

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschrank Typ BB 16 (B 5060 EK-CO₂) (Heraeus, Hanau, Deutschland), Reinraumwerkbank mit laminarer Luftströmung Typ HF 36 und BSB 6A (Flow Laboratories), Zentrifuge Minifuge RF (Heraeus), Zentrifuge Typ CH-J2 ME (Beckmann), Cell Harvester Typ 11900 (LKB Wallac, Turku, Finnland), Szintillationszähler (Liquid scintillation and luminescence counter) Typ 1450 MicroBeta (LKB Wallac), ELISA-Reader (Dynatech Laboratories), Mikroskop (Zeiss IM, Oberkochen, Deutschland), Kamera C-4040 ZOOM CAMEDIA (Olympus), Ofen Typ 6120 (Heraeus), Pumpe Typ N811KN.18 (KNF Neuberger, Neo Lab), temperiertes Wasserbad Typ U3 (Julabo).

2.1.2 Weitere Materialien

Zellkulturflaschen mit 25 cm² oder 75 cm² Bodenfläche (NUNC, Roskilde, Dänemark), 96-Loch-Platten für die Zellkulturexperimente mit einer Fläche von 0,33 cm² pro Vertiefung (Falcon, BD Biosciences GmbH, Heidelberg, Deutschland), Zählkammer nach Neubauer (Brand, Deutschland), Glasfasermatte (Printed Filtermat A, Skatron, Lier, Norwegen) Typ 1205-401, Szintillationswachs (MeltiLex™ A) Typ 1205-441 (Wallac, Turku, Finnland), Multipipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), Mehrkanalpipette (Labsystems), Pipettierhilfe (Hirschmann Laborgeräte; IBS Integra Biosciences), Einwegpipetten (steril) 5 ml, 10 ml, 25 ml (Falcon, Becton Dickinson Labware), Einwegmultipipetten (autoklaviert) (Combitips, Eppendorf), Pipettenspitzen (autoklaviert) (Eppendorf).

2.1.3 Medien, Lösungen und Reagenzien

Für die Zellkultivierung wurden verwendet:

Kulturmedium: Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit Glutamax-I (enthält 862 mg/l L-Alanyl-L-Glutamin, 4,5 g/l Glucose und 110 mg/l Natriumpyruvat; Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies, Eggenstein, Deutschland). Hinzugefügt wurden 10% fetales Kälberserum (FKS) (Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies) (vor der Anwendung in Zellkulturmedien wurde das FKS für 30 min. bei 56°C hitzeinaktiviert), 50 mg/l L-Ascorbinsäure (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 50.000 E/l Penicillin und 50 mg/l Streptomycin. FKS-Mangelmedium: Kulturmedium mit 0,5% (v/v) FKS.

Sterile Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) ohne Mg^{2+}/Ca^{2+} , pH 7,2 (Biochrom, Berlin, Deutschland), Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,05%/0,02% (Biochrom).

Zum Einfrieren von Zellen in flüssigem Stickstoff:

Einfriermedium: 50% (v/v) DMEM, 45% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 5% (v/v) FKS.

Für die Zellproliferationsbestimmung:

[³H]-Thymidin, spezifische Aktivität 5 mCi/mmol (Halbwertszeit 12,3 Jahre), sterile Lösung (# TRA61, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland), 10%ige Trichloressigsäure (TCA) (Merck), 0,2 M Natriumhydroxid (NaOH) (Merck), 0,8 M Salzsäure (HCl) (Merck), 0,1%iges bovines Serumalbumin (BSA) (Dade Behring).

Zur Zellzahlbestimmung:

Farbstoff Sulforhodamin B (SRB) (Sigma), 1%ige Essigsäure (Merck), Tris-HCl.

Für Adhäsionsversuche:

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium mit 25 mM Hepes (= 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure), Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (Sigma), Humanes Fibronectin (Boehringer, Deutschland).

Für die Zelldifferenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten:

Färbung mit Oil Red O: Oil Red O, O-0625 (Sigma), Hormoncocktail: 1,7 µM Insulin, 1 µM Dexamethason, 0,5 mM Methylxanthin in 10% FKS-haltigem Medium.

