines gemeinsamen Kulturmediums für die EC-, HCK- und HCE-Zelllinie. Aus diesem Grund wurde zunächst das Wachstum der EC-Zelllinie in vier verschiedenen Medien in Abhängigkeit vom Serum- und Calciumgehalt durchflusszytometrisch untersucht. Der Anteil der nekrotischen Zellen wurde durch Anfärbung der Proben mit Propidiumiodid (PI) bestimmt.

In den serumhaltigen Medien, Medium F99 mit 4% FKS und Advanced Medium mit 2% FKS, proliferierten die EC am stärksten, wobei eine klare Abhängigkeit vom Serumgehalt bestand. Das mit 4% FKS versetzte Standard-EC-Medium F99 war allen anderen Medien überlegen. Die Proliferation in den serumfreien Medien KGM und KGM+Ca erfolgte sehr langsam, an Tag zwölf hatte sich die Zellzahl lediglich verdreifacht. Der erhöhte Calciumgehalt im KGM+Ca-Medium (0,5 mM CaCl<sub>2</sub>) hatte keinen wachstumsfördernden Effekt auf die EC (**Abb. 7A**).

Diese Ergebnisse spiegelten sich in umgekehrter Weise im Anteil der mit PI angefärbten, nekrotischen Zellen wider. Dieser blieb in den serumhaltigen Medien über den gesamten Beobachtungszeitraum sehr niedrig: In Medium F99 4% und Adv + 2%-Medium betrug der nekrotische Zellanteil in Relation zum lebenden Anteil anfangs 2% und erreichte an Tag vierzehn ein Maximum von 4%, bzw. von 7%.

Wie erwartet stieg jedoch die Anzahl der toten Zellen im serumfreien KGM-Medium von anfangs 3% auf 26% und in KGM+Ca-Medium von 2% auf 23% an (**Abb. 7B**).

MEDIUM	BASISMEDIUM	ZUSÄTZE
<b>F99 4%</b>	Medium 199/ Ham's F12 (1:1)	Antibiotika-Antimykotika-Lösung 1% (v/v) <b>FKS 4% (v/v)</b>
<b>Adv + 2%</b>	Advanced DMEM/F12	Insulin 5 µg/ml, EGF 10 ng/ml L-Glutamin 2 mM Antibiotika-Antimykotika-Lösung 1% (v/v) <b>FKS 2% (v/v)</b>
<b>KGM</b>	Keratinozyten- Basalmedium (KBM) enthält <b>0,15 mM CaCl<sub>2</sub></b>	BPE 30 µg/ml, hEGF 0,1 ng/ml, Hydrocortison 0,5 µg/ml, Insulin 5 µg/ml , Amphotericin B 50 ng/ml, Gentamicinsulfat 50 µg/ml
<b>KGM+Ca</b>	KGM-Medium	<b>CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM</b>
<b>KGM+++</b>	KGM-Medium	<b>Hydrocortison 1 µg/ml</b> <b>Ascorbinsäure 50 mg/ml</b> <b>Retinolsäure 1,5 ng/ml</b> <b>CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM</b>

Tabelle 3

Zusammensetzung der Kulturmedien, in denen die Proliferation der EC und HCK untersucht wurde.

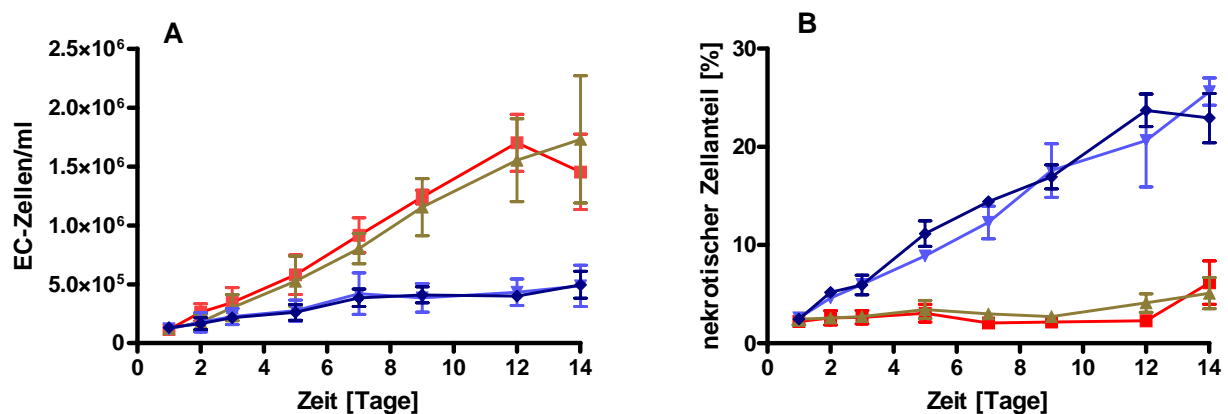


Abbildung 7

FACS-Untersuchungen zu **A**: Proliferation und **B**: Nekrose der EC-Zelllinie. Der Einfluss des Serumanteils sowie des Calciumgehalts wurde in Medium F99 4% (■), Adv + 2%-Medium (▲), KGM-Medium (▼) und KGM+Ca-Medium (●) untersucht. Der nekrotische Zellanteil wurde aus dem Verhältnis der PI-gefärbten Zellen zur Anzahl nicht-angefärbter, viable Zellen berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n = 3 unabhängigen Versuchen, jeder Versuch wurde vierfach durchgeführt.

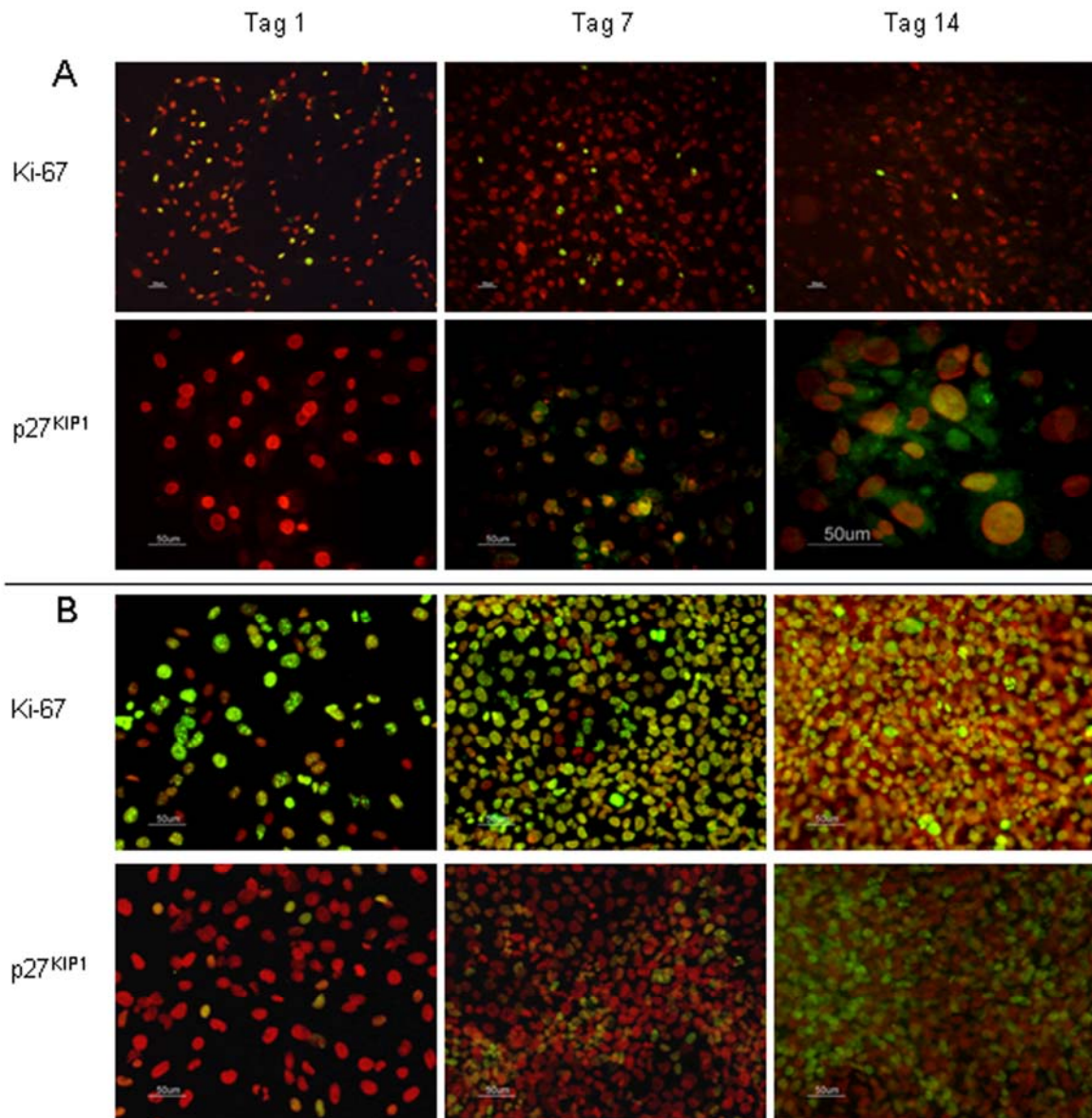
### 3.1.2 Untersuchungen zur Kontaktinhibition der EC-Zelllinie

Im Zuge der ursprünglich geplanten Etablierung eines dreischichtigen Kompletmodells der menschlichen Augenhornhaut sollte überprüft werden, ob die durch SV40-Transfektion immortalisierten EC in der Lage sind, einen organotypischen Zell-Monolayer zu bilden. Dies geschieht bei primären Endothelzellen bekanntermaßen durch gegenseitige Kontaktinhibition unter Beteiligung der Kernproteine P27<sup>KIP1</sup> und Ki-67. Nach Erreichen der Konfluenz führen eine gesteigert Expression von P27<sup>KIP1</sup> sowie die Degradation von Ki-67 zur Arretierung des Zellzyklus und damit zum Proliferationsstopp (Joyce et al., 1996b).

Die EC wurden in verschiedenen Phasen der Konfluenz, an Tag eins, sieben und vierzehn nach der Aussaat auf Kammerobjektträgern immunocytochemisch, unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper auf Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 sowie des Inhibitionsmarkers p27<sup>KIP1</sup> untersucht. Die Visualisierung erfolgte durch einen FITC-gekoppelten, grünen Sekundärantikörper. Zur Darstellung der Zelldichte wurden zudem die Zellkerne mit PI rot angefärbt. Als Kontrolle dienten primäre Endothelzellen.

Am Tag eins nach der Aussaat der primären Endothelzellen konnte in der überwiegenden Anzahl der Zellkerne Ki-67 nachgewiesen werden. Mit zunehmender Zelldichte nahm die Expression des Proliferationsmarkers deutlich ab und war am Tag vierzehn, nachdem sich eine konfluente einlagige Endothelzellschicht gebildet hatte, kaum noch sichtbar. Im Gegensatz dazu wurde der, die Kontaktinhibition induzierende Marker p27<sup>KIP1</sup> in den subkonfluenten Zellen am Tag eins gar nicht, mit ansteigender Zelldichte an den Tagen sieben und vierzehn jedoch zunehmend detektiert. Innerhalb des vierzehntägigen Untersuchungszeitraumes hatte sich eine konfluente Einzelschicht hexagonaler Zellen ausgebildet, in der kaum noch KI-67-gefärbte Zellen nachzuweisen waren, p27<sup>KIP1</sup> jedoch hochgradig exprimiert wurde (**Abb. 8A**).

Die immortalisierten EC zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum eine starke KI-67-Expression, die auch mit zunehmender Zelldichte nicht abnahm. P27<sup>KIP1</sup> konnte von Beginn an detektiert werden, seine Expression schien zudem wie bei den primären Zellen bis Tag vierzehn zuzunehmen. Anhand der mit PI rot angefärbten Zellkerne ist jedoch zu erkennen, dass bei den EC-Zellen keine Monolayer-Formation stattgefunden hatte. Vielmehr hatten sich nach zwei Wochen mehrere, sich überlagernde Zellschichten mit Zellclustern gebildet (**Abb. 8B**).



**Abbildung 8**

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Kontaktinhibition in **A**: primären Endothelzellen und **B**: EC. Die Visualisierung der primären Antikörper gegen Ki-67 bzw. p27<sup>KIP1</sup> erfolgte durch einen FITC-gekoppelten, grün fluoreszierenden Sekundärantikörper. Die Zellkerne wurden mit PI rot angefärbt. Die Bilder der Zelllinie sind charakteristisch für drei weitere Versuche, die der primären Zellen für einen weiteren Versuch.

### 3.1.3 Einfluss verschiedener Kulturmedien auf den Transmembranwiderstand der EC-Kultur

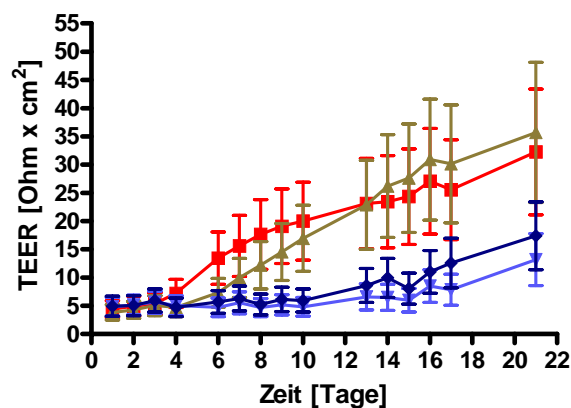
Das Wachstum sowie die Fähigkeit zur Monolayer-Formation der EC in verschiedenen Medien wurde durch TEER-Messungen auf Zellkultur-Membraneinsätzen untersucht. Hierbei nutzt man die Tatsache, dass mit fortschreitender Proliferation die Zelldichte und damit



gleichzeitig der Widerstand über der EC-besiedelten Polycarbonat-Membran zunehmen. Parallel zu den TEER-Messungen wurde die Zellformation unter dem Lichtmikroskop beobachtet.

In den serumhaltigen Medien F99 4% und Adv + 2% stieg der Widerstand deutlich stärker an als unter serumfreien Bedingungen, was die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Proliferationsuntersuchungen bestätigte (**Abb. 9**). Die lichtmikroskopischen Untersuchungen ergaben, dass ab Tag vier die Zellen übereinander zu wachsen begannen und dass diese Multilayer-Bildung bis Tag 21 anhielt.

Unter serumfreien Bedingungen blieben die Widerstandswerte über einen Zeitraum von zehn Tagen beinahe auf Anfangsniveau und stiegen erst ab Tag elf leicht an (**Abb. 9**). Die lichtmikroskopischen Untersuchungen während dieses Zeitraums ergaben, dass die EC auch in KGM- und KGM+Ca-Medium nicht zur Formation eines Monolayers fähig waren. In der subkonfluenten EC-Kultur bildeten sich zunächst einzelne Zell-Cluster mit großen Zwischenbereichen aus. Ab Tag zehn begannen diese Zellhaufen dicht zusammenzuwachsen, was sich in einem Anstieg der TEER-Werte widerspiegelte. Hier konnte im KGM+Ca-Medium eine stärkere Zunahme der Widerstandswerte als im einfachen KGM-Medium beobachtet werden (**Abb. 9**).



**Abbildung 9**

Untersuchungen zum transmembranären Widerstand der EC-Kultur in verschiedenen Medien. Der Einfluss des Serumanteils sowie des Calciumgehalts auf die Zelldichte wurde in Medium F99 4% (—■—), Adv + 2%-Medium (—▲—), KGM-Medium (—▼—) und KGM+Ca-Medium (—●—) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 3$  unabhängigen Versuchen, jeder Versuch wurde vierfach durchgeführt.

## 3.2 Charakterisierung der Keratocyten-Zelllinie HCK

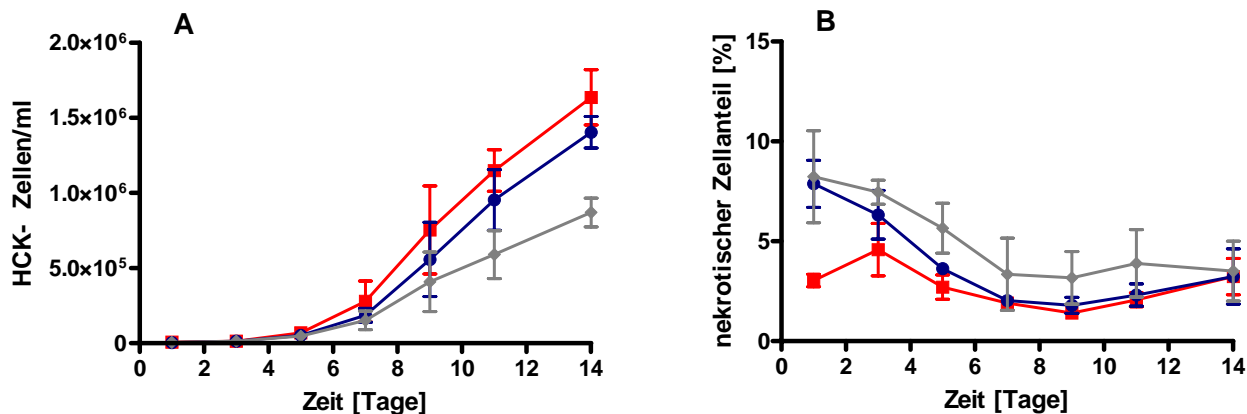
### 3.2.1 Charakterisierung der HCK-Zelllinie in der Monolayerkultur auf Kunststoffzellkulturplatten

#### 3.2.1.1 Einfluss verschiedener Kulturmedien auf die Proliferation der HCK-Zelllinie

Aufgrund der Bestrebung, ein gemeinsames, möglichst serumfreies Kulturmedium für die HCK- und HCE-Zelllinie zu finden, wurde zunächst das Wachstum der HCK im Standard-Kulturmedium F99 5% sowie in den serumfreien Medien KGM+Ca und KGM+++ durchflusszytometrisch untersucht. Vor der FACS-Untersuchung wurden die Zellen für mindestens zehn Passagen an die serumfreien Bedingungen adaptiert. Wie bei den EC wurde der nekrotische Zellanteil durch Anfärbung der Proben mit PI bestimmt.

In serumhaltigem F99 + 5%-Medium proliferierten die HCK stärker als unter serumfreien Bedingungen. Die Anzahl der HCKo hatte sich an Tag vierzehn um das 206-fache, gegenüber der Zellzahl an Tag eins erhöht (Tag 1: 7953 HCKo/ml; Tag 14: 1636648 HCKo/ml). Die Menge der HCK+Ca stieg innerhalb des zweiwöchigen Untersuchungszeitraums auf das 281-fache (Tag 1: 4961 HCK+Ca/ml; Tag 14: 1403817 HCK+Ca/ml), wobei die Gesamtzellzahl hinter derjenigen der serumhaltigen Kultur zurückblieb. Verglichen mit dem Wachstum der ebenfalls serumfrei kultivierten, an KGM+++-Medium adaptierten HCK+++ war die Proliferation der HCK+Ca jedoch deutlich erhöht. Die Zahl der HCK+++ vervielfachte sich lediglich um das 144-fache der eingesäten Zellmenge (Tag 1: 6024 HCK+++ /ml; Tag 14: 870122 HCK+++ /ml) (**Abb. 10A**).

Wie zu erwarten zeigten die HCK+++ die höchste Nekroserate, gefolgt von HCK+Ca und HCKo. Der Anteil der nekrotischen und spätapoptotischen Zellen an der Gesamtkultur war jedoch in allen drei Medien sehr gering und lag durchweg unter 10% (**Abb. 10B**). Die unerwartete Abnahme der Nekrose-Werte mit der Zeit könnte ein Artefakt sein und an einem unbeabsichtigten Ablösen der toten Zellen während des Waschvorgangs liegen, der der Probenaufbereitung für die FACS-Untersuchung voranging.



**Abbildung 10**

FACS-Untersuchungen zu **A**: Proliferation und **B**: Nekrose der HCK-Zelllinie. Der Einfluss des Serumanteils sowie verschiedener Medium-Zusätze wurde in Medium F99 5% (—■—), KGM+Ca-Medium (—●—) und KGM+++ -Medium (—◆—) untersucht. Der nekrotische Zellanteil wurde aus dem Verhältnis der PI-gefärbten Zellen zur Anzahl nicht-angefärbter, d.h. viabler Zellen berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n = 3 unabhängigen Versuchen, jeder Versuch wurde vierfach durchgeführt.

Zellen	Medium	Zellzahl Tag 1 (n Tag1) [HCK/ml]	Zellzahl Tag 14 (n Tag14) [HCK/ml]	n Tag14/ n Tag1
<b>HCKo</b>	F99 5%	7953	1 636 648	<b>206</b>
<b>HCK+Ca</b>	KGM+Ca	4961	1 403 817	<b>281</b>
<b>HCK+++</b>	KGM+++	6024	870 122	<b>144</b>

**Tabelle 4**

Zusammenfassung der Ergebnisse der FACS-Proliferations-Untersuchungen nach Adaption der HCK an drei verschiedene Medien. [n Tag14/ n Tag1] gibt das Vielfache der Zellzahl an Tag 14 gegenüber der Zellzahl an Tag 1 wieder.

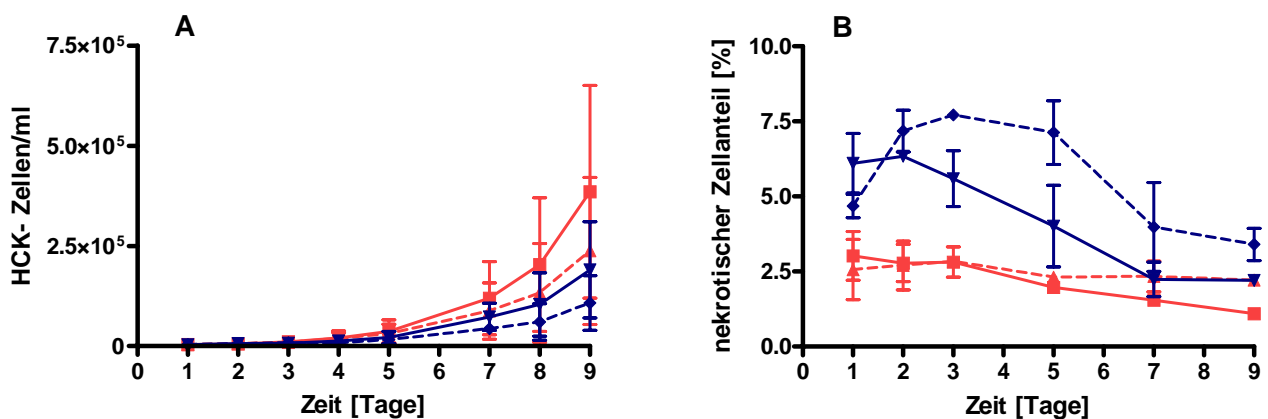
### 3.2.1.2 Einfluss von TGFβ1 auf die Proliferation der HCK-Zelllinie

Bis heute herrscht in der Literatur Uneinigkeit darüber, in welcher Weise der Wachstumsfaktor TGFβ die Proliferation cornealer Keratocyten beeinflusst. TGFβ1 diente in den Untersuchungen zum Phänotyp der HCK als Stimulans für die Myofibroblasten-Differenzierung. Deshalb wurde ergänzend untersucht, welchen Einfluss TGFβ1 in einer Konzentration von 0,2 ng/ml auf die Keratocyten-Proliferation unter serumhaltigen und serumfreien Bedingungen hatte.

Wie bereits gezeigt, wuchsen die HCKo in serumhaltigem F99 5%-Medium insgesamt deutlich besser als die in serumfreiem KGM+Ca-Medium kultivierten HCK+Ca. Die Anzahl der unstimulierten HCKo stieg innerhalb des neuntägigen Versuchszeitraums um das 95-fache (Tag 1: 4030/ml; Tag 9: 385325/ml), die der KGM+Ca um das 52-fache (Tag 1: 3623/ml; Tag 9: 190357/ml).

In beiden Medien zeigte sich eine HCK-Proliferations-Hemmung nach Zusatz von TGFβ1. Die Zellzahl der mit FKS kultivierten HCKo reduzierte sich bis Tag neun durch die Stimulation um 23% im Vergleich zur unstimulierten Kultur. Zu diesem Zeitpunkt betrug sie lediglich das 74-fache der ursprünglichen Menge (Tag 1: 3224/ml; Tag 9: 237572/ml). In der serumfreien Kultur war die Zellzahl an Tag neun durch den Einfluss von TGFβ1 sogar um 52% reduziert. In Relation zur Zellmenge an Tag eins hatten sich die stimulierten HCK+Ca lediglich ver25-facht (Tag 1: 4237/ml; Tag 9: 107532/ml) (**Abb. 11A**).

Die Ergebnisse der Proliferationsuntersuchungen spiegeln sich in den Resultaten der PI-Färbung des nekrotischen bzw. spätapoptotischen Zellanteils wieder. Dieser erschien unter serumfreien Bedingungen gegenüber dem Nekrose-Anteil der serumhaltigen Kultur erhöht. Der Zusatz von TGFβ1 erhöhte die Nekroserate in KGM+Ca-Medium weiter. In serumhaltigem Medium F99 5% war dieser Effekt nicht deutlich zu erkennen (**Abb. 11B**). Der unerwartete Rückgang der Nekroserate mit fortschreitender Proliferation lässt sich wie im vorangegangenen Versuch durch den Verlust der toten Zellen beim Waschen erklären.



**Abbildung 11**

FACS-Untersuchungen zu **A**: Proliferation und **B**: Nekrose der HCK-Zelllinie nach Stimulation mit TGFβ1 (2ng/ml). An Medium F99 5% adaptierte HCKo (—■—) sowie an KGM+Ca-Medium adaptierte HCK+Ca (—●—) wurden nach dem Anwachsen mit dem Wachstumsfaktor stimuliert und parallel zur unstimulierten Kultur über neun Tage hinweg untersucht. Die stimulierten Zellen sind durch gestrichelte Linien dargestellt: HCKo + TGFβ1 (---▲---) bzw. HCK+Ca + TGFβ1 (---◆---). Der nekrotische Zellanteil wurde aus dem

Verhältnis der PI-gefärbten Zellen zur Anzahl der nicht angefärbten, viablen Zellen berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 3 unabhängigen Versuchen, jeder Versuch wurde vierfach durchgeführt.

Zellen	Medium	TGF $\beta$ 1	n Tag1 [HCK/ml]	n Tag9 [HCK/ml]	n Tag9 / n Tag1	Verdopplungszeit [Tage]
<b>HCKo</b>	F99 5%	-	4030	385 325	<b>95</b>	<b>1,154</b>
		+	3224	237 572	<b>74</b>	<b>1,334</b>
<b>HCK+Ca</b>	KGM+Ca	-	3623	190 357	<b>52</b>	<b>1,316</b>
		+	4237	107 532	<b>25</b>	<b>1,471</b>

**Tabelle 5**

Zusammenfassung der Ergebnisse der FACS-Proliferations-Untersuchungen nach Stimulation der HCK mit TGF $\beta$ 1 unter serumhaltigen und serumfreien Bedingungen. [nTag9/ n Tag1] gibt das Vielfache der Zellzahl an Tag 9 gegenüber der Zellzahl an Tag 1 wieder. Aufgrund des exponentiellen Kurvenverlaufs wurden hier zudem die Verdopplungszeiten berechnet.

### 3.2.1.3 Einfluss der unterschiedlichen Kulturbedingungen und TGF $\beta$ 1 auf den Phänotyp der HCK-Zelllinie

Der Phänotyp der Keratocyten-Zelllinie HCK wurde in Abhängigkeit vom Serumgehalt des Kulturmediums sowie nach Stimulation mit TGF $\beta$  untersucht. TGF $\beta$ 1 spielt in den frühen Stadien der cornealen Wundheilung eine wichtige Rolle, indem es unter anderem die Differenzierung der stromalen Keratocyten zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen fördert. Dies geht mit der Ausbildung prominenter Mikrofilament-Bündel einher, die alpha-smooth-muscle-Aktin ( $\alpha$ -SMA) enthalten, ein hochkontraktilen Protein, welches den Wundverschluss ermöglicht (Barry-Lane et al., 1997, Carrington et al., 2006). Ferner behalten primäre Keratocyten unter serumfreien Bedingungen den ruhenden, dendritischen Phänotyp bei (Kirschner et al., 1990), während Serum-Exposition zu einer Differenzierung zu fibroblastoiden Zellen führt (Dahl, 1981, Hassell et al., 1992)

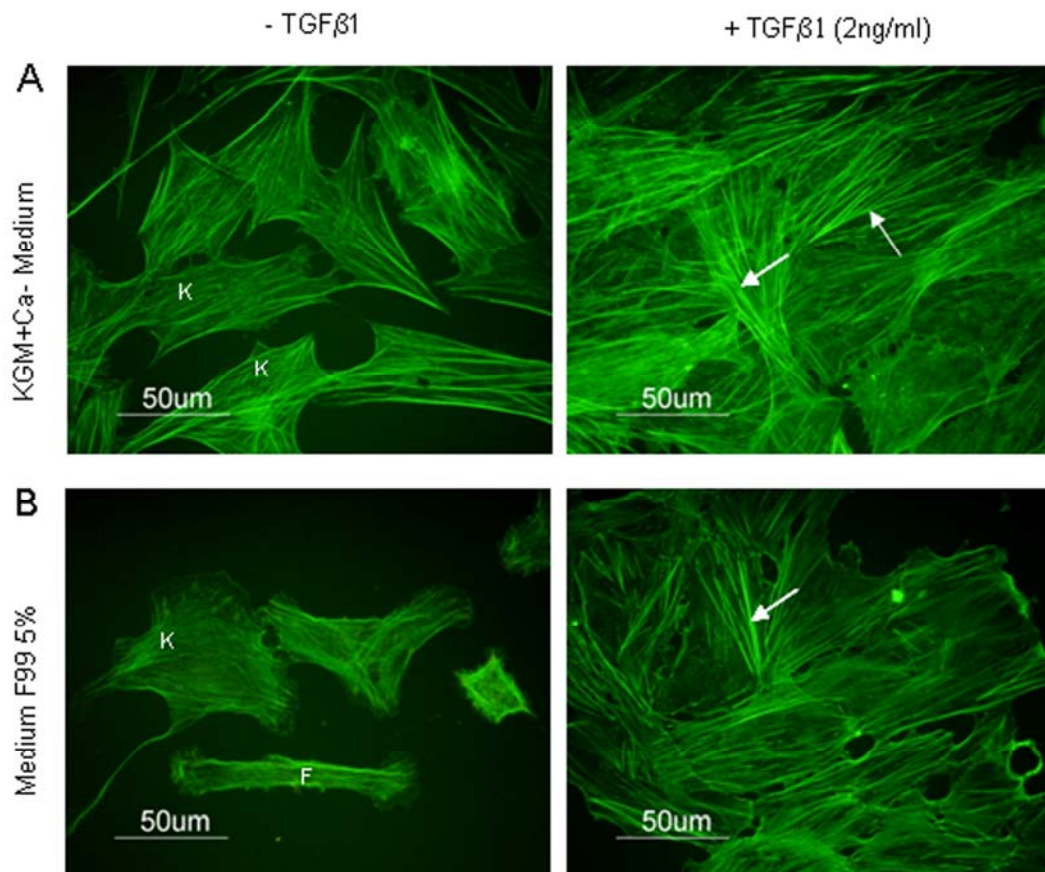
Zur phänotypischen Charakterisierung der HCK-Zelllinie wurden neben der  $\alpha$ -SMA-Expression auch die zelluläre Morphologie, die Organisation des Zytoskeletts sowie die Expression spezifischer Zelladhäsions-Proteine herangezogen, anhand derer sich der aktivierte, Fibroblasten-ähnliche Phänotyp von dem ruhender Keratocyten unterscheiden ließ.

### 3.2.1.3.1 Organisation des Zytoskeletts in Abhängigkeit von Serum und TGFβ1

Der Einfluss von TGFβ1 auf den Differenzierungsstatus der HCK unter serumhaltigen und serumfreien Kulturbedingungen wurde zunächst durch immunocytochemische Untersuchung der intrazellulären F-Aktin-Verteilung nach Anfärben mit Oregon green<sup>®</sup> Phalloidin analysiert.

Unstimulierte HCK+Ca, die für drei Tage im serumfreien KGM+Ca-Medium auf Glasobjekträgern kultiviert worden waren, zeigten die typische dendritische, sternförmige Morphologie ruhender Keratocyten mit kortikal, d.h. überwiegend entlang der Zellmembranen angeordnetem F-Aktin. Auf die dreitägige Stimulation mit TGFβ1 in einer Konzentration von 2 ng/ml reagierten die HCK+Ca mit einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts unter Ausbildung länglicher, spindelförmiger Zellkörper mit prominenten, für aktivierte Zellen typischen, parallel angeordneten Aktin-Stressfasern (**Abb. 12A**).

In der serumhaltigen HCKo-Kultur (Medium F99 5%) konnte man sowohl die typischen dendritischen Strukturen ruhender Keratocyten mit eher kortikal angeordnetem F-Aktin als auch aktivierte, Fibroblasten-ähnliche Zellen mit spindelförmigem Zellkörper und Stressfasern beobachten. Nach TGFβ-Stimulation verschwanden die keratocytären Strukturen vollständig (**Abb. 12B**).



**Abbildung 12**

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des F-Aktin-Zytoskeletts in **A:** serumfrei kultivierten HCK+Ca und in **B:** mit 5% Serum kultivierten HCKo, vor und nach dreitägiger Stimulation mit TGFβ1 (400-fache Vergrößerung). Die mit „K“ bezeichneten Zellen weisen die für ruhende Keratocyten typische dendritische/stellare Struktur mit sich intrazellulär überkreuzenden F-Aktin-Fibrillen auf. „F“ markiert exemplarisch eine Zelle mit fibroblastoidem Phänotyp. Die weißen Pfeile weisen ebenfalls exemplarisch auf typische, parallel zueinander angeordnete Stressfasern aktivierter Zellen hin. Die Bilder sind charakteristisch für vier weitere Versuche.

### 3.2.1.3.2 Expression von Zelladhäsions-Proteinen in Abhängigkeit von Serum und TGFβ1

Die F-Aktin-Organisation deutet darauf hin, dass die Kultivierung in serumhaltigem Medium sowie die Stimulation durch TGFβ1 eine Differenzierung der HCK zur Folge hatte. Auf dieser Basis wurden weitere Untersuchungen zum Phänotyp durch den immunocytochemischen Nachweis spezifischer Zelladhäsions-Proteine vorgenommen, welche entweder als Komplexbestandteile in punktuellen Zell-Substrat-Anhaftungen (fokalen Adhäsionen) und

adhärenten Interzellulärverbindungen (Adhärenz-Verbindungen) von aktivierten Zellen oder in den Gap Junctions ruhender Zellen vorkommen.

HCKo und HCK+Ca wurden dazu einer Doppel-Fluoreszenzfärbung auf Objektträgern unterzogen. Um die zu untersuchenden Proteine im Bereich der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Übergänge besser lokalisieren zu können, wurde das Zytoskelett durch Anfärben von F-Aktin mit Oregon green<sup>®</sup> Phalloidin sichtbar gemacht. Die Junction-Proteine Vinculin,  $\beta$ -Catenin und Connexin-43 selbst wurden unter Zuhilfenahme eines roten Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers dargestellt.

