

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Etablierung einer Zellkultur orbitaler Fibroblasten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Maria Lisa Viktoria Steiner
aus Mannheim

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand: XXX

1. Gutachter: XXX

2. Gutachter: XXX

Tag der Promotion: 06. Juli 2021

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| <i>Abkürzungsverzeichnis</i> | 5 |
| <i>Abbildungsverzeichnis</i> | 7 |
| <i>Tabellenverzeichnis</i> | 10 |
| 1. Einleitung | 11 |
| 1.1. <i>Etablierung einer Zellkultur</i> | 11 |
| 1.2. <i>Orbitale Fibroblasten</i> | 12 |
| 2. Literaturdiskussion | 14 |
| 2.1. <i>Endokrine Orbitopathie</i> | 14 |
| 2.1.1. Allgemeines | 14 |
| 2.1.2. Pathogenese der Endokrinen Orbitopathie | 16 |
| 2.1.3. Aktueller Stand der Therapie bei Endokriner Orbitopathie | 19 |
| 2.2. <i>Zellkulturen</i> | 20 |
| 2.2.1. Allgemeines | 20 |
| 2.2.2. Primärzellkulturen | 20 |
| 2.2.3. Kulturbedingungen..... | 21 |
| 2.2.4. Kontamination..... | 23 |
| 2.2.5. KulturgefäÙe | 24 |
| 2.2.6. Subkultivierung | 25 |
| 2.2.7. Benötigtes Equipment..... | 26 |
| 2.2.8. Kryokonservierung..... | 27 |
| 2.2.9. Qualitätssicherung in der Zellkultur..... | 27 |
| 2.3. <i>Endokrine Orbitopathie: Fibroblasten in der Zellkultur</i> | 29 |
| 2.3.1. Anlegen der Kultur und verwendete Medien | 29 |
| 2.3.2. Verwendete Passagen..... | 32 |
| 2.3.3. KulturgefäÙe und Zellzahlen | 32 |
| 2.3.4. Zellfärbungen..... | 33 |
| 2.3.5. Verwendete Assays | 33 |
| 2.3.6. Stimulation..... | 34 |
| 2.3.7. Differenzierung | 39 |
| 3. Material und Methoden | 42 |
| 3.1. <i>Material</i> | 42 |
| 3.2. <i>Orbitagewebe</i> | 48 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.3. | <i>Methoden</i> | 49 |
| 3.3.1. | Erhalt des Gewebes | 49 |
| 3.3.2. | Kryokonservierung von Gewebe | 49 |
| 3.3.3. | Anlegen einer Zellkultur | 51 |
| 3.3.4. | Wachstum der Primärkulturen aus frischem Gewebe | 55 |
| 3.3.5. | Vergleich: Wachstum von Kulturen aus frischem oder kryokonserviertem Gewebe | 55 |
| 3.3.6. | Einstellen des Trypsinprotokolls..... | 55 |
| 3.3.7. | Fotodokumentation | 55 |
| 3.3.8. | Beschichtung der Petrischalen mit Poly-D-Lysin | 56 |
| 3.3.9. | Mediumwechsel | 56 |
| 3.3.10. | Erstellen einer Subkultur..... | 57 |
| 3.3.11. | Kryokonservierung einer Subkultur | 58 |
| 3.3.12. | Anlegen einer kryokonservierten Subkultur | 60 |
| 3.3.13. | Zellzählung | 61 |
| 3.3.14. | Oil red O Färbung | 63 |
| 3.3.15. | MTT Test | 65 |
| 3.3.16. | Wachstum und Stoffwechselaktivität in Medium 199..... | 66 |
| 3.3.17. | Stoffwechselaktivität nach Stimulation | 67 |
| 3.3.18. | Mykoplasmentest..... | 67 |
| 3.3.19. | Hyaluronsäure Sandwich ELISA Assay | 68 |
| 3.4. | <i>Auswertung</i> | 70 |
| 4. | Ergebnisse | 71 |
| 4.1. | <i>Wachstumsverhalten</i> | 71 |
| 4.1.1. | Wachstumsgeschwindigkeit in Basisplatten - Kulturen aus frischem Gewebe... .. | 72 |
| 4.1.2. | Wachstumsgeschwindigkeit der Subkulturen aus frischem Gewebe | 73 |
| 4.1.3. | Wachstumsgeschwindigkeit in Basisplatten - Kulturen aus kryokonserviertem Gewebe | 74 |
| 4.1.4. | Vergleich: Stoffwechselaktivität der Subkulturen..... | 76 |
| 4.1.5. | Nicht erfolgreich angewachsene Kulturen | 77 |
| 4.1.6. | Verwendete Gewebemengen | 78 |
| 4.1.7. | Beschichtung der Platten mit Poly-D-Lysin | 78 |
| 4.1.8. | Anlegen kryokonservierter Subkulturen | 79 |
| 4.1.9. | Stoffwechselaktivität kryokonservierter Subkulturen | 79 |
| 4.2. | <i>Fotodokumentation</i> | 80 |
| 4.2.1. | Anwachsen einer Kultur aus frischem Gewebe | 80 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.2.2. | Vergleich: Kultur aus frischem Gewebe versus kryokonserviertem Gewebe | 84 |
| 4.2.3. | Fettzellkonglomerate und Fettgewebe | 86 |
| 4.2.4. | Unterschiedliche Morphologien der Fibroblasten | 87 |
| 4.2.5. | Prädipozyten | 88 |
| 4.2.6. | Oil red O Färbung | 89 |
| 4.2.7. | Subkultur nach Kryokonservierung | 90 |
| 4.2.8. | Seneszenz und schlechtes Wachstum | 91 |
| 4.2.9. | Kontamination | 92 |
| 4.2.10. | Zellmorphologie nach 6 h, 24 h, 48 h der M22 MAk Stimulation | 93 |
| 4.3. | <i>Einstellen des Trypsinprotokolls</i> | 93 |
| 4.4. | <i>Zellzählung</i> | 94 |
| 4.4.1. | Zellzählung mit Neubauerkammer und Trypanblau | 94 |
| 4.4.2. | Zellzählung mit dem Zellzählgerät LunaFl – Färbung: Trypanblau | 95 |
| 4.4.3. | Zellzählung mit Zellzählgerät LunaFl – Färbung: Acridinorange und Propidiumjodid | 96 |
| 4.5. | <i>Umstellung des Wachstumsmediums auf Medium 199</i> | 97 |
| 4.5.1. | Stoffwechselaktivität bei Umstellung des Mediums | 97 |
| 4.5.2. | Zellwachstum bei Umstellung des Mediums | 97 |
| 4.6. | <i>Stoffwechselaktivität bei Stimulation der Zellen</i> | 98 |
| 4.7. | <i>Stimulation der Zellen mit M22 MAk</i> | 100 |
| 5. | Diskussion | 103 |
| 5.1. | <i>Wachstum und Stoffwechselaktivität</i> | 103 |
| 5.1.1. | Wachstumsbedingungen | 103 |
| 5.1.2. | Frisches Gewebe | 107 |
| 5.1.3. | Kontrollgewebe | 108 |
| 5.1.4. | Limitation der Ergebnisse von Kontrollkulturen | 108 |
| 5.1.5. | Kryokonserviertes Gewebe | 109 |
| 5.1.6. | Gewebemenge | 109 |
| 5.1.7. | Kryokonservierte Subkulturen | 109 |
| 5.2. | <i>Stimulation der Zellen</i> | 110 |
| 5.2.1. | Wechsel des Mediums | 110 |
| 5.2.2. | Stimulationsbedingungen | 111 |
| 5.2.3. | Stimulation mit M22 MAk | 111 |
| 5.2.4. | Ermittlung von Versuchsbedingungen | 113 |
| 5.2.5. | Hyaluronsäure Assay | 113 |