2.1.4 Zelllinien

Humane Hautfibroblasten (HF) aus Primärkulturen der Vorhaut (57); die folgenden Zelllinien sind etablierte permanente Zellkulturlinien von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA): 3T3-Swiss albino (# CCL-92 Fibroblasten aus Mausembryonen), A-375 (# CRL-1619 maligne humane Melanom-Zellen) sowie HT-1080 (# CCL-121 humane Fibrosarkom-Zellen).

2.1.5 Kollagene

Isolierung von Kollagen XIV:

Frische humane Plazenten wurden in einem neutralen Hochsalzpuffer (4,5 M NaCl, 50 mM Tris, 1% Triton-X-100, 0,05% Natriumazid, 10 mM EDTA, 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 2 mM N-Ethylmaleimid, pH 7,4) gewaschen, homogenisiert und vorextrahiert. Das nicht gelöste Material wurde im gleichen Puffer, der nur 0,5 M NaCl enthielt extrahiert. Nach dem Abzentrifugieren (Zentrifugieren bei 8000 U/min., 30 min., Zentrifuge CH-J2 Beckmann) wurde der Extrakt filtriert und NaCl hinzugefügt, um wieder eine Endkonzentration von 4,5 M zu erhalten. Das nach 24 h entstandene Präzipitat wurde mehrmals mit diesem Puffer gewaschen, in Harnstoffpuffer (50 mM Tris, 2 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 2 mM PMSF, 2 mM N-Ethylmaleimid, 90 mM NaCl, pH 7,4) gelöst und mit DEAE-Zellulose (Whatman, Maidstone, Großbritannien), die mit dem gleichen Puffer präequilibriert wurde, für 10 h inkubiert. Das nicht gebundene Material wurde mit Tris-Puffer auf 70 mM NaCl verdünnt und nochmals mit DEAE-Zellulose für 10 Stunden inkubiert. Die an DEAE-Zellulose gebundenen Proteine wurden dann in Tris-Puffer-Lösung mit 300 mM NaCl eluiert und eine Verunreinigung durch Moleküle niedrigen Molekulargewichts durch Ultrafiltration beseitigt (DIAFLO-Ultrafilter, Membran XM-300 von Amicon, Witten, Deutschland). Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei 4 bis 8°C durchgeführt und die erhaltene Proteinlösung in Aliquots bei -20°C gelagert. Es resultierte eine Laminin- und Fibronectin-freie Kollagen XIV-Stammlösung mit einer Konzentration von 50-200 µg/ml (Puffer: 2 M Harnstoff, 50 mM Tris, ca. 0,2 M NaCl, pH 7,4).

Herstellung der rekombinanten Proteine von Kollagen XIV:

Für die Versuche mit einzelnen Teilstücken von Kollagen XIV wurden sieben verschiedene Sequenzen der N-terminalen globulären Domäne von Kollagen XIV (NC3) ausgewählt (von W.

Dieterich freundlicherweise zur Verfügung gestellt). Die Angaben über die Funktion der Teilstücke von Kollagen XIV stammen neben den zitierten Veröffentlichungen (20, 24) auch aus einer Dissertationsarbeit aus der eigenen Arbeitsgruppe: “Charakterisierung zellulärer Rezeptoren für das extrazelluläre Matrixprotein Kollagen XIV (Undulin)“, Tobias Ehnis, FU-Berlin, 1997.