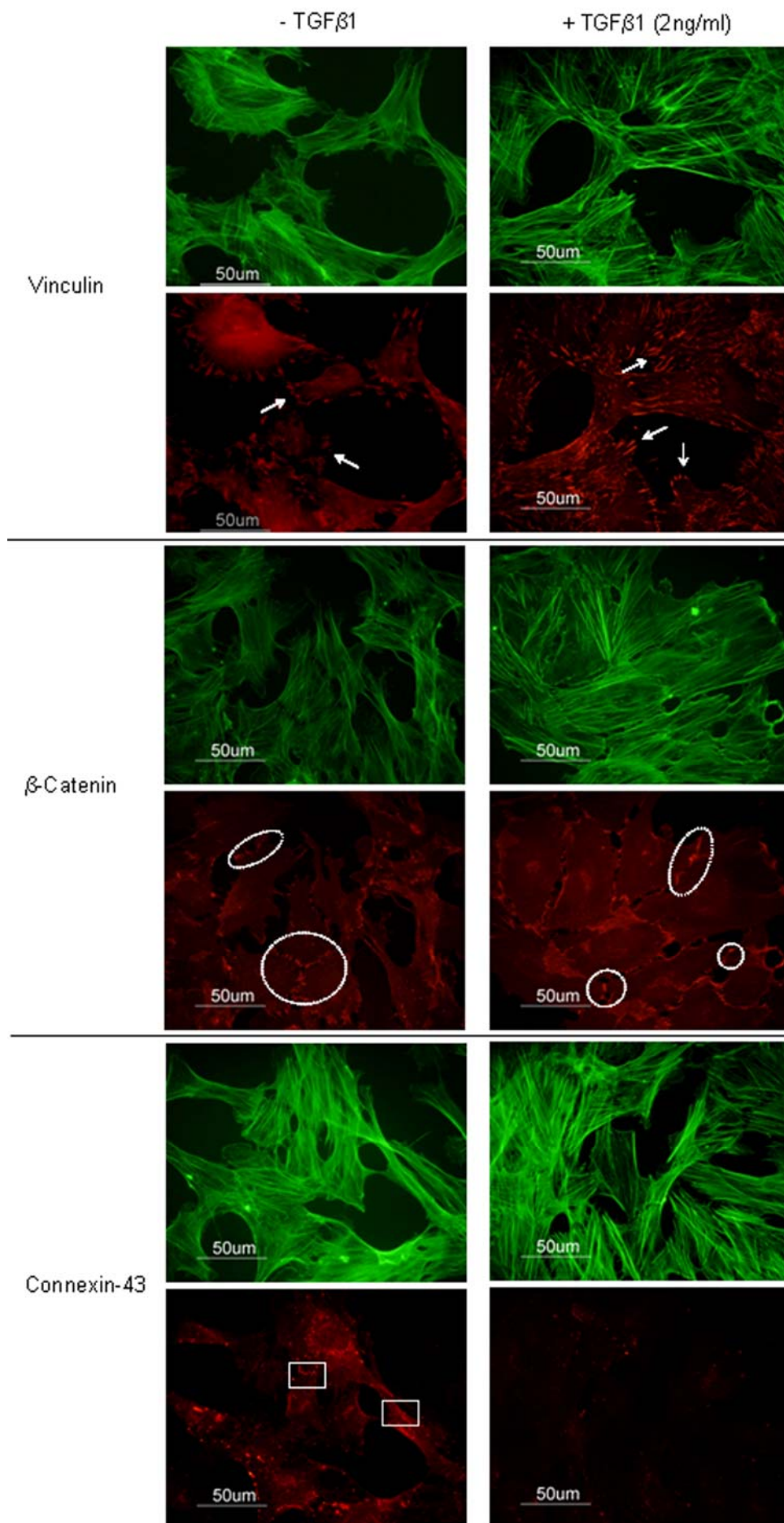
Vinculin, ein Komplexbestandteil von fokalen Adhäsionen und Adhärenz-Verbindungen aktivierter Phänotypen, war in den serumhaltigen HCKo-Kulturen bereits unter unstimulierten Bedingungen deutlich nachzuweisen. Nach dreitägiger TGF $\beta$ 1-Stimulation nahm die Expression von Vinculin vor allem im Bereich der zellulären Anhaftungsstellen auf der Objektträger-Oberfläche sowie an den interzellulären Kontaktpunkten noch weiter punktförmig zu. Diese Ergebnisse spiegelten sich in der Expression und zellulären Lokalisierung von  $\beta$ -Catenin wider, welches als spezifischer Komplexbestandteil von Adhärenz-Verbindungen ebenfalls als Marker für den aktivierten Phänotyp eingesetzt wurde.  $\beta$ -Catenin konnte bereits vor der Stimulation deutlich entlang der interzellulären Grenzen von HCKo detektiert werden. Nach Stimulation mit TGF $\beta$ 1 erhöhte sich sowohl die intrazelluläre als auch die membrangebundene Expression des Proteins.

Das Gap Junction-Protein Connexin-43 konnte teilweise, wie für ruhende Keratocyten charakteristisch, in Form dichter Flecken an den Zell-Zell-Kontakten der serumhaltigen HCKo-Kultur nachgewiesen werden. Ein Großteil des Proteins befand sich hier jedoch intrazellulär. Nach der Stimulation mit TGF $\beta$ 1 ging die Expression von Connexin-43 vollständig zurück (**Abb. 13**), was für eine Differenzierung der Zelle sprach. Diese Ergebnisse deuteten erneut darauf hin, dass die HCKo in ihrem serumhaltigen Aufzuchtmedium bereits ohne Stimulation durch TGF $\beta$  als Mischkultur von aktivierten Fibroblasten oder Myofibroblasten und ruhenden Keratocyten vorlagen.

Im serumfreien KGM+Ca-Medium zeigten die unstimulierten HCK+Ca an ihren Zellrändern weder eine ausgeprägte Vinculin- noch  $\beta$ -Catenin-Färbung, was auf die Abwesenheit von Fokalen Adhäsionen und Adhärenz-Verbindungen schließen ließ. Im Gegensatz dazu wurde das Gap Junction-Protein Connexin-43 in der unstimulierten Kultur hochgradig exprimiert und war überwiegend im Bereich der zellulären Übergänge punktförmig nachzuweisen. Demzufolge lagen die HCK+Ca unter serumfreien Kulturbedingungen überwiegend

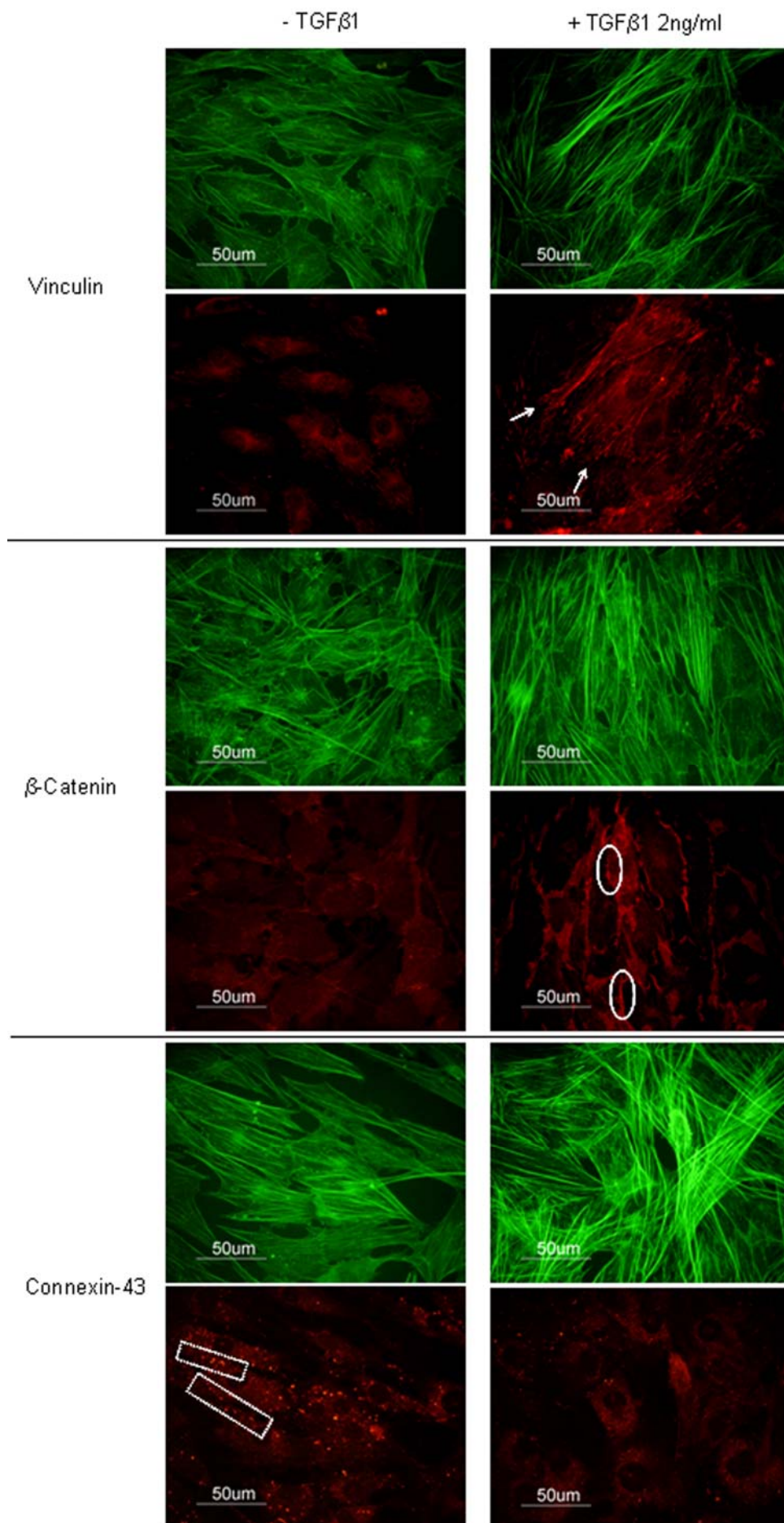


undifferenziert, d.h. als ruhende Keratocyten vor. Nach Stimulation mit TGF $\beta$ 1 kam es wie in Medium F99 5% zu einer deutlichen Aktivierung der Zellen, was anhand der überwiegend im Bereich der Zellränder verstärkten Expression von Vinculin und  $\beta$ -Catenin sowie am fast vollständigen Rückgang der Connexin-43-Expression gezeigt werden konnte (**Abb. 14**).



**Abbildung 13**

Doppel-Fluoreszenzfärbung von Zelladhäsions-Proteinen der serumhaltig (Medium F99 5%) kultivierten HCKo (400-fache Vergrößerung). Das Zytoskelett wurde durch Anfärbung von F-Aktin mit Oregon green® Phalloidin grün fluoreszierend sichtbar gemacht. Die Adhäsions-Proteine Vinculin, β-Catenin und Connexin-43 wurden mithilfe eines rot fluoreszierenden, Cy3-gekoppelten IgG-Antikörper visualisiert. Auf charakteristische Bereiche wird in der Abbildung mit folgenden Symbolen exemplarisch hingewiesen: → bezeichnet Zell-Substrat-Anhaftungsstellen mit Fokalen Adhäsionen, ○ Zell-Zell-Kontakte mit Adhärenz-Verbindungen und □ Zell-Zell-Kontakte mit Gap Junctions. Die Bilder sind charakteristisch für drei weitere Versuche.



**Abbildung 14**  
 Doppel-Fluoreszenzfärbung von Zelladhäsions-Proteinen der serumfrei (KGM+Ca-Medium) kultivierten HCK+Ca (400-fache Vergrößerung). Das Zytoskelett wurde durch Anfärbung von F-Aktin mit Oregon green® Phalloidin grün fluoreszierend sichtbar gemacht. Die Adhäsions-Proteine Vinculin, β-Catenin und Connexin-43 wurden mithilfe eines rot fluoreszierenden, Cy3-gekoppelten IgG-Antikörper visualisiert. Auf charakteristische Bereiche wird in der Abbildung mit folgenden Symbolen exemplarisch hingewiesen:  
 → bezeichnet Zell-Substrat-Anhaftungsstellen mit Fokalen Adhäsionen,  
 ○ Zell-Zell-Kontakte mit Adhärenz-Verbindungen und  
 □ Zell-Zell-Kontakte mit Gap Junctions.  
 Die Bilder sind charakteristisch für drei weitere Versuche.

### 3.2.1.3.3 Expression von $\alpha$ -SMA in Abhängigkeit von Serum und TGF $\beta$ 1

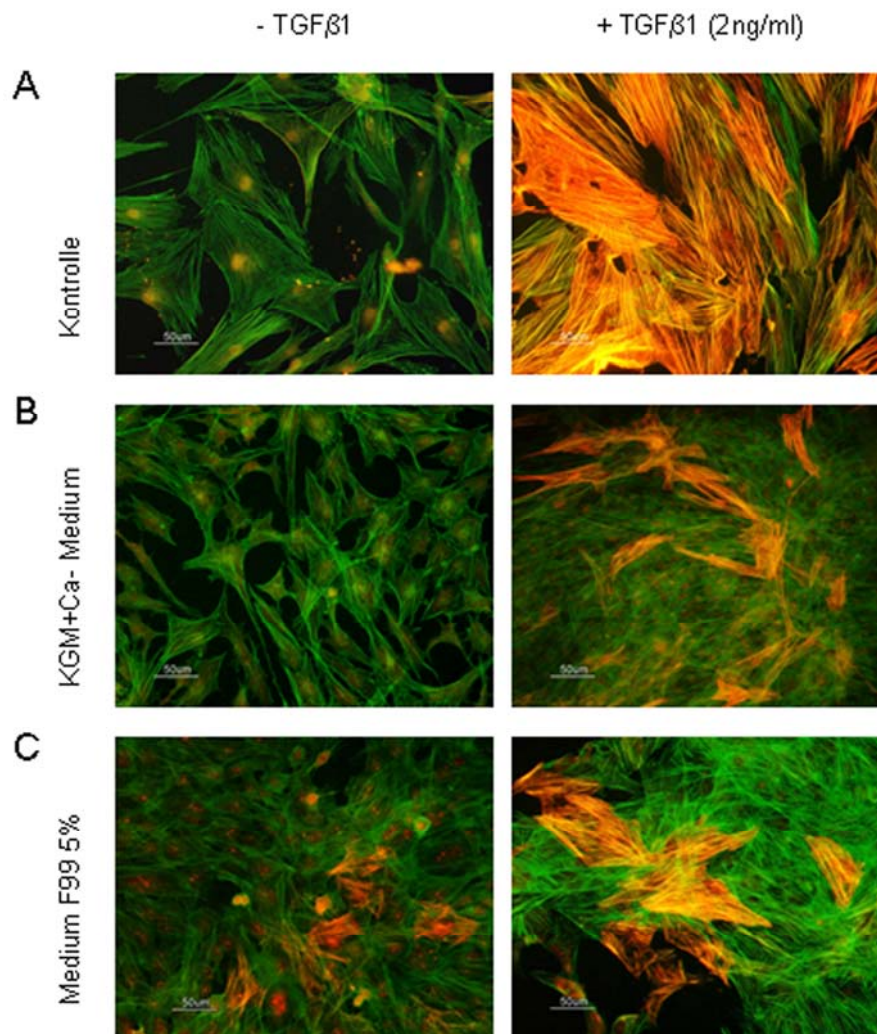
Bekanntermaßen spielt TGF $\beta$ 1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Myofibroblasten, welche durch die Expression von  $\alpha$ -SMA charakterisiert sind (Jester et al., 1999a, Jester et al., 1999c, Masur et al., 1996, Moller-Pedersen et al., 1998).

Die vorangegangenen Untersuchungen zum Phänotyp zeigten deutlich, dass durch den Einfluss von Serum und TGF $\beta$ 1 eine Differenzierung der HCKo und HCK+Ca zu Fibroblasten-ähnlichen Zellen stattfand. Um festzustellen, ob es sich bei diesen Zellen um Myofibroblasten handelte, wurde der genaue Differenzierungsgrad durch Detektion von  $\alpha$ -SMA bestimmt. Als Kontrolle wurden primäre Vorhaut-Fibroblasten eingesetzt.

Um den Myofibroblasten-Anteil in der serumhaltigen und serumfreien Kultur vor und nach Stimulation mit TGF $\beta$ 1 zu bestimmen, wurden HCKo und HCK+Ca erneut einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Durch Anfärben des Zytoskeletts mit Oregon green<sup>®</sup> Phalloidin wurde zunächst die zelluläre Morphologie sichtbar gemacht. Das ausschließlich von Myofibroblasten exprimierte  $\alpha$ -SMA wurde durch einen roten Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert. Einzel-Aufnahmen der roten und grünen Fluoreszenz wurden anschließend digital zusammengefügt.

Unter serumfreien Bedingungen zeigten die HCK+Ca keine  $\alpha$ -SMA-Expression, sondern die typische, weit ausgestreckte und sternförmige Struktur ruhender Keratocyten. Die Zugabe von TGF $\beta$ 1 resultierte in einer überwiegenden Transformation der HCK+Ca zu spindelförmigen Myofibroblasten, welche in hohem Maße  $\alpha$ -SMA exprimierten (**Abb. 15B**).

In serumhaltigem Medium kultivierte HCKo zeigten dagegen bereits ohne TGF $\beta$ -Einfluss fibroblastoide Strukturen mit ausgeprägten Stressfasern sowie eine Serum-induzierte  $\alpha$ -SMA-Expression in etwa 1 bis 10% der Zellen. Die Stimulation mit TGF $\beta$ 1 (2 ng/ml) verstärkte die  $\alpha$ -SMA-Expression und damit die Myofibroblasten-Differenzierung in der HCKo-Kultur weiter, was auch anhand des deutlich erhöhten Gehalts von zu Stressfasern angeordnetem F-Aktin sichtbar wurde (**Abb. 15C**).



**Abbildung 15**

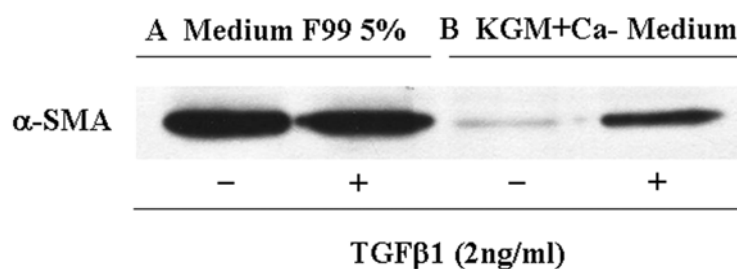
Doppel-Fluoreszenzfärbung zur Detektion von  $\alpha$ -SMA (rot) und F-Aktin (grün) in **B**: serumfrei kultivierten HCK+Ca und in **C**: mit 5% Serum kultivierten HCKo, vor und nach dreitägiger Stimulation mit TGF $\beta$ 1 (400-fache Vergrößerung). Als Kontrolle dienten **A**: primäre Haut-Fibroblasten.

In serumfreiem KGM+Ca-Medium lagen die Keratocyten undifferenziert vor, konnten aber durch TGF $\beta$ 1-Stimulation zu Myofibroblasten transformiert werden (B). Medium F99 5% führte aufgrund des Serum-Gehalts zu einer initialen  $\alpha$ -SMA-Expression, die durch TGF $\beta$ 1 noch gesteigert werden konnte (C). Die Bilder sind charakteristisch für drei weitere Versuche.

Zur Verifizierung der Ergebnisse erfolgte eine Westernblot-Analyse der  $\alpha$ -SMA-Expression aus den Zelllysaten der Keratocyten. Auch hier wurde deutlich, dass die Proteinexpression bereits durch den Serumgehalt des ursprünglichen Aufzucht-Mediums F99 5% in hohem Maße induziert wurde. Eine weitere Steigerung der Proteinmenge durch Wachstumsfaktor-Stimulation konnte hier im Gegensatz zur immunocytochemischen Untersuchung jedoch nicht festgestellt werden (**Abb 9A**). Dies könnte daran liegen, dass die stimulierten Zellen auf den

Fluoreszenzaufnahmen im Vergleich zur unstimulierten Kultur lediglich eine größere Gestalt aufwiesen, was den Anteil der differenzierten Zellen höher erscheinen ließ (**Abb. 15C**).

$\alpha$ -SMA war in den serumfrei kultivierten HCK+Ca kaum detektierbar, was wiederum auf einen Rückgang der Myofibroblasten-Differenzierung durch Adaption der HCK-Zelllinie an serumfreies KGM+Ca-Medium schließen ließ. Die Stimulierbarkeit dieser Zellen durch dreitägige Inkubation mit TGF $\beta$ 1 konnte, wie bereits anhand der Fluoreszenzaufnahmen gezeigt, auch durch eine erhöhte  $\alpha$ -SMA-Expression im Western Blot bestätigt werden (**Abb. 16B**). Die Proteinmenge war jedoch geringer als in den serumhaltig kultivierten HCKo.



**Abbildung 16**

Detektion der  $\alpha$ -SMA-Expression in den **A**: unter Serum-Einfluss kultivierten HCKo und den **B**: an serumfreies Medium adaptierten HCK+Ca mittels Western Blot aus dem Zellysate nach dreitägiger TGF $\beta$ 1-Stimulation. Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

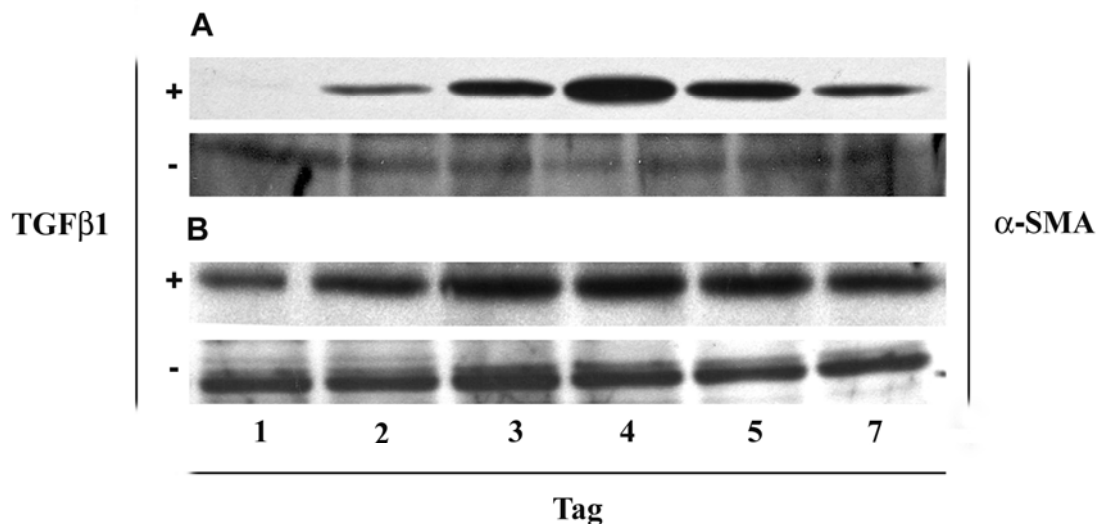
### 3.2.1.3.4 Zeitabhängigkeit der Myofibroblasten-Differenzierung nach TGF $\beta$ 1-Stimulation

Um optimale Stimulationsbedingungen für die nachfolgenden Versuche zur Keratocyten-Charakterisierung zu finden, wurde die Zeitabhängigkeit des TGF $\beta$ 1-induzierten phänotypischen Wandels der HCK-Zelllinie auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurde die  $\alpha$ -SMA-Expression der HCKo und HCK+Ca über einen Zeitraum von sieben Tagen halbquantitativ durch Westernblot-Analytik verfolgt.

Unter serumfreien Bedingungen war am ersten Tag nach TGF $\beta$ -Stimulation noch keine  $\alpha$ -SMA-Bande zu erkennen, was wiederum auf eine „Dedifferenzierung“ der HCK-Zelllinie durch den Entzug von Serum hinwies. Ab Tag zwei konnte das Protein in den HCK+Ca in zunehmendem Ausmaß detektiert werden, wobei das Maximum der  $\alpha$ -SMA-Expression am vierten Tag nach der Wachstumsfaktor-Stimulation erreicht wurde. Ab Tag fünf fand eine

zunehmende Degradation des Proteins statt. Die unstimulierte Kontrolle zeigte über den gesamten Zeitraum so gut wie keine  $\alpha$ -SMA-Expression, die entsprechenden Banden wurden erst bei extrem langen Belichtungszeiten sichtbar (**Abb. 17A**).

Die in Medium F99 5% kultivierten HCKo zeigten bereits am ersten Tag eine deutliche, wahrscheinlich durch Serum induzierte Myofibroblasten-Differenzierung. Die Anwesenheit von TGF $\beta$ 1 führte zu einer weiteren Zunahme der  $\alpha$ -SMA-Expression, welche an Tag drei und vier ihr Maximum erreichte und anschließend langsam zurückging. Die Negativkontrolle wies an allen sechs Tagen eine ähnliche, inhärente Proteinexpression auf (**Abb. 17B**). Dies bestätigte nochmals die Ergebnisse der immunocytochemischen Untersuchung zum Phänotyp und zeigte, dass der Serumgehalt des Mediums unabhängig von der TGF $\beta$ 1-Stimulation zur Myofibroblasten-Differenzierung beitragen konnte.



**Abbildung 17**

Zeitreihe der  $\alpha$ -SMA-Expression in **A**: HCK+Ca und **B**: HCKo nach Stimulation mit TGF $\beta$ 1 (Tag 0).

Die Detektion des Myofibroblasten-Markers erfolgte aus dem Zelllysate mittels Western Blot über sieben Tage nach der Stimulation der HCK. Als Negativkontrolle dienten Lysate der unstimulierten Kultur. Die Versuche wurden zweifach durchgeführt und dreimal unabhängig wiederholt, wobei sie vergleichbare Ergebnisse lieferten.

### 3.2.2 Charakterisierung der HCK-Zelllinie im Stroma-Gel

#### 3.2.2.1 Einfluss von Typ I-Collagen auf den Phänotyp der HCK-Zelllinie

Grundsätzlich sollten die HCK als zellulärer Baustein des künstlichen Cornea-Modells verwendet und in dessen collagenhaltige Stroma-Matrix inkorporiert werden. Bekanntermaßen führt die Kultivierung humaner Fibroblasten auf Collagen-Oberflächen zu Veränderungen der zellulären Morphologie und Proteinexpression. Dies äußert sich unter anderem in dem Verlust von Stressfasern und einer Drosselung der  $\alpha$ -SMA-Synthese in Myofibroblasten (Ehrlich et al., 1998). Eine Unterdrückung der Keratocyten-Differenzierung durch Collagen-Kontakt wäre ein Vorteil im Hinblick auf die Anwendbarkeit des Stroma-Modells.

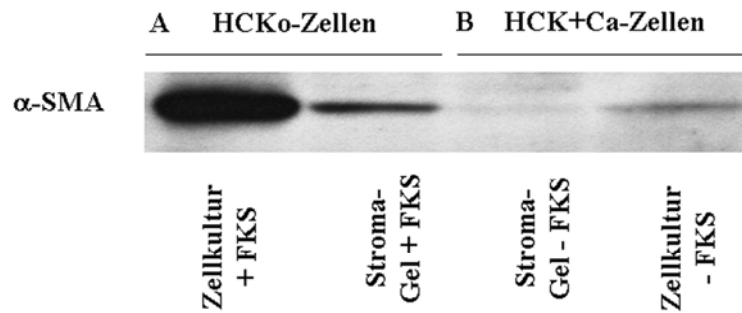
Deshalb war es von Interesse zu ermitteln, ob nach einer mehrtägigen Einbettung der fibroblastoiden HCKo und HCK+Ca in das überwiegend aus Typ I-Collagen bestehende Stroma-Äquivalent ebenfalls phänotypische Veränderungen stattfinden. Besonderes Augenmerk wurde darauf gerichtet, ob die Myofibroblasten-Differenzierung der unter Serum-Einfluss kultivierten HCKo durch den Kontakt mit Collagen rückgängig gemacht werden kann.

Hierzu wurden HCKo in serumhaltige (10% FKS) sowie HCK+Ca in serumfreie Stroma-Matrices eingebettet und für sechs Tage in Medium F99 5%, bzw. KGM+Ca-Medium kultiviert. Nach Herauslösen der Zellen mittels Collagenase aus dem Konstrukt wurde deren  $\alpha$ -SMA-Expression durch Westernblot-Analytik untersucht. Als Kontrolle dienten Collagen-freie Monolayer-Kulturen der HCKo bzw. HCK+Ca auf der Kunststoffoberfläche von Zellkulturplatten.

Die in Collagen eingebetteten HCKo zeigten eine deutliche Reduktion der  $\alpha$ -SMA-Synthese im Vergleich zur Collagen-freien Monolayer-Kultur. Diese wies, wie bereits erwähnt, eine vergleichsweise starke Myofibroblasten-Differenzierung, einhergehend mit einer ausgeprägten  $\alpha$ -SMA-Expression aufgrund des Serum-Gehalts des F99-Mediums auf (**Abb. 18A**). Bei den serumfrei kultivierten HCK+Ca konnte die bereits auf ein Minimum reduzierte  $\alpha$ -SMA-Expression der auf Kunststoff kultivierten Zellen durch den Kontakt mit Collagen nahezu vollständig unterdrückt werden (**Abb. 18B**).

Dies war ein weiterer Beweis dafür, dass HCK nicht terminal differenziert vorlagen, sondern eine Rückkehr zu nicht-myofibroblastoiden Phänotypen möglich war.





**Abbildung 18**

Detektion der  $\alpha$ -SMA-Expression mittels Western Blot aus dem Zelllysate von **A:** HCKo, die 6 Tage lang in serumhaltigem Stroma-Gel (Collagen, Medium F99 10x, 10% FKS) eingebettet oder über den gleichen Zeitraum auf Kunststoff-Zellkulturplatten (Monolayer-Kultur) kultiviert worden waren; als Kulturmedium diente Medium F99 5%. **B:** HCK+Ca, die über 6 Tage in serumfreies Stroma (Collagen, KGM+Ca-Medium) inkorporiert oder ebenfalls über den gleichen Zeitraum auf Zellkulturplatten kultiviert worden waren; als serumfreies Kulturmedium diente KGM+Ca-Medium. Die Versuche wurden dreifach mit jeweils zwei gleichartigen Proteinproben durchgeführt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

### 3.2.2.2 Kontraktion der Stroma-Äquivalente in Abhängigkeit vom Phänotyp der HCK-Zelllinie

Die Phänotypen humaner Stroma-Zellen unterscheiden sich unter anderem in ihrer Fähigkeit zur Kontraktion der extrazellulären Matrix. Ruhende Keratocyten besitzen keine kontraktile Eigenschaften, wohingegen ausdifferenzierte Myofibroblasten im Zuge der cornealen Wundheilung hochgradig kontrahierend auf die sie umgebenden Strukturen einwirken können (Jester und Ho-Chang, 2003). Diese Beobachtungen konnten auf isolierte Stroma-Zellen übertragen werden, was eine Steuerung der in vitro-Kontraktilität keratocytärer Zellen über den Gehalt des Kulturmediums an Serum oder Wachstumsfaktoren ermöglichte (Jester und Ho-Chang, 2003).

Bei der Etablierung des in vitro-Stroma-Modells war es im Hinblick auf dessen Eignung als Permeations-, Irritations- oder Wundheilungsmodell, aber auch hinsichtlich der geplanten Rekonstruktion des Full-thickness-Modells/ SE-Modells der Cornea wünschenswert, eine Kontraktion der Collagen-Matrix zu unterdrücken. Für die spätere Verwendung der HCK-Zelllinie als Baustein eines mechanistischen Wundheilungsmodells war zudem von Interesse, ob diese Keratocyten nach Einbettung in das Stroma-Gel ihre Stimulierbarkeit durch TGF $\beta$ 1

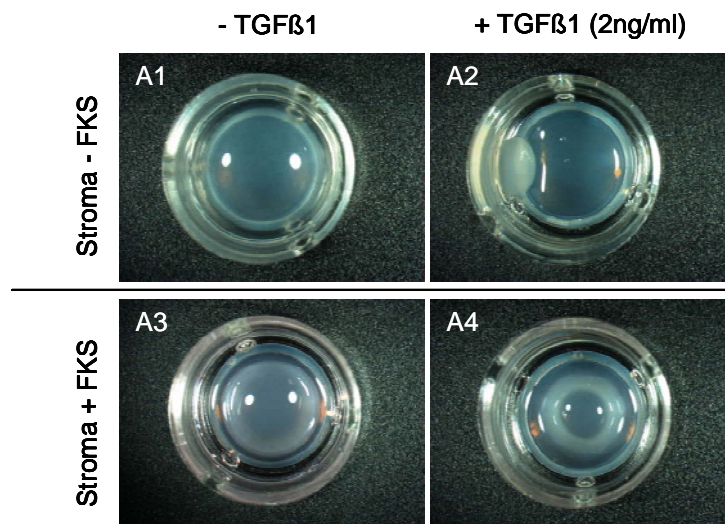
beibehielten. Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob es möglich war, die durch den Collagen-Kontakt reduzierte Myofibroblasten-Differenzierung der eingebetten HCK durch TGF $\beta$ 1 erneut zu stimulieren. Gleichzeitig wurde geprüft, ob sich die phänotypischen Alterationen der inkorporierten Keratocyten auf den Durchmesser der Stroma-Äquivalente auswirkten.

Innerhalb des sechstägigen Beobachtungszeitraums zeigten serumfreie Stroma-Gele, welche  $1 \times 10^6$  HCK+Ca enthielten, keinerlei Kontraktion in Abwesenheit von TGF $\beta$ 1 (Kontraktion =  $0 \pm 6,62\%$ ). Abweichungen im Durchmesser ergaben sich ausschließlich durch die experimentelle Variabilität bei der Anfertigung der Stroma-Äquivalente (**Abb. 19(A1)**). Hingegen wurde für serumfreie Konstrukte, deren HCK+Ca nach dreitägiger Vorinkubation für weitere drei Tage mit TGF $\beta$ 1 stimuliert worden waren, die in Relation zu den unstimulierten Gelen stärkste Kontraktion beobachtet (**Abb. 19(A2)**). Sie betrug durchschnittlich  $77,71 \pm 3,53\%$ . Wie in **Abb. 19(A3)** gezeigt, ergab die sechstägige Einbettung von  $1 \times 10^6$  HCKo in serumhaltige Stroma-Gele bereits ohne TGF $\beta$ 1 eine Reduktion der Matrix-Oberfläche von  $37,92 \pm 0,83\%$ . Durch Stimulation mit dem Wachstumsfaktor TGF $\beta$ 1 ließen sich die kontraktile Eigenschaften der HCKo weiter steigern, was das sie umgebende Collagengel auf durchschnittlich  $52,64 \pm 1,63\%$  der Ursprungsfläche schrumpfen ließen (**Abb. 19(A4)**). Dennoch war die Kontraktion der serumhaltigen Konstrukte nach Stimulation mit TGF $\beta$ 1 im Vergleich zur Kontraktion der ebenso stimulierten serumfreien Matrices um ca. 25% weniger ausgeprägt (**Abb. 19(A2)/(A4)**).