| | | |
|-----------|-----------------------------------|------------|
| 5.3. | <i>Zellzählung</i> | 114 |
| 5.4. | <i>Qualitätsmanagement</i> | 115 |
| 5.5. | <i>Ausblick</i> | 116 |
| 6. | Zusammenfassung | 117 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 119 |
| | <i>Anhang</i> | 127 |
| | <i>Danksagung</i> | 129 |
| | <i>Lebenslauf</i> | 130 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| µM | Mikromol |
| Abb. | Abbildung |
| bzgl. | bezüglich |
| CAS | Clinical Activity Score |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagles Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme - linked Immunosorbent Assay |
| EO | Endokrine Orbitopathie |
| FBS | Fetales Bovines Serum |
| g | Gramm |
| GAG | Glykosaminoglykane |
| ggf. | gegebenenfalls |
| h | Stunde/n |
| HA | Hyaluronsäure |
| Ig | Immunglobuline |
| IGF-1 | Insulin like growth Factor - 1 |
| IGF-1R | Insulin like growth Factor - 1 Rezeptor |
| IL | Interleukin |
| Kryo. | Kryokonserviert |
| l | Liter |
| M22 | humaner monoklonaler Antikörper des TSHR |
| MAK | Monoklonaler Antikörper |
| mg | Milligramm |
| min | Minute/n |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimol |
| MTT | 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid |
| ng | Nanogramm |
| nM | Nanomol |