Es handelt sich hierbei um folgende Sequenzen (s.o. Abb. 2

- Das als ‘III,1s‘ (FN III Homologie 1; kurz) bezeichnete Peptid ist relativ klein und enthält nur die N-terminale Fibronectin Typ III Homologie, auf der sich die Zellbindungsregion und zusätzlich ein Heparin-bindender Bereich befindet. Bezogen auf die Nummerierung der Aminosäurereste der vollständigen Kollagen XIV-Sequenz handelt es sich hier um die Sequenz Q29-F115.
- ‘III,1l‘ (FN III Homologie 1; lang) enthält die gleiche Sequenz wie ‘III,1s‘ einschließlich der carboxyterminal folgenden 39 Aminosäuren, die in Zelladhäsionsstudien die Zelladhäsion deutlich verstärkt (Sequenz Q29-P154) (20).
- ‘Hep2‘ beinhaltet die Sequenz P478-V580. Diese Sequenz wurde initial für eine Heparinbindungsstelle gehalten und deshalb mit der Bezeichnung Hep2 versehen, was sich jedoch nicht bestätigte.
- ‘III3,6‘ enthält die Fibronectin Typ III Homologien 3 bis 6 – Sequenz S336-V895.
- ‘III7,8‘ enthält die Fibronectin Typ III Homologien 7 und 8 – Sequenz I827-K1010.
- ‘vWF‘ auf diesem Fusionsprotein liegt eine von Willebrand-Faktor-A Domäne – Sequenz A1009-K1257.
- ‘NC4‘ ist die nicht-kollagene Domäne 4 (Sequenz F1210-P1462). Dieses Teilstück scheint bei der Zelladhäsion keine entscheidende Rolle zu spielen.

Herstellung der Fusionsproteine:

Die Teilstücke von Kollagen XIV wurden in Kooperation mit Dr. W. Dieterich (Universität Erlangen) mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion aus cDNA von humaner Plazenta synthetisiert, vervielfältigt und in den Vektor pGEX-2T (Pharmacia Biotech GmbH) kloniert. Alle Fusionsproteine, die ein Fragment der Glutathion-S-Transferase (26 kDa-Fragment aus *Schistosoma japonicum* am Aminoterminus) enthielten, wurden in transformierten *E. coli* NM522 (Invitrogen Life Technologies, Leek, Niederlande) exprimiert und affinitätschromatographisch über Glu-

tation-Sepharose 4B (Pharmacia Biotech GmbH) aufgereinigt. Gelöst wurden die Fusionsproteine in 5 mM Glutathion-Puffer (Sigma) in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 (24).

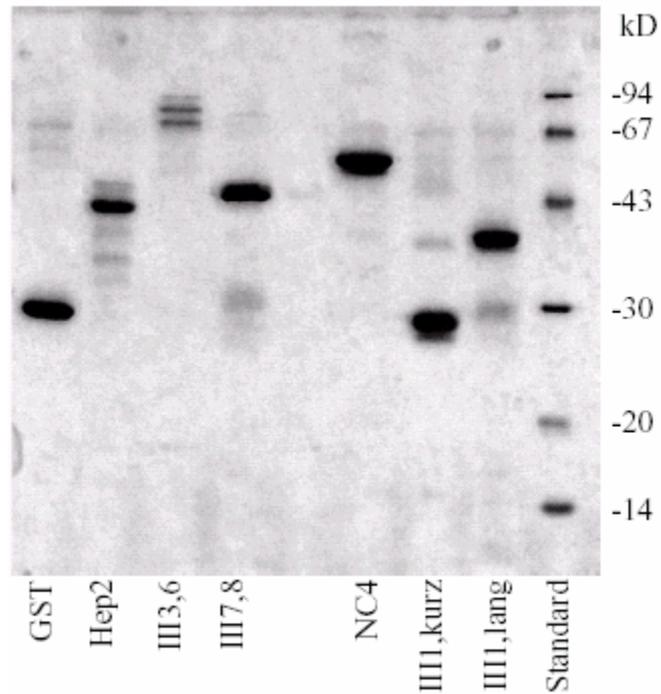


Abb. 6
SDS-Gel-Elektrophorese der Kollagen XIV-Peptide. Aufgetragen je 1 µg/10µl.