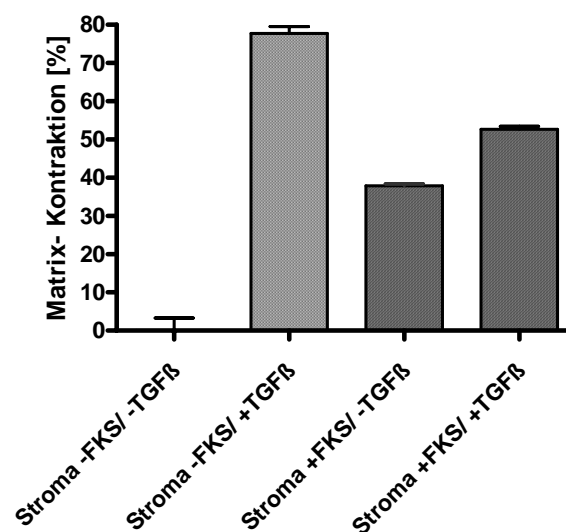
Die nachfolgende Westernblot-Untersuchung der  $\alpha$ -SMA-Expression aus den Lysaten der aus den Stroma-Äquivalenten isolierten HCK, stellte den Zusammenhang zwischen der Myofibroblasten-Differenzierung dieser Zellen, den daraus resultierenden kontraktile Eigenschaften und der entsprechenden Reduktion der Matrix-Oberfläche her. Wie bereits gezeigt begünstigte die Einbettung von HCK+Ca in serumfreie Collagen-Matrices den ruhenden, nicht-aktivierten Phänotyp, was durch die mangelnde Detektierbarkeit von  $\alpha$ -SMA im Western Blot deutlich wurde (**Abb. 20A**). Diese mangelnde Differenzierung der Stroma-inkorporierten Keratocyten war ursächlich für die fehlende Kontraktion serumfreier Konstrukte (**Abb. 19(A1)**). Hingegen führte die Stimulation mit TGF $\beta$ 1 zu einer ausgeprägten Steigerung der  $\alpha$ -SMA-Synthese in den serumfrei eingebetteten HCK+Ca (**Abb. 20A**). Dies zeigte den phänotypischen Wandel der undifferenzierten HCK+Ca zu hochgradig aktivierten Myofibroblasten, welche aufgrund ihrer ausgeprägten kontraktile Eigenschaften die, beispielhaft in **Abb. 19(A2)** gezeigte, starke Matrixkontraktion verursachten. Die durch die Collagen-Einbettung unterdrückte Myofibroblasten-Differenzierung spiegelte sich in den

serumhaltig eingebetteten HCKo als mäßig starke  $\alpha$ -SMA-Expression wider (**Abb. 20B**). Die Aktivierung der unstimulierten HCKo war durch den Serum-Einfluss jedoch deutlich stärker als die der HCK+Ca und reichte aus, um eine schwache Kontraktion des Stroma-Gels herbeizuführen (**Abb. 19(A3)**). Auch bei den HCKo steigerte TGF $\beta$ 1 trotz der Einbettung in extrazelluläre Matrix die  $\alpha$ -SMA-Synthese (**Abb. 20B**). Die hierbei von den Myofibroblasten entwickelten kontrahierenden Kräfte ließen die Stroma-Äquivalente stark schrumpfen, reichten jedoch nicht aus, um sie wie im Falle der stimulierten, serumfreien Konstrukte vollständig von der Zellkultureinsatz-Membran zu lösen (**Abb. 19(A4)**).

A



B

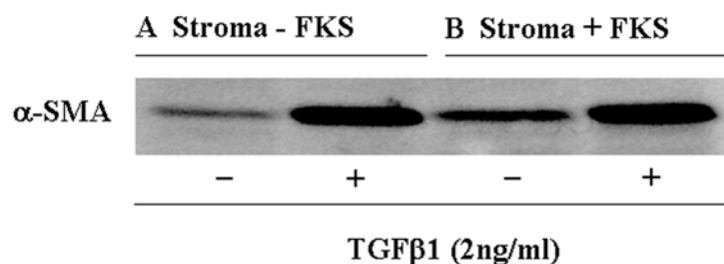


**Abbildung 19**

Kontraktion der Stroma-Matrix durch unterschiedliche HCK-Phänotypen. **A:** Digitalaufnahmen der kontrahierten Stroma-Äquivalente in Zellkultureinsätzen. **A1 und A2:** Serumfreie Stroma-Gele (Collagen,

KGM+Ca-Medium) mit  $1 \times 10^6$  inkorporierten HCK+Ca nach sechstägiger Inkubation in KGM+Ca-Medium; **A3 und A4:** Serumhaltige Stroma-Gele (Medium F99 10x, 10% FKS) mit  $1 \times 10^6$  inkorporierten HCKo nach sechstägiger Inkubation in Medium F99 5%; **A2 und A4:** Die eingebetteten HCKo/ HCK+Ca wurden nach dreitägiger Adaption an die Gel-Bedingungen für weitere drei Tage mit TGF $\beta$ 1 stimuliert. Die Bilder sind repräsentativ für drei weitere Versuche.

**B:** Prozentuale Reduktion der Stroma-Oberfläche im Verhältnis zur Durchschnittsoberfläche der unkontrahierten serumfreien Gele (Die Benennung der Matrix-Typen erfolgte analog Abb. 12A.). Dargestellt sind die gewichteten arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 4$  unabhängigen Versuchen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Stichprobengrößen. Jeder Versuch wurde mindestens zweifach durchgeführt.



**Abbildung 20**

Western blot-Analyse der  $\alpha$ -SMA-Expression aus dem Zellysate von HCK, die aus den in Abb. 12 gezeigten Stroma-Äquivalenten isoliert worden waren. **A:** aus den serumfreien Stroma-Äquivalenten isolierte, teilweise mit TGF $\beta$ 1 stimulierte HCK+Ca; **B:** aus den serumhaltigen Stroma-Gele isolierte, teilweise mit TGF $\beta$ 1 stimulierten HCKo; Der Versuch wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

### 3.3 Anwendung der Cornea-Modelle zur Bestimmung des Augenirritations-Potentials ausgewählter Modellsubstanzen

Auf Basis der Charakterisierungsversuche von HCK und HCE (Seeber et al., 2008) wurden zwei serumfreie Testmodelle/ Cornea-Äquivalente in Zellkultureinsätzen rekonstruiert: ein einfaches, von Seeber et al. charakterisiertes und etabliertes Epithel-Modell, welches im ausdifferenzierten Zustand aus fünf bis sieben Zelllagen HCE bestand (EPI-Modell; Seeber et al., 2008) und ein komplexes Stroma-Epithel-Modell (SE-Modell). Dieses wurde aus dem bereits charakterisierten, serumfreien Stroma-Äquivalent mit inkorporierten HCK+Ca durch Auflagerung eines mehrschichtigen HCE-Epithels geschaffen. Beide Gewebe-Äquivalente wiesen in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) organotypischen Strukturen auf. So konnten beispielsweise eine Basalzellschicht aus säulenförmigen, miteinander verflochtenen Epithelzellen, welche die unterste Lage des Epithels bildeten, eine

Basalmembran mit Hemidesmosomen an der Grenze zwischen Epithel und künstlicher Stroma-Matrix sowie darunterliegend die Bowman-Membran als azelluläre Schicht mit unregelmäßig angeordneten Kollagenfibrillen nachgewiesen werden (Seeber et al., 2008).

Die Sensitivität dieser beiden Cornea-Konstrukte wurde vergleichend anhand zweier Referenzsubstanzen mit bekanntem Schädigungspotential/ Draize Score, TritonX-100 0,3% und Benzalkoniumchlorid (BAC) 0,1%, untersucht. Die Exposition der Modelle mit der jeweiligen Substanzlösung erfolgte über unterschiedliche Zeitspannen. Mittels MTT-Assay wurde die substanzspezifische Expositionsdauer ermittelt, die nötig war, um die Durchschnittsviabilität der Testgewebe auf 50% der Viabilität der Kontroll-Gewebe zu reduzieren ( $ET_{50}$ ). Dieser Endpunkt wurde zum einen gewählt, um die Sensitivitäten des EPI- und SE-Modells gegenüber der jeweiligen Test-Substanz direkt miteinander vergleichen zu können. Zudem ermöglichten die  $ET_{50}$ -Werte eine Prüfung der Reproduzierbarkeit der Toxizitäts-Vorhersage beider Konstrukte sowie eine Untersuchung der Vorhersagegenauigkeit der beiden Gewebe-Äquivalente im Vergleich zu anderen in vitro-Modellen der Cornea.

### **3.3.1 Bestimmung der $ET_{50}$ für TritonX-100 0,3% am SE- und EPI-Modell**

TritonX-100, auch Octoxinol (INN), ein Polyoxyethylen-Octylphenol mit variabler Polyethylenglykol-Seitenkette aus neun bis zehn Ethylenoxid-Einheiten, ist ein nicht-ionisches Tensid aus der Gruppe der Octylphenoethoxylate. Da es Proteine nicht denaturiert, wird es in der Biotechnologie benutzt, um Membranproteine in ihrer nativen Konformation aus Membranen herauszulösen und so Zellmembranen zu permeabilisieren.

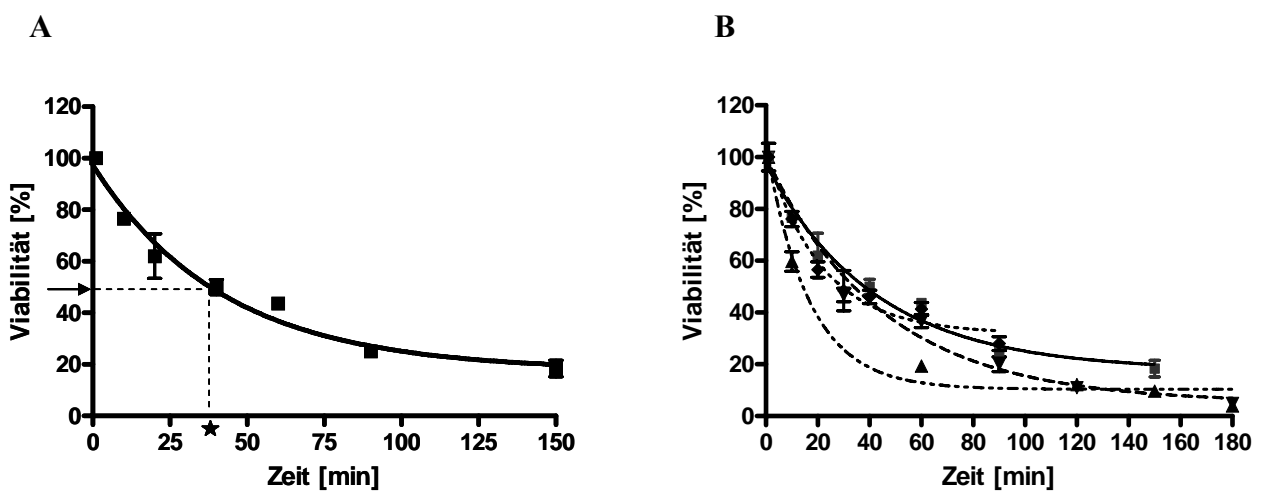
In einer Konzentration von 0,3% dient es häufig als Referenzstandard bzw. Positivkontrolle bei der Beurteilung der Irritationsantwort anderer in vitro Augenirritations-Testsysteme, beispielsweise dem Clonetics Human Epithelial Model (Powers et al. 2007b) und dem EpiOcular<sup>TM</sup> Tissue Model von MatTek (Stern et al., 1998). Das nichtionische Tensid wurde in der genannten Konzentration im Draize-Test als „nicht-irritierend“ eingestuft (Bagley et al., 1999).

Um eine erste Evaluierung der Sensitivität des EPI- und SE-Modells vorzunehmen, wurden die  $ET_{50}$ -Werte für 0,3% TritonX-100 mehrfach an unterschiedlichen Gewebe-Chargen, bestehend aus jeweils 21 Modellen ermittelt. Um den Tissue-spezifischen  $ET_{50}$ -Wert möglichst genau zu definieren, wurden in jedem Versuchsdurchgang sechs verschiedene Expositionintervalle individuell gewählt und nach und nach dem Erwartungswert angepasst. Die Exposition mit der Testsubstanz fand für jeden Zeitpunkt dreifach statt. Als

Negativkontrolle wurden ebenfalls drei Modelle für die maximale Expositionsdauer mit Aqua bidest. benetzt. Der Mittelwert der Absorptionsdaten der Kontroll-Gewebe wurde einer Viabilität von 100% gleichgesetzt.

Für jedes exponierte SE- bzw. EPI-Modell wurde aus den Absorptionsdaten die Viabilität im Verhältnis zur Kontrolle berechnet und der Mittelwert aus drei Modellen pro Zeitintervall gebildet. In die Berechnung der  $ET_{50}$  gingen die gemittelten Viabilitätsdaten aller Expositionszeitpunkte durch nichtlineare Regression ein.

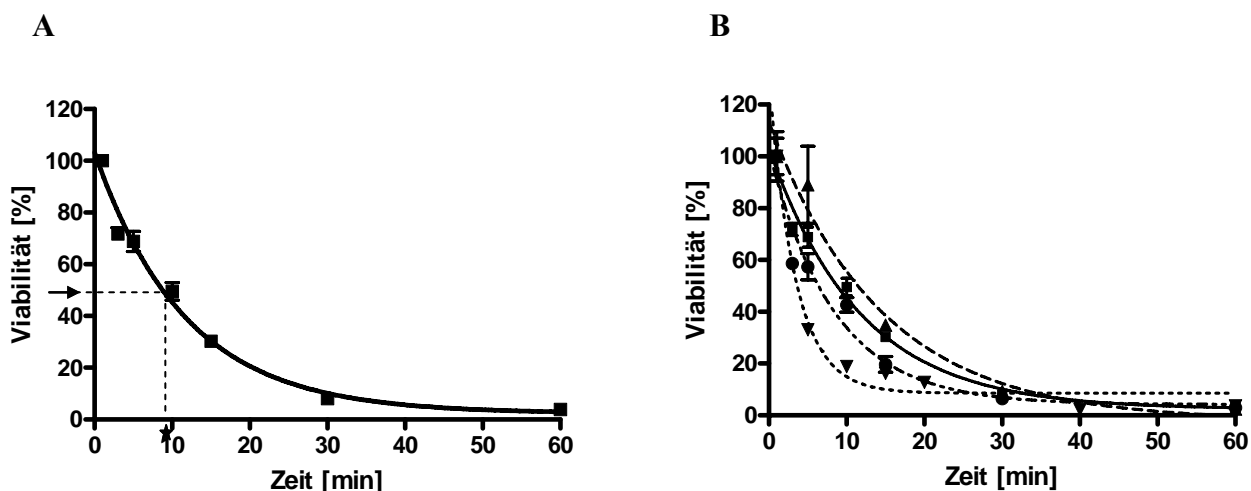
Durch den Vergleich der  $ET_{50}$ -Werte des EPI- und SE-Modells konnten deutliche Unterschiede in der Sensitivität der beiden Testsysteme festgestellt werden. Die Zeit der halbmaximalen Reduktion der Zellviabilität durch 0,3% TritonX-100 betrug für das komplexe Stroma-Epithel-Modell durchschnittlich  $28,83 \pm 10,13$  min. Der erste Versuch ergab eine  $ET_{50}$  von 14,79 min, der zweite von 33,9, der dritte von 38,03 und der vierte eine  $ET_{50}$  von 28,61 min (**Abb. 21**). Die  $ET_{50}$  des komplexeren Modells lag damit deutlich höher als die des einfachen Epithel-Modells, welches bereits bei durchschnittlich  $7,54 \pm 3,28$  eine halbmaximale Schädigung erfuhr. Die  $ET_{50}$ -Werte betragen im Einzelnen 11,33 min, 8,78 min, 3,66 und 6,38 min (**Abb. 22**).



**Abbildung 21**  $ET_{50}$ -Bestimmung für Triton X-100 0,3% an Stroma-Epithel-(SE-)Modellen.

**A:** Prinzip der  $ET_{50}$ -Bestimmung am Beispiel eines SE-Äquivalente-Sets. Einfach exponentiell abfallende nichtlineare Regression und Interpolation des Zeitpunktes der 50%igen Viabilitäts-Minderung ( $ET_{50}$ = \*)

**B:** Zusammenfassung der  $ET_{50}$ -Bestimmungen für TritonX-100 0,3% an verschiedenen SE-Tissue-Chargen. Dargestellt sind vier unabhängige Versuche mit jeweils sechs verschiedenen Expositionszeiten, jeder Versuch wurde pro Zeitintervall dreifach durchgeführt.



**Abbildung 22** ET<sub>50</sub>-Bestimmung für Triton X-100 0,3% an einfachen Epithel-(EPI-)Modellen.

**A:** Prinzip der ET<sub>50</sub>-Bestimmung am Beispiel eines EPI-Äquivalente-Sets. Einfach exponentiell abfallende nichtlineare Regression und Interpolation des Zeitpunktes der 50%igen Viabilitäts-Minderung (ET<sub>50</sub>= \* )

**B:** Zusammenfassung der ET<sub>50</sub>-Bestimmungen für TritonX-100 0,3% an verschiedenen EPI-Tissue-Chargen. Dargestellt sind vier unabhängige Versuche mit jeweils sechs verschiedenen Expositionen, jeder Versuch wurde pro Zeitintervall dreifach durchgeführt.

	ET <sub>50</sub> EPI-Modell [min]	ET <sub>50</sub> SE-Modell [min]
MW	7,54	28,83
SD	3,28	10,13
SEM	1,64	5,04
n =	4	4

**Tabelle 6**

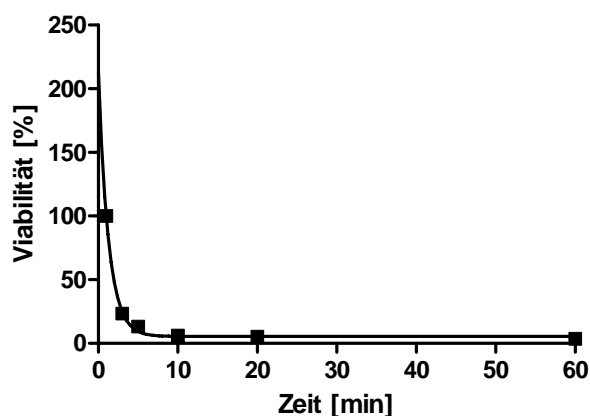
Statistische Daten für die wiederholte ET<sub>50</sub>-Bestimmung mit Triton X-100 0,3% an verschiedenen Chargen des EPI-Modells sowie des zweischichtigen SE-Modells.

### 3.3.2 Bestimmung der ET<sub>50</sub> für TritonX-100 0,3% am SE-Modell mit zellfreiem Stroma

Durch Vergleich der ET<sub>50</sub>-Werte des einfachen EPI-Modells mit denen des zweischichtigen SE-Modells für 0,3% TritonX-100 konnte gezeigt werden, dass sich durch den komplexeren Aufbau des Stroma-Epithel-Modells eine höhere Widerstandsfähigkeit, bzw. eine geringere Sensitivität gegenüber dieser Substanz ergab. Inwiefern und ob die im Stroma enthaltenen HCK eine Rolle für die gesteigerte Tenazität des komplexen Modells spielten, wurde anhand

eines azellulären Stroma-Äquivalents mit aufgelagertem Epithel analog zum SE-Modell untersucht. Erstaunlicherweise nahm die Viabilität des vereinfachten Modells bereits nach dreiminütiger Exposition mit TritonX-100 auf unter 25% ab. Die  $ET_{50}$  betrug durchschnittlich  $2,42 \pm 0,79$  min und lag damit nicht nur weit unter den entsprechenden Werten des SE-Modells, sondern auch deutlich unterhalb der mittleren  $ET_{50}$  des EPI-Modells (**Abb. 23**).

Die Umsetzung von MTT konnte beim Keratocyten-freien SE-Modell wie beim EPI-Modell ausschließlich durch die HCE-Schicht erfolgen. Ein Vergleich der Viabilität des Epithels beider Modelle vor der Chemikalien-Exposition war deshalb anhand der Absorptionsdaten der Negativkontrollen möglich. Hierbei zeigte sich, dass die ursprüngliche metabolische Aktivität des EPI-Modells höher war als die ursprüngliche Aktivität desjenigen Epithels, welches auf azellulären Stroma-Äquivalenten kultiviert worden war (**Tab. 7**).



**Abbildung 23**  $ET_{50}$ -Bestimmung für Triton X-100 0,3% an SE-Modellen mit azellulärem Stroma.

Dargestellt ist die nichtlineare Regression der Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen, jeder Versuch wurde mit 18 Gewebe-Modellen, d.h. dreifach pro Expositionsintervall durchgeführt. ( $ET_{50} = 2,42 \pm 0,79$  min)

	Kontrolle EPI-Modell	Kontrolle SE-Modell ohne HCK
MW	0,777	0,470
SD	0,193	0,032
SEM	0,096	0,018
n =	4	3

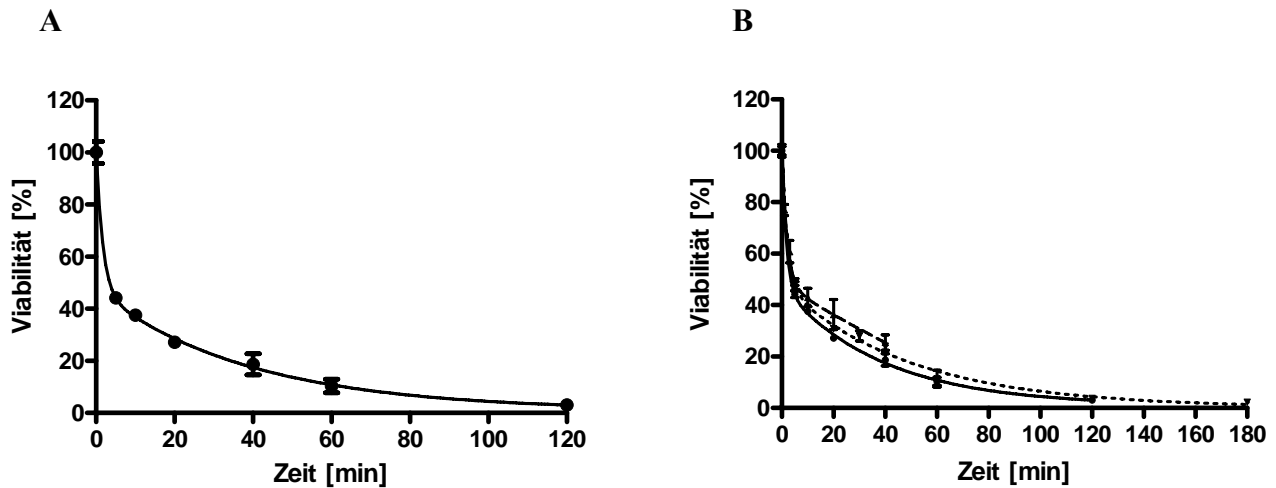
**Tabelle 7**

Absorptionsdaten der mit Aqua bidest behandelten Negativkontrollen der EPI-Modelle sowie der Keratocyten-freien SE-Modelle. Aus der Absorption erschließt sich die metabolische Aktivität der Modelle und damit indirekt die Viabilität des Epithels vor Inkubation mit TritonX-100.



### 3.3.3 Bestimmung der $ET_{50}$ für Benzalkoniumchlorid (BAC) 0,1% am SE- und EPI-Modell

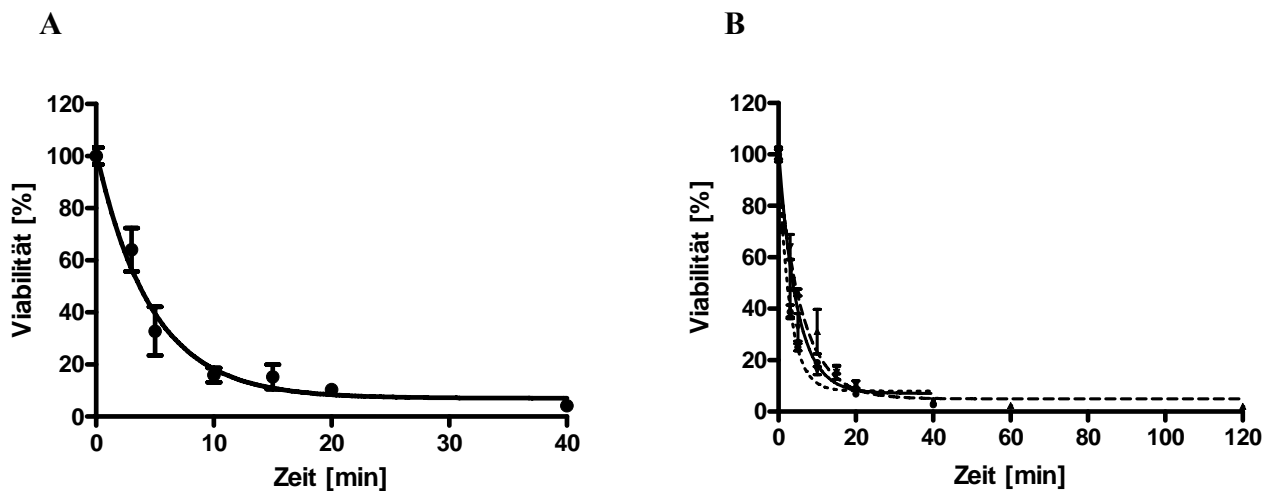
Analog zu TritonX-100 erfolgte die Bestimmung der  $ET_{50}$  am SE- und EPI-Modell für Benzalkoniumchlorid (BAC) in einer Konzentration von 0,1%. Hierbei handelt es sich um ein kationisches Tensid, das vor allem für seine desinfizierende und konservierende Wirkung bekannt ist und zu den quartären Ammoniumverbindungen gehört. BAC zählt international zu den am häufigsten verwendeten Konservierungsmitteln für Ophthalmika und wird zur Konservierung von Augentropfen zumeist in einer Konzentration von 0.01% eingesetzt (Richards und McBride, 1972). Zudem erhöht BAC, wie alle quartären Ammoniumverbindungen, die Permeabilität der Cornea durch Einlagerung in Zellmembranen, was zu einer Wirkungsverstärkung von gleichzeitig applizierten Arzneistoffen führen kann (Green und Tonjum, 1971). In der Verdünnung von 0,1% wurde BAC im Draize-Test als „nicht irritierend“ auf das Auge eingestuft (Bagley et al., 1999, Powers et al., 2007a). Für die Evaluation der  $ET_{50}$  wurden auch hier sechs Expositionszeiträume gewählt, in denen jeweils drei Modelle mit dem Tensid inkubiert wurden. Es zeigte sich, dass die Schädigung beider Modell-Typen im Vergleich zu TritonX-100 0,3% weitaus schneller erfolgte. Dies erforderte die Wahl sehr kurzer Expositionsintervalle, beispielsweise 1, 3, 5, 10, 20, 30 und 40 min. Die Zeit, innerhalb derer die MTT-Metabolisierungs-Kapazität des einfach EPI-Modells um 50% vermindert wurde, betrug im Durchschnitt  $3,43 \pm 1,06$  min. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt und ergab  $ET_{50}$ -Werte von 4,33 min, 3,70 min und 2,26 min (**Abb. 25**). Überraschenderweise unterschieden sich die  $ET_{50}$ -Ergebnisse der Stroma-Epithel-Modelle für BAC 0,1% kaum von denen der EPI-Modelle (**Tab. 8**). Im Durchschnitt erfolgte eine 50%ige Viabilitätsminderung innerhalb von  $4,31 \pm 0,74$  min. Im Einzelnen ergaben die Versuche  $ET_{50}$ -Werte von 4,81 min, 3,46 min und 4,66 min (**Abb. 24**). Die gemittelten Viabilitätsdaten der Einzelkonstrukte pro Expositionsintervall gingen wie bereits beschrieben durch nichtlineare Regression in die Berechnung der  $ET_{50}$ -Werte ein. Im Gegensatz zu den Viabilitätsdaten des EPI-Modells, deren Zusammenhang durch eine einfache Exponentialfunktion ausreichend genau beschrieben werden konnte, mussten die  $ET_{50}$ -Werte des SE-Modells für BAC mithilfe einer biphasischen Exponentialfunktion ermittelt werden.



**Abbildung 24**  $ET_{50}$ -Bestimmung für BAC 0,1% am SE-Modell.

**A:** Beispiel für einen Versuchsdurchgang mit sechs Expositionenintervallen und doppelt exponentiell abfallender Regression.

**B:** Zusammenfassung der  $ET_{50}$ -Bestimmung für BAC 0,1% an verschiedenen Chargen des SE-Modells. Dargestellt sind drei unabhängige Versuche, jeder Versuch wurde pro Zeitintervall dreifach durchgeführt



**Abbildung 25**  $ET_{50}$ -Bestimmung für BAC 0,1% am EPI-Modell.

**A:** Beispiel für einen Versuchsdurchgang mit sechs Expositionenintervallen und einfach exponentiell abfallender Regression.

**B:** Zusammenfassung der  $ET_{50}$ -Bestimmung für BAC 0,1% an verschiedenen Chargen des EPI-Modells. Dargestellt sind drei unabhängige Versuche, jeder Versuch wurde pro Zeitintervall dreifach durchgeführt

	ET <sub>50</sub> EPI-Modell [min]	ET <sub>50</sub> SE-Modell [min]
MW	3,43	4,31
SD	1,06	0,74
SEM	0,61	0,43
n =	3	3

**Tabelle 8**

Statistische Daten für die wiederholte ET<sub>50</sub>-Bestimmung mit Benzalkoniumchlorid 0,1% an verschiedenen Chargen des EPI-Modells sowie des zweischichtigen SE-Modells.

	ET <sub>50</sub> EPI-Modell (MW ± SD) [min]	ET <sub>50</sub> SE-Modell (MW ± SD) [min]
<b>TritonX-100 0,3%</b>	7,54 ± 3,28	28,83 ± 10,13
<b>BAC 0,1%</b>	3,43 ± 1,06	4,31 ± 0,74

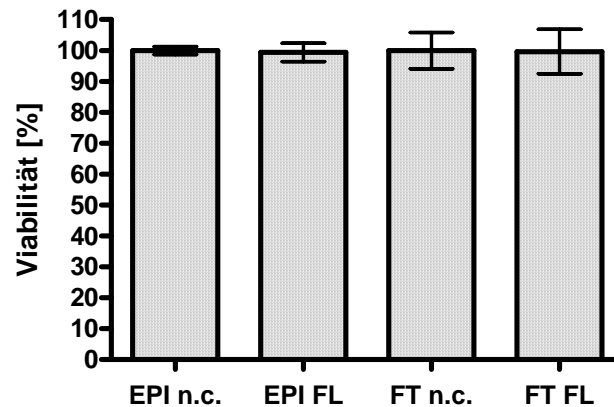
**Tabelle 9**

Zusammenfassung der Ergebnisse der ET<sub>50</sub>-Untersuchungen am EPI- und SE-Modell.

### 3.3.4 Beeinflussung der Gewebe-Viabilität durch Fluorescein

Der Xanthenfarbstoff Fluorescein fand aufgrund seiner Fluoreszenz-Eigenschaften Verwendung bei Permeationsuntersuchungen am EPI- und SE-Modell. Dabei wurde die wässrige Substanz-Lösung auf die Oberfläche der Konstrukte aufgebracht und die permeierte Fluorescein-Menge nach 150 min photometrisch ermittelt (Seeber et al., 2008).

Um eine Schädigung der zellulären Strukturen von Epithel und Stroma durch die Chemikalie auszuschließen, wurden die Modelle für ebenfalls 150 min mit 10 mM Fluorescein-Lösung benetzt und anschließend einer Viabilitätsuntersuchung mittels MTT-Assay unterzogen. Als Negativkontrolle wurden die EPI- und SE-Modelle über den gleichen Zeitraum mit Aqua bidest. inkubiert. Im Durchschnitt lag die Viabilität der EPI-Modelle nach Inkubation mit Fluorescein bei  $99,38 \pm 1,71\%$ , die der SE-Modelle bei  $99,63 \pm 3,67\%$ , im Vergleich zur jeweils entsprechenden unbehandelten Kontrolle, deren Viabilität definitionsgemäß 100% betrug (**Abb. 26A**). Aufgrund dieser Ergebnisse ist keine Schädigung des Gewebes durch Fluorescein während des Zeitraumes der Permeationsuntersuchungen zu erwarten.



**Abbildung 26 Untersuchungen zum Irritationspotential von Fluorescein.**

**A:** Durchschnittliche Viabilität der Modelle nach 150-minütiger Exposition gegenüber 10mM Fluorescein-Lösung (FL). Die Daten wurden auf die Werte der Negativkontrolle (n.c.) mit Aqua bidest (100% Viabilität) normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 2$  unabhängigen Versuchen, jeder Versuch wurde dreifach durchgeführt.

### 3.3.5 Wiederherstellung von Viabilität und Barriereeigenschaften des SE- und EPI-Modells nach Exposition mit TritonX-100 0,3%

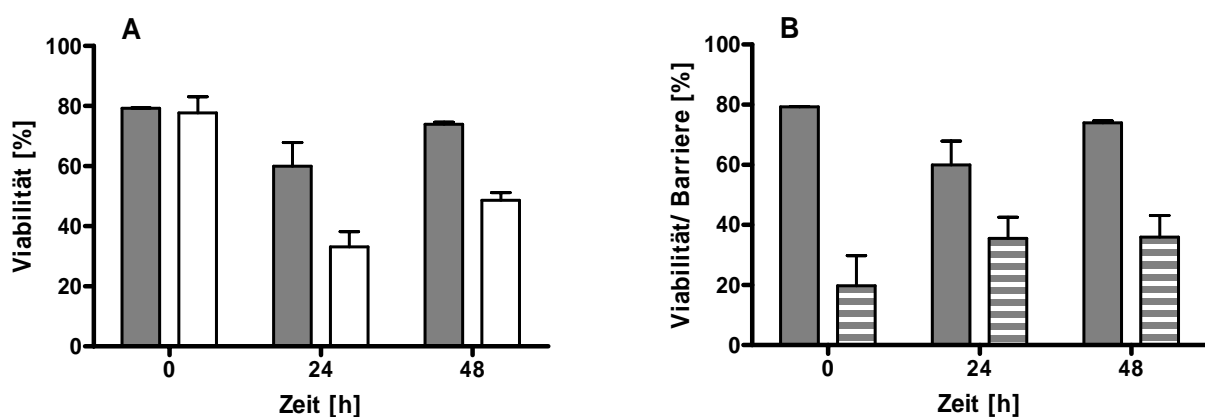
Bekanntermaßen spielt nach einer cornealen Verletzung das Zusammenspiel von Epithel und Stroma durch wechselseitige Aussendung parakriner Faktoren eine Schlüsselrolle für die Wundheilung (Wilson et al., 1999). Ein wichtiges Ereignis dabei ist die Reepithelialisierung, da sie mit einer Wiederherstellung der Barriereeigenschaften der Augenhornhaut einhergeht. Diese wird durch die Aussendung von Wachstumsfaktoren wie HGF und EGF aus Keratocyten, aber auch durch die Anwesenheit von Matrixkomponenten wie Integrinen und Fibronectin begünstigt (Wilson et al., 2001).

Im Folgenden wurde untersucht, ob auch das EPI- und SE-Modell nach einer leichten, vermutlich nur das Epithel betreffenden Verletzung zu einer Regeneration fähig ist. Auf Basis der vorangegangenen  $ET_{50}$ -Untersuchungen war es möglich, durch 0,3% TritonX-100 eine gezielte Reduktion der Gewebe-Viabilität auf 80% hervorzurufen. Dazu wurden die EPI-Modelle für drei Minuten, die SE-Modelle für neun Minuten mit 0,3% TritonX-100 inkubiert. Die zeitabhängige Regeneration der Modelle wurde durch MTT-Bestimmung der Gewebe-Viabilität über zwei Tage verfolgt. Parallel dazu wurde die Membranintegrität durch TEER-

Messungen am EPI-Modell aufgezeichnet. Letzteres war bei den SE-Modellen aus technischen Gründen leider nicht möglich.

Durch dreiminütige Exposition der EPI-Modelle mit 0,3% TritonX-100 wurde deren Viabilität wie beabsichtigt um ca. 20% auf  $79,31 \pm 0,08\%$  vermindert. In den 24 Stunden lang rekultivierten Geweben normalisierte sich die metabolische Aktivität jedoch nicht, die Viabilität sank sogar noch weiter auf durchschnittlich  $59,95 \pm 11,21\%$ . Erst nach 48 Stunden war ein Wiederanstieg der MTT-Metabolisierung auf  $73,94 \pm 6,93\%$  zu beobachten (**Abb. 27A**). Die TEER-Untersuchungen an denselben EPI-Modellen zeigten eine sehr starke Störung der Barriereigenschaften durch die dreiminütige TritonX-100-Exposition. Direkt nach der Exposition war die Membranintegrität der Modelle in Relation zur Negativkontrolle auf  $19,79 \pm 14,13\%$  abgesunken. Hier zeigte sich aber bereits nach 24 Stunden eine Verbesserung der Barriere ( $35,50 \pm 9,94\%$ ). Eine weitere Regeneration erfolgte jedoch nicht, nach 48 Stunden lagen die TEER-Werte bei  $36,00 \pm 10,14\%$  (**Abb. 27B**).

Hinsichtlich der zeitabhängigen Entwicklung der Viabilität zeigte sich bei den SE-Modellen die gleiche Tendenz wie bei den EPI-Modellen. Ausgehend von einer nur noch  $77,72 \pm 7,67\%$ igen MTT-Metabolisierungskapazität nach neunminütiger Exposition mit TritonX-100, sanken die entsprechenden Werte der SE-Modelle innerhalb der ersten 24 Stunden der Rekultivierungsperiode weiter auf  $33,10 \pm 7,28\%$  und stiegen dann wieder innerhalb eines Tages auf  $48,31 \pm 3,67\%$  an (**Abb. 27A**).



**Abbildung 27 Untersuchungen zur Regenerationsfähigkeit der Cornea-Äquivalente.**

**A:** Vergleich der Regeneration der EPI-Modelle (grau) und SE-Modelle (weiß) anhand der relativen Viabilitätsdaten. Die MTT-Reduktionsassays wurden sofort (0h), 24 und 48 Stunden nach der Exposition mit 0,3% TritonX-100 durchgeführt.

**B:** Gegenüberstellung der relativen Viabilität (grau) und der relativen Membranintegrität (gestreift) der EPI-Modelle zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Die Barriereigenschaften wurden vor der MTT-Reduktionsuntersuchung der Gewebe durch TEER-Messungen ermittelt. Die Daten wurden auf die Kontrollwerte (Aqua bidest = 100% Viabilität/ Barriere) des jeweiligen Testzeitpunkts normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 2 unabhängigen Versuchen, jeder Versuch wurde dreifach durchgeführt.

## **4 DISKUSSION**

---

## 4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, zwei Zelllinien der humanen Cornea, die Keratocytzelllinie HCK und die Endothelzelllinie EC, hinsichtlich des Kulturmediums zu optimieren und ihre Eignung für die Rekonstruktion eines *in vitro* Corneamodells zu untersuchen. Zunächst wurde jede Zelllinie individuell charakterisiert. Dabei wurde geprüft, ob wichtige Funktionen der Primärzellen trotz der Immortalisierung durch SV40-Transfektion erhalten geblieben sind und ob eine morphologisch exakte Nachbildung der einzelnen Augenhornhaut-Strukturen unter Zuhilfenahme dieser Zelllinien möglich ist. Bei der Auswahl des Kulturmediums war vor allem der Gehalt an Fötalem Kälberserum (FKS) ausschlaggebend, welches eine sehr komplexe Mischung verschiedener, teilweise noch unbekannter Proteine ist. Dazu gehören unter anderem Wachstumsfaktoren wie EGF, FGF und PDGF, welche die Proliferation und Differenzierung der Cornea-Zelllinien entscheidend beeinflussen können (van der Valk et al., 2004). Die aufgrund der hochvariablen Zusammensetzung von FKS nicht standardisierbaren Einflüsse sowie das Risiko einer Übertragung von Krankheitserregern (Gstraunthaler, 2003, Jayme et al., 1988) ließen eine chemisch wohldefinierte, möglichst serumfreie Kultur wünschenswert erscheinen.

Die besondere Herausforderung dieser Arbeit bestand darin, ein Medium zu finden, in dem alle drei Zelllinien gleichzeitig unter Aufrechterhaltung ihrer Viabilität und ihrer zelltypischen biologischen Eigenschaften kultiviert werden können. Die Epithelzelllinie HCE zeigte sich hinsichtlich der Anforderungen an ihr Wachstumsmedium am anspruchsvollsten. Daher wurde zunächst die Kultur jener Zellen von Seeber et al. schrittweise optimiert (Seeber et al., 2008). Gleichzeitig wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die EC- und HCK-Zelllinie an diese Bedingungen zu adaptieren.

### 4.1 Charakterisierung der Endothel-Zelllinie EC

**Bedeutung des Endothels *in vivo* und *in vitro*.** Das corneale Endothel ist ein Monolayer aus differenzierten Zellen. Durch aktiven Ionen- und Flüssigkeitstransport reguliert das Cornea-Endothel die Hydratation und Nährstoffversorgung des Stromas, zudem hält es die corneale Transparenz aufrecht (Bednarz et al., 2001). Der transcornealen Permeation von Substanzen setzt das Endothel aufgrund seiner Monolayer-Struktur sowie fehlender Tight Junctions eher



geringen Widerstand entgegen (Hornof et al., 2005). Dies ließ vermuten, dass der EC-Zelllinie im Hinblick auf in vitro Permeationsstudien am Komplet-Modell der humanen Cornea nach Zorn-Kruppa eine eher untergeordnete Rolle zukommen würde. Dennoch war eine Endothel-Zellschicht bei der in vitro Rekonstruktion anderer Cornea-Äquivalente notwendig, da z.B. die Einbeziehung muriner Cornea-Endothelzellen bei einem Modell aus Epithelzellen und stromalen Fibroblasten der Kaninchen-Augenhornhaut die Qualität der Basalmembran erhöhte und die epitheliale Differenzierung unterstützte (Zieske et al., 1994).

#### **4.1.1 Einfluss der Kulturmedien auf die Proliferation der EC-Zelllinie**

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Kulturmedien auf die Proliferation der EC untersucht. Dabei stellte sich eine Serum-Ergänzung der Kulturmedien als obligatorisch für das Wachstum dieser Zelllinie heraus. In den serumfreien Keratinocytenmedien KGM und KGM+Ca war die Proliferation der EC so stark verzögert, dass eine Adaptierung an diese Kulturmedien durch wiederholte Passagierung nicht möglich war. Im FACS-Versuch zeigte sich zudem ein hoher Anteil nekrotischer Zellen in den serumfreien Kulturen (Abb. 7). Analog dazu ließen die nachfolgenden TEER-Messungen auf einen sehr langsamen Anstieg der Zelldichte in der serumfreien Kultur schließen (Abb. 9).

Die Hoffnung, dass die eingeschränkte Proliferation der EC-Zelllinie unter serumfreien Bedingungen zur Ausbildung und Aufrechterhaltung eines einschichtigen Epithels beitragen würde, bestätigte sich leider nicht. Lichtmikroskopische Beobachtungen ergaben, dass sich die EC bereits in der subkonfluenten Kultur zu mehrschichtigen Clustern vereinigten, welche erst nach und nach zu einer lückenlosen Zellschicht zusammenwuchsen. Die Kultivierung der EC in den FKS-haltigen Medien F99 4% und Adv + 2% führte hingegen in Abhängigkeit vom Serum-Anteil zu einer starken Proliferation mit niedrigen Nekroseraten (Abb. 7) und ermöglichte dadurch die Verbreiterung der EC-Zelllinie. Das ungebremste Wachstum in diesen Medien verhinderte jedoch die Ausbildung eines organotypischen Endothel-Monolayers.

#### **4.1.2 Untersuchungen zur Kontaktinhibition der EC-Zelllinie**

**Antiproliferative Mechanismen in primären Endothelzellen.** Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit charakterisierten EC-Zelllinie besitzen primäre Endothelzellen eine eingeschränkte

Proliferations-Kapazität *in vivo* und *in vitro* (Wilson et al., 1995). *In vivo* sind diese Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus arretiert (Joyce et al., 1996a, Joyce et al., 1996b), behalten aber die Fähigkeit zur Proliferation (Wilson et al., 1995). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass das Endothel aktiv, d.h. durch antimittotische Signale, im nicht-proliferativen Zustand gehalten werden muss. Eine interzelluläre Kontaktinhibitorin als wichtiger antiproliferativer Mechanismus im heranreifenden und ausdifferenzierten Endothel der humanen Cornea wurde sodann experimentell bestätigt (Joyce et al., 2002).

Die genauen Mechanismen der kontaktvermittelten Proliferationshemmung wurden immunocytochemisch anhand der p27<sup>KIP1</sup>- und KI-67-Expression an der postnatalen Ratten-Cornea untersucht (Joyce et al., 2002). KI-67 ist ein Kernprotein bislang unbekannter Funktion, das ausschließlich in proliferierenden Zellen exprimiert wird (Gerdes, Li et al. 1991). Das Protein wird in der frühen G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus synthetisiert, wandert in den Zellkern und ist in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase) nachweisbar. Beim Übergang in die G<sub>0</sub>-Phase wird KI-67 rasch degradiert und kann daher als Marker für Zellen mit aktivem Zellzyklus herangezogen werden (Joyce et al., 1996a).

p27<sup>KIP1</sup> gehört zur CIP/KIP-Familie der Cyclin-abhängige Kinase (CDK)-Inhibitoren (CKI). CDKs sind zusammen mit ihren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen, positive Regulatoren des Zellzyklus. CKI tragen entscheidend zur Arretierung des Zellzyklus bei, indem sie an CDK-Cyclin-Komplexe binden und diese in die G<sub>1</sub>-Phase involvierten positiv-Modulatoren des Zellzyklus inaktivieren. Da p27<sup>KIP1</sup> in hohem Ausmaß in ruhenden Zellen, in proliferierenden Zellen jedoch nur in sehr geringen Mengen vorliegt, könnte dieses Protein der Einstellung und Aufrechterhaltung des nicht-proliferativen Zustandes von Endothelzellen dienen (Zieske et al., 2004). Damit in Einklang steht eine Herabregulierung der p27<sup>KIP1</sup>-Expression nach FGF2-Stimulation endothelialer Zellen (Lee und Kay, 2003). Auch nach SV40-Transfektion von ruhenden, primären Endothelzellen sanken die hohen p27<sup>KIP1</sup>-Level sehr stark (Schonthal et al., 1999).

Joyce et al. stellten schließlich den Zusammenhang zwischen der endothelialen p27<sup>KIP1</sup>-Expression und der Kontaktinhibition her: Bei postnataler Ratten-Cornea wurde mit steigender Zelldichte und abnehmender Proliferation eine zunehmende Menge an p27<sup>KIP1</sup> detektiert, während die Expression des Proliferationsmarkers KI-67 deutlich abnahm. Durch Lösen der Zell-Zell-Kontakte mittels EDTA-Behandlung konnte die p27<sup>KIP1</sup>-Expression rückgängig gemacht werden. Diese Beobachtungen legten nahe, dass die kontaktvermittelte Proliferationshemmung durch p27<sup>KIP1</sup> hervorgerufen wurde. Zudem machten diese Ergebnisse erneut deutlich, dass die Arretierung des Zellzyklus während der endothelialen Entwicklung,

genauso wie die Aufrechterhaltung des Ruhezustandes des ausdifferenzierten Endothels, von der Fähigkeit der Zellen zur Kontaktinhibition abhängig ist (Joyce et al., 2002).

**Untersuchungen zur Kontaktinhibition der EC-Zelllinie.** In der vorliegenden Arbeit wurde, ausgehend von den oben genannten Versuchen anderer Arbeitsgruppen, die Expression von KI-67 und p27<sup>KIP1</sup> der EC in verschiedenen Stadien der Konfluenz untersucht. Die EC-Zelllinie sollte damit auf ihre Fähigkeit zur Kontaktinhibition geprüft werden, welche eine entscheidende Voraussetzung für die Ausbildung und Aufrechterhaltung eines organotypisch einschichtigen Endothels darstellt.

Im Falle einer Zell-Zell-Kontakt-vermittelten Proliferationshemmung sollte wie bei Joyce et al. mit zunehmender Zelldichte die Expression des Proliferationsmarkers KI-67 abnehmen und die des Inhibitionsmarkers p27<sup>KIP1</sup> zunehmen. Die Primärzellkultur folgte dieser Erwartung, was auf eine Abnahme der aktiv proliferierenden Zellen in der Kultur schließen ließ (Abb. 8A). Mikroskopisch zeigte sich die Ausbildung eines stabilen, dichten Endothel-Monolayers, was die Ergebnisse von Joyce et al. bestätigte (Joyce et al., 2002).

Eine Kontaktinhibition fand in der SV40-immortalisierten EC-Kultur dagegen nicht statt. Die EC proliferierten über den gesamten 14-tägigen Versuchszeitraum, was der gleich bleibend starken KI-67-Expression entsprach. Die Anzahl der EC mit aktivem Zellzyklus ging auch nach dem Erreichen der Konfluenz nicht signifikant zurück. Vielmehr bildeten sich aufgrund der ungebremsten Proliferation einzelne Zellcluster, die nach und nach zu einem mehrschichtigen Endothel zusammen wuchsen.

Der Inhibitionsmarker p27<sup>KIP1</sup> wurde mit zunehmender Konfluenz verstärkt detektiert, was aber hauptsächlich am starken Anstieg der Zellzahl und an der Ausbildung mehrerer, übereinander liegender Zellschichten lag. Der prozentuale Anteil p27<sup>KIP1</sup>-exprimierender EC in der Kultur blieb dagegen von Anfang an konstant (Abb. 8B). Diese Ergebnisse zeigten, dass die EC weder zur Ausbildung eines organotypischen Endothel-Monolayers noch zur Zellkontakt-induzierten Proliferationshemmung fähig sind. Offensichtlich wurden hier an der Regulation des Zellzyklus beteiligte Mechanismen durch die SV40-Transformation der EC-Zelllinie außer Kraft gesetzt.

**Mögliche Ursachen für die Hyperproliferation der EC-Zelllinie.** Um die weitgehend unbekannt, an der Regulierung der endothelialen Proliferation beteiligten Faktoren zu identifizieren, wurden auch von anderen Arbeitsgruppen primäre humane Endothelzellen durch Transfektion mit dem SV40 large-T-Antigen immortalisiert. Bei Joyce et al. zeigte das

Endothel von humanen Spenderhornhäuten keinerlei KI-67-Expression (Joyce et al., 1996a), das Antigen konnte jedoch wie bei der EC-Zelllinie in aktiv proliferierenden, SV40-transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Joyce et al., 1996b).

Eine Proliferationszunahme als Folge der SV40-Transformation primärer Endothelzellen wurde von Schonthal et al. als sogenannter „proliferative switch“ beschrieben (Schonthal et al., 1999). Wie bei der EC-Zelllinie führte die Einführung eines adenoviralen Vektors mit der Sequenz für das SV40 large-T-Antigen zu einer Wiederaufnahme der mitotischen Aktivität und einem schnellen, ungebremsten Zellwachstum.

Primäre humane Endothelzellen unterliegen einer zweiphasigen, negativen Wachstumskontrolle durch Drosselung der Enzymaktivität von positiven Modulatoren des Zellzyklus, den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) sowie der verstärkten Expression von CDK-Inhibitoren (CKI; Schonthal et al., 1999), wie dem auch in dieser Arbeit untersuchten p27<sup>KIP1</sup>. Durch Hemmung der CDK-Aktivität wirken CKI, wie bereits erwähnt, als Negativmodulatoren des Zellzyklus (Grana und Reddy, 1995, Sherr und Roberts, 1995) und tragen damit zur Kontaktinhibition primärer Endothelzellen bei. Die Expression eines potenten Onkogens wie dem Large-T-Antigen ist laut Schonthal et al. ausreichend, um diese Kontrollmechanismen zu überwinden und eine starke Steigerung der Zellproliferation auszulösen. In deren SV40-transformierten Zellen erhöhte sich die enzymatische Aktivität der CDKs stark, wohingegen die Expression von p27<sup>KIP1</sup> bis unter die Nachweisgrenze reduziert war (Schonthal et al., 1999). Auch bei Wilson et al. erhöhte die Transfektion humaner Cornea-Endothelzellen mit dem SV40-Onkogen die Proliferations-Kapazität (Wilson et al., 1993a).

Allgemein stören virale Onkoproteine wie das SV40 large-T-Antigen die Aktivität des Retinoblastoma Tumor Suppressor Proteins (pRB) sowie des p53 Tumor Suppressor Proteins durch direkte Bindung an diese negativ-Modulatoren des Zellzyklus und führen dadurch zur Freisetzung und Aktivierung von E<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, einem Transkriptionsfaktor, der für den Eintritt der Zelle in die S-Phase verantwortlich ist. Die Inaktivierung dieser an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligten Proteine führt zu einer aktiven und anhaltenden Proliferation jener Zellen, in denen das Large-T-Antigen exprimiert wird (Wilson et al., 1995; Bandara et al., 1993; Joyce et al., 1996b; Zieske et al., 2004).

### 4.1.3 Zusammenfassung und Fazit der EC-Charakterisierung

Die Ergebnisse der Charakterisierung der EC-Zelllinie zeigten, dass die morphologisch korrekte Nachbildung eines endothelialen Monolayers bei der Rekonstruktion des dreidimensionalen Kompletmodells der humanen Cornea nach Zorn-Kruppa vorerst nicht möglich ist. Auch die Implementierung der EC in ein serumfreies Konstrukt konnte nach den vorliegenden Ergebnissen, aufgrund der mangelnden Überlebensfähigkeit der Zelllinie unter serumfreien Bedingungen, nicht erfolgen.

## 4.2 Charakterisierung der Keratocyten-Zelllinie HCK

### 4.2.1 Charakterisierung der HCK in der Monolayerkultur

#### **Bedeutung und charakteristische Eigenschaften von Keratocyten in vivo und in vitro.**

Die aus dem Mesenchym stammenden Keratocyten proliferieren in der ausgereiften Cornea sehr langsam (Hay, 1979). Ihre Aufgabe besteht darin, Collagen-Fibrillen und andere Matrix-Bestandteile zu synthetisieren (Muller et al., 1995) sowie die Transparenz der Cornea aufrechtzuerhalten (Jester et al., 1999b, Muller et al., 1995). Eine wichtige Rolle spielen Keratocyten auch bei der cornealen Wundheilung. Nach einer physikalischen oder chemischen Verletzung der Augenhornhaut erleiden die Stroma-Zellen entweder den programmierten Zelltod oder sie wandeln sich in aktivierte Reparatur-Phänotypen, Fibroblasten und Myofibroblasten um. Abhängig von Tiefe und Art der Verletzung kommt es zu einer Regeneration des Gewebes oder aber einer fibrotischen Umwandlung mit Narbenbildung (Fini, 1999, Fini und Stramer, 2005, Jester und Ho-Chang, 2003).

Aus der humanen Cornea isolierte Keratocyten können dementsprechend zu mindestens drei phänotypisch unterschiedlichen Zelltypen heranwachsen (Fini, 1999, Jester und Ho-Chang, 2003), den keratocytären, fibroblastoiden und myofibroblastoiden Phänotypen, die einem ruhenden, aktivierten oder hochkontraktilen Differenzierungsstadium entsprechen (Nakamura, 2003).

#### **Einflussfaktoren auf den Phänotyp und die Proliferation kultivierter Keratocyten.**

Primäre Keratocyten behalten in vitro den ruhenden, dendritischen Phänotyp bei, solange dem Kulturmedium kein Serum zugesetzt wird (Jester et al., 1996a, Kirschner et al., 1990). Eine Aufrechterhaltung der charakteristischen dendritischen Morphologie in DMEM-basierten, serumfreien Medien ist für Keratocyten vom Rind (Beales et al., 1999), Kaninchen (Jester et

al., 1996a, Jester und Ho-Chang, 2003), Affen (Kawakita et al., 2006) und Mensch (España et al., 2003, España et al., 2004) belegt. Die serumfreie Kultivierung war jedoch mit einem Verlust der proliferativen Fähigkeiten der primären Keratocyten durch den Entzug von FKS verbunden (Kawakita et al., 2006). Serum-Zugabe stimulierte zwar das Zellwachstum, führte jedoch zu einem Verlust der dendritischen Morphologie (Beales et al., 1999, Jester et al., 1996a) und zur Umwandlung in einen den Reparatur-Fibroblasten der Cornea ähnelnden Phänotyp (Cook et al., 1999, Dahl, 1981, Fini et al., 1994, Fini und Stramer, 2005, Hassell et al., 1992, Hasty und Hay, 1977, Jester et al., 1994).

Aufgrund dieser Problematik wurde im zweiten Teil dieser Arbeit versucht, ein serumfreies Medium zu entwickeln, welches in der Lage ist, sowohl die Proliferation der HCK-Zelllinie aufrechtzuerhalten als auch den keratocytären Phänotyp der HCK-Zelllinie wiederherzustellen. Zudem wurde die Transformation der HCK in den fibrotischen Phänotyp nach Stimulation mit TGF $\beta$ 1 untersucht, um deren Eignung als zellulären Bestandteil eines in vitro Wundheilungsmodells zu evaluieren.

#### **4.2.1.1 Charakterisierung des Phänotyps der HCK-Zelllinie unter serumhaltigen Kulturbedingungen**

**Organisation des Zytoskeletts.** Wie erwartet führte die Kultivierung der HCK im serumhaltigen Standard-Medium F99 5% zum partiellen Verlust der keratocytären Strukturen und zur Aktivierung der Zelllinie. Laut Jester et al. lassen insbesondere strukturelle Unterschiede in der Organisation des Zytoskeletts Rückschlüsse auf den Phänotyp der untersuchten Zellen zu. Ruhende Keratocyten sind durch eine dendritische Struktur und kortikal angeordnetes F-Aktin charakterisiert (Jester et al., 1994). In der serumhaltigen HCK-Kultur waren nach Phalloidin-Färbung ruhende Zellen mit typisch dendritischer Morphologie fluoreszenzmikroskopisch zu erkennen. Daneben zeigten sich jedoch auch Zellen mit gestrecktem, spindelförmigem Zellkörper. In diesen Zellen lag das intrazelluläre F-Aktin zu parallel angeordneten Stressfasern kondensiert vor (Abb. 12B und Abb. 13), welche an den interzellulären Kontaktstellen sowie im Bereich der Zell-Substrat-Anhaftungsstellen eine punktuell verstärkte Vinculin- und  $\beta$ -Catenin-Expression aufwiesen (Abb. 13). Ebenso wurde in einem Teil der Zellen  $\alpha$ -SMA detektiert (Abb. 15C). Die Reorganisation des Zytoskeletts zu Stressfasern ist ein charakteristisches Merkmal für den phänotypischen Wandel der Keratocyten zu Wundheilungs-Fibroblasten und Myofibroblasten. Diese parallel zueinander angeordneten F-Aktin-Mikrofilament-Bündel sind eine Voraussetzung für die mechanische

Kraftentwicklung innerhalb der aktivierten Zellformen und tragen damit in vivo zur Wundkontraktion bei (Gabbiani et al., 1971, Jester et al., 1995b, Mar et al., 2001, Petroll et al., 1993, Petroll et al., 1998).

**Nachweis von Vinculin zur Detektion von Fokalen Adhäsionen.** Zur Komplettierung dieses kontraktilen Apparates müssen die intrazellulären Stressfasern mit der extrazellulären Matrix über spezifische Membranoberflächenrezeptoren der Integrin-Familie verknüpft werden (Geiger et al., 2001, Hynes, 1987, Masur et al., 1999, Petroll et al., 1993, Welch et al., 1990). Die Verankerung der intrazellulären Stressfasern in der Zellmembran findet dabei durch Vinculin und andere cytoplasmatische Proteine statt. Diese bilden in Assoziation mit heterodimeren Transmembran-Glykoproteinen, den Integrinen, spezialisierte Adhäsionsstrukturen mit der Extrazellulären Matrix, sogenannte Fokale Adhäsionen (Geiger und Bershadsky, 2001, Geiger et al., 2001, Zamir et al., 1999). Vinculin wurde in den serumhaltig kultivierten HCK im Bereich der Zell-Matrix-Anhaftungen punktförmig stark exprimiert (Abb. 13) und diente - wie bei Jester et al.- als Hinweis auf eine Differenzierung der Keratocyten zu aktivierten Phänotypen (Jester und Ho-Chang, 2003, Jester et al., 2003). Vinculin-enthaltende Fokale Adhäsionen sind in Myofibroblasten stärker ausgeprägt als in Fibroblasten (Hinz et al., 2003, Masur et al., 1999). Dies war ein erstes Anzeichen für die Induktion einer Differenzierung der HCK zu Myofibroblasten durch den Serumgehalt des F99-Mediums. Allein die Detektion von Vinculin in den HCK ließ jedoch noch keine exakte Unterscheidung zwischen dem fibroblastoiden und dem myofibroblastoiden Phänotyp zu, weswegen weitere Differenzierungsmarker wie  $\beta$ -Catenin und  $\alpha$ -SMA untersucht wurden.

**Nachweis von  $\beta$ -Catenin zur Detektion von Adhärenzverbindungen.** Im Gegensatz zu ruhenden Keratocyten, die im Bereich ihrer interzellulären Kontaktstellen Gap Junctions ausbilden und damit eine interzelluläre Kommunikation ermöglichen, bilden Myofibroblasten untereinander feste Adhärenzverbindungen, an deren Aufbau Zelladhäsionsproteine wie Cadherine und Catenine beteiligt sind (Petridou und Masur, 1996).  $\beta$ -Catenin ist ein Cadherin-assoziiertes, cytoplasmatisches Protein, welches sich intrazellulär mit Aktin-Filamenten verbindet (Geiger et al., 1987, Geiger und Ayalon, 1992, Gumbiner, 1993, Heaysman und Pegrum, 1973). Die extrazellulären Domänen der Cadherine benachbarter Zellen verbinden sich untereinander, während die cytoplasmatischen Domänen der Cadherine sich intrazellulär mit einem Proteinkomplex aus Cateninen assoziieren, sodass die Cadherine der Zelloberfläche mit den Mikrofilamenten des Zytoskeletts verknüpft vorliegen (Ehrlich et al., 2006). Die transmembranäre Interaktion zwischen intrazellulärem Aktin und den Cadherin- $\beta$ -Catenin-Komplexen benachbarter Zellen in Adhärenzverbindungen stabilisiert

deren Verknüpfung und generiert eine interzelluläre, auf der Aktin-Myosin-Interaktion basierende Spannung, welche Voraussetzung für einen effektiven Wundverschluss ist (Ehrlich et al., 2006, Petridou und Masur, 1996).

Petridou et al. untersuchten erstmals die Zell-Zell-Adhäsionen von Fibroblasten und Myofibroblasten anhand der Cadherin- und Catenin-Expression.  $\beta$ -Catenin wurde dabei ausschließlich im Bereich der Adhärenzverbindungen von Myofibroblasten detektiert. In Fibroblasten kam das Protein in geringeren Mengen vor und war überwiegend intrazellulär lokalisiert (Petridou und Masur, 1996). Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde  $\beta$ -Catenin in der vorliegenden Arbeit als weiterer Marker für den aktivierten Phänotyp herangezogen. HCK, die unter Serumeinfluss kultiviert worden waren, wiesen eine deutlich erhöhte Expression von  $\beta$ -Catenin im Bereich der interzellulären Kontaktstellen auf, was auf die Ausbildung von Adhärenzverbindungen hinwies und damit die Aktivierung der HCK-Zelllinie durch Serum bestätigte (Abb. 13). Die überwiegend intrazelluläre Expression von Connexin-43 zeigte zusätzlich, dass die Gap Junctions ruhender Phänotypen größtenteils durch  $\beta$ -Catenin-enthaltende Adhärenzverbindungen von Fibroblasten oder Myofibroblasten ersetzt worden waren (Abb. 13).

**Nachweis von  $\alpha$ -SMA zur Detektion von Myofibroblasten.** Der endgültige Beweis dafür, dass es sich bei den aktivierten HCK in der serumhaltigen Kultur um Myofibroblasten handelte, wurde durch den Nachweis von  $\alpha$ -SMA mittels Fluoreszenzfärbung und Westernblot-Analyse erbracht (Abb. 15 und Abb. 16). Im Gegensatz zu Stressfasern, Fokalen Adhäsionen und Adhärenzverbindungen, die in schwächerer Ausprägung auch in aktivierten Fibroblasten vorkommen (Fini und Stramer, 2005), wird  $\alpha$ -SMA ausschließlich von Myofibroblasten exprimiert (Darby et al., 1990, Jester et al., 2002, Jester und Ho-Chang, 2003) und ist daher ein spezifisches Markerprotein für diesen Phänotyp. Die  $\alpha$ -SMA-Expression steht in vivo in direktem Zusammenhang mit der Wundkontraktion, da das Protein an die intrazellulären Stressfaser-Bündel von Myofibroblasten bindet (Jester et al., 1995c), die in vitro auf glattmuskuläre Agonisten mit einer Kontraktion reagieren (Gabbiani et al., 1971, Gabbiani et al., 1972). Diese Ergebnisse weisen auf die große Bedeutung von  $\alpha$ -SMA als Bestandteil des kontraktile Apparates von Myofibroblasten und seine entscheidende Rolle für die Funktion der Stressfasern während des Wundverschlusses hin, die mittels  $\alpha$ -SMA wahrscheinlich eine glattmuskel-ähnliche isometrische Spannung erzeugen können (Jester et al., 1995c).



Die Serum-kultivierten HCK zeigten teilweise eine deutliche Expression von  $\alpha$ -SMA entlang der intrazellulären Stressfaser-Bündel (Abb. 15 und 16), wodurch die betreffenden Zellen eindeutig dem myofibroblastoiden Phänotyp zugeordnet werden konnten.

Alles in allem bringt die Kultivierung in serumhaltigem Medium offenbar eine Mischkultur aus ruhenden und aktivierten HCK hervor, die teilweise zu Myofibroblasten ausdifferenzieren.

#### **Mögliche Ursachen für die zelluläre Differenzierung in Serum-haltigem Kulturmedium.**

Zusammengefasst ergaben die Untersuchungen an der HCK-Zelllinie, dass sich die Serum-Supplementierung des Kulturmediums nachteilig auf den keratocytären Phänotyp der Zellen auswirkt, wie es bereits für primäre Keratocyten verschiedener Herkunft beschrieben wurde (Kawakita et al., 2006). Laut Kawakita et al. könnte die Erklärung für die Myofibroblasten-Differenzierung in Medium F99 5% sein, dass Serum den Wachstumsfaktor TGF $\beta$ 1 enthält (Berryhill et al., 2002, Kropf et al., 1997, Masui et al., 1986), der die Myofibroblasten-Differenzierung primärer Zellen in vitro stimuliert (Funderburgh et al., 2001, Funderburgh et al., 2003, Jester und Ho-Chang, 2003, Petridou und Masur, 1996).

#### **4.2.1.2 Charakterisierung des Phänotyps der HCK-Zelllinie unter serumfreien Kulturbedingungen**

**Proliferation der HCK in serumfreien Kulturmedien.** Um das Problem der Serum-induzierten Zelldifferenzierung zu umgehen war es erforderlich, ein serumfreies Medium zu formulieren, welches das Wachstum der HCK ausreichend förderte, um die Zelllinie für mindestens zehn Passagen an die neuen Kulturbedingungen adaptieren zu können. Gleichzeitig sollte der ruhende, keratocytäre Phänotyp aufrechterhalten werden.

Unter den zahlreichen serumfreien Medienzusammensetzungen, die zunächst an der Epithel-Zelllinie HCE und anschließend an den HCK getestet worden waren, stellten sich zwei Formulierungen auf der Basis des Keratinocytenmediums KGM als ausreichend wachstumsfördern und mehr oder weniger gleichwertig zum Serum-enthaltenden Kulturmedium F99 5% heraus. Speziell das mit 0,5 mM Calciumchlorid versetzte KGM+Ca-Medium führte bei den HCK mit Ausnahme einer etwas längeren Lag-Phase zu demselben Wachstumsprofil wie bei der serumhaltigen Kultur sowie zu einer ähnlich niedrigen Nekroserate (Abb. 10).

**Der Einfluss serumfreier Kulturbedingungen auf den Phänotyp der HCK.** Die an KGM+Ca-Medium adaptierten HCK zeigten in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen die typischen Merkmale ruhender Keratocyten, wie serumfrei kultivierte, primäre humane Keratocyten (Jester et al., 2003), d.h. eine dendritische, abgerundete Morphologie sowie ein eher spärlich ausgeprägtes, eng mit der Plasmamembran assoziiertes Aktin-Netzwerk (Abb. 12; Jester et al., 1994). Die Anfärbung von intrazellulärem F-Aktin mit Oregon green<sup>®</sup> Phalloidin sowie die immuncytochemischen Untersuchungen mit Antikörpern gegen Vinculin und  $\beta$ -Catenin zeigten weder ausgeprägte Mikrofilament-Bündel, noch fokale Adhäsionen oder Adhärenz-Verbindungen, was gegen eine Aktivierung und für die Aufrechterhaltung des keratocytären Phänotyps in der serumfreien HCK-Kultur sprach (Abb. 14). Aufgrund der fehlenden  $\alpha$ -SMA-Expression konnte eine Myofibroblasten-Differenzierung dieser Zellen in KGM+Ca-Medium ausgeschlossen werden (Abb. 15). Der immuncytochemische Nachweis von Connexin-43 im Bereich der interzellulären Kontaktstellen bestätigte diese Ergebnisse (Abb. 14).

**Nachweis von Connexin-43 zur Detektion keratocytärer Gap Junctions.** Wie bereits erwähnt, kommunizieren die ruhenden Keratocyten im intakten Stroma über verlängerte protoplasmatische Fortsätze, welche miteinander über Gap Junctions verbunden sind (Hasty und Hay, 1977, Nishida et al., 1988, Ueda et al., 1987). Connexin-43 ist ein Gap Junction-assoziiertes Protein (Beyer et al., 1989), welches bereits von Jester et al. punktuell an den Kontaktstellen zwischen ruhenden Keratocyten in situ nachgewiesen werden konnte (Jester et al., 1994). Petridou et al. beschrieben erstmals die Expression von Connexin-43 in isolierten, kultivierten humanen Keratocyten und Myofibroblasten. Das Gap Junction-Protein wurde hier überwiegend im Bereich der punktuellen Zell-Zell-Verbindungen von ruhenden Keratocyten in Form sogenannter „Maculae“ immuncytochemisch detektiert. In kultivierten Myofibroblasten ging die Connexin-43-Expression stark zurück und war lediglich intrazellulär nachzuweisen (Petridou und Masur, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde Connexin-43 in der konfluenten HCK-Kultur ebenfalls überwiegend punktförmig im Bereich der zellulären Kontaktstellen exprimiert, was erneut darauf hinwies, dass die Kultivierung in serumfreiem KGM+Ca zur Aufrechterhaltung eines undifferenzierten, keratocytären Phänotyps der HCK geeignet war.

**Vergleich der Ergebnisse zur serumfreien Kultivierung der HCK mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen.** Auch Barry-Lane et al. gelang es, eine Keratocyten-Zelllinie aus SV40-immortalisierten Kaninchen-Zellen serumfrei zu kultivieren. Hier zeigten jedoch nur

50% der Klone die stellare Morphologie ruhender Keratocyten. Die andere Hälfte wies eine konstitutive  $\alpha$ -SMA-Expression auf, die durch TGF $\beta$ -Stimulation nicht weiter verstärkt werden konnte (Barry-Lane et al., 1997).

Eine detaillierte immunocytochemische Untersuchung von Jester et al. ergab erstmals, dass auch bei humanen Keratocyten eine Aufrechterhaltung der dendritischen Morphologie in vitro durch den Entzug von Serum möglich ist, wie es schon zuvor für serumfrei kultivierte Kaninchen-Keratocyten (Jester et al., 1996a) sowie bovine Zellen beschrieben wurde (Beales et al., 1999, Kirschner et al., 1990). Wie die HCK wiesen die von Jester et al. untersuchten primären Keratocyten ein nur spärlich entwickeltes und mit der Zellmembran assoziiertes Aktin-Netzwerk ohne Stressfasern auf. Fokale Adhäsionen wurden mittels Vinculin-Staining nur minimal, der Myofibroblasten-Marker  $\alpha$ -SMA gar nicht nachgewiesen, was den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit entspricht (Jester et al., 2003). Die von Jester et al. entwickelte, durch Telomerase-(hTERT-)Transfektion isolierter Stroma-Zellen immortalisierte humane Keratocyten-Zelllinie besaß zwar keine konstitutive  $\alpha$ -SMA-Expression, die Zellen wiesen jedoch durchweg die spindelförmige Morphologie aktivierter Fibroblasten auf. Auch anhaltender Serum-Entzug stellte den Keratocyten-Phänotyp nicht wieder her (Jester et al., 2003).