Kollagen I wurde ebenfalls aus humaner Plazenta durch Pepsinverdau, wiederholte, fraktionierte Salzfällung in sauren und neutralen Puffern und abschließender Molekularsieb-Chromatographie isoliert, gereinigt und in 0,15 M Essigsäure gelöst (58).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

Alle Arbeiten wurden unter keimarmen Bedingungen unter einer Reinraumwerkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Die verwendeten Lösungen wurden in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Die Zellkultivierung erfolgte in 25 cm²- oder 75 cm²-Kulturflaschen mit Kulturmedium (siehe 2.1.3) in einem Brutschrank bei 37°C in 5% Kohlendioxid-haltiger Atmosphäre.

Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert und der Zellrasen einmal mit PBS gespült. Bei erreichter Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu mussten die Zellen nach zweimaligem Spülen mit PBS durch Zugabe von (je nach Größe der Kulturflasche) 1 bzw. 3 ml Trypsin/EDTA abgelöst werden. Um ein vollständiges Ablösen der gut haftenden Fibroblasten zu erreichen, mussten sie für 5 min. im Brutschrank inkubiert werden. Danach konnten die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 (HF) bzw. 1:5 (3T3) ausgesät werden.

Humane Hautfibroblasten wurden nur bis zur achten Passage verwendet.

Für das Einfrieren von Zellen wurde ein spezielles Medium mit DMSO (siehe 2.1.3) verwendet. Die Zellen wurden dafür in einer Konzentration von einer Million Zellen pro 1,8 ml vorgekühltem Einfriermedium in speziellen Kryoröhrchen (NUNC, Roskilde, Dänemark) aufgenommen und für 24 Stunden in einem Isopropanol-gefüllten Einfriercontainer bei -80°C gekühlt. Danach konnten sie in flüssigen Stickstoff überführt werden. Dieses schrittweise Vorgehen beim Einfrieren und die Anwendung von DMSO sind nötig, um einer intrazellulären Kristallbildung entgegenzuwirken.

Das Wiederauftauen der Zellen muss im Gegensatz zum Einfrieren rasch erfolgen, um die wieder stoffwechselaktiv werdenden Zellen möglichst nur kurz dem toxisch wirkenden DMSO auszusetzen. Man taut dazu das Kryoröhrchen kurz im 37°C Wasserbad an, pipettiert den Inhalt sukzessive in 40 ml Kulturmedium um und zentrifugiert die Zellen bei 800 rpm für 10 min. Danach kann der Überstand abgegossen und die Zellen in eine Kulturflasche überführt werden. Am folgenden Tag erfolgt ein Mediumwechsel.

2.2.2 Beschichtung der Zellkulturflaschen mit EZM-Proteinen

Zur Beschichtung der Zellkulturplatten (Falcon) wurden unterschiedliche Konzentrationen der Kollagene XIV, I, Fibronektin und der Fusionspeptide von Kollagen XIV verwendet: jeweils 0,5 µg, 1 µg, oder 3 µg, gelöst in 0,1 ml PBS pro Vertiefung der 96-Loch-Platte. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Mikrotiterplatten einmal mit PBS (0,25 ml/Loch) gewaschen.

Noch vorhandene freie unspezifische Bindungsstellen wurden mit 0,1%igem BSA (Dade Behring) gelöst in PBS (0,2 ml/Loch) für 1 h bei 37°C blockiert. Bevor die Zellen einpipettiert werden konnten, mussten die Löcher der Zellkulturplatte dreimal mit je 0,25 ml PBS gewaschen werden, damit insbesondere der Harnstoff-enthaltende Puffer von Kollagen XIV komplett entfernt wird.

Um zu bestimmen, wie hoch der Anteil des Moleküls ist, der tatsächlich an das Plastik bindet („coating efficiency“), wurde eine Proteinmarkierung mit [¹²⁵I] nach der Chloramin-T Methode durchgeführt (11, 58, 59). Dazu wurden Zellkulturplatten mit nicht markierten Proteinen - wie zuvor beschrieben - zusammen mit dem entsprechenden radioaktiv markierten Protein beschichtet. Anschließend wurde die anteilmäßig gebundene Radioaktivität im Gammazähler gemessen. Für die Beschichtung mit 1 µg des jeweiligen Proteins ergaben sich folgende Werte: Kollagen XIV 25%, Kollagen I 30%, Fibronektin 32% und für die Kollagen XIV-Fragmente III1lang 29%, III1kurz 21%, Hep2 20%, NC4 34% und isoliertes GST 23%.