Demzufolge handelt es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten HCK um die erste humane Keratocyten-Zelllinie, die unter serumfreien Kulturbedingungen die Morphologie und Proteinexpression ruhender Keratocyten in vivo hervorbrachte und aufrechterhielt, ohne Anzeichen einer phänotypischen Aktivierung zu zeigen.

#### **4.2.1.3 Charakterisierung der HCK-Zelllinie nach Stimulation mit TGF $\beta$ 1**

##### **Die Rolle von TGF $\beta$ bei der Myofibroblasten-Differenzierung cornealer Keratocyten.**

Bekanntlich wird die Transformation ruhender Keratocyten zu Myofibroblasten in vivo (Jester et al., 1997) und in vitro durch TGF $\beta$  induziert (Funderburgh et al., 2001, Jester et al., 1996a, Jester et al., 1999a, Masur et al., 1996, Petridou et al., 2000) und ist reversibel (Maltseva et al., 2001). Der Wachstumsfaktor TGF $\beta$  wird in vivo und in vitro konstitutiv vom Epithel synthetisiert (Fini, 1999, Wilson et al., 1992) oder von Keratocyten in einem autokrinen Vorgang nach cornealer Verletzung (Song et al., 2000), beziehungsweise nach einer Aussat in geringer Zelldichte (Masur et al., 1996) exprimiert (Jester et al., 2003). Durch Bindung an transmembranäre Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren löst TGF $\beta$  eine autokrine Phosphorylierungskaskade aus, die Signalpeptide der SMAD-Familie aktiviert (Massague,

1990, Massague et al., 2000). In Keratocyten der Cornea löst die Phosphorylierung von SMAD2 die nachgeschaltete (downstream-)Expression von Proteinen aus, welche für die Myofibroblasten-Differenzierung spezifisch sind, z.B.  $\alpha$ -SMA (Jester et al., 2003).

**TGF $\beta$ -Isoformen in der humanen Cornea.** Die TGF $\beta$ -Familie umfasst mehrere Strukturhomologe Proteine, welche die Migration, Proliferation, Apoptose und Differenzierung vieler Zellen, inklusive cornealer Endothel-, Stroma- und Epithelzellen, beeinflussen (Attisano et al., 1994, Carrington et al., 2006, Massague, 1990, Mita et al., 1998). Dadurch reguliert TGF $\beta$  Wundheilungsreaktionen in den meisten Spezies und Geweben, die Cornea eingeschlossen (Funderburgh et al., 2001, Jester et al., 1997, Mita et al., 1998, Saika, 2004).

Beim Menschen wurden drei TGF $\beta$ -Isoformen identifiziert, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ 3, welche eine 64-85%ige Homologie in ihrer Aminosäure-Sequenz aufweisen (Massague, 1990). Die beiden Isoformen TGF $\beta$ 1 und TGF $\beta$ 2 wurden sowohl im Cornea-Epithel als auch im Stroma nachgewiesen und sind zudem Bestandteil der Tränenflüssigkeit (Carrington et al., 2006, Gupta et al., 1996, Nishida et al., 1994, Nishida et al., 1995). TGF $\beta$ 1 und TGF $\beta$ 2 weisen zwar eine sehr hohe Sequenzhomologie von 80% auf, können aber gegensätzliche Effekte auf biologische Prozesse, wie die zelluläre Proliferation, Migration und Differenzierung ausüben (Carrington et al., 2006). Die spezifischen Rollen, die den Isoformen während der cornealen Wundheilung zukommen, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt (Carrington et al., 2006). Song et al. fanden heraus, dass eine Verletzung der Cornea die TGF $\beta$ 1-Expression erhöht (Song et al., 2000), dagegen berichten andere, dass TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ 3 im humanen Cornea-Gewebe dominieren (Nishida et al., 1994) und TGF $\beta$ 2 im verletzten Epithel stärker exprimiert wird als die beiden anderen Isoformen (Nishida et al., 1995). TGF $\beta$ 2 soll insbesondere eine Schlüsselrolle in der Wechselwirkung von verletztem Epithel und Stroma während der cornealen Wundheilungsreaktion spielen (Fini und Stramer, 2005, Nakamura, 2003). Untersuchungen von Carrington et al. an bovinen Keratocyten ergaben jedoch, dass von allen drei Isoformen, die in vitro getestet wurden, nur hochdosiertes TGF $\beta$ 1 eine Differenzierung der Keratocyten zu Myofibroblasten auslöste und bestätigten zudem die primäre Rolle von TGF $\beta$ 1 bei der cornealen Wundheilung in vivo (Carrington et al., 2006). Dieses Ergebnis stimmte mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen überein, die allesamt eine TGF $\beta$ 1-induzierte  $\alpha$ -SMA-Expression in den Stroma-Zellen verschiedener Spezies nachwiesen (Carrington et al., 2006). Dazu gehörte beispielsweise die TGF $\beta$ 1-Stimulation von serumfrei kultivierten bovinen (Kurosaka et al., 1998), humanen (Jester und Ho-Chang, 2003) und Kaninchen-Keratocyten (Jester et al., 1996a, Jester et al., 1999a, Petridou et al., 2000). Auch die SV40-immortalisierte Keratocyten-Zelllinie von Barry-Lane

et al. reagierte auf den Zusatz von TGF $\beta$ 1 (1 ng/ml) mit der Transformation zu myofibroblastoiden,  $\alpha$ -SMA-exprimierenden Zellen (Barry-Lane et al., 1997). TGF $\beta$ 1 ist demnach der einzige Faktor, der eine  $\alpha$ -SMA-Expression in Stroma-Zellen induzieren kann (Jester et al., 1996a, Jester et al., 1997).

**Transformation des HCK-Phänotyps durch Stimulation mit TGF $\beta$ 1.** Die Zugabe von TGF $\beta$ 1 zu serumfreien Kulturen ruhender, primärer Keratocyten resultierte stets in einer Transformation zu spindelförmig vergrößerten, fibroblastoiden Zellen mit ausgeprägter Phalloidin-induzierter Färbung, der Ausbildung von Stressfasern und einer meist 100%igen Expression von  $\alpha$ -SMA. Jester et al. zeigte an den humanen Zellen nach dreitägiger TGF $\beta$ 1-Stimulation zusätzlich eine prominente Vinculin-Expression, was auf die Ausbildung Fokaler Adhäsionen hinwies (Jester et al., 2003).

Dasselbe Bild zeigte sich nach 72-stündiger TGF $\beta$ 1-Exposition in den an serumfreies KGM+Ca-Medium adaptierten HCK. Dendritische Strukturen verschwanden vollständig und wurden durch längliche Zellen mit ausgeprägter, zu Mikrofilamentbündeln kondensierter Aktin-Struktur ersetzt (Abb. 12). Im Bereich der zellulären Matrix-Anhaftungen hatten sich punktförmige, Vinculin-enthaltende Fokale Adhäsionen ausgebildet. Die Connexin-43-markierten Gap Junctions, die im TGF $\beta$ - und Serum-freien Medium deutlich im Bereich der interzellulär-Kontaktstellen detektiert wurden, waren nach dreitägiger TGF $\beta$ -Stimulation gänzlich verschwunden und durch  $\beta$ -Catenin-enthaltende Adhärenzverbindungen aktivierter Stromazellen ersetzt worden (Abb. 14). Sowohl in den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen als auch durch Westernblot-Analyse zeigte sich eine TGF $\beta$ 1-induzierte Hochregulation der  $\alpha$ -SMA-Expression, welche die Ausdifferenzierung der HCK zu myofibroblastoiden Zellen belegte (Abb. 15B und 16B). Dies erbrachte den endgültigen Beweis dafür, dass eine Transformation der HCK-Zelllinie vom keratocytären zum fibrotischen Phänotyp durch TGF $\beta$ 1-Stimulation in serumfreiem Medium induziert werden konnte.

Wie bereits beschrieben brachte die Kultivierung der HCK in serumhaltigem Kulturmedium eine Mischkultur aus teilweise zu Myofibroblasten differenzierten Zellen und ruhenden Keratocyten hervor. Das Ansprechen der serumfrei kultivierten HCK auf TGF $\beta$ 1 bestätigte die Vermutung, dass die Aktivierung dieser Zellen durch den TGF $\beta$ 1-Gehalt des Serums hervorgerufen wurde (Berryhill et al., 2002, Fini, 1999, Kawakita et al., 2006, Kropf et al., 1997, Masui et al., 1986).

Die Ergänzung des serumhaltigen Mediums F99 5% mit 2 ng/ml TGF $\beta$ 1 führte, wie in der serumfreien Kultur, innerhalb von drei Tagen zu einem vollständigen Verlust der für Keratocyten typischen Strukturen. Fluoreszenzmikroskopisch waren keine abgerundeten Zellen mit stellarer Morphologie mehr zu erkennen (Abb. 12 und 13) und auch Gap Junctions waren kaum mehr nachzuweisen (Abb. 13). Die Fluoreszenzintensität der Färbung von F-Aktin,  $\beta$ -Catenin und Vinculin war im Vergleich zur unstimulierten Kultur deutlich erhöht, was auf eine weiter gesteigerte Expression von Stressfasern, Adhärenzverbindungen und Fokalen Adhäsionen und damit eine verstärkte Zell-Aktivierung hinwies (Abb. 13). Auf den Fluoreszenzaufnahmen war jedoch zu erkennen, dass nicht alle HCK zu Myofibroblasten differenziert vorlagen, wie es die Hautfibroblasten-Kontrolle zeigte, obgleich alle stimulierten HCK eine durchweg fibroblastoide Gestalt aufwiesen (Abb. 15C). Auch die halbquantitative Analyse der  $\alpha$ -SMA-Expression im Western Blot zeigte, dass die Zugabe von TGF $\beta$ 1 zur serumhaltigen Kultur keine wesentliche Steigerung der Myofibroblastendichte in der Kultur hervorgerufen hatte (Abb. 16A). Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass die TGF $\beta$ 1-Stimulation der serumhaltig kultivierten HCK eine vollständige Aktivierung und Differenzierung der Kultur induziert. Sie zeigten aber auch, dass diese Aktivierung lediglich eine Transformation vom keratocytären zum fibroblastoiden Phänotyp auslöst.

**Beeinflussung der Keratocytenproliferation durch TGF $\beta$ 1.** TGF $\beta$  agiert als bifunktionaler Regulator der Zellteilung in Abhängigkeit von Zellart und Kulturbedingungen (Masui et al., 1986, Sporn et al., 1986). Der Wachstumsfaktor hemmt die Mitose von Zellen ektodermaler Herkunft und stimuliert die Mitose mesothelialer Zellen (Sporn et al., 1986).

Die Aussagen zum Einfluss von TGF $\beta$  auf die Proliferation cornealer Keratocyten sind in der Literatur teilweise widersprüchlich. Während einerseits von einer TGF $\beta$ 1-vermittelten Wachstumsstimulation stromaler Fibroblasten in vitro berichtet wird (Grant et al., 1992a, Kay et al., 1998, Song et al., 2000), stellten andere eine teilweise dosisabhängige Hemmung der Proliferation kultivierter humaner Keratocyten fest (Andresen et al., 1997, Pancholi et al., 1998). Bei Carrington et al. hatten TGF $\beta$ 1-Konzentrationen von über 1 ng/ml keine Auswirkung auf die Proliferation primärer, boviner Keratocyten. Eine Dosis-Senkung auf 0,1 ng/ml verlängerte jedoch die Verdopplungszeit dieser Zellen (Carrington et al., 2006).

FACS-Untersuchungen an den HCK ergaben hingegen, dass deren Wachstumsrate durch Stimulation mit 2 ng/ml TGF $\beta$ 1 stark gesenkt wurde. Diese Proliferationshemmung war sowohl im serumfreien KGM+Ca-Medium als auch im serumhaltigen Medium F99 5% zu beobachten (Abb. 11C).

Die Divergenz dieser Ergebnisse kann durch eine Dosisabhängigkeit des TGF $\beta$ -Effekts auf die Keratocyten-Proliferation erklärt werden, wie sie von Kurosaka et al. beschrieben wurde: TGF $\beta$ 1 in einer Konzentration von 0,01 und 0,032 ng/ml beschleunigte das keratocytäre Wachstum, hohe Dosen von 1 und 10 ng/ml hemmten dagegen die Proliferation (Kurosaka et al., 1998). Demnach lag die TGF $\beta$ 1-Konzentration der in den Proliferationsversuchen verwendeten Medien ebenfalls im sehr hohen Dosisbereich, was die Einschränkung der HCK-Proliferation erklären kann. Der Mechanismus einer TGF $\beta$ -vermittelten Proliferationshemmung wird in der Literatur als Zellzyklus-Arretierung in der G<sub>1</sub>-Phase beschrieben, welche wahrscheinlich - wie die Kontaktinhibition endothelialer Zellen- durch p27<sup>KIP1</sup> vermittelt wird (Polyak et al., 1994, Zieske et al., 2004).

#### **4.2.1.4 Zusammenfassung und Fazit der HCK-Charakterisierung in der Monolayerkultur**

Zusammenfassend ergab die phänotypische Charakterisierung der HCK-Zelllinie auf Plastik, dass das Standard-Kulturmedium F99 5% aufgrund seines Serumgehaltes auch ohne Ergänzung mit TGF $\beta$ 1 eine partielle Differenzierung der HCK zu Myofibroblasten auslöst. Zudem konnte die Zelllinie an ein neu entwickeltes serumfreies Medium unter Beibehaltung ihrer proliferativen Fähigkeiten adaptiert werden. Dieses Medium ermöglichte sowohl die Wiederherstellung und Aufrechterhaltung eines Keratocyten-ähnlichen Phänotyps als auch eine TGF $\beta$ 1-vermittelte Transformation dieser Zellen zu Myofibroblasten, wie es bereits von anderen Arbeitsgruppen für serumfrei kultivierte, primäre Keratocyten beschrieben worden war (Carrington et al., 2006, Funderburgh et al., 2001, Jester et al., 1996a, Jester et al., 1999a, Masur et al., 1996, Petridou et al., 2000). Im Unterschied zu den dort untersuchten Primärzellen war die HCK-Zelllinie jedoch nicht von Beginn an serumfrei, sondern für mindestens 20 Passagen in 5% FKS-haltigem Medium kultiviert worden, wodurch sich eine Mischkultur aus ruhenden und aktivierten Zellformen gebildet hatte. Im Verlauf der Adaption an serumfreies KGM+Ca-Medium fand demnach eine Rückdifferenzierung der aktivierten Myofibroblasten zu keratocytären Zellen statt. Dies zeigte, dass die HCK trotz der sehr langen Serum-Exposition nicht endgültig ausdifferenziert waren, was die Idee von Maltseva et al. unterstützte, dass Myofibroblasten keinen terminal differenzierten Phänotyp darstellen. Eine TGF $\beta$ -vermittelte Differenzierung von Kaninchen-Keratocyten konnte durch die Zugabe von FGF rückgängig gemacht werden (Maltseva et al., 2001).

Desweiteren zeigte die Adaption an KGM+Ca-Medium, dass die Dedifferenzierung aktivierter HCK-Phänotypen durch Entzug von Serum möglich ist. Dies ist wahrscheinlich auf den damit verbundenen Entzug des in Serum enthaltenen Wachstumsfaktors TGF $\beta$  zurückzuführen. Myofibroblasten, die zuvor durch TGF $\beta$ -Stimulation primärer Kaninchen-Keratocyten generiert worden waren, kehrten nach dem Entzug des Wachstumsfaktors teilweise zum Keratocyten-Phänotyp zurück (Jester und Ho-Chang, 2003). Ob durch die Adaption der HCK an serumfreies Medium die Wiederherstellung eines tatsächlich ruhenden Phänotyps möglich ist, konnte im Folgenden durch Untersuchung der kontraktilen Eigenschaften dieser Zellen geklärt werden.

#### **4.2.2 Charakterisierung der HCK in der rekonstruierten Stroma-Matrix**

Die in vitro-Rekonstruktion und Optimierung des dreidimensionalen Stroma-Äquivalents war Voraussetzung für die Optimierung des Gesamt-Modells der Cornea nach Zorn-Kruppa. Dazu war auch die weiterführende Charakterisierung der HCK-Zelllinie unter Berücksichtigung ihres Phänotyps und den damit zusammenhängenden kontraktilen Eigenschaften unter organotypischen Bedingungen in der Collagen-Matrix erforderlich. Basierend auf dem von Zorn-Kruppa et al. entwickelten Stroma-Äquivalent mit Medium F99 und einem Serumanteil von 10% (Zorn-Kruppa et al., 2005) wurde durch Abwandlung der Rezeptur eine serumfreie Stroma-Variante mit KGM+Ca-Medium rekonstruiert. Die vergleichende Phänotypisierung der HCK in den beiden Stroma-Varianten sollte Aufschluss über den Einfluss der Matrix-Einbettung auf die Keratocyten-Differenzierung geben und die Eignung des serumfreien Stroma-Äquivalents als Baustein eines serumfreien Komplet-Modells der Cornea belegen. Durch Untersuchung der Myofibroblasten-Transformation der HCK nach Integration in die Collagen-Matrix und der damit verbundenen kontraktilen Fähigkeiten dieser Zellen konnte zudem evaluiert werden, ob die Stroma-Äquivalente auch als Bausteine eines in vitro-Wundheilungsmodells geeignet sein würden.

##### **4.2.2.1 Der Einfluss von Typ I-Collagen auf die $\alpha$ -SMA-Expression der HCK**

Wenn Haut-Fibroblasten auf Collagen ausgesät werden, verändern sie sowohl ihre Morphologie als auch die Synthese von Oberflächenproteinen und Proteinen ihres Zytoskeletts. Dazu gehören beispielsweise der Verlust cytoplasmatischer Stressfasern und



eine Reduktion der  $\alpha$ -SMA-Synthese, verglichen mit der Monolayerkultur der Fibroblasten (Ehrlich et al., 1998). Auch Myofibroblasten, die durch Aussaat in geringer Zell-Dichte erzeugt und für 24 Stunden mit einer Collagenschicht bedeckt wurden, verloren innerhalb dieser kurzen Zeitspanne sowohl ihre Stressfasern als auch ihre  $\alpha$ -SMA-Expression (Ehrlich et al., 2006).

Dasselbe Phänomen wurde in der vorliegenden Arbeit in den HCK beobachtet. Der Kontakt mit Typ I-Collagen wurde durch Einbettung der HCKo und HCK+Ca in serumhaltige oder serumfreie Stroma-Äquivalente über einen Zeitraum von sechs Tagen hergestellt. Nach der Collagenase-Verdauung der Collagen-Matrix zeigten die in serumhaltige Stroma-Äquivalente eingebetteten HCKo eine stark verminderte  $\alpha$ -SMA-Expression (Westernblot-Analyse) trotz des hohen FKS-Gehalts im Stroma-Äquivalent, verglichen mit der Monolayerkultur dieser Zellen in serumhaltigem Medium (Abb. 18A). Die ohnehin nur geringfügige  $\alpha$ -SMA-Expression der an serumfreies KGM+Ca-Medium adaptierten HCK+Ca war nach deren Integration in serumfreie Stroma-Äquivalente kaum noch detektierbar, was vermutlich auf den Collagen-Kontakt zurückzuführen war (Abb. 18B). Demzufolge reagierte auch die HCK-Zelllinie mit einer veränderten Protein-Expression auf den Collagen-Kontakt. Die verglichen mit der Monolayerkultur reduzierte  $\alpha$ -SMA-Expression im Stroma zeigte, dass die Serumbedingte Myofibroblasten-Differenzierung der HCK durch die Stroma-Einbettung zurückgedrängt werden konnte. Dies war ein weiterer Hinweis darauf, dass die myofibroblastoiden HCK-Zellen nicht terminal differenziert vorlagen und dieser aktivierte Phänotyp reversibel ist (Maltseva et al., 2001). Alternativ könnte der Verlust von  $\alpha$ -SMA durch den Zell-Collagen-Kontakt aber auch auf einen verstärkten  $\alpha$ -SMA-Abbau und nicht auf eine Inhibition der  $\alpha$ -SMA-Synthese zurückzuführen sein (Ehrlich et al., 2006).

**Ursachen der verminderten  $\alpha$ -SMA-Expression von HCK im Stroma-Gel.** Eine Erklärung für den geringen  $\alpha$ -SMA-Gehalt nach Collagen-Kontakt könnte die folgende Vorstellung liefern. In Wundheilungsgewebe ist die Expression von kontraktilen Proteinen des Zytoskeletts von der Entwicklung einer intra- und interzellulären Spannung abhängig (Arora et al., 1999, Ehrlich et al., 2006). Diese Mechanotension ist für die Ausbildung von Stressfasern und damit für die  $\alpha$ -SMA-Expression verantwortlich (Hinz et al., 2003). Die intrazelluläre Spannungsentwicklung erfordert die Ausbildung von Fokalen Adhäsionen, welche eine Interaktion zwischen intrazellulären Stressfasern und der extrazellulären Matrix ermöglichen (Arora et al., 1999). Die interzelluläre Mechanotension resultiert aus der Ausbildung von Adhärenzverbindungen zwischen benachbarten Zellen (Ehrlich et al., 2006).

In der Monolayerkultur entwickelt sich der myofibroblastoide Phänotyp jedoch auch in Abwesenheit kontraktile Kräfte (Ehrlich et al., 2006) durch Aussaat in niedriger Dichte (Masur et al., 1996), Einsatz eines serumhaltigen Kulturmediums (Kawakita et al., 2006) oder durch Stimulation mit TGF $\beta$ 1 (Jester et al., 1996a). Der Myofibroblasten-Phänotyp kann in solchen Zellen durch Collagen-Kontakt eliminiert werden (Ehrlich et al., 2006), was auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde.

**Rückgang der  $\alpha$ -SMA-Expression durch den Verlust der interzellulären Mechanotension.** Der nach Collagen-Einbettung beobachtete Rückgang der  $\alpha$ -SMA-Expression der HCK könnte an einem Verlust der interzellulären Mechanotension liegen (Ehrlich et al., 2006). Der Grund für den potentiellen Spannungsverlust könnte der Verlust direkter Zell-Zell-Kontakte zwischen den HCK gewesen sein.

So soll der Collagen-Kontakt der Cadherin-Akkumulation auf der Zell-Oberfläche entgegenwirken (Ehrlich et al., 2006). Dadurch würden Adhärenzverbindungen zwischen benachbarten Zellen gelöst, welche Voraussetzung für eine interzelluläre Spannungsentwicklung sind. In Abwesenheit der Zell-Zell-Spannung werden gleichzeitig die intrazellulär durch  $\beta$ -Catenin-Komplexe mit den Cadherinen verknüpften Stressfasern von ihrer Mechanotension befreit, wodurch die Notwendigkeit für eine Expression von  $\alpha$ -SMA verlorenght (Ehrlich et al., 2006).

Eine zu geringe Zelldichte und damit ein zu großer interzellulärer Abstand in der Collagen-Matrix, welcher die Ausbildung interzellulärer Adhäsionen und damit eine Spannungsentwicklung verhinderte scheidet als Ursache aus, da die Zelldichte in der Collagen-Matrix an die Aussaat-Dichte der Monolayerkultur angepasst wurde, in welcher eine  $\alpha$ -SMA-Expression stattfand.

Die erste Hypothese könnte auch auf die HCK zutreffen, zumal parallel zur  $\alpha$ -SMA-Expression in der Monolayerkultur die Ausbildung von Adhärenzverbindungen anhand der Expression von  $\beta$ -Catenin nachgewiesen wurde. Zellen in Monolayerkultur sind zwar keiner externen Spannung ausgesetzt, doch können Cadherin-abhängige Verbindungen der Zellen in der aktivierten Monolayer-Zellkultur unabhängig von der interzellulären Spannungsentwicklung an der  $\alpha$ -SMA-Expression beteiligt sein. Die zelluläre Signalgebung über Adhärenzverbindungen und Cadherine kann bekanntlich auch in Abwesenheit von Spannung die  $\alpha$ -SMA-Expression fördern (Ehrlich et al., 2006).

Sofern dieser direkte Zusammenhang zwischen der Ausbildung von interzellulären Adhärenzverbindungen und der  $\alpha$ -SMA-Expression existiert, ist der Rückgang der Myofibroblasten-Differenzierung in den HCK durch eine Internalisierung der am Aufbau

dieser Zell-Zell-Kontakte beteiligten  $\beta$ -Catenin-Cadherin-Komplexe durch den Collagen-Kontakt erklärbar.

**Rückgang der  $\alpha$ -SMA-Expression durch den Verlust der intrazellulären Mechanotension.** Alternativ könnte der Rückgang der  $\alpha$ -SMA-Expression der HCK nach Einbettung in die Stroma-Matrix durch einen Verlust der intrazellulären Tension bedingt sein. Laut Arora et al. exprimieren Wundheilungsfibroblasten nur dann  $\alpha$ -SMA in ihren Stressfasern, wenn eine Spannung innerhalb dieser Zellen erzeugt wird. Der Spannungsaufbau ist wiederum von zwei Faktoren abhängig: Die betreffende Zelle muss Fokale Adhäsionen ausbilden, mit denen sie sich fest an das sie umgebende Substrat heften kann, und das Substrat muss einen ausreichend großen physikalischen Widerstand besitzen, den es den von der Zelle generierten Kontraktionskräften entgegenzusetzen hat. So korrelierte der Widerstand des Substrates gegen Verformung mit dem TGF $\beta$ 1-induzierten Anstieg der  $\alpha$ -SMA-Expression von Humanhaut-Fibroblasten: Bei Integration in Collagen-Matrices mit drei unterschiedlichen Graden an Verformbarkeit, erzeugten diese Zellen unterschiedliche Spannungsintensitäten, was sich im Ausmaß der Stressfaser-Formation und  $\alpha$ -SMA-Expression widerspiegelte. Zellen, die auf Substraten mit geringer Verformbarkeit kultiviert wurden, erlangten Charakteristika von Myofibroblasten mit hoher  $\alpha$ -SMA-Expression, wie z.B. Monolayerkulturen auf Collagen-beschichteten Kunststoff-Zellkulturplatten - einem Substrat mit geringer Verformbarkeit. Fibroblasten, die in anhaftende oder von der Kulturplatte abgelöste, deformierbare Collagengele eingebettet wurden, entwickelten eine geringere Spannung, was eine Reduktion der  $\alpha$ -SMA-Expression zur Folge hatte. Die Bedeutung Fokaler Adhäsionen für die intrazelluläre Mechanotension wurde durch Antikörper-Blockade von  $\alpha$ 2 $\beta$ 1-Integrin deutlich, das am Aufbau dieser Zell-Substrat-Anhaftungen maßgeblich beteiligt ist. Die Integrin-Komplexierung führte bei allen Substraten gleichermaßen zu einem vollständigen Verlust der  $\alpha$ -SMA-Expression (Arora et al., 1999).

Zu gleichen Ergebnissen führten auch die Untersuchungen an der HCK-Zelllinie. Bei der HCK-Kultur auf Kunststoff-Zellkulturplatten konnte die Zelllinie aufgrund des großen Deformations-Widerstandes des Substrates eine erhebliche intrazelluläre Spannung aufbauen, welche eine ausgeprägte  $\alpha$ -SMA-Expression ermöglichte (Abb. 15, 16 und 18). Diese Spannungsentwicklung wurde im Zuge der Myofibroblasten-Differenzierung durch das im Serum enthaltene TGF $\beta$ 1 oder durch Zugabe des Wachstumsfaktors zum Kulturmedium induziert und zeigte sich wie bei Arora et al. anhand der Ausbildung prominenter Stressfasern (Abb. 12 bis 15) sowie Fokaler Adhäsionen (Abb. 13 und 14). Der signifikante Rückgang der Serum-induzierten  $\alpha$ -SMA-Expression nach Einbettung in FKS-haltige Stroma-Äquivalente

lässt sich durch den geringeren Deformations-Widerstand des Collagen-Substrats erklären. Diese Verformbarkeit wurde in den serumhaltigen Stroma-Äquivalenten durch die Kontraktion der Gele sichtbar, welche auf die kontraktilen Kräfte der integrierten, teilweise zu Myofibroblasten differenzierten HCK zurückzuführen war (Abb. 19A). Zusammengefasst könnte dies bedeuten, dass der geringere Widerstand der Stroma-Gele gegen Deformation, im Gegensatz zur nicht-deformierbaren Kunststoff-Zellkultur, zu einem Verlust der intrazellulären Spannung in den Serum-generierten Myofibroblasten führte und dies einen Rückgang der  $\alpha$ -SMA-Expression auslöste.

Teilweise wird die Theorie von Arora jedoch durch die nachfolgend beschriebenen Versuche zur Stroma-Kontraktion widerlegt. Trotz der Deformierbarkeit der Collagen-Matrix führte die TGF $\beta$ 1-Stimulation der Collagen-inkorporierten HCK zu einer zunehmenden Myofibroblasten-Differenzierung, wie anhand einer gesteigerten  $\alpha$ -SMA-Expression im Vergleich zu den unstimulierten Gelen erkennbar war. Die Myofibroblasten-Differenzierung und  $\alpha$ -SMA-Expression waren von einer starken Matrix-Kontraktion begleitet (Abb. 19 und 20).

#### 4.2.2.2 Untersuchungen zur Stroma-Kontraktion

**Kontraktile Charakteristika stromaler Phänotypen.** Um eine Vorhersage des HCK-Phänotyps in den verschiedenen Stroma-Gelen zu erleichtern, wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Myofibroblasten-Differenzierung dieser Zellen und der Kontraktion der sie umgebenden Collagenmatrix existiert. Wie bei der Charakterisierung dieser Zellen in der Monolayerkultur auf Kunststoff, wurde die Transformation der HCK in den fibrotischen Phänotyp nach Stimulation mit TGF $\beta$ 1 unter Gel-Bedingungen untersucht. Diese Versuche sollten die Eignung des Stroma-Äquivalents als Bestandteil eines in vitro Wundheilungsmodells zeigen.

Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal der keratocytären Phänotypen ist ihre Fähigkeit, die sie umgebende extrazelluläre Matrix zu kontrahieren. Anhand eines Wundkontraktions-Assays mit Collagen-eingebetteten humanen Keratocyten konnten Jester et al. als erste zeigen, dass der ruhende, keratocytäre Phänotyp die ihn umgebende Collagen-Matrix nicht zu kontrahieren vermag. Diese Zellen zeigten eine reduzierte F-Aktin-Kondensation und Fokale Adhäsionen fehlten. Der fibroblastoide Phänotyp, welcher durch FGF2- und PDGF-Stimulation generiert wurde, verursachte hingegen eine signifikante Gelkontraktion, begleitet von der Entwicklung von Stressfasern und Fokalen Adhäsionen. TGF $\beta$ 1-induzierte

Myofibroblasten lösten eine nochmals deutlich stärkere Collagen-Kontraktion als die Fibroblasten aus und zeigten als einziger Phänotyp neben Stressfasern und Fokalen Kontakten eine  $\alpha$ -SMA-Expression.

Zusammenfassend sind die drei unterschiedlichen, im Stroma vorkommenden Phänotypen durch ihre einzigartigen kontraktile Charakteristika definierbar. Keratocyten stellen dabei den nicht-kontraktile Phänotyp dar, Fibroblasten einen Phänotyp mit mittel-starken kontraktile Eigenschaften, jedoch fehlender  $\alpha$ -SMA-Expression. Der Myofibroblasten-Phänotyp dagegen ist hochgradig kontraktile und gleichzeitig als einziger durch Expression von  $\alpha$ -SMA charakterisiert (Jester und Ho-Chang, 2003).

Untersuchungen mit bovinen Fibroblasten in serumhaltigen Typ I-Collagengelen ergaben erstmals eine direkte Korrelation zwischen der TGF $\beta$ 1-vermittelten Gelkontraktion und dem durch Detektion von  $\alpha$ -SMA bestimmten Ausmaß der Myofibroblasten-Differenzierung der Zellen im Gel (Kurosaka et al., 1998).

**Myofibroblasten und die Kontraktion Extrazellulärer Matrix.** Bei der cornealen Wundheilung ist eine der wichtigsten Folgen die Kontraktion des Keratocyten-Netzwerks (Borderie et al., 1999), welche an die Differenzierung der Stroma-Zellen zu Myofibroblasten gebunden ist (Jester et al., 1995a, Petroll et al., 1993). Der Wundverschluss in der Cornea soll durch zelluläre Kontraktion ausgelöst und die dafür notwendige Mechanotension von Myofibroblasten erzeugt werden (Gabbiani et al., 1971). Voraussetzung für eine kontraktile Kraftentwicklung ist die  $\alpha$ -SMA-Expression entlang der zellulären Stressfasern und die Ausbildung stabiler Zell-Matrix-Kontakte, den Fokalen Adhäsionen. Diese punktförmigen Substrat-Anhaftungen verknüpfen Fibronectin-Fibrillen der Extrazellulären Matrix über den Fibronectin-Membranoberflächen-Rezeptor  $\alpha$ 2 $\beta$ 1-Integrin mit dem Aktingerüst und unterstützen so die Aktin-basierte Kraftentwicklung der Zelle. Zudem könnte die TGF $\beta$ -induzierte Veränderung der Zell-Zell-Kontakte, wie der Ersatz von Gap Junctions durch Adhärenzverbindungen, den Grad der Kontraktilität von Keratocyten zu Myofibroblasten steigern (Kurosaka et al., 1998, Petroll et al., 1993). Der genaue Mechanismus, über den dieser kontraktile Apparat von Myofibroblasten eine Matrix-Kontraktion auslöst, ist jedoch unbekannt. Die Beteiligung von  $\alpha$ -SMA, die erstmals von Darby et al. gezeigt wurde, legt jedoch einen Stressfaser-vermittelten Mechanismus nahe, der dem kontraktile Mechanismus von glattmuskulären Zellen ähnelt (Darby et al., 1990, Desmouliere et al., 2005, Jester et al., 1995c, Petroll et al., 1993)

**Kontraktion der Stroma-Äquivalente durch unterschiedliche HCK-Phänotypen.** Bei der phänotypischen Charakterisierung der in die Stroma-Gele eingebetteten HCK zeigte sich wie bei Kurosaka et al. eine direkte Korrelation zwischen der Serum- oder TGF $\beta$ 1-induzierten Myofibroblasten-Differenzierung und der Kontraktion der Gelmatrix (Kurosaka et al., 1998). Der durch gleichzeitigen Collagen-Kontakt und Serum-Entzug ausgelöste starke Rückgang der  $\alpha$ -SMA-Expression der HCK in serumfreien Stroma-Äquivalenten wurde von dem Phänomen begleitet, dass diese Gele über den gesamten Untersuchungszeitraum und darüber hinaus keinerlei Kontraktion zeigten (Abb. 19). Dieses Ergebnis unterstützt einerseits die Hypothese, dass Myofibroblasten einen reversiblen, nicht terminal differenzierten Phänotyp darstellen (Fini, 1999, Maltseva et al., 2001), widerspricht jedoch den Untersuchungen von Jester et al., in denen der Entzug von TGF $\beta$ 1 nur eine partielle Umkehr der Differenzierung von Collagen-inkorporierten Kaninchen-Myofibroblasten auslöste. Der Wachstumsfaktor-Entzug bewirkte zwar die Rückkehr zu einem keratocytären Phänotyp, eine Wiederherstellung der ruhenden, nicht-kontraktilen Eigenschaften war jedoch nicht möglich (Jester und Ho-Chang, 2003). Auch in vivo können Myofibroblasten im Wundheilungsgewebe vermutlich nur zu Fibroblasten-ähnlichen Phänotypen retransformieren. Diese schränken zwar mit der Zeit ihre kontraktilen Eigenschaften ein und nehmen eine keratocytäre Erscheinung an, bleiben jedoch biochemisch gesehen immer fibroblastoide Zellen (Fini, 1999).

Die HCK-Zelllinie könnte eine Ausnahme darstellen, da sie durch serumfreie Kultivierung und einen damit verbundenen Entzug von Wachstumsfaktoren nicht nur die morphologischen und ultrastrukturellen Charakteristika von Keratocyten wiedererlangen, sondern auch einen nicht-kontraktilen Phänotyp ausbilden kann (Abb. 18 und 19).

Der Einsatz von 10% FKS bei der Rekonstruktion der Stroma-Äquivalente führte auch ohne zusätzliche TGF $\beta$ 1-Supplementierung des Kulturmediums zu einer leichten Kontraktion der Collagengele (Abb. 19), was auf die Serum-induzierte Aktivierung der eingebetteten HCK zu kontraktilen Myofibroblasten hinweist (Berryhill et al., 2002, Kropf et al., 1997, Masui et al., 1986). Auch bei Borderie et al. riefen allein serumhaltige Kulturbedingungen eine Kontraktion von Collagengelen durch eingebettete bovine Keratocyten hervor (Borderie et al., 1999). Die phänotypische Partialaktivierung der HCK durch Serum wurde bekanntlich durch die Collagen-Einbettung abgeschwächt, was die relativ schwache Collagen-Kontraktion erklärt. Die Westernblot-Analyse der  $\alpha$ -SMA-Expression in den, mittels Collagenase-Verdauung aus dem kontrahierten Stroma herausgelösten HCK, bestätigte erneut diesen Zusammenhang (Abb. 20). Bei Borderie konnte in den serumhaltig kultivierten Gelen, trotz Kontraktion, kein  $\alpha$ -SMA nachgewiesen werden (Borderie et al., 1999), was auf den geringen

Deformationswiderstand des Collagengels zurückgeführt wurde, der die Aufrechterhaltung einer intrazellulären Mechanotension als Voraussetzung für die  $\alpha$ -SMA-Expression verhinderte (Arora et al., 1999).

Die Stimulation mit TGF $\beta$ 1 führte sowohl in den serumhaltigen als auch in den serumfreien Stroma-Äquivalenten zu einer starken Myofibroblasten-Differenzierung der eingebetteten HCK (Abb. 20). Die mit der zellulären Aktivierung einhergehende Kraftentwicklung der Collagen-inkorporierten HCK spiegelte sich in einer starken Kontraktion der Stroma-Gele wider (Abb. 19). Obgleich sich die Intensität der  $\alpha$ -SMA-Banden von serumfreien und serumhaltigen Stroma-Gelen im Western Blot ähnelte, verminderte sich die Oberfläche der serumfreien Gele um durchschnittlich 25% stärker als die der unter Serum-Einsatz konstruierten Stroma-Äquivalente. Die Ursache dafür ist bislang ungeklärt. Zum einen könnte eine stärkere,  $\alpha$ -SMA-unabhängige Kraftentwicklung in den serumfrei generierten Myofibroblasten stattgefunden haben. Andererseits könnte die verstärkte Kontraktion der serumfreien Collagen-Matrices aber auch an einer geringeren mechanischen Stabilität dieser Konstrukte liegen, wodurch die Kraftentwicklung der TGF $\beta$ 1-generierten Myofibroblasten eine größere Verformung erzielen würde.

**Abhängigkeit der Gelkontraktion von der Deformierbarkeit der Collagen-Matrix und der Zellzahl.** Diese Ergebnisse widersprachen teilweise den weiter oben beschriebenen Beobachtungen von Arora et al. Die Einbettung von Haut-Fibroblasten in Collagengele reduzierte bei dieser Arbeitsgruppe die Ansprechbarkeit der inkorporierten Zellen auf TGF $\beta$ 1, was sich in einer verringerten  $\alpha$ -SMA-Expression, im Vergleich zur auf Kunststoff kultivierten und stimulierten Kontrolle äußerte. Dies wurde, wie bereits beschrieben, mit der Abhängigkeit der  $\alpha$ -SMA-Expression von der Aufrechterhaltung der intrazellulären Mechanotension während des Versuchszeitraumes erklärt. Der Erhalt dieser Mechanotension wurde wiederum als abhängig vom mechanischen Widerstand des Substrats gegen Verformung beschrieben, der demnach im Falle der Collagengele zu gering war, um eine  $\alpha$ -SMA-Expression zu ermöglichen (Arora et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich die Ansprechbarkeit der HCK-Zelllinie auf TGF $\beta$ 1 hingegen unabhängig vom Widerstand des Substrats. Sowohl in der Monolayerkultur auf Kunststoff-Zellkulturplatten (Abb. 16) als auch eingebettet in die hochgradig deformierbare Stroma-Matrix (Abb. 20) reagierten HCK gleichermaßen auf die Anwesenheit von TGF $\beta$ 1 mit einer Steigerung der  $\alpha$ -SMA-Expression. Diese nahm auch im Zuge der Matrix-Kontraktion nicht ab, was zeigt, dass die an die  $\alpha$ -SMA-Expression gekoppelte intrazelluläre Spannungs- und Kraftentwicklung der HCK unabhängig vom Widerstand des Substrates ist.

Die von cornealen Keratocyten ausgelöste Gelkontraktion kann jedoch nicht nur von deren Transformation zum myofibroblastoiden Phänotyp, sondern auch von der Anzahl der Zellen in oder auf dem Collagengel beeinflusst werden (Assouline et al., 1992; Nakamura, 2003). Eine Steigerung der Keratocyten-Proliferation wurde mit einer verstärkten Matrix-Kontraktion in Zusammenhang gebracht (Guidry und Grinnell, 1985, Guidry et al., 1992). Demnach könnte die Ursache für die TGF $\beta$ 1-induzierte Kontraktion der Stroma-Gele, neben der Myofibroblasten-Differenzierung der HCK, auch ein TGF $\beta$ 1-vermittelter Anstieg der HCK-Proliferation in diesen Gelen gewesen sein. Die bereits beschriebene Konzentrationsabhängigkeit der TGF $\beta$ 1-Wirkung auf die Keratocyten-Proliferation schloss diese Theorie jedoch weitestgehend aus. Durch den Einsatz einer relativ hohen TGF $\beta$ 1-Konzentration von 2 ng/ml in serumfreien und serumhaltigen Medien wurde, wie bereits beschrieben, die Proliferation der stimulierten HCK im Vergleich zur unstimulierten Kultur nicht nur nicht gefördert, sondern sogar deutlich inhibiert. Dies wurde zwar nicht unter Gel-Bedingungen überprüft, jedoch sollten sich die Proliferationsverhältnisse zwischen den stimulierten und unstimulierten HCK infolge der Collagen-Einbettung nicht gänzlich umkehren. Zudem wurde an bovinen Fibroblasten dieselbe Beobachtung unter Gel-Bedingungen gemacht: der fördernde Effekt von TGF $\beta$ 1 auf die Gelkontraktion war auch hier nicht auf eine Stimulation der Zellproliferation, sondern auf eine Induktion der zellulären Myofibroblasten-Differenzierung zurückzuführen. Die stärkste Kontraktion der serumhaltigen Collagengele wurde mit TGF $\beta$ 1-Konzentrationen zwischen 1 ng/ml und 10 ng/ml erzielt, welche gleichzeitig die Keratocytenproliferation blockierten. Die Zugabe von TGF $\beta$ 1 führte in diesen Konzentrationen zwar zu einer Abnahme der Zellzahl insgesamt, löste aber gleichzeitig eine relative Zunahme der Myofibroblasten-Dichte aus (Kurosaka et al., 1998). Auch Borderie et al. beobachteten keine Korrelation zwischen der Zelldichte und der Gelkontraktion (Borderie et al., 1999).

Aufgrund dieser Ergebnisse könnte die Stromagel-Kontraktion eventuell als Surrogatparameter für das Ausmaß der Myofibroblasten-Differenzierung der integrierten HCK herangezogen werden. Damit könnte insbesondere das serumfreie Stroma-Äquivalent als wertvolles Instrument zur Untersuchung von Wachstumsfaktor-Effekten, Zell-Zell-Wechselwirkungen und Zell-Matrix-Wechselwirkungen dienen. Da die zelluläre Differenzierung von primärer Bedeutung für die corneale Wundheilung ist, könnte das Kontraktionsphänomen eventuell genutzt werden, um einige Aspekte der cornealen Wundheilung in vivo anhand des Stroma-Modells nachzustellen (Assouline et al., 1992).



#### 4.2.2.3 Zusammenfassung und Fazit der HCK-Charakterisierung in der rekonstruierten Stroma-Matrix

Ein Problem bei der Rekonstruktion des Stroma-Äquivalents nach Zorn-Kruppa stellte die starke Kontraktion der Gelmatrix dar, welche auf die Aktivierung der HCK durch den hohen Serumgehalt zurückzuführen war. Durch serumfreie Kultur konnte dieses Problem gelöst und ein Stroma-Äquivalent geschaffen werden, welches die Wiederherstellung eines ruhenden, nicht kontraktiven HCK-Phänotyps ermöglicht. Die fehlende Kontraktion des serumfreien Stroma-Äquivalents könnte im Hinblick auf eine Anwendung als Permeations- und Irritations-Modell sowie als Baustein eines serumfreien Full-thickness-Modells/ SE-Modells von großem Vorteil sein.

Die serumfrei eingebetteten HCK behielten ihre Stimulierbarkeit durch TGF $\beta$ 1, was eine massive Myofibroblasten-Differenzierung auslöste, die sich in der Kontraktion der Collagen-Matrix widerspiegelte. Dies ermöglicht eine einfache Einschätzung zur phänotypischen Entwicklung der eingebetteten Zellen anhand ihrer kontraktiven Eigenschaften und macht das serumfreie Stroma-Konstrukt zudem zum idealen Baustein eines mechanistischen in vitro Wundheilungsmodells.

#### 4.3 Vergleichende Untersuchungen zum Augenirritations-Potential von Modellsubstanzen am Epithel- und Stroma-Epithel-Modell

**Anforderungen an in vitro-Modelle zur Vorhersage des Augenirritations-Potentials chemischer Substanzen.** Damit eine Ersatzmethode mit höchstmöglicher Präzision die in vivo Reaktionen des Auges vorherzusagen vermag, ist ein mechanistischer Zusammenhang zwischen der Methode und dem Tierversuch erforderlich (Jester et al., 2001), wobei die Tiefe der anfänglichen Verletzung den wichtigsten mechanistischen Faktor darstellt, der die Folgen der Irritationsreaktion vorherbestimmt (Jester et al., 1996b, Jester et al., 1998a, Jester et al., 1998b, Maurer und Jester, 1999). Toxizitäts-Modelle, die nur aus einer Epithel-Einzelschicht bestehen, beschränken die Untersuchung potentiell Augen-irritierender Substanzen auf Stoffe, die lediglich eine leichte Irritation hervorrufen. Die Einbeziehung des Stromas und stromaler Keratocyten erweitert den Untersuchungs-Spielraum auf milde und mittelstarke Irritantien (Jester et al., 2001, Maurer und Jester, 1999). Zudem wurde bei der Toxizitäts-Untersuchung verschiedenster Irritantien in vivo beobachtet, dass manche Substanzen, beispielsweise Wasserstoffperoxid 10%, ausschließlich das Stroma verletzen, ohne in gleichem Maße das

Epithel zu schädigen (Jester et al., 2001, Maurer et al., 2001). Diese Beobachtungen weisen auf die Notwendigkeit hin, sowohl eine Epithel- als auch eine Stroma-Komponente in die in vitro Untersuchungen zur okularen Toxizität einzubeziehen, da die alleinige Verwendung des Epithels zu einer Unterschätzung des Irritationspotentials solcher Substanzen führen würde (Jester et al., 2001).

**Rekonstruktion des EPI- und SE-Modells.** Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein dreidimensionales Cornea-Modell für die in vitro Toxizitätstestung zu entwickeln. Ausgehend von der zunehmenden Schädigung des Stromas mit steigendem Irritationspotential einer Substanz (Jester et al., 1998a) erschien es sinnvoll, ein komplexes in vitro Testmodell aus dem in dieser Arbeit charakterisierten Stroma-Äquivalent und dem von Seeber et al. charakterisierten Epithel zu rekonstruieren (Seeber et al., 2008). Da insbesondere ein Modell für die Toxizitätsevaluation im Bereich der leichten bis mittelstarken Augenirritation geschaffen werden sollte, war die Einbeziehung der Stroma-Komponente, aber nicht zwingend die Anwesenheit eines Endothels erforderlich (Jester et al., 2001). Die fehlende Kontaktinhibition und die nur bedingt mögliche serumfreie Kultivierung der EC schlossen die Rekonstruktion eines organotypischen Komplett-Modells der Cornea ohnehin aus.

Das serumfreie Stroma-Epithel-(SE)-Modell wies hingegen alle typischen morphologischen und biochemischen Charakteristika der humanen Cornea auf. Neben der Ausbildung von Tight Junctions zwischen den HCE fanden sich eine Basalzellschicht als unterste Lage des Epithels, eine Basalmembran mit Hemidesmosomen an der Grenze zwischen Epithel und künstlicher Stroma-Matrix sowie darunterliegend die Bowman-Membran als azelluläre Schicht des Stromas mit unregelmäßig angeordneten Kollagenfibrillen (Seeber et al., 2008). Der Vorteil eines solch komplexen Modells kann aus bereits genannten Gründen eine höhere Vorhersagegenauigkeit sein (Jester et al., 2001). Die Rekonstruktion des dreidimensionalen Cornea-Modells aus mehreren Zelllinien bedeutet jedoch auch einen erheblichen Zeit- und Kosten-Mehraufwand im Vergleich zum einfachen Epithelmodell, was die routinemäßige Verwendung des SE-Modells erschwert. Daher wurde vergleichend untersucht, ob und welche Unterschiede zwischen dem SE-Modell und dem einfach EPI-Modell bezüglich der Vorhersage der Toxizität chemischer Substanz bestehen. Mittels MTT-Viabilitäts-Assay wurden  $ET_{50}$ -Bestimmungen für zwei Modellsubstanzen mit bekanntem Irritationspotential parallel am SE-Modell und am EPI-Modell vorgenommen. Durch Bestimmung der  $ET_{50}$ -Werte war es möglich, die Sensitivität der Gewebe-Äquivalente gegenüber der Testsubstanz

zu ermitteln. Zudem konnten die  $ET_{50}$ -Werte für die beiden Test-Substanzen mit den Daten anderer in vitro-Modelle zur okularen Irritationstestung aus der Literatur verglichen werden.

**Auswahl und Klassifizierung der Testsubstanzen.** Für die vorläufigen Untersuchungen zur Augenirritation wurden TritonX-100 sowie Benzalkoniumchlorid (BAC) als Modellsubstanzen ausgewählt, welche in den Konzentrationen 1%, 5% und 10% als Referenzchemikalien in der Datenbank des European Center for Toxicology and Ecotoxicology of Chemicals (ECETOC) von 1999 gelistet sind. Die ECETOC-Datenbank enthält 132 Referenzchemikalien, für die bereits umfangreiche in vivo Daten aus dem Draize-Test existieren und welche deshalb für die Validierung alternativer in vitro Testmethoden für die Untersuchung des Augenirritations-Potentials empfohlen werden. Die Chemikalien werden darin auf Basis eines „modified average score (MAS)“, welcher mit dem Draize-Score korreliert, nach ihrem Augenirritations-Potential klassifiziert. Die Draize-MAS reichen dabei von null (nicht irritierend) bis 110 (extrem irritierend). TritonX-100 10% ist beispielsweise mit einem MAS von 68,7 als stark („severe“) irritierend eingestuft, während BAC 10% mit einem MAS von 108,0 das am stärksten cytotoxische Tensid darstellt und als extrem irritierend („extreme“) klassifiziert wurde (Bagley et al., 1999). Auch bei Kennah et al. wurde das Irritationspotential der entsprechenden 10%igen Lösungen von BAC im Draize Test mit einem Draize Score von 98 als „extreme“ und TritonX-100 mit einem Draize Score von 59 als „severe“ eingestuft (Kennah et al., 1989). Die Einteilung der Irritantien in die Klassen „non-irritating (Klasse 0)“, „practically non-irritating (1)“, „minimal (2)“, „mild (3)“, „moderate (4)“, „severe (5)“ und „extreme (6)“, die auf dem 24h-Draize-Score basieren, geht dabei auf Kay und Calandra zurück (Grant et al., 1992b, Kay und Calandra, 1962).

Das Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) der Vereinten Nationen definiert das Augenirritations-Potential chemischer Substanzen nicht nur über dessen Schweregrad, sondern zusätzlich über die Reversibilität der okularen Schädigung. TritonX-100 10% gehört nach GHS-Klassifikation zu einer Gruppe von Substanzen, die irritierend auf das Auge wirken, deren Effekt jedoch innerhalb von 21 Tagen reversibel ist, wohingegen BAC 10% zu einer schwerwiegenden, irreversiblen Schädigung des Auges führt (UNECE, 2007, Amenuvor et al., 2005, Bagley et al., 1999, Powers et al., 2007a, Powers et al., 2007b, Stern et al., 1998, Van Goethem et al., 2006).

#### 4.3.1 Viabilitäts-Untersuchungen am EPI- und SE-Modell mit TritonX-100

TritonX-100 dient in einer Konzentration von 0,3% als Referenzstandard bzw. Positivkontrolle bei Augenirritations-Untersuchungen mit anderen in vitro Testsystemen, beispielsweise dem Clonetics<sup>®</sup> Human Epithelial Model (Amenuvor et al., 2005, Powers et al., 2007a, Powers et al., 2007b) und dem EpiOcular<sup>™</sup> Tissue Model (OCL-200) von MatTek (Stern et al., 1998). Diese Modelle können das Irritationspotential chemischer Substanzen mit relativ hoher Genauigkeit analog dem Draize-Test vorhersagen, wie MTT-Viabilitäts-Untersuchungen mit anschließender Bestimmung der ET<sub>50</sub> an einer großen Bandbreite chemischer Substanzen bestätigt haben (Powers et al., 2007a, Stern et al., 1998). Das Versuchsprotokoll von Stern et al. wurde in der vorliegenden Arbeit mit leichten Abwandlungen, z.B. bei der Auswahl der Expositionszeitintervalle in Anzahl und Länge, übernommen. Statt der, in der Literatur üblichen, maximal drei (Stern et al., 1998), vier (Amenuvor et al., 2005, Powers et al., 2007b) oder fünf Expositionszeiten (Osborne et al., 1995), wurden für das EPI- und SE-Modell mindestens sechs verschiedene Inkubationsintervalle gewählt, um den Verlauf der Viabilitäts-Zeit-Kurve genau definieren zu können. Eine weitere methodische Modifikation erfolgte bei der graphischen Bestimmung der ET<sub>50</sub>-Werte aus den Absorptionsdaten. Die allgemein übliche lineare Interpolation zwischen den zwei Expositionszeitpunkten, die den Zeitpunkt einschließen, an dem die Viabilität des Testgewebes um 50% reduziert ist (Amenuvor et al., 2005, Osborne et al., 1995, Powers et al., 2007a, Powers et al., 2007b, Stern et al., 1998), erschien hier nicht ausreichend präzise. Infolge von Besonderheiten im Kurvenverlauf, die erst durch Einbeziehung aller Expositionsintervalle detektierbar werden, ergab sich in der vorliegenden Arbeit eine höhere Präzision, wenn der zeitliche Verlauf der Viabilitäts-Abnahme durch nichtlineare Regression ermittelt und der ET<sub>50</sub>-Wert rechnerisch durch Interpolation des 50% Viabilitäts-Werts auf die Zeitachse bestimmt wurde (Abb. 21A und 22A).

Bei Untersuchungen am EpiOcular<sup>™</sup>-Modell zur Vorhersage des Augenirritations-Potentials kosmetischer Inhaltsstoffe betragen die ET<sub>50</sub>-Werte für die Positivkontrolle 0,3% TritonX-100  $24,9 \pm 6,3$  min (n = 47; Stern et al., 1998), bei der Kalibrierung der Irritations-Antwort am Cambrex-Modell entsprechend  $40,0 \pm 6,8$  min (Powers et al., 2007b).

In der vorliegenden Arbeit führte die Exposition mit TritonX-100 in der Standard-Konzentration von 0,3% zu einer Viabilitäts-Abnahme, die bei beiden Modell-Typen einer einfach exponentiell abfallenden Kurvenfunktion folgte. In vier unabhängigen Versuchen wurde eine ET<sub>50</sub> von  $28,8 \pm 10,1$  min für das komplexe SE-Modell ermittelt (Abb. 21B). Bei

dem EPI-Modell zeigte sich dagegen ein rascherer Viabilitäts-Verlust mit  $ET_{50}$ -Werten von  $7,5 \pm 3,3$  min (Abb. 22B). Trotz der histologischen Ähnlichkeit mit dem EpiOcular- und Cambrex-Modell, bzw. dem in vivo Cornea-Epithel, reagierte das einfache EPI-Modell demnach weitaus empfindlicher und instabiler als die kommerziell erhältlichen Epithelmodelle. Bei der alleinigen Verwendung des EPI-Modells als Augenirritations-Modell könnte es aufgrund dieser hohen Sensitivität zu einer Über-Prädiktion des Irritationspotentials und damit zu falsch positiven Ergebnissen kommen, was es den kommerziellen Epithelmodellen deutlich unterlegen macht, bzw. einer entsprechenden Korrektur über ein Prädiktionsmodell bedarf. Da bereits die Exposition mit einer sehr schwach irritierenden Substanz wie TritonX-100 0,3% zu einem sehr raschen Verlust der Viabilität des EPI-Gewebes führte, war außerdem zu erwarten, dass die Untersuchung von potenteren Irritantien, beispielsweise von Substanzen mit mittelstarkem Schädigungspotential, zu einem überaus raschen Verlust der Viabilität führen würde. Zur experimentellen Ermittlung der  $ET_{50}$  wären in einem solchen Falle sehr kurze Expositionszeiten nötig, was sich technisch nur schwer realisieren läßt und Ungenauigkeiten hervorruft. Diese Vermutung bestätigte sich bei der Exposition mit BAC 0,1%, welche später im Text beschrieben wird.

Die  $ET_{50}$ -Untersuchungen am SE-Modell mit TritonX-100 0,3% ergaben eine Ähnlichkeit zwischen der Sensitivität dieses komplexen Modells mit der Sensitivität der kommerziellen Epithel-Modelle gegenüber dieser Substanz. Die Expositionszeit, die zu einer halbmaximalen Reduktion der Viabilität des SE-Modells führte, lag zwischen den entsprechenden Werten des Cambrex- und EpiOcular<sup>TM</sup>-Modells (Amenuvor et al., 2005, Stern et al., 1998).

Der direkte Vergleich der  $ET_{50}$ -Werte aus den parallel zueinander durchgeführten MTT-Viabilitäts-Untersuchungen an den EPI- und SE-Modellen mit TritonX-100 0,3% verdeutlicht den signifikanten Unterschied in der Sensitivität der beiden Modelltypen und zeigt eine Überlegenheit des komplexen SE-Modells (Tab. 6).

**Viabilitäts-Untersuchungen am HCK-freien SE-Modell mit TritonX-100.** Um auszuschließen, dass die höhere Robustheit des SE-Modells lediglich auf dem Vorhandensein der Collagen-Matrix und damit eventuell auf einer verbesserten Differenzierung des Epithels durch die Collagenschicht beruhte (Builles et al., 2007), wurden die Versuche mit TritonX-100 0,3% auch an SE-Modellen mit azellulärem Stroma-Äquivalent durchgeführt. Als Kontrolle diente das EPI-Modell, das für die gleichen Zeiten wie das Keratocyten-freie SE-Modell mit TritonX-100 0,3% inkubiert wurde. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass die Widerstandsfähigkeit des Keratocyten-freien Modells sogar noch geringer war als die des

reinen Epithel-Modells. Durch Exposition mit dem Tensid ergaben sich hier  $ET_{50}$ -Werte von  $2,4 \pm 0,8$  min, die damit nicht nur unter denen des Keratocyten-haltigen SE-Modells, sondern auch unter den  $ET_{50}$ -Werten des EPI-Modells lagen (Abb. 23).

Ein Vergleich der Viabilität der unbehandelten Gewebe anhand der UV-Absorption vor Inkubation mit dem Irritans zeigte, dass die mitochondriale Aktivität, die in beiden Modellen nur vom Epithel herrühren konnte, in den Keratocyten-freien SE-Modellen deutlich geringer war als in den EPI-Modellen (Tab. 7). Daraus folgt, dass die azelluläre Stroma-Matrix die Entwicklung des Epithels nicht fördert, sondern diese sogar behindert.

Diese Ergebnisse beweisen, dass die Einbettung von HCK in die Stroma-Matrix für die Robustheit des SE-Modells obligatorisch ist und rechtfertigen damit die Komplexität des Modells. Die mangelnde Viabilität des Epithels auf dem azellulären Stroma-Gel weist auf eine unzureichende Proliferation und Differenzierung dieser Zellen auf dem reinen Collagen-Substrat hin und läßt vermuten, dass eine Interaktion von HCK und HCE im SE-Modell für die Differenzierung eines voll funktionsfähigen Epithels entscheidend ist. Die Notwendigkeit von Collagen und Keratocyten für die Differenzierung der Epithelzellen und die Ausbildung einer Basalmembran nahmen auch andere Arbeitsgruppen zum Anlass, ein aus bovinen Epithelzellen und Collagen-eingebetteten bovinen Keratocyten bestehendes, dreidimensionales Cornea-Modell zu rekonstruieren (Parnigotto et al., 1998), bzw. eine sogenannte „Hemicornea“, ein epithelialisiertes Stroma, aus primären humanen Keratocyten und Epithelzellen (Builles et al., 2007) zu schaffen. Bekanntlich beeinflussen Keratocyten die Proliferation und Differenzierung epithelialer Zellen vornehmlich durch Expression des Keratinocyten-Wachstumsfaktors (KGF), der als parakriner Mediator auf Epithelzellen wirkt (Imanishi et al., 2000, Sotozono et al., 1994)

Auch Parnigotto et al. führten MTT-Cytotoxizitäts-Untersuchungen mit anschließender Bestimmung der  $ET_{50}$  zur Evaluierung ihres Modells durch. Genau wie in der vorliegenden Arbeit wurden unter anderem BAC und TritonX-100 als Modellsubstanzen ausgewählt und vergleichend am reinen Epithel, am Keratocyten-Monolayer und an einem dreidimensionalen Epithel-Stroma-Modell getestet. Im Gegensatz zum EPI- und SE-Modell ergaben sich zwischen dem reinen Epithel-Modell und dem komplexen Stroma-Epithel-Modell von Parnigotto et al. kaum Unterschiede in der Sensitivität gegenüber TritonX-100 (Parnigotto et al., 1998). Die  $ET_{50}$ -Werte für BAC lagen dabei wie beim EPI- und SE-Modell deutlich unter denen für TritonX-100, wobei Konzentrationsangaben bedauerlicherweise fehlen (Parnigotto et al., 1998).

#### 4.3.2 Viabilitäts-Untersuchungen am EPI- und SE-Modell mit Benzalkoniumchlorid (BAC)

Benzalkoniumchlorid (BAC), die zweite Modellsubstanz zur Einschätzung der Irritations-Antwort der Cornea-Modelle, ist das Tensid mit dem höchsten Irritationspotential. In der hier untersuchten Konzentration von 0,1% wird es jedoch mit einem Draize-MAS von lediglich 2,0 als „nicht irritierend“ eingestuft (Powers et al., 2007a). Am Cambrex-Epithel-Modell wurden ET<sub>50</sub>-Werte von durchschnittlich 32,6 min (Powers et al., 2007b), 31,5 min (Powers et al., 2007a) und über 60 min (Amenuvor et al., 2005) ermittelt.

Die Exposition der EPI- und SE-Modelle mit BAC 0,1% resultierte in einem deutlich rascheren Verlust der Viabilität. Die halbmaximale Schädigung des EPI-Modells war nach  $3,4 \pm 1,1$  min erreicht (Abb. 25), eine 50%ige Viabilitätsminderung im SE-Modell fand innerhalb von  $4,3 \pm 0,7$  min statt (Abb. 24). Anders als bei der Exposition gegenüber TritonX-100 unterschieden sich damit die ET<sub>50</sub>-Werte der komplexen SE-Modelle für BAC 0,1% kaum von denen der einfachen EPI-Modelle. Diese Ergebnisse stimmen mit Cytotoxizitätsversuchen an den bovinen Cornea-Modellen von Parnigotto et al. überein, die eine signifikant stärkere Toxizität von BAC gegenüber TritonX-100 ergaben. Wie in der vorliegenden Arbeit unterschieden sich die ET<sub>50</sub>-Werte des einfachen Epithelmodells und die Werte des Epithel-Stroma-Modells nur geringfügig (11,00 min/ 12,37 min; Parnigotto et al., 1998).

Ein weiterer wichtiger Unterschied zu den Untersuchungen mit TritonX-100 lag auch im Verlauf der Viabilitäts-Zeit-Kurve der mit BAC inkubierten SE-Modelle. Bei TritonX-100 fiel die Kurve, wie bereits beschrieben, einfach exponentiell ab (Abb. 21). Die Exposition des zweischichtigen SE-Modells mit BAC führte hingegen zu einem deutlich zweiphasigen Kurvenverlauf in Form einer doppelt exponentiell abfallenden Exponentialfunktion (Abb. 24). Dagegen erfolgte die Viabilitäts-Abnahme des einfachen EPI-Modells für beide Substanzen einfach exponentiell (Abb. 25). Diese Unterschiede könnten in der verschiedenen Penetrationsfähigkeit der beiden Substanzen und damit in der unterschiedlichen Eindringtiefe in das Gewebe der in vitro Modelle begründet sein.

Die Untersuchung der Detergens-induzierten Irritation am Kanichenaugen mittels Konfokaler Mikroskopie zeigte, dass ein kationisches Tensid schwerwiegende Veränderungen der Cornea in derer gesamten Dicke verursachte. Neben einer Abtragung des Epithels und der Schädigung, bzw. dem Verlust des Endothels kam es zur Ablagerung hochgradig reflektierender Partikel im Stroma, was auf eine Koagulation zellulärer oder extrazellulärer Proteine hinwies. Kationische Tenside wie BAC rufen eine akute koagulative Verletzung der Cornea hervor, welche mit einer Fragmentierung der Zellen und der Denaturierung zellulärer

Proteine in allen drei Schichten einhergeht und die Nekrose des Gewebes zur Folge hat (Jester et al., 1996b; Maurer und Parker, 1996). Spezifische Untersuchungen mit BAC an isolierten Hornhäuten ergaben, dass diese Substanz eine Trübung der Cornea hervorrufen und in tiefere Schichten vordringen kann (Igarashi et al., 1993)

Der zweiphasige Kurvenverlauf des SE-Modells könnte demnach durch ein Vordringen von BAC in tiefere Schichten des Konstrukts erklärt werden, wodurch nicht nur die epitheliale, sondern auch die Viabilität des Stromas beeinträchtigt würde. Die erste Exponentialphase des Kurvenverlaufs könnte das Eindringen von BAC in das Epithel beschreiben, was die Erosion des Epithels und eine Nekrose der HCE zur Folge hatte. Die zweite Phase könnte das Vordringen der Substanz in das Stroma-Äquivalent widerspiegeln, was mit dem Verlust der Viabilität der HCK einherging. Der einphasige Kurvenverlauf des EPI-Modells unterstützt diese Hypothese.

Die Viabilitäts-Zeit-Kurve des SE-Modells verläuft nach Exposition mit TritonX-100 dagegen einphasig. Die Abweichungen in der Kinetik des toxischen Effekts von TritonX-100 und BAC an dem zweischichtigen Modell könnten sich aus den Unterschieden in der chemischen Struktur und den physikochemischen Eigenschaften oder den unterschiedlichen Cytotoxizitäts-Mechanismen dieser Substanzen ergeben. Aufgrund seiner kationisch amphiphilen und sehr polaren Struktur kann sich BAC in hydrophilen wie in lipophilen Geweben anreichern und diese durchdringen. Mit einem HLB-Wert von ca. 34 besitzt BAC zudem einen weitaus größeren hydrophilen Anteil als TritonX-100 mit einem HLB von 13,5. Vermutlich stellt die sehr hydrophile Stroma-Matrix keine Barriere für BAC dar, sondern ermöglicht vielmehr seine Anreicherung in tieferen cornealen Schichten, wie es an der isolierten Cornea nachgewiesen wurde (Igarashi et al., 1993). Hingegen ist TritonX-100 als nichtionisches Detergens weniger polar. Dadurch kann TritonX-100 zwar ins Epithel eindringen und dort einen cytotoxischen Effekt auf die HCE ausüben, das Stroma stellt für diese Substanz aber vermutlich eine Penetrationsbarriere dar.

Ein zweiter Erklärungsansatz geht von einem Unterschied im Ausmaß der Membrantoxizität der beiden Substanzen aus, welche vermutlich die primäre Schlüsselrolle in der Cytotoxizität grenzflächenaktiver Substanzen spielt (Aranzazu Partearroyo et al., 1990).

Im Gegensatz zu weniger cytotoxischen Tensiden erhöhte BAC weit vor der Zerstörung der Zellmembran zunächst die Permeabilität derselben. Diese Permeabilitätserhöhung erfolgte auch vor der Beeinträchtigung der mitochondrialen Aktivität. Jelinek postulierte daraufhin folgenden Ablauf der Membrantoxizität für BAC: konzentrations- und zeitabhängig steigt zunächst die Membranpermeabilität, gefolgt von einer partiellen und schließlich vollständigen



Desintegration der Membran. TritonX-100 hingegen wirkte erst in sehr hohen Konzentrationen zerstörend auf Zellmembranen. Laut Jelinek liegt dessen primärer toxischer Mechanismus in der Reduktion der mitochondrialen Aktivität, gefolgt von apoptotischen Veränderungen. Erst nach längerer Exposition kommt es zur Zerstörung der Zellmembran, zur Nekrose und schließlich zur kompletten Lyse der Zellen (Jelinek, 2001).

Aufgrund der gesteigerten Membranpermeabilität konnte neben der parazellulären BAC-Permeation eventuell auch eine transzelluläre Permeation stattfinden, wodurch BAC das Epithel eventuell schneller durchdringen konnte als TritonX-100 und sich deshalb rascher im Stroma anreicherte. Das weniger toxische TritonX-100 benötigte eventuell aufgrund seines alternativen Toxizitäts-Mechanismus mehr Zeit für die Schädigung der Epithelzellschicht, was ein Vordringen der Substanz in das Stroma-Gewebe verzögerte.

Sowohl die Hypothese, dass das Stroma eine Penetrationsbarriere für TritonX-100 darstellt als auch die Überlegung, dass die geringere Membrantoxizität dieser Substanz dessen Permeation zu stromalen Schichten verzögert, kann auch den einphasigen Verlauf der Viabilitätskurve des SE-Modells nach Exposition mit TritonX-100 erklären. In beiden Fällen würde lediglich die Viabilität der HCE beeinträchtigt, die HCK blieben jedoch von der Substanz unbeeinflusst. Auch die höhere Robustheit des SE-Modells gegenüber TritonX-100, welches verglichen mit dem EPI-Modell signifikant höhere  $ET_{50}$ -Werte aufweist, kann durch diese Theorien erklärt werden.

Die schnelle Penetration von BAC in das Cornea-Gewebe und seine sehr gute Löslichkeit in hydrophiler Umgebung sowie die eventuell damit verbundene Anreicherung der Substanz im Stroma-Gewebe könnte auch der Grund für die ungewöhnlich starke Beeinträchtigung der Viabilität der beiden Modelle sein, da das Auswaschen der Substanz nach der Exposition durch die Anreicherung erschwert würde. Unter Umständen war die in dieser Arbeit angewandte Waschmethode mit PBS nicht ausreichend, um die Konstrukte vollständig von der Substanz zu befreien. Dadurch könnte BAC weit über die eigentliche Expositionsdauer hinaus toxisch auf Epithel und Stroma eingewirkt haben, was die unerwartet starke Schädigung des Gewebes erklären würde. Ein entscheidender Schritt bei der Versuchsdurchführung wäre damit der Waschschrift.