2.2.3 Direkter Zusatz von gelösten Kollagen XIV-Fragmenten

Die einzelnen Fusionproteine von Kollagen XIV wurden nicht nur zur Beschichtung der Zellkulturplatten eingesetzt, sondern in weiteren Versuchen auch direkt in gelöster Form zu den Zellen gegeben. Sie können im Gegensatz zu dem Gesamtmolekül von Kollagen XIV in einem zellverträglichen Glutathion-Puffer gelöst werden (siehe 2.1.5). Dies erlaubt eine direkte Zugabe in das Medium der Zellen. Für die jeweiligen Versuche wurden die Zellkulturplatten zunächst wie unter 2.2.2 beschrieben mit Kollagen I oder mit Kollagen XIV beschichtet, die Zellen darauf ausgesät und die gelösten Fusionsproteine mit dem für den Versuch eingesetzten FKS-Mangelmedium (0,5% FKS) verdünnt und entweder 5 µg oder 10 µg pro Vertiefung zu den Zellen hinzupipettiert.

Als Kontrolle diente hier jeweils die Proliferation mit Zusatz des entsprechenden Volumens der reinen Pufferlösung ohne Fusionproteine.

2.2.4 Zellproliferationsuntersuchung

Das Zellwachstum wurde durch Messung der DNS-Synthese durch den Einbau radioaktiv markierten Thymidins bestimmt. Thymidin wird als natürliches Nukleosid während der Synthesephase des Zellzyklus in die sich replizierende DNS eingebaut. Das hier verwendete Thymidin ist mit Tritium, einem β -Strahler markiert.

Mikrotiterplatten wurden wie unter 2.2.2 beschrieben mit den verschiedenen Kollagenen beschichtet. Für eine zuverlässige statistische Auswertung wurden sechsfach-Werte erhoben.

Die in 25 oder 75 cm² Kulturflaschen vorkultivierten, subkonfluenten Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst, in serumreduziertem Medium aufgenommen, abzentrifugiert (bei 800 U/min) und in Neubauer-Zählkammern gezählt. Entsprechend der Zellzahl wurden die Zellen mit serumreduziertem Medium auf 50.000 Zellen/ml verdünnt und in 0,1 ml pro Vertiefung (entspricht 5000 Zellen/0,33 cm²) der Mikrotiterplatten (96-Loch-Platten von Falcon bzw. NUNC) ausgesät.

Das FKS-Mangelmedium wird eingesetzt, um die Zellen „auszuhungern“ und damit zuverlässig in die G₀/G₁-Phase des Zellzyklusses zu versetzen. Diese Synchronisation der Zellen ist eine notwendige Voraussetzung, um die Sensitivität der Proliferationsuntersuchung zu erhöhen (60).

Die serumreduzierten Zellen wurden nun 20 h inkubiert. Dann folgte für 4 h der Einbau von [³H]-Thymidin in die DNS der Zellen. Dazu wurden 0,5 μ Ci [³H]-Thymidin (0,0185 MBq) in einem Volumen von 0,01 ml DMEM pro Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 4 Stunden wurde der [³H]-Thymidin-Einbau durch Entfernung des Mediums beendet und die Zellen jeweils mit 0,2 ml 10%iger Trichloressigsäure (TCA) bei Raumtemperatur für 30 min fixiert, dann für weitere 30 min in 0,05 ml 0,2 M Natronlauge lysiert.

Die alkalische partielle Hydrolyse führt zu einem Freisetzen der DNS und einer Ablösung von am Kollagen und dem Plastik haftender DNS. Dieser Vorgang wird nach 30 min. durch Neutralisierung mit 0,05 ml 0,8 M HCl gestoppt. Die in Lösung gebrachte DNS kann nun mit Hilfe eines Cell Harvesters auf einen speziellen Glasfaserfilter (Wallac) übertragen werden. Nicht eingebautes Thymidin und sehr kleine DNS-Fragmente werden weggespült. Nach Aufschmelzen eines Szintillationswachses (Wallac, Turku, Finnland) auf den Glasfaserfilter (Skatron, Lier, Norwegen) (ca. 10 min. bei 80°C) können die radioaktiven Zerfälle im Szintillationszähler (LKB Wallac, Turku, Finnland) gemessen werden.

2.2.5 Zellzahlbestimmung mit Sulforhodamin B

Die Zellzahl wurde parallel zur Bestimmung der DNS-Synthese durchgeführt. Dazu wurden die Zellen bis auf den Einbau von [³H]-Thymidin in der gleichen Weise eingesetzt wie unter 2.2.4 (Zellproliferationsbestimmung) beschrieben. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen nach Abgießen des Mediums dreimal mit 0,2 ml PBS gewaschen. Der Waschvorgang musste sehr behutsam durchgeführt werden, um die Zellen nicht abzuschwemmen. Anschließend folgte die Fixierung mit 0,1 ml 10% TCA für 30 min. bei Raumtemperatur. Diese Behandlung mit Trichloressigsäure ist für die Färbung mit Sulforhodamin B eine wichtige Voraussetzung, da die Sulfatgruppen des Aminoxanthen-Farbstoffes nur im sauren Milieu an die basischen Aminosäurereste der fixierten Proteine binden (61). Bevor der Farbstoff aufgebracht werden konnte, musste die Zellkulturplatte mit destilliertem Wasser gewaschen werden und an der Luft bei Raumtemperatur trocknen. Die Färbung erfolgte pro Vertiefung mit 0,1 ml 0,4% Sulforhodamin B (SRB) gelöst in 1%iger Essigsäure für 30 min. Abschließend wurde viermal mit 1%iger Essigsäure gewaschen, um ungebundene Farbstoffreste zu entfernen, und die Zellkulturplatte bei Raumtemperatur getrocknet. Durch SRB wurden die Zellen violett angefärbt, was auch für eine morphologische Beurteilung der Zellen genutzt wurde.

Für die photometrische Bestimmung wurde das gebundenen SRB durch je 0,1 ml 10 mM Tris-Base bei 5 minütigem Schütteln in Lösung gebracht. Die Extinktion wurde bei 564 nm im Photometer (ELISA Reader) bestimmt und der jeweilige Leerwert (keine Zellen) subtrahiert. Die sich ergebenden Messwerte korrelieren mit dem Proteingehalt der Zellen und damit auch mit der Zellzahl. Da die Zellzahl vom Wachstum der Zellen abhängt, kann man diese Methode auch als weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Zellproliferation ansehen.

Zur Kontrolle wurde jeweils eine Standardextinktion für die jeweiligen Zellen durchgeführt (Verdünnungsreihe von 20.000 bis 650 Zellen pro Vertiefung der Mikrotiterplatte).