### 4.3.3 Vergleichende Untersuchungen zur Regenerationsfähigkeit der in vitro Cornea-Modelle nach Exposition mit TritonX-100

Viele chemische Substanzen fallen in den Bereich der moderaten Augenirritation (Kay und Calandra, 1962). Um eine abschließende Einstufung dieser Stoffe vorzunehmen, wird - ausgehend von diesem initialen Score - häufig die Reversibilität des toxischen Effektes im in vivo Draize-Test bestimmt. Hält der schädigende Effekt über die Expositionsdauer hinweg an, wird die Substanz endgültig als „severe/ moderate“ eingestuft, persistiert der Toxizitätseffekt nicht, wird die Substanz als „mild/ moderate“ klassifiziert. Die Entwicklung einer in vitro Testmethode, welche die Reversibilität eines Chemikalien-induzierten toxischen Effektes vorherzusagen vermag (Grant et al., 1992b) und so die Umgehung des Draize-Tests erlaubt, ist daher von großer Bedeutung. Cornelis et al. fanden eine exzellente Korrelation zwischen den in vivo Draize-Scores und der zellulären Regenerationsrate in vitro, welche mittels MTT-Assay bestimmt worden war (Cornelis et al., 1992). Im Hinblick auf die Entwicklung eines solchen in vitro-Modells erfolgten auch in der vorliegenden Arbeit erste Untersuchungen zur Regenerationsfähigkeit des EPI- und SE-Modells mittels MTT-Viabilitäts-Assay.

**Untersuchungen zur Regeneration des EPI- und SE-Modells.** Die Grundlage eines jeden Wundheilungsvorganges nach einer Verletzung der Cornea ist die Kommunikation zwischen Epithel und Stroma (Wilson et al., 1999). Die von Keratocyten exprimierte parakrine Mediatoren HGF (Hepatocyten-Wachstumsfaktor) und KGF (Keratinocyten-Wachstumsfaktor) regulieren die Proliferation, Motilität, Differenzierung sowie vermutlich weitere Funktionen epithelialer Zellen. Umgekehrt beeinflussen corneale Epithelzellen die Zellen des Stromas durch Aussendung von Cytokinen wie Interleukin-1, Fas-Ligand und TGF $\beta$ , die infolge einer Verletzung freigesetzt werden (Fini und Stramer, 2005, Wilson et al., 1992, Wilson et al., 1999). Zudem wurde von einem stimulatorischen Effekt des epidermalen Wachstumsfaktors EGF auf die Proliferation stromaler Keratocyten berichtet (Wilson et al., 1993b, Woost et al., 1985)

Auf der Basis dieser Erkenntnisse wäre zu erwarten, dass die Regeneration des SE-Modells nach einer Tensid-bedingten Schädigung aufgrund der genannten zellulären Interaktionen schneller bzw. in höherem Ausmaß stattfände als die Erholung des EPI-Modells. Powers et al. untersuchten das Regenerationspotential des Epithelmodells von Cambrex nach fünfminütiger Exposition mit verschiedenen Detergenzien. Parallel zum MTT-Test durchgeführte TEER-Messungen ergaben, dass der Verlust der epithelialen Barriere innerhalb der fünfminütigen Expositionszeit sogar bei sehr milden Irritantien (ET<sub>80</sub> ~ 80 min, z.B. TritonX-100 1%) sehr

rasch erfolgte, während die Viabilität des Gewebes innerhalb derselben Zeitspanne kaum beeinträchtigt wurde. Nach 24 Stunden hatte sich die Barriere der Epithelgewebe, die mit milden Irritantien behandelt worden waren, auf über 80% des Kontrollwertes regeneriert. Nach 48 Stunden war jedoch keine weitere Besserung zu verzeichnen. Die metabolische Aktivität regenerierte sich innerhalb der 48-stündigen Reinkubationszeit kaum. Die Viabilitätswerte der Cambrex-Modelle blieben entweder auf niedrigem Niveau stabil, beispielsweise nach Exposition mit BAC (0,01%), TritonX-100 (0,3%) und SDS (3%) oder nahmen innerhalb der 48 Stunden sogar deutlich ab. Besonders auffällig war dies bei mit BAC 0,1% behandelten Konstrukten, deren Viabilität von annähernd 100% direkt nach der Exposition auf 77% nach 24-stündiger und 59% nach 48-stündiger Reinkubation sank (Powers et al., 2007a).

In der vorliegenden Arbeit wurden die EPI- und SE-Modelle analog auf ihre regenerativen Fähigkeiten hin untersucht, wobei eine Bestimmung der Membranintegrität mittels TEER-Messung aus technischen Gründen nur an den EPI-Modellen möglich war. Ausgehend von einer Reduktion der Viabilität auf 80% des Kontrollwertes, die durch TritonX-100 0,3% mittels verschiedener Expositionszeiten an beiden Modell-Typen gezielt herbeigeführt werden konnte, zeigte sich bei beiden Modellen ein weiterer Rückgang der MTT-Metabolisierungskapazität nach 24-stündiger Reinkubation (EPI-Modell:  $59,95 \pm 11,21\%$ ; SE-Modell:  $33,10 \pm 7,28\%$ ). Entgegen den Erwartungen sank die Viabilität des SE-Modells innerhalb der ersten 24 Stunden nach Exposition noch weiter ab als die des EPI-Modells. Nach 48 Stunden war bei beiden Modellen ein Wiederanstieg der Viabilität im Vergleich zum Vortag zu beobachten, eine vollständige Regeneration erfolgte jedoch nicht (EPI-Modell:  $73,94 \pm 6,93\%$ ; SE-Modell:  $48,31 \pm 3,67\%$ ; Abb. 27A). Eventuell wäre ein längerer Untersuchungszeitraum nötig gewesen, um die fortschreitende Regeneration der Modelle bezüglich ihrer Metabolisierungskapazität zu verfolgen. Die anhaltende Reduktion der Gewebs-Viabilität innerhalb der ersten 24 Stunden nach TritonX-100-Exposition, wie sie auch bei Powers et al. nach Exposition des Cambrex-Modells teilweise beobachtet wurde (Powers et al., 2007a), lässt sich eventuell durch eine Anreicherung der Substanz im Gewebe oder eine Adsorption an der Oberfläche des Konstrukts erklären. Damit würde sich ein anhaltender toxischer Effekt ergeben, der zur weiteren Beeinträchtigung der Viabilität führte. Durch den Mediumwechsel nach 24 Stunden wurde eventuell restliche Substanz entfernt, wodurch die verzögerte Erholung der Gewebe zustande kam.

Über die Wahrscheinlichkeit eines anhaltenden toxischen Effekts gaben die Untersuchungen von Grant et al. Aufschluss (Grant et al., 1992b). Im Rahmen von Untersuchungen zum

Cytotoxizitäts-Potential von Detergentien an primären Kaninchen-Epithelzellen wurde ein *in vitro* Assay entwickelt, der nicht nur das anfängliche toxische Potential von Testsubstanzen, sondern auch langfristige Effekte dieser Stoffe untersuchen sollte. Dabei wurde die Schädigung der Zellen direkt nach einstündiger Substanz-Exposition mittels Lactatdehydrogenase (LDH)-Assay ermittelt. Wie in der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen an denselben Zellen nach einem Mediumwechsel und 24-stündiger Postinkubation wiederholt, um eine verzögerte toxische Wirkungen der Chemikalien oder eine teilweise Erholung der Epithelzellen zu erfassen. Sowohl TritonX-100 als auch BAC übten einen nachhaltigen toxischen Effekt, erkennbar anhand eines fortgesetzten LDH-Austritts aus den Zellen, auch nach der Beseitigung der irritierenden Substanz aus. Diese anhaltende Toxizität wies auf eine starke und anhaltende Schädigung der Zellmembranen und/oder intrazellulärer Vorgänge hin. Mild, minimal und nicht-irritierende Tenside wirkten hingegen nicht anhaltend toxisch (Grant et al., 1992b). Diese Ergebnisse zeigte auch der *in vivo* Draize-Test. Hier führte die Exposition mit TritonX-100 und BAC zu einer bleibenden Irritation des Kaninchenauges über mehrere Tage (Kennah et al., 1989). Somit ist anzunehmen, dass die am SE- und EPI-Modell beobachtete Viabilitätsabnahme innerhalb der 24-stündigen Post-Expositionsphase tatsächlich auf einen fortgesetzten toxischen Effekt von TritonX-100 zurückzuführen ist. Ob eine Anreicherung der Substanz im Cornea-Gewebe die Ursache für deren verlängerte toxische Wirkung ist, muss noch geklärt werden.

**Regeneration der Barriereeigenschaften.** Die Regeneration der Barriereeigenschaften des EPI-Modells entsprach ebenfalls den Ergebnissen von Powers et al. am Cambrex-Epithelmodell. Der TritonX-100-bedingte Viabilitätsverlust von 20% wurde von einem ungleich stärkeren Verlust der Membranintegrität begleitet, die direkt nach der Exposition nur noch  $19,8 \pm 14,1\%$  im Vergleich zur Kontrolle betrug. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Schädigung erholte sich die Barriere auf  $35,5 \pm 9,9\%$  des Ausgangswertes. Analog zum Cambrex-Modell unterschieden sich die TEER-Werte des EPI-Modells nach 48-stündiger Reinkubation mit durchschnittlich  $36,0 \pm 10,1\%$  kaum von den 24 Stunden-Werten.

#### **4.3.4 Fazit der vergleichenden Untersuchungen zum Augenirritations-Potential am Epithel- und Stroma-Epithel-Modell**

Um die Eignung der in dieser Arbeit rekonstruierten *in vitro*-Modelle der Cornea für die Einstufung des Irritationspotentials chemischer Substanzen sowie die Einschätzung eines persistierenden toxischen Effekts anhand der Regeneration dieser Modelle belegen zu können,

muss ein großes Spektrum an Substanzen mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften am EPI- und SE-Modell getestet werden. Dann kann eventuell ein Vorhersagemodell unter Einbeziehung bereits existierender in vivo Daten aus dem Draize-Test geschaffen werden.

#### **4.4 Rekonstruktion eines optimierten Kompletmodells der humanen Cornea und Ausblick**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, ein serumfreies, mehrschichtiges Cornea-Äquivalent aus einer Stroma- und Epithel-Komponente (SE-Modell) zu rekonstruieren, welches alle wichtigen morphologischen Strukturen der humanen Cornea, inklusive einer Basal- und Bowman-Membran, aufweist (Seeber et al., 2008). Desweiteren zeichnet sich das SE-Modell, im Gegensatz zu dem entsprechenden serumhaltig kultivierten Cornea-Äquivalent (Zorn-Kruppa et al., 2004), durch eine über mehrere Wochen konstant bleibende Oberfläche aus, da die Stroma-Matrix dieses Konstruktes unter serumfreien Bedingungen nicht kontrahiert. Vor allem diese Besonderheit könnte es zum idealen Modell für Permeations-Untersuchungen an der humanen Cornea machen.

Das SE-Modell ermöglicht zudem eine Interaktion zwischen Epithel und Stroma, die der in vivo-Situation ähnelt. Die in das serumfreie Stroma-Äquivalent inkorporierten HCK zeigen die organotypischen Eigenschaften humaner Keratocyten in vivo, d.h. einen ruhenden, nicht-kontraktilen Phänotyp, der durch TGF $\beta$  zur Differenzierung in aktivierte Zelltypen, Fibroblasten und Myofibroblasten, angeregt werden kann. Beides könnte für die Etablierung eines mechanistischen in vitro Wundheilungs-Modells genutzt werden. Substanzen mit mittlerem bis starkem Augenirritations-Potential schädigen bekanntlich neben dem Epithel auch die Basalmembran und Teile des Stromas (Maurer et al., 1997). Bei einer Zerstörung der Basalmembran, welche das epitheliale vom Stroma-Kompartiment trennt und damit vermutlich als „Fibroseschalter“ agiert (Fini und Stramer, 2005), gelangt in vivo konstitutiv vom Epithel exprimiertes TGF $\beta$  zu den Keratocyten des Stromas und löst deren Myofibroblasten-Differenzierung aus, welche letztendlich zur Wundkontraktion führt.

Der mechanistische Zusammenhang zwischen einer tiefergehenden Schädigung der Cornea, die spezifisch durch milde respektive moderate Irritantien verursacht werden kann und zur Zerstörung der Basalmembran führt, der Myofibroblasten-Differenzierung im Stroma und der darauffolgenden Gewebe-Kontraktion könnte auch im SE-Modell genutzt werden. Als mechanistischer Endpunkt bietet sich hierbei die Myofibroblasten-Differenzierung der HCK bzw. die damit einhergehende Kontraktion des Cornea-Konstrukts an, welche für eine einfache Vorhersage des Irritationspotentials chemischer Substanzen, insbesondere im

Bereich der milden bis moderaten Augenirritation genutzt werden könnte: Eine fehlende Kontraktion des Konstrukts würde auf eine rein oberflächliche Schädigung des Gewebes mit intakter Basalmembran und damit auf eine sehr leicht irritierende Substanz hinweisen.

Um ein solches Modell zu realisieren, ist allerdings zunächst eine weiterführende Charakterisierung der HCE-Zelllinie hinsichtlich ihrer TGF $\beta$ -Expression und Freisetzung sowie die Untersuchung der Reaktion von HCK auf das epitheliale TGF $\beta$ -Angebot erforderlich. Dies könnte beispielsweise durch Monolayer-Kokultur von HCK und HCE in Zellkultureinsätzen bzw. Zellkulturplatten geschehen (Minami et al., 1993), wobei die Myofibroblasten-Differenzierung der HCK mittels Westernblot-Analyse der  $\alpha$ -SMA-Expression erfaßt werden sollte.

Da Tiefe und Ausmaß des toxischen Effekts bekanntlich den primären mechanistischen Faktor für die Korrelation zwischen der in vitro Methode und dem Tierversuch darstellen (Jester et al. 2001), könnte desweiteren eine Methode etabliert werden, mit der die Tiefe der Schädigung des SE-Modells direkt evaluiert werden kann, um die nachfolgende Irritationsreaktion vorherzusagen. Dafür bietet sich der LIVE/DEAD<sup>®</sup> Viabilitäts-/Cytotoxizitäts-Assay mit Calcein AM und Ethidium Homodimer-1 am SE-Modell und eine Erfassung der Schädigungstiefe mittels Konfokaler Mikroskopie an.

Um ein, auf dem SE-Modell basierendes, dreischichtiges Kompletmodell der humanen Cornea zu rekonstruieren, müsste eine neue Endothelzelllinie geschaffen werden, die an serumfreie Kulturbedingungen adaptiert werden kann und gleichzeitig einen funktionalen, kontaktinhibierten Endothel-Monolayer ausbildet.

Momentan wird das SE-Modell in einem vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projekt („Prävalidierung eines biotechnologisch hergestellten Hornhautmodells für die pharmakokinetische und sicherheitstoxikologische Prüfung von ophthalmologischen Arzneistoffen und Hilfsstoffen“) prävalidiert.

## **5 ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY**

---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Bis heute existiert keine validierte Alternativmethode, die im Rahmen der Risikobewertung von Chemikalien und Arzneistoffen sowie der toxikologischen Sicherheitsprüfung von Kosmetika den Augenirritations-Test nach Draize am lebenden Kaninchen vollständig ersetzen kann. Für Substanzen mit starkem Augenirritations-Potential kann die Toxizität anhand verschiedener, validierter *in vitro* Assays im Rahmen einer abgestuften, von der OECD empfohlenen Teststrategie mit hoher Genauigkeit erfasst werden (BCOP-Assay, ICE-Methode). Substanzen mit sehr mildem Augenirritations-Potential können zukünftig möglicherweise durch kommerziell erhältliche, dreidimensionale Cornea-Epithelmodelle identifiziert werden, die sich momentan in der Validierung befinden (EpiOcular™ Modell, SkinEthik HCE™ Modell). Dagegen muss insbesondere die Lücke im Bereich der milden bis moderaten Augenirritation durch neue Alternativmethoden geschlossen werden.

Die Überprädiktivität/ hohe Sensitivität der dreidimensionalen Epithelmodelle sowie die Forderung nach einem mechanistischen Ansatz, der die Tiefe der cornealen Verletzung durch toxische Substanzen berücksichtigt und damit ermöglicht, die gesamte Bandbreite an Schweregraden okulotoxischer Reaktionen abzudecken (Jester et al., 2001), erfordert die Einbeziehung weiterer cornealer Schichten, Stroma und Endothel, in ein organotypisches *in vitro* Modell der Cornea.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, ein solches, von Zorn-Kruppa et al. etabliertes Kompletmodell der Cornea aus drei humanen, SV40-immortalisierten Zelllinien hinsichtlich des Kulturmediums zu optimieren und diese Endothel (EC)-, Keratocyten (HCK)- und Epithel (HCE)-Zelllinie an ein gemeinsames, möglichst serumfreies Wachstumsmedium zu adaptieren. EC und HCK wurden zudem in Abhängigkeit von Art und Serumgehalt des Kulturmediums hinsichtlich der Frage, ob die organotypischen Merkmale der primären Zellen trotz der SV40-Immortalisierung erhalten geblieben sind, charakterisiert.

Die EC-Zelllinie wurde auf ihre Fähigkeit zur interzellulären Kontaktinhibition untersucht, welche nach dem Erlangen der zellulären Konfluenz die Voraussetzung zur Ausbildung und Aufrechterhaltung eines organotypischen Endothel-Monolayers darstellt (Joyce et al., 2002).

Die Keratocytenzelllinie HCK wurde in Monolayer-Kultur und nach Einbettung in die collagenöse Matrix des Stroma-Äquivalents phänotypisch und funktionell sowie in Abhängigkeit von Serum und Wachstumsfaktoren charakterisiert. Insbesondere wurde die Transformation der HCK in fibrotische Phänotypen nach Stimulation mit TGFβ untersucht,



welche in vivo an cornealen Wundheilungsreaktionen beteiligt sind (Fini und Stramer, 2005, Jester et al., 1999).

Bei der Untersuchung der EC-Zelllinie zeigte sich FKS als obligatorisch für das Zellwachstum, eine Adaption an serumfreie Kulturbedingungen war nicht möglich. Untersuchungen zur Kontaktinhibition ergaben, dass die EC weder zur Ausbildung eines organotypischen Monolayers noch zur Zellkontakt-induzierten Proliferationshemmung in der Lage sind. Dies ist vermutlich auf eine Störung der an der Zellzykluskontrolle beteiligten Mechanismen durch die Immortalisierung mittels Transfektion mit dem SV40-Large-T-Antigen, einem viralen Onkoprotein, zurückzuführen. Die morphologisch korrekte Nachbildung eines endothelialen Monolayers bei der Rekonstruktion des dreidimensionalen Kompletmodells der humanen Cornea nach Zorn-Kruppa ist demnach vorerst nicht möglich. Auch die Implementierung der EC in ein serumfreies Konstrukt konnte nach den vorliegenden Ergebnissen leider nicht erfolgen.

Die Keratocytenzelllinie HCK hingegen behielt auch nach Adaption an ein neu entwickeltes serumfreies Medium ihre Proliferationskapazität und kehrte gleichzeitig durch den Entzug von FKS zu einem ruhenden, nicht-kontraktilen Keratocyten-Phänotyp zurück. Die Kultivierung der HCK im serumhaltigen Standardmedium stimulierte zwar das Zellwachstum, führte aber zu einem Verlust der dendritischen Morphologie und zur Differenzierung in fibrotische Phänotypen, Fibroblasten und  $\alpha$ -SMA-exprimierende Myofibroblasten. Dies war auf den TGF $\beta$ -Gehalt des Fötalen Kälberserums (FKS) zurückzuführen, welcher bekanntlich die Myofibroblasten-Differenzierung primärer Zellen in vitro und in vivo stimuliert.

Die Einbettung der HCK in das collagenöse Stroma-Äquivalent resultierte sowohl unter serumfreien als auch unter serumhaltigen Bedingungen in einem Rückgang der  $\alpha$ -SMA-Expression im Vergleich zur Monolayer-Kultur, was auf eine Dedifferenzierung des myofibroblastoiden Phänotyps hinweist und eventuell auf einem Verlust der interzellulären Mechanotension durch den Collagen-Kontakt basiert.

Die Stimulation mit TGF $\beta$ 1 (2ng/ml) verminderte die Proliferation der HCK und führte sowohl in der Monolayer-Kultur als auch unter Gel-Bedingungen zu einer Transformation der Zellen in hochkontraktile Myofibroblasten, die eine starke, makroskopisch sichtbare Kontraktion der Stroma-Äquivalente auslösten. Ruhende Keratocyten hingegen besitzen keine kontraktilen Eigenschaften, die Fläche der serumfreien Stroma-Äquivalente blieb deshalb konstant. Demzufolge spiegelte sich der Phänotyp der Stroma-inkorporierten HCK in der

Kontraktion der Collagengele wider. Dies ermöglicht eine einfache Einschätzung zur phänotypischen Entwicklung der eingebetteten HCK anhand ihrer kontraktiven Eigenschaften und macht das serumfreie Stroma-Konstrukt zudem zum idealen Baustein eines mechanistischen in vitro Wundheilungsmodells.

Abschließend wurde ein komplexes in vitro Testmodell aus dem in dieser Arbeit charakterisierten Stroma-Äquivalent und dem von Seeber et al. charakterisierten Epithel (SE-Modell) sowie ein einfaches dreidimensionales Epithelmodell (EPI-Modell) in Zellkultureinsätzen rekonstruiert und deren Sensitivität gegenüber zwei Detergenzien mit bekanntem Irritationspotential vergleichend untersucht. Viabilitätsuntersuchungen nach Exposition mit TritonX-100 zeigten die Überlegenheit des SE-Modells, dessen Ergebnisse denen kommerziell erhältlicher Epithelmodelle ähnelten, gegenüber dem übermäßig sensitiven EPI-Modell. Versuche mit BAC hingegen ergaben eine gleichermaßen hohe Sensitivität beider Modelle, was vermutlich auf den alternativen Toxizitätsmechanismus dieser Testsubstanz zurückzuführen ist, d.h. einer primär stark Zellmembran-schädigenden Wirkung.

Bei ersten Versuchen zur Regenerationsfähigkeit des EPI- und SE-Modells nach Schädigung mit TritonX-100 ließ sich bei beiden Konstrukten innerhalb von 48 Stunden keine vollständige Erholung der Viabilität feststellen, was vermutlich auf einen anhaltenden toxischen Effekt von TritonX-100 zurückzuführen ist.

Um eine Eignung dieser rekonstruierten in vitro Cornea-Modelle für die Einstufung des Irritationspotentials chemischer Substanzen sowie die Einschätzung eines persistierenden toxischen Effekts anhand der Regeneration der Modelle belegen zu können, muss allerdings ein großes Spektrum an Substanzen mit unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften getestet werden.

## SUMMARY

Currently, there is no regulatory accepted alternative method to fully replace the Draize rabbit eye irritation test on the living animal in risk assessment of chemicals, testing of pharmaceuticals and toxicological safety assessment of cosmetics. The toxicity of chemical substances with severe eye irritation potential can be evaluated by several validated in vitro assays (BCOP-assay, ICE-method) in the framework of a tiered testing strategy that is recommended by the OECD. Very mild irritants may soon be identified by commercially available, three-dimensional models of the corneal epithelium that are currently under validation (EpiOcular<sup>TM</sup> Modell, SkinEthik HCE<sup>TM</sup> Modell). However, the gap between mild and moderate eye irritation potential has to be closed by new alternative methods.

The high sensitivity of the three-dimensional epithelial models, as well as the call for a mechanistically based method that considers the depth of the corneal injury and therefore covers the whole severity range of toxic reactions (Jester et al., 2001), demands an implementation of other corneal structures, such as stroma and endothelium, in an organotypic in vitro model of the human cornea.

The aim of the present work was to optimise an already existing full-thickness-model of the human cornea, which was established by Zorn-Kruppa et al. from three SV40-immortalised human cell lines, with respect to their culture conditions and to adapt this endothelial (EC)-, keratocyte (HCK)- and epithelial (HCE)-cell line to a common serumfree culture medium. EC and HCK were characterised with regard to the preservation of organotypic features despite SV40-immortalisation, depending on the culture medium and its serum content.

The EC-cell line was examined with regard to intercellular contact inhibition, which is an important feature of primary endothelial cells that allows them to establish and sustain an organotypic monolayer after reaching confluency (Joyce et al., 2002). The keratocyte cell line HCK was characterised in monolayer culture and after embedding in the stromal collagen-matrix. Phenotype and functionality were studied with respect to the presence of serum and growth factors. The work focussed on the HCK transformation into fibrotic phenotypes, fibroblasts and myofibroblasts after stimulation with TGF $\beta$  since those phenotypes are involved in corneal wound healing in vivo (Fini und Stramer, 2005, Jester et al., 1999).

In contrast to the results for HCK and HCE, FCS showed to be mandatory for EC proliferation. Hence the adaptation of the EC to serum-free culture conditions was not

possible. Contact inhibition experiments demonstrated that EC are unable to build an organotypic monolayer and to cease proliferation due to intercellular contact. This is possibly caused by the failure of mechanisms involved in cell cycle control as a result of the immortalisation by transfection with the SV40-large-T-antigen, a viral oncoprotein. Therefore, the morphologically exact rebuilding of an endothelial monolayer during the reconstruction of the three-dimensional full-thickness-model of the human cornea developed by Zorn-Kruppa is not possible for now. An implementation of the EC in a serum-free corneal construct could not be realized at the moment, as shown by the present results.

After the adaptation to a newly developed serum-free medium the keratocyte cell line HCK retained its proliferation capacity and returned to a quiescent, non-contractile phenotype, caused by serum deprivation. The serum containing standard medium on the one hand stimulated HCK growth but on the other hand caused a loss of the keratocyte morphology and induced the transformation into fibrotic phenotypes, fibroblasts and  $\alpha$ -SMA containing myofibroblasts. This resulted from the TGF $\beta$ -content of fetal calf serum (FCS), which is known to stimulate myofibroblast differentiation in vitro and in vivo.

Embedding HCK in the stromal collagen-matrix reduced  $\alpha$ -SMA expression under serum-free as well as under serum-containing conditions, when compared to monolayer cultures. This finding points at a dedifferentiation of the myofibroblast phenotype and is possibly based on the loss of intercellular mechanotension due to collagen contact.

The stimulation with TGF $\beta$ 1 (2ng/ml) reduced HCK proliferation and led to a transformation into highly contractile myofibroblasts that caused a strong, macroscopically visible contraction of the stromal equivalents under serum-free as well as under serum containing conditions. In contrast, quiescent keratocytes are not contractile. Therefore, the area of the serum-free stromal equivalents remained constant. Consequently, stromal collagen-gel-contraction reflected the phenotype of the matrix-incorporated HCK. This facilitates the evaluation of the phenotypical changes in stroma-embedded HCK on the basis of their contractile features and makes the serum-free stromal construct an ideal component of a mechanistic in vitro wound-healing model.

Finally, a complex in vitro test model was reconstructed from the stromal equivalent characterised in this work and an epithelium characterised by Seeber et al. (SE-model) as well as a simple three-dimensional epithelial model (EPI-model). Both models were built in cell culture inserts and their sensitivity against two detergents with known eye irritation potential

was compared. Viability measurements after exposure to TritonX-100 showed an advantage of the SE-model over the EPI-model as the SE-model's  $ET_{50}$ -results were similar to those from commercially available epithelial models. In contrast, exposure to benzalkoniumchloride (BAC) revealed a comparably high sensitivity for both models. This finding is possibly related to an alternative toxicity mechanism of BAC, which is primarily based on strong cell membrane damage.

Preliminary experiments focussing on the regenerative capacity of the EPI- and SE-model after tissue damage with TritonX-100 did not show a complete restoration of viability in between the 48 hours observation period which was possibly caused by a delayed toxic effect of TritonX-100.

To prove the suitability of those reconstructed in vitro cornea-models for the evaluation of the irritation potential of chemicals as well as for the detection of a persistent toxic effect by analysing tissue regeneration, a representative range of substances with different physico-chemical properties has still to be tested.

## **6 LITERATUR**

---

## 6 LITERATUR

- UNECE, 2007. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition. United Nations Publications, New York.
- Amenuvor, L., Zeigler, P., Hauber, S.A., Roberts, K.N., Powers, M.J., 2005. A Human Corneal Cell-Based Tissue Model for Evaluation of Ocular Irritation, 5th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Berlin.
- Andresen, J.L., Ledet, T., Ehlers, N. 1997. Keratocyte Migration and Peptide Growth Factors: The Effect of PDGF, bFGF, EGF, IGF-I, FGF and TGF-Beta on Human Keratocyte Migration in a Collagen Gel. *Curr Eye Res.* 16, 605-613.
- Araki-Sasaki, K., Ohashi, Y., Sasabe, T., Hayashi, K., Watanabe, H., Tano, Y., Handa, H. 1995. An SV40-Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line and Its Characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36, 614-621.
- Aranzazu Partearroyo, M., Ostolaza, H., Goni, F.M., Barbera-Guillem, E. 1990. Surfactant-Induced Cell Toxicity and Cell Lysis. A Study Using B16 Melanoma Cells. *Biochem Pharmacol.* 40, 1323-1328.
- Arora, P.D., Narani, N., McCulloch, C.A. 1999. The Compliance of Collagen Gels Regulates Transforming Growth Factor-Beta Induction of Alpha-Smooth Muscle Actin in Fibroblasts. *Am J Pathol.* 154, 871-882.
- Assouline, M., Chew, S.J., Thompson, H.W., Beuerman, R. 1992. Effect of Growth Factors on Collagen Lattice Contraction by Human Keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33, 1742-1755.
- Attisano, L., Wrana, J.L., Lopez-Casillas, F., Massague, J. 1994. TGF-Beta Receptors and Actions. *Biochim Biophys Acta.* 1222, 71-80.
- Bagley, D.M., Gardner, J.R., Holland, G., Lewis, R.W., Vrijhof, H., Walker, A.P. 1999. Eye Irritation: Updated Reference Chemicals Data Bank. *Toxicol In Vitro.* 505-510.
- Bandara, L.R., Buck, V.M., Zamanian, M., Johnston, L.H., La Thangue, N.B. 1993. Functional Synergy between DP-1 and E2F-1 in the Cell Cycle-Regulating Transcription Factor DRTF1/E2F. *Embo J.* 12, 4317-4324.
- Barry-Lane, P.A., Wilson, S.E., Cavanagh, H.D., Petroll, W.M., Jester, J.V. 1997. Characterization of SV40-Transfected Cell Strains from Rabbit Keratocytes. *Cornea.* 16, 72-78.

- Baum, J.P., Maurice, D.M., McCarey, B.E. 1984. The Active and Passive Transport of Water across the Corneal Endothelium. *Exp Eye Res.* 39, 335-342.
- Beales, M.P., Funderburgh, J.L., Jester, J.V., Hassell, J.R. 1999. Proteoglycan Synthesis by Bovine Keratocytes and Corneal Fibroblasts: Maintenance of the Keratocyte Phenotype in Culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40, 1658-1663.
- Bednarz, J., Teifel, M., Friedl, P., Engelmann, K. 2000. Immortalization of Human Corneal Endothelial Cells Using Electroporation Protocol Optimized for Human Corneal Endothelial and Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Acta Ophthalmol Scand.* 78, 130-136.
- Bednarz, J., Doubilei, V., Wollnik, P.C., Engelmann, K. 2001. Effect of Three Different Media on Serum Free Culture of Donor Corneas and Isolated Human Corneal Endothelial Cells. *Br J Ophthalmol.* 85, 1416-1420.
- Berryhill, B.L., Kader, R., Kane, B., Birk, D.E., Feng, J., Hassell, J.R. 2002. Partial Restoration of the Keratocyte Phenotype to Bovine Keratocytes Made Fibroblastic by Serum. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43, 3416-3421.
- Beyer, E.C., Kistler, J., Paul, D.L., Goodenough, D.A. 1989. Antisera Directed against Connexin-43 Peptides React with a 43-KD Protein Localized to Gap Junctions in Myocardium and Other Tissues. *J Cell Biol.* 108, 595-605.
- Borderie, V.M., Mourra, N., Laroche, L. 1999. Influence of Fetal Calf Serum, Fibroblast Growth Factors, and Hepatocyte Growth Factor on Three-Dimensional Cultures of Human Keratocytes in Collagen Gel Matrix. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 237, 861-869.
- Builles, N., Bechetoille, N., Justin, V., Andre, V., Barbaro, V., Di Iorio, E., Auxenfans, C., Hulmes, D.J., Damour, O. 2007. Development of a Hemicornea from Human Primary Cell Cultures for Pharmacotoxicology Testing. *Cell Biol Toxicol.* 23, 279-292.
- Burton, A.B. 1972. A Method for the Objective Assessment of Eye Irritation. *Food Cosmet Toxicol.* 10, 209-217.
- Carrington, L.M., Albon, J., Anderson, I., Kamma, C., Boulton, M. 2006. Differential Regulation of Key Stages in Early Corneal Wound Healing by TGF-Beta Isoforms and Their Inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47, 1886-1894.
- Cook, J.R., Mody, M.K., Fini, M.E. 1999. Failure to Activate Transcription Factor NF-KappaB in Corneal Stromal Cells (Keratocytes). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40, 3122-3131.



- Cornelis, M., Dupont, C., Wepierre, J. 1992. Prediction of Eye Irritancy Potential of Surfactants by Cytotoxicity Tests in Vitro on Cultures of Human Skin Fibroblasts and Keratinocytes. *Toxicol In Vitro*. 6.
- Curren, R.D., Harbell, J.W. 1998. In Vitro Alternatives for Ocular Irritation. *Environ Health Perspect*. 106 Suppl 2, 485-492.
- Dahl, I.M. 1981. Biosynthesis of Proteoglycans and Hyaluronate in Rabbit Corneal Fibroblast Cultures. Variation with Age of the Cell Line and Effect of Foetal Calf Serum. *Exp Eye Res*. 32, 419-433.
- Darby, I., Skalli, O., Gabbiani, G. 1990. Alpha-Smooth Muscle Actin Is Transiently Expressed by Myofibroblasts During Experimental Wound Healing. *Lab Invest*. 63, 21-29.
- De Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hills, R.N. 1997. Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. *Food Chem Toxicol*. 35, 159-164.
- Debbasch, C., Ebenhahn, C., Dami, N., Pericoi, M., Van Den Berghe, C., Cottin, M., Nohynek, G.J. 2005. Eye Irritation of Low-Irritant Cosmetic Formulations: Correlation of in Vitro Results with Clinical Data and Product Composition. *Food Chem Toxicol*. 43, 155-165.
- Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., Gabbiani, G. 1993. Transforming Growth Factor-Beta 1 Induces Alpha-Smooth Muscle Actin Expression in Granulation Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts. *J Cell Biol*. 122, 103-111.
- Desmouliere, A., Chaponnier, C., Gabbiani, G. 2005. Tissue Repair, Contraction, and the Myofibroblast. *Wound Repair Regen*. 13, 7-12.
- Doucet, O., Lanvin, M., Thillou, C., Linossier, C., Pupat, C., Merlin, B., Zastrow, L. 2006. 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*. 20, 499-512.
- Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. 1944. Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *J Pharmacol and Exp Therapeutics* 377-390.
- ECVAM, 2007. ESAC Statement on the Conclusion of the ICCVAM Retrospective Study on Organotypic in Vitro Assays as Screening Tests to Identify Potential Ocular

- Corrosives and Severe Irritants as Determined by US EPA, EU (R41) and UN GHS Classifications in a Tiered Testing Strategy, as Part of a Weight of Evidence Approach. European Commission.
- EEC, 1996. Council Directive 86/609/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions of the Member States Regarding the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Official Journal of the European Union.
- EEC, 2003. Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the European Council. Official Journal of the European Union.
- EEC, 2004a. Council Directive 67/548/EEC, Annex V, Part B.40 on Skin Corrosion. Official Journal of the European Union.
- EEC, 2004b. Council Directive 67/548/EEC, Annex V, Part B.41 on Phototoxicity. Official Journal of the European Union.
- EEC, 2006. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 Concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), Establishing a European Chemicals Agency, Amending Directive 1999/45/EC and Repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as Well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Official Journal of the European Union.
- Ehrlich, H.P., Cremona, O., Gabbiani, G. 1998. The Expression of Alpha 2 Beta 1 Integrin and Alpha Smooth Muscle Actin in Fibroblasts Grown on Collagen. *Cell Biochem Funct.* 16, 129-137.
- Ehrlich, H.P., Allison, G.M., Leggett, M. 2006. The Myofibroblast, Cadherin, Alpha Smooth Muscle Actin and the Collagen Effect. *Cell Biochem Funct.* 24, 63-70.
- Engelke, M., Patzke, J., Tykhonova, S., Zorn-Kruppa, M. 2004. Assessment of Ocular Irritation by Image Processed Quantification of Cell Injury in Human Corneal Cell Cultures and in Corneal Constructs. *Altern Lab Anim.* 32, 345-353.
- Eskes, C., Bessou, S., Bruner, L., Curren, R., Harbell, J., Jones, P., Kreiling, R., Liebsch, M., Mcnamee, P., Pape, W., Prinsen, M.K., Seidle, T., Vanparys, P., Worth, A., Zuang, V. 2005. Eye Irritation. *Altern Lab Anim.* 33 Suppl 1, 47-81.
- Espana, E.M., He, H., Kawakita, T., Di Pascuale, M.A., Raju, V.K., Liu, C.Y., Tseng, S.C. 2003. Human Keratocytes Cultured on Amniotic Membrane Stroma Preserve Morphology and Express Keratocan. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44, 5136-5141.