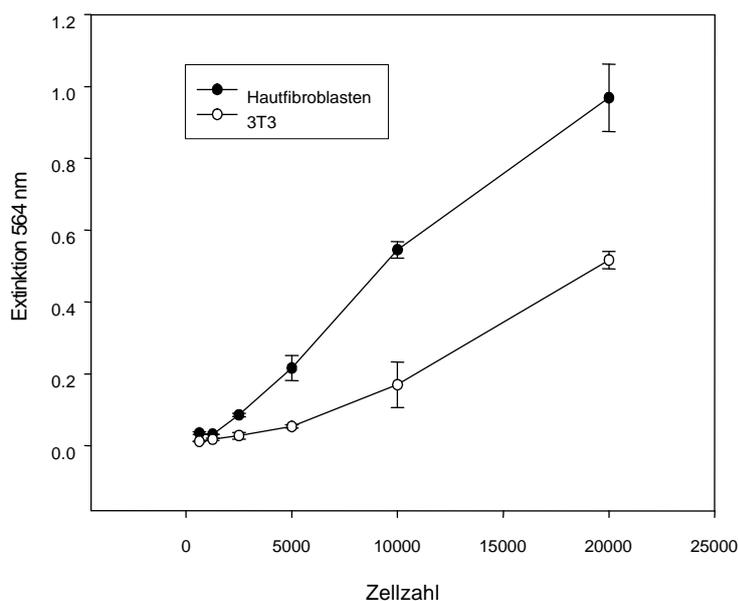


Abb. 7

Standardextinktionskurve von HF und 3T3. Beispielhaft ist hier eine Referenzkurve gezeigt. Die Kurve zeigt die Korrelation zwischen der Extinktion und der Zellzahl bzw. Proteinmenge von HF und 3T3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation in FKS-Mangelmedium (0,5%).

2.2.6 Zelladhäsionsversuche

Um die Adhäsionsfähigkeit der Zellen an Kollagen XIV und seine Peptide zu untersuchen, wurden wie unter 2.2.2 beschrieben die verschiedenen Kollagene auf 96-Loch-Platten jeweils mit 1 µg pro Vertiefung immobilisiert. Als Positivkontrolle diente die Beschichtung mit Fibronectin, als Negativkontrolle BSA. Für diesen Versuch wurde ein spezielles Medium für die Zellen verwendet: DMEM mit 25 mM Hepes. Vor dem Aussäen wurden die Zellen 30 min. mit einem Sojabohnen-Trypsininhibitor (1 mg/ml) bei 37°C inkubiert, um das zum Ablösen der Zellen verwendete Trypsin/EDTA zu neutralisieren. Die Zellen wurden in 30 ml Medium aufgenommen, zweimal abzentrifugiert, gezählt und in der entsprechenden Verdünnung (10^4 Zellen pro 0,1 ml und Vertiefung) in Medium mit 0,5% FKS aufgenommen und in die Mikrotiterplatte ausgesät und für 30 min. bei 37° inkubiert (55). Anschließend wurde der Proteingehalt der adhären Zellen mittels Extinktionsbestimmung gemessen wie unter 2.2.5 beschrieben.

2.2.7 Reaktivierungsversuche mit Hautfibroblasten

Der Versuchsaufbau sah folgendermaßen aus: Wie unter 2.2.4 beschrieben, wurde ein Zellproliferationsversuch angesetzt, dann aber nach 20 Stunden das Nährstoffangebot für alle Zellen auf

optimale Bedingungen erhöht. Dazu wurde 10%iges FKS (20 µl 50% FKS pro Vertiefung) zugeführt und eine weitere 20-stündige Inkubation bei 37°C angeschlossen. Zur Aktivitätsbestimmung wurde wie bei den bisherigen Versuchen radioaktiv markiertes Thymidin für 5 bis 8 Stunden eingebaut. Als Kontrolle diente das Zellwachstum auf Kollagen I mit und ohne Zusatz von FKS. Der Versuch sollte zeigen, ob die Zellen auf den unterschiedlichen Beschichtungen (auf Kollagen I und auf Kollagen XIV) gleichermaßen zur Proliferation angeregt werden könnten.

2.2.8 Durchflusszytometrie

Der Anteil apoptotischer Zellen in einer Zellpopulation kann über den DNS-Gehalt einzelner Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wird die DNS mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie Propidiumjodid gefärbt. Der DNS-Gehalt nicht proliferierender Zellen in der G0/1 Phase entspricht dem diploiden Chromosomensatz, der sich in der S-Phase (Synthese-Phase) verdoppelt. Die proliferierenden Zellen fluoreszieren somit entsprechend stärker. Während der Apoptose werden DNS-Fragmente generiert, die die Zellmembran der fixierten und permeabilisierten Zellen passieren können und während der Waschschritte verloren gehen. Apoptotische Zellen zeigen daher eine geringere Fluoreszenz und lassen sich als Sub-G1 Gipfel darstellen. In der Auswertung werden die Flächen unter den entsprechenden Abschnitten der Kurve im Vergleich zur Fläche unter der gesamten Kurve ermittelt. Sie sind ein Maß für den Anteil der Zellen in dem jeweiligen physiologischen Zustand innerhalb der Zellpopulation.