- Espana, E.M., Kawakita, T., Liu, C.Y., Tseng, S.C. 2004. Cd-34 Expression by Cultured Human Keratocytes Is Downregulated During Myofibroblast Differentiation Induced by TGF-Beta1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45, 2985-2991.
- Fini, M.E., Strissel, K.J., Girard, M.T., Mays, J.W., Rinehart, W.B. 1994. Interleukin 1 Alpha Mediates Collagenase Synthesis Stimulated by Phorbol 12-Myristate 13-Acetate. *J Biol Chem.* 269, 11291-11298.
- Fini, M.E. 1999. Keratocyte and Fibroblast Phenotypes in the Repairing Cornea. *Prog Retin Eye Res.* 18, 529-551.
- Fini, M.E., Stramer, B.M. 2005. How the Cornea Heals: Cornea-Specific Repair Mechanisms Affecting Surgical Outcomes. *Cornea.* 24, S2-S11.
- Flecknell, P. 2002. Replacement, Reduction and Refinement. *Altex.* 19, 73-78.
- Frazier, J.M. 1994. The Role of Mechanistic Toxicology in Test Method Validation. *Toxicology in vitro.* 8, 787-791.
- Funderburgh, J.L., Funderburgh, M.L., Mann, M.M., Corpuz, L., Roth, M.R. 2001. Proteoglycan Expression During Transforming Growth Factor Beta -Induced Keratocyte-Myofibroblast Transdifferentiation. *J. Biol. Chem.* 276, 44173-44178.
- Funderburgh, J.L., Mann, M.M., Funderburgh, M.L. 2003. Keratocyte Phenotype Mediates Proteoglycan Structure: A Role for Fibroblasts in Corneal Fibrosis. *J Biol Chem.* 278, 45629-45637.
- Gabbiani, G., Ryan, G.B., Majne, G. 1971. Presence of Modified Fibroblasts in Granulation Tissue and Their Possible Role in Wound Contraction. *Experientia.* 27, 549-550.
- Gabbiani, G., Hirschel, B.J., Ryan, G.B., Statkov, P.R., Majno, G. 1972. Granulation Tissue as a Contractile Organ. A Study of Structure and Function. *J Exp Med.* 135, 719-734.
- Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D., Sina, J.F. 1992. Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: An in Vitro Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442-449.
- Geiger, B., Volk, T., Volberg, T., Bendori, R. 1987. Molecular Interactions in Adherens-Type Contacts. *J Cell Sci Suppl.* 8, 251-272.
- Geiger, B., Ayalon, O. 1992. Cadherins. *Annu Rev Cell Biol.* 8, 307-332.
- Geiger, B., Bershadsky, A. 2001. Assembly and Mechanosensory Function of Focal Contacts. *Curr Opin Cell Biol.* 13, 584-592.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., Yamada, K.M. 2001. Transmembrane Crosstalk between the Extracellular Matrix--Cytoskeleton Crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 793-805.

- Germain, L., Auger, F.A., Grandbois, E., Guignard, R., Giasson, M., Boisjoly, H., Guerin, S.L. 1999. Reconstructed Human Cornea Produced in Vitro by Tissue Engineering. *Pathobiology*. 67, 140-147.
- Germain, L., Carrier, P., Auger, F.A., Salesse, C., Guerin, S.L. 2000. Can We Produce a Human Corneal Equivalent by Tissue Engineering?. *Prog Retin Eye Res*. 19, 497-527.
- Grana, X., Reddy, E.P. 1995. Cell Cycle Control in Mammalian Cells: Role of Cyclins, Cyclin Dependent Kinases (CDKs), Growth Suppressor Genes and Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors (CKIs). *Oncogene*. 11, 211-219.
- Grant, M.B., Peng, T.K., Schultz, G.S., Adams, J.L., Shimizu, R.W. 1992a. Effects of Epidermal Growth Factor, Fibroblast Growth Factor, and Transforming Growth Factor-Beta on Corneal Cell Chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 3292-3301.
- Grant, R.L., Yao, C., Gabaldon, D., Acosta, D. 1992b. Evaluation of Surfactant Cytotoxicity Potential by Primary Cultures of Ocular Tissues: I. Characterization of Rabbit Corneal Epithelial Cells and Initial Injury and Delayed Toxicity Studies. *Toxicology*. 76, 153-176.
- Green, K., Tonjum, A. 1971. Influence of Various Agents on Corneal Permeability. *Am J Ophthalmol*. 72, 897-905.
- Griffith, M., Osborne, R., Munger, R., Xiong, X., Doillon, C.J., Laycock, N.L., Hakim, M., Song, Y., Watsky, M.A. 1999. Functional Human Corneal Equivalents Constructed from Cell Lines. *Science*. 286, 2169-2172.
- Griffith, M., 2002. *Methods of Tissue Engineering*. Academic Press.
- Gstraunthaler, G. 2003. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-Free Cell Culture. *Altex*. 20, 275-281.
- Guidry, C., Grinnell, F. 1985. Studies on the Mechanism of Hydrated Collagen Gel Reorganization by Human Skin Fibroblasts. *J Cell Sci*. 79, 67-81.
- Guidry, C., Mcfarland, R.J., Morris, R., Witherspoon, C.D., Hook, M. 1992. Collagen Gel Contraction by Cells Associated with Proliferative Vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 33, 2429-2435.
- Gumbiner, B.M. 1993. Proteins Associated with the Cytoplasmic Surface of Adhesion Molecules. *Neuron*. 11, 551-564.
- Gupta, A., Monroy, D., Ji, Z., Yoshino, K., Huang, A., Pflugfelder, S.C. 1996. Transforming Growth Factor Beta-1 and Beta-2 in Human Tear Fluid. *Curr Eye Res*. 15, 605-614.

- Hassell, J.R., Schrecengost, P.K., Rada, J.A., Sundarraj, N., Sossi, G., Thoft, R.A. 1992. Biosynthesis of Stromal Matrix Proteoglycans and Basement Membrane Components by Human Corneal Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33, 547-557.
- Hasty, D.L., Hay, E.D. 1977. Freeze-Fracture Studies of the Developing Cell Surface. I. The Plasmalemma of the Corneal Fibroblast. *J Cell Biol.* 72, 667-686.
- Hay, E.D. 1979. Development of the Vertebrate Cornea. *Int Rev Cytol.* 63, 263-322.
- Heaysman, J.E., Pegrum, S.M. 1973. Early Contacts between Fibroblasts. An Ultrastructural Study. *Exp Cell Res.* 78, 71-78.
- Hinz, B., Dugina, V., Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., Chaponnier, C. 2003. Alpha-Smooth Muscle Actin Is Crucial for Focal Adhesion Maturation in Myofibroblasts. *Mol Biol Cell.* 14, 2508-2519.
- Hirsch, M., Prenant, G., Renard, G. 2001. Three-Dimensional Supramolecular Organization of the Extracellular Matrix in Human and Rabbit Corneal Stroma, as Revealed by Ultrarapid-Freezing and Deep-Etching Methods. *Exp Eye Res.* 72, 123-135.
- Hofer, T., Gerner, I., Gundert-Remy, U., Liebsch, M., Schulte, A., Spielmann, H., Vogel, R., Wettig, K. 2004. Animal Testing and Alternative Approaches for the Human Health Risk Assessment under the Proposed New European Chemicals Regulation. *Arch Toxicol.* 78, 549-564.
- Hornof, M., Toropainen, E., Urtti, A. 2005. Cell Culture Models of the Ocular Barriers. *Eur J Pharm Biopharm.* 60, 207-225.
- Huggins, J. 2003. Alternatives to Animal Testing: Research, Trends, Validation, Regulatory Acceptance. *Altex.* 20, 3-61.
- Huhtala, A., Alajuuma, P., Burgalassi, S., Chetoni, P., Diehl, H., Engelke, M., Marselos, M., Monti, D., Pappas, P., Saettone, M.F., Salminen, L., Sotiropoulou, M., Tahti, H., Uusitalo, H., Zorn-Kruppa, M. 2003. 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.* 19, 11-21.
- Hynes, R.O. 1987. Integrins: A Family of Cell Surface Receptors. *Cell.* 48, 549-554.
- Igarashi, H., Katsuta, Y., Sawa, K., Chiba, Y., Kozima, M., Ogawa, K., Nakazato, Y.K., Kawasaki, T. 1993. Effects of Benzalkonium Chloride on Pilocarpine-Induced Opacity in Porcine Isolated Corneas. *ATLA.* 21, 372-383.
- Imanishi, J., Kamiyama, K., Iguchi, I., Kita, M., Sotozono, C., Kinoshita, S. 2000. Growth Factors: Importance in Wound Healing and Maintenance of Transparency of the Cornea. *Prog Retin Eye Res.* 19, 113-129.

- Jayme, D.W., Epstein, D.A., Conrad, D.R. 1988. Fetal Bovine Serum Alternatives. *Nature*. 334, 547-548.
- Jelinek, A., 2001. In-Vitro-Toxizität Grenzflächenaktiver Substanzen: Wirkung Auf Zellmembran, Mitochondriale Funktion Und Apoptose, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Jester, J.V., Barry, P.A., Lind, G.J., Petroll, W.M., Garana, R., Cavanagh, H.D. 1994. Corneal Keratocytes: In Situ and in Vitro Organization of Cytoskeletal Contractile Proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 35, 730-743.
- Jester, J.V., Petroll, W.M., Barry, P.A., Cavanagh, H.D. 1995a. Temporal, 3-Dimensional, Cellular Anatomy of Corneal Wound Tissue. *J Anat*. 186, 301-311.
- Jester, J.V., Petroll, W.M., Barry, P.A., Cavanagh, H.D. 1995b. Expression of Alpha-Smooth Muscle (Alpha-SM) Actin During Corneal Stromal Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 36, 809-819.
- Jester, J.V., Barry-Lane, P.A., Cavanagh, H.D., Petroll, W.M. 1996a. Induction of Alpha-Smooth Muscle Actin Expression and Myofibroblast Transformation in Cultured Corneal Keratocytes. *Cornea*. 15, 505-516.
- Jester, J.V., Maurer, J.K., Petroll, W.M., Wilkie, D.A., Parker, R.D., Cavanagh, H.D. 1996b. Application of in Vivo Confocal Microscopy to the Understanding of Surfactant-Induced Ocular Irritation. *Toxicol Pathol*. 24, 412-428.
- Jester, J.V., Barry-Lane, P.A., Petroll, W.M., Olsen, D.R., Cavanagh, H.D. 1997. Inhibition of Corneal Fibrosis by Topical Application of Blocking Antibodies to TGF Beta in the Rabbit. *Cornea*. 16, 177-187.
- Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. 1998a. Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 39, 922-936.
- Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. 1998b. Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 39, 2610-2625.
- Jester, J.V., Huang, J., Barry-Lane, P.A., Kao, W.W., Petroll, W.M., Cavanagh, H.D. 1999a. Transforming Growth Factor(Beta)-Mediated Corneal Myofibroblast Differentiation Requires Actin and Fibronectin Assembly. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 40, 1959-1967.
- Jester, J.V., Moller-Pedersen, T., Huang, J., Sax, C.M., Kays, W.T., Cavanagh, H.D., Petroll, W.M., Piatigorsky, J. 1999b. The Cellular Basis of Corneal Transparency: Evidence for 'Corneal Crystallins'. *J Cell Sci*. 112, 613-622.

- Jester, J.V., Petroll, W.M., Cavanagh, H.D. 1999c. Corneal Stromal Wound Healing in Refractive Surgery: The Role of Myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res.* 18, 311-356.
- Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. 2001. Extent of Initial Corneal Injury as a Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol In Vitro.* 15, 115-130.
- Jester, J.V., Huang, J., Petroll, W.M., Cavanagh, H.D. 2002. TGFbeta Induced Myofibroblast Differentiation of Rabbit Keratocytes Requires Synergistic TGFbeta, PDGF and Integrin Signaling. *Exp Eye Res.* 75, 645-657.
- Jester, J.V., Ho-Chang, J. 2003. Modulation of Cultured Corneal Keratocyte Phenotype by Growth Factors/Cytokines Control in Vitro Contractility and Extracellular Matrix Contraction. *Exp Eye Res* 77, 581-592.
- Jester, J.V., Huang, J., Fisher, S., Spiekerman, J., Chang, J.H., Wright, W.E., Shay, J.W. 2003. Myofibroblast Differentiation of Normal Human Keratocytes and HTERT, Extended-Life Human Corneal Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44, 1850-1858.
- Jones, P.A., Budynsky, E., Cooper, K.J., Decker, D., Griffiths, H.A., Fentem, J.H. 2001. Comparative Evaluation of Five in Vitro Tests for Assessing the Eye Irritation Potential of Hair-Care Products. *Altern Lab Anim.* 29, 669-692.
- Joyce, N.C., Meklikr, B., Joyce, S.J., Zieske, J.D. 1996a. Cell Cycle Protein Expression and Proliferative Status in Human Corneal Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37, 645-655.
- Joyce, N.C., Navon, S.E., Roy, S., Zieske, J.D. 1996b. Expression of Cell Cycle-Associated Proteins in Human and Rabbit Corneal Endothelium in Situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37, 1566-1575.
- Joyce, N.C., Harris, D.L., Mello, D.M. 2002. Mechanisms of Mitotic Inhibition in Corneal Endothelium: Contact Inhibition and TGF-Beta2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43, 2152-2159.
- Kanski, J.J., 2003. *Clinical Ophthalmology.* Butterworth- Heinemann.
- Kawakita, T., Espana, E.M., He, H., Smiddy, R., Parel, J.M., Liu, C.Y., Tseng, S.C. 2006. Preservation and Expansion of the Primate Keratocyte Phenotype by Downregulating TGF-Beta Signaling in a Low-Calcium, Serum-Free Medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47, 1918-1927.
- Kay, E.P., Lee, M.S., Seong, G.J., Lee, Y.G. 1998. TGF-Beta Stimulates Cell Proliferation Via an Autocrine Production of FGF-2 in Corneal Stromal Fibroblasts. *Curr Eye Res.* 17, 286-293.

- Kay, J.H., Calandra, J.C. 1962. Interpretation of Eye Irritation Tests. *J Soc Cos Chem.* 13, 281-289.
- Kennah, H.E., 2nd, Hignet, S., Laux, P.E., Dorko, J.D., Barrow, C.S. 1989. An Objective Procedure for Quantitating Eye Irritation Based Upon Changes of Corneal Thickness. *Fundam Appl Toxicol.* 12, 258-268.
- Kirschner, S.E., Ciaccia, A., Ubels, J.L. 1990. The Effect of Retinoic Acid on Thymidine Incorporation and Morphology of Corneal Stromal Fibroblasts. *Curr Eye Res.* 9, 1121-1125.
- Krek, W., Livingston, D.M., Shirodkar, S. 1993. Binding to DNA and the Retinoblastoma Gene Product Promoted by Complex Formation of Different E2F Family Members. *Science.* 262, 1557-1560.
- Kropf, J., Schurek, J.O., Wollner, A., Gressner, A.M. 1997. Immunological Measurement of Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF-Beta1) in Blood; Assay Development and Comparison. *Clin Chem.* 43, 1965-1974.
- Kruszewski, F.H., Walker, T.L., Dipasquale, L.C. 1997. Evaluation of a Human Corneal Epithelial Cell Line as an in Vitro Model for Assessing Ocular Irritation. *Fundam Appl Toxicol.* 36, 130-140.
- Kurosaka, H., Kurosaka, D., Kato, K., Mashima, Y., Tanaka, Y. 1998. Transforming Growth Factor-Beta 1 Promotes Contraction of Collagen Gel by Bovine Corneal Fibroblasts through Differentiation of Myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39, 699-704.
- Langley, G., Broadhead, C.B., Bottrill, K., Combes, R., Ward, L. 1999. Accessing Information on the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experiments. *ATLA.* 27, 239-245.
- Lee, H.T., Kay, E.P. 2003. Regulatory Role of PI 3-Kinase on Expression of CDK4 and P27, Nuclear Localization of CDK4, and Phosphorylation of P27 in Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44, 1521-1528.
- Luepke, N.P. 1985. Hen's Egg Chorioallantoic Membrane Test for Irritation Potential. *Food Chem Toxicol.* 23, 287-291.
- Maltseva, O., Folger, P., Zekaria, D., Petridou, S., Masur, S.K. 2001. Fibroblast Growth Factor Reversal of the Corneal Myofibroblast Phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42, 2490-2495.
- Mar, P.K., Roy, P., Yin, H.L., Cavanagh, H.D., Jester, J.V. 2001. Stress Fiber Formation Is Required for Matrix Reorganization in a Corneal Myofibroblast Cell Line. *Exp Eye Res.* 72, 455-466.



- Massague, J. 1990. The Transforming Growth Factor-Beta Family. *Annu Rev Cell Biol.* 6, 597-641.
- Massague, J., Blain, S.W., Lo, R.S. 2000. TGFbeta Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell.* 103, 295-309.
- Masui, T., Wakefield, L.M., Lechner, J.F., Laveck, M.A., Sporn, M.B., Harris, C.C. 1986. Type Beta Transforming Growth Factor Is the Primary Differentiation-Inducing Serum Factor for Normal Human Bronchial Epithelial Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 2438-2442.
- Masur, S.K., Dewal, H.S., Dinh, T.T., Erenburg, I., Petridou, S. 1996. Myofibroblasts Differentiate from Fibroblasts When Plated at Low Density. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 4219-4223.
- Masur, S.K., Conors, R.J., Jr., Cheung, J.K., Antohi, S. 1999. Matrix Adhesion Characteristics of Corneal Myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40, 904-910.
- Maurer, J.K., Parker, R.D. 1996. Light Microscopic Comparison of Surfactant-Induced Eye Irritation in Rabbits and Rats at Three Hours and Recovery/Day 35. *Toxicol Pathol.* 24, 403-411.
- Maurer, J.K., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Jester, J.V. 1997. Confocal Microscopic Characterization of Initial Corneal Changes of Surfactant-Induced Eye Irritation in the Rabbit. *Toxicol Appl Pharmacol.* 143, 291-300.
- Maurer, J.K., Parker, R.D., Carr, G.J. 1998a. Ocular Irritation: Microscopic Changes Occurring over Time in the Rat with Surfactants of Known Irritancy. *Toxicol Pathol.* 26, 217-225.
- Maurer, J.K., Parker, R.D., Carr, G.J. 1998b. Ocular Irritation: Pathological Changes Occurring in the Rat with Surfactants of Unknown Irritancy. *Toxicol Pathol.* 26, 226-233.
- Maurer, J.K., Jester, J.V. 1999. Use of in Vivo Confocal Microscopy to Understand the Pathology of Accidental Ocular Irritation. *Toxicol Pathol.* 27, 44-47.
- Maurer, J.K., Molai, A., Parker, R.D., Li, L., Carr, G.J., Petroll, W.M., Cavanagh, H.D., Jester, J.V. 2001. Pathology of Ocular Irritation with Bleaching Agents in the Rabbit Low-Volume Eye Test. *Toxicol Pathol.* 29, 308-319.
- Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. 2002. Extent of Initial Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Regul Toxicol Pharmacol.* 36, 106-117.

- Mertens, S., Bednarz, J., Engelmann, K. 2002. Evidence of Toxic Side Effects of Perfluorohexyloctane after Vitreoretinal Surgery as Well as in Previously Established in Vitro Models with Ocular Cell Types. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 240, 989-995.
- Minami, Y., Sugihara, H., Oono, S. 1993. Reconstruction of Cornea in Three-Dimensional Collagen Gel Matrix Culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34, 2316-2324.
- Mita, T., Yamashita, H., Kaji, Y., Obata, H., Yamada, H., Kato, M., Hanyu, A., Suzuki, M., Tobar, I. 1998. Effects of Transforming Growth Factor Beta on Corneal Epithelial and Stromal Cell Function in a Rat Wound Healing Model after Excimer Laser Keratectomy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 236, 834-843.
- Moller-Pedersen, T., Cavanagh, H.D., Petroll, W.M., Jester, J.V. 1998. Neutralizing Antibody to TGFbeta Modulates Stromal Fibrosis but Not Regression of Photoablative Effect Following PRK. *Curr Eye Res.* 17, 736-747.
- Muller, L.J., Pels, L., Vrensen, G.F. 1995. Novel Aspects of the Ultrastructural Organization of Human Corneal Keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36, 2557-2567.
- Nakamura, K. 2003. Interaction between Injured Corneal Epithelial Cells and Stromal Cells. *Cornea.* 22, S35-47.
- Nishida, K., Kinoshita, S., Yokoi, N., Kaneda, M., Hashimoto, K., Yamamoto, S. 1994. Immunohistochemical Localization of Transforming Growth Factor-Beta 1, -Beta 2, and -Beta 3 Latency-Associated Peptide in Human Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35, 3289-3294.
- Nishida, K., Sotozono, C., Adachi, W., Yamamoto, S., Yokoi, N., Kinoshita, S. 1995. Transforming Growth Factor-Beta 1, -Beta 2 and -Beta 3 mRNA Expression in Human Cornea. *Curr Eye Res.* 14, 235-241.
- Nishida, T., Yasumoto, K., Otori, T., Desaki, J. 1988. The Network Structure of Corneal Fibroblasts in the Rat as Revealed by Scanning Electron Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 29, 1887-1890.
- O'neal, M.R., Polse, K.A. 1985. In Vivo Assessment of Mechanisms Controlling Corneal Hydration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 26, 849-856.
- OECD, 1987. Guideline for Testing of Chemicals No. 405: Acute Eye Irritation/ Corrosion.
- OECD, 2002. Guideline for Testing of Chemicals No. 405: Acute Eye Irritation/ Corrosion.
- OECD, 2004a. Guideline for the Testing of Chemicals No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test.

- OECD, 2004b. Guideline for the Testing of Chemicals No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test.
- OECD, 2004c. Guideline for the Testing of Chemicals No. 430: In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER).
- Osborne, R., Perkins, M.A., Roberts, D.A. 1995. Development and Intralaboratory Evaluation of an in Vitro Human Cell-Based Test to Aid Ocular Irritancy Assessments. *Fundam Appl Toxicol.* 28, 139-153.
- Pancholi, S., Tullo, A., Khaliq, A., Foreman, D., Boulton, M. 1998. The Effects of Growth Factors and Conditioned Media on the Proliferation of Human Corneal Epithelial Cells and Keratocytes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 236, 1-8.
- Parnigotto, P.P., Bassani, V., Montesi, F., Conconi, M.T. 1998. Bovine Corneal Stroma and Epithelium Reconstructed in Vitro: Characterisation and Response to Surfactants. *Eye.* 12, 304-310.
- Petridou, S., Masur, S.K. 1996. Immunodetection of Connexins and Cadherins in Corneal Fibroblasts and Myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37, 1740-1748.
- Petridou, S., Maltseva, O., Spanakis, S., Masur, S.K. 2000. TGF-Beta Receptor Expression and SMAD2 Localization Are Cell Density Dependent in Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 89-95.
- Petroll, W.M., Cavanagh, H.D., Barry, P., Andrews, P., Jester, J.V. 1993. Quantitative Analysis of Stress Fiber Orientation During Corneal Wound Contraction. *J Cell Sci.* 104, 353-363.
- Petroll, W.M., Cavanagh, H.D., Jester, J.V. 1998. Assessment of Stress Fiber Orientation During Healing of Radial Keratotomy Wounds Using Confocal Microscopy. *Scanning.* 20, 74-82.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., Koff, A. 1994. P27kip1, a Cyclin-CDK Inhibitor, Links Transforming Growth Factor-Beta and Contact Inhibition to Cell Cycle Arrest. *Genes Dev.* 8, 9-22.
- Powers, M.J., Amenuvor, L., Rodin, P., Damer, J., Evaluation of Human Corneal Epithelial Response to Xenobiotic Compounds Using an in Vitro Cell Culture Model ARVO 2007a.
- Powers, M.J., Amenuvor, L., Rodin, P., Hauber, S.A., A Human Corneal Epithelial Culture Model for Evaluation of Ocular Irritation and Barrier Properties. ARVO 2007b.

- Prinsen, M.K., Koeter, H.B. 1993. 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.* 31, 69-76.
- Prinsen, M.K. 1996. The Chicken Enucleated Eye Test (CEET): A Practical (Pre)Screen for the Assessment of Eye Irritation/Corrosion Potential of Test Materials. *Food Chem Toxicol.* 34, 291-296.
- Reichl, S., Muller-Goymann, C.C. 2003. The Use of a Porcine Organotypic Cornea Construct for Permeation Studies from Formulations Containing Befunolol Hydrochloride. *Int J Pharm.* 250, 191-201.
- Reichl, S., Bednarz, J., Muller-Goymann, C.C. 2004. Human Corneal Equivalent as Cell Culture Model for in Vitro Drug Permeation Studies. *Br J Ophthalmol.* 88, 560-565.
- Richards, R.M., McBride, R.J. 1972. The Preservation of Ophthalmic Solutions with Antibacterial Combinations. *J Pharm Pharmacol.* 24, 145-148.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Human Experimental Technique.*
- Saarinen-Savolainen, P., Jarvinen, T., Araki-Sasaki, K., Watanabe, H., Urtti, A. 1998. Evaluation of Cytotoxicity of Various Ophthalmic Drugs, Eye Drop Excipients and Cyclodextrins in an Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line. *Pharm Res.* 15, 1275-1280.
- Saika, S. 2004. TGF-Beta Signal Transduction in Corneal Wound Healing as a Therapeutic Target. *Cornea.* 23, S25-30.
- Schmitt-Graff, A., Desmouliere, A., Gabbiani, G. 1994. Heterogeneity of Myofibroblast Phenotypic Features: An Example of Fibroblastic Cell Plasticity. *Virchows Arch.* 425, 3-24.
- Schonthal, A.H., Hwang, J.J., Stevenson, D., Trousdale, M.D. 1999. Expression and Activity of Cell Cycle-Regulatory Proteins in Normal and Transformed Corneal Endothelial Cells. *Exp Eye Res.* 68, 531-539.
- 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. *ATLA.* [in press]
- Sherr, C.J., Roberts, J.M. 1995. Inhibitors of Mammalian G1 Cyclin-Dependent Kinases. *Genes Dev.* 9, 1149-1163.
- Song, Q.H., Singh, R.P., Richardson, T.P., Nugent, M.A., Trinkaus-Randall, V. 2000. Transforming Growth Factor-Beta1 Expression in Cultured Corneal Fibroblasts in Response to Injury. *J Cell Biochem.* 77, 186-199.

- Sotozono, C., Kinoshita, S., Kita, M., Imanishi, J. 1994. Paracrine Role of Keratinocyte Growth Factor in Rabbit Corneal Epithelial Cell Growth. *Exp Eye Res.* 59, 385-391.
- Spielmann, H., Liebsch, M. 2001. Lessons Learned from Validation of in Vitro Toxicity Test: From Failure to Acceptance into Regulatory Practice. *Toxicol In Vitro.* 15, 585-590.
- Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., Assoian, R.K. 1986. Transforming Growth Factor-Beta: Biological Function and Chemical Structure. *Science.* 233, 532-534.
- Stern, M., Klausner, M., Alvarado, R., Renskers, K., Dickens, M. 1998. Evaluation of the Epiocular<sup>TM</sup> Tissue Model as an Alternative to the Draize Eye Irritation Test. *Toxicol In Vitro.* 12, 455-461.
- Suuronen, E.J., Mclaughlin, C.R., Stys, P.K., Nakamura, M., Munger, R., Griffith, M. 2004. Functional Innervation in Tissue Engineered Models for in Vitro Study and Testing Purposes. *Toxicol Sci.* 82, 525-533.
- Tegtmeyer, S., Reichl, S., Muller-Goymann, C.C. 2004. Cultivation and Characterization of a Bovine in Vitro Model of the Cornea. *Pharmazie.* 59, 464-471.
- Ueda, A., Nishida, T., Otori, T., Fujita, H. 1987. Electron-Microscopic Studies on the Presence of Gap Junctions between Corneal Fibroblasts in Rabbits. *Cell Tissue Res.* 249, 473-475.
- Van Der Valk, J., Mellor, D., Brands, R., Fischer, R., Gruber, F., Gstraunthaler, G., Hellebrekers, L., Hyllner, J., Jonker, F.H., Prieto, P., Thalen, M., Baumans, V. 2004. The Humane Collection of Fetal Bovine Serum and Possibilities for Serum-Free Cell and Tissue Culture. *Toxicol In Vitro.* 18, 1-12.
- Van Goethem, F., Adriaens, E., Alepee, N., Straube, F., De Wever, B., Cappadoro, M., Catoire, S., Hansen, E., Wolf, A., Vanparys, P. 2006. Prevalidation of a New in Vitro Reconstituted Human Cornea Model to Assess the Eye Irritating Potential of Chemicals. *Toxicol In Vitro.* 20, 1-17.
- Vinardell, M.P., Mitjans, M. 2008. Alternative Methods for Eye and Skin Irritation Tests: An Overview. *J Pharm Sci.* 97, 46-59.
- Ward, S.L., Walker, T.L., Dimitrijevic, S.D. 1997. Evaluation of Chemically Induced Cytotoxicity Using an in Vitro Model of Human Corneal Epithelium. *Toxicol In Vitro.* 11, 121-139.
- Welch, M.P., Odland, G.F., Clark, R.A. 1990. Temporal Relationships of F-Actin Bundle Formation, Collagen and Fibronectin Matrix Assembly, and Fibronectin Receptor Expression to Wound Contraction. *J Cell Biol.* 110, 133-145.

- West-Mays, J.A., Strissel, K.J., Sadow, P.M., Fini, M.E. 1995. Competence for Collagenase Gene Expression by Tissue Fibroblasts Requires Activation of an Interleukin 1 Alpha Autocrine Loop. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 6768-6772.
- West-Mays, J.A., Dwivedi, D.J. 2006. The Keratocyte: Corneal Stromal Cell with Variable Repair Phenotypes. *Int J Biochem Cell Biol.* 38, 1625-1631.
- Wilhelmus, K.R. 2001. The Draize Eye Test. *Surv Ophthalmol.* 45, 493-515.
- Wilson, S.E., He, Y.G., Lloyd, S.A. 1992. EGF, EGF Receptor, Basic FGF, TGF Beta-1, and Il-1 Alpha mRNA in Human Corneal Epithelial Cells and Stromal Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33, 1756-1765.
- Wilson, S.E., Lloyd, S.A., He, Y.G., Mccash, C.S. 1993a. Extended Life of Human Corneal Endothelial Cells Transfected with the SV40 Large T Antigen. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34, 2112-2123.
- Wilson, S.E., Walker, J.W., Chwang, E.L., He, Y.G. 1993b. Hepatocyte Growth Factor, Keratinocyte Growth Factor, Their Receptors, Fibroblast Growth Factor Receptor-2, and the Cells of the Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34, 2544-2561.
- Wilson, S.E., Weng, J., Blair, S., He, Y.G., Lloyd, S. 1995. Expression of E6/E7 or SV40 Large T Antigen-Coding Oncogenes in Human Corneal Endothelial Cells Indicates Regulated High-Proliferative Capacity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36, 32-40.
- Wilson, S.E., He, Y.G., Weng, J., Li, Q., Mcdowall, A.W., Vital, M., Chwang, E.L. 1996. Epithelial Injury Induces Keratocyte Apoptosis: Hypothesized Role for the Interleukin-1 System in the Modulation of Corneal Tissue Organization and Wound Healing. *Exp Eye Res.* 62, 325-327.
- Wilson, S.E., Liu, J.J., Mohan, R.R. 1999. Stromal-Epithelial Interactions in the Cornea. *Prog Retin Eye Res.* 18, 293-309.
- Wilson, S.E., Mohan, R.R., Mohan, R.R., Ambrosio, R., Jr., Hong, J., Lee, J. 2001. The Corneal Wound Healing Response: Cytokine-Mediated Interaction of the Epithelium, Stroma, and Inflammatory Cells. *Prog Retin Eye Res.* 20, 625-637.
- Wilson, S.E., Netto, M., Ambrosio, R., Jr. 2003. Corneal Cells: Chatty in Development, Homeostasis, Wound Healing, and Disease. *Am J Ophthalmol.* 136, 530-536.
- Woost, P.G., Brightwell, J., Eiferman, R.A., Schultz, G.S. 1985. Effect of Growth Factors with Dexamethasone on Healing of Rabbit Corneal Stromal Incisions. *Exp Eye Res.* 40, 47-60.
- Xu, K.P., Li, X.F., Yu, F.S. 2000. Corneal Organ Culture Model for Assessing Epithelial Responses to Surfactants. *Toxicol Sci.* 58, 306-314.

- Zamir, E., Katz, B.Z., Aota, S., Yamada, K.M., Geiger, B., Kam, Z. 1999. Molecular Diversity of Cell-Matrix Adhesions. *J Cell Sci.* 112, 1655-1669.
- Zieske, J.D., Mason, V.S., Wasson, M.E., Meunier, S.F., Nolte, C.J., Fukai, N., Olsen, B.R., Parenteau, N.L. 1994. Basement Membrane Assembly and Differentiation of Cultured Corneal Cells: Importance of Culture Environment and Endothelial Cell Interaction. *Exp Cell Res.* 214, 621-633.
- Zieske, J.D., Takahashi, H., Hutcheon, A.E., Dalbone, A.C. 2000. Activation of Epidermal Growth Factor Receptor During Corneal Epithelial Migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 1346-1355.
- Zieske, J.D., Guimaraes, S.R., Hutcheon, A.E. 2001. Kinetics of Keratocyte Proliferation in Response to Epithelial Debridement. *Exp Eye Res.* 72, 33-39.
- Zieske, J.D., Francesconi, C.M., Guo, X. 2004. Cell Cycle Regulators at the Ocular Surface. *Exp Eye Res.* 78, 447-456.
- Zorn-Kruppa, M., Tykhonova, S., Belge, G., Diehl, H.A., Engelke, M. 2004. Comparison of Human Corneal Cell Cultures in Cytotoxicity Testing. *ALTEX.* 21, 129-134.
- Zorn-Kruppa, M., Tykhonova, S., Belge, G., Bednarz, J., Diehl, H.A., Engelke, M. 2005. A Human Corneal Equivalent Constructed from SV40-Immortalised Corneal Cell Lines. *Altern Lab Anim.* 33, 37-45.

## **SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Hamburg, den 20.10. 2008

Anna Katharina Manzer