3T3-Zellen wurden nach 24 stündigem Wachstum auf immobilisiertem Kollagen XIV bzw. unbehandelt (2.2.4) trypsinisiert, mit PBS gewaschen, zentrifugiert und in 70% Ethanol bei -20 °C 30 min. fixiert, anschließend zum Abbau der verbliebenen RNS in 500 µl PBS mit RNase (250 mg/l) 30 min. bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Propidiumjodid (1 µg/ml) 30 min. bei Raumtemperatur gefärbt.

Für die Durchflusszytometrie wurde ein FACScan-Gerät (Becton Dickinson, San Jose, USA) mit der CellQuest Software verwendet. Die Zellen wurden anhand ihrer Forward- /Side-Scatter-Eigenschaften eingegrenzt, insgesamt jeweils 20.000 Zellen aufgenommen und der individuelle Propidiumjodidgehalt ausgewertet.

2.2.9 Zellmorphologie

Morphologische Veränderungen der Zellen bzw. der Zellverbände unter dem Einfluss von Kollagen XIV wurden lichtmikroskopisch beurteilt und fotodokumentiert.

2.2.10 Zelldifferenzierungsassay mit 3T3-L1 Präadipozyten

Die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten wird als Standard-Assay verwendet (62, 63). Der Assay wurde leicht modifiziert eingesetzt: Wie unter 2.2.4 beschrieben wurden zunächst 3T3-L1 Zellen auf immobilisiertem Kollagen XIV, Kollagen I oder auf Plastik (2.2.2) ausgesät. Nach dreitägiger Inkubation bei 37 °C und täglichem Mediumwechsel waren die Zellen konfluent. 2 Tage nach erreichter Konfluenz wurde eine Teil der Zellen mit einem „Hormoncocktail“ bestehend aus 1,7 µM Insulin, 1 µM Dexamethason, 0,5 mM Methylxanthin in 10% FKS-haltigem Medium behandelt. Am 4. Tag wurde das Medium ausgetauscht gegen 10% FKS-haltiges Medium mit Insulin (Positivkontrolle). Die Fetttropfenbildung als ein Differenzierungsparameter wurde täglich mikroskopisch beurteilt.

Am 5. Tag wurden bereits erste Fetttropfen beobachtet. Am 9. Tag wurden die Zellen dann mit 10%igem Formalin (100 µl pro Vertiefung auf der Platte) für 1 h fixiert und mit destilliertem Wasser gewaschen.

Zur Anfärbung der Fetttropfen wurde Oil Red O verwendet (0,53 g Oil Red O, gelöst in 150 ml Isopropanol, zweimal mit Millipore-Filter 0,45 µm filtriert und vor Gebrauch mit destilliertem Wasser 3:2 verdünnt). Einwirkzeit 2 h. Die Zellkerne wurden mit Meyer's Hämatoxylin für 5 Minuten angefärbt. Nachfolgend wurde fünfmal mit destilliertem Wasser gewaschen und abschließend bei 40facher Vergrößerung mittels einer Digitalkamera fotodokumentiert. Die Bearbeitung der Fotos erfolgte mit Adobe Photoshop.

Die mit dem Hormoncocktail behandelten Zellen konnten nun morphologisch mit den unbehandelten verglichen werden, die zum Teil auf immobilisiertem Kollagen XIV, zum Teil auf Plastik oder immobilisiertem Kollagen I gewachsen waren.

2.2.11 Statistische Auswertung

Um den zufälligen (statistischen) Fehler bei den Messvorgängen zu bestimmen, wurden die Ergebnisse als Mittelwert (MW, \bar{x}) von 6 Messwerten mit Standardabweichung (SA, s_1) darge-

stellt. Dabei wurde der Mittelwert \bar{x} als arithmetisches Mittel aus n Einzelmessungen x_i ermittelt. Die Standardabweichung s_1 ist durch die folgende Gleichung definiert:

$$s_1 = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$