| | |
|------|--|
| OP | Operation |
| P | Passage |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| sec | Sekunde/n |
| SOP | Standard Operating Procedure |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| TSH | Thyreotropin/Thyroidea-stimulierendes Hormon |
| TSHR | Thyreotropin-Rezeptor |
| U/l | Units pro Liter |
| z.B. | zum Beispiel |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Fibroblasten | 13 |
| Abbildung 2: Darstellung der Symptome der Endokrinen Orbitopathie | 15 |
| Abbildung 3: Entwicklung der Symptome der Endokrinen Orbitopathie | 15 |
| Abbildung 4: Symptome der Endokrinen Orbito-pathie..... | 15 |
| Abbildung 5: Pathogenese der Endokrinen Orbitopathie | 18 |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung: Verarbeitung des Orbita Gewebes | 53 |
| Abbildung 7: Flowchart: Arbeitsschritte beim Anlegen einer Zellkultur | 54 |
| Abbildung 8: Flowchart - Arbeitsabläufe während der Kultivierung der Zellen | 61 |
| Abbildung 9: Vergleich von frischem und kryokonserviertem Gewebe gleicher Gewebeproben | 75 |
| Abbildung 10: Stoffwechselaktivität der Subkulturen von Kulturen aus frischem oder kryokonserviertem Gewebe..... | 76 |
| Abbildung 11: Verwendete Gewebemenge in Gramm [g] beim Anlegen einer neuen Kultur mit kryokonserviertem Gewebe | 78 |
| Abbildung 12: Stoffwechselaktivität der Subkulturen ohne und mit Kryokonservierung | 79 |
| Abbildung 13: Kultur nach 1 Woche | 80 |
| Abbildung 14: Kultur nach 1 Woche | 80 |
| Abbildung 15: Kultur nach 1 Woche | 80 |
| Abbildung 16: Kultur nach 1 Woche | 80 |
| Abbildung 17: Kultur nach 2 Wochen | 81 |
| Abbildung 18: Kultur nach 2 Wochen | 81 |
| Abbildung 19: Kultur in 6 Well Platte nach 2 Wochen..... | 81 |
| Abbildung 20: Kultur in 6 Well Platte nach 2 Wochen..... | 81 |
| Abbildung 21: Kultur in Petrischale nach 3 Wochen..... | 81 |
| Abbildung 22: Kultur in Petrischale nach 3 Wochen..... | 81 |
| Abbildung 23: Kultur in 6 Well Platte nach 3 Wochen..... | 82 |
| Abbildung 24: Kultur in 6 Well Platte nach 3 Wochen..... | 82 |
| Abbildung 25: Kultur in Petrischale nach 3 Wochen..... | 82 |
| Abbildung 26: Kultur in Petrischale nach 3 Wochen..... | 82 |
| Abbildung 27: Kultur in Petrischale nach 4 Wochen..... | 82 |
| Abbildung 28: Kultur in 6 Well Platte nach 4 Wochen..... | 82 |
| Abbildung 29: Kultur in 6 Well Platte nach 4 Wochen..... | 83 |
| Abbildung 30: Kultur in Petrischale nach 4 Wochen..... | 83 |
| Abbildung 31: Kultur in Petrischale nach 5 Wochen..... | 83 |
| Abbildung 32: Kultur in Petrischale nach 5 Wochen..... | 83 |
| Abbildung 33: Kultur in Petrischale nach 5 Wochen..... | 83 |
| Abbildung 34: Kultur in Petrischale nach 5 Wochen..... | 83 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 35: Kultur in Petrischale nach 5 Wochen..... | 84 |
| Abbildung 36: Kultur in Petrischale nach 5 Wochen..... | 84 |
| Abbildung 37: Kultur aus kryo. Gewebe nach 1 Woche..... | 84 |
| Abbildung 38: Vergleich: Kultur aus frischem Gewebe nach 1 Woche | 84 |
| Abbildung 39: Kultur aus kryo. Gewebe nach 1 Woche..... | 84 |
| Abbildung 40: Kultur aus kryo. Gewebe nach 2 Wochen..... | 84 |
| Abbildung 41: Kultur aus kryo. Gewebe nach 2 Wochen..... | 85 |
| Abbildung 42: Kultur aus kryo. Gewebe nach 3 Wochen..... | 85 |
| Abbildung 43: Kultur aus kryo. Gewebe nach 3 Wochen..... | 85 |
| Abbildung 44: Kultur aus kryo. Gewebe nach 4 Wochen..... | 85 |
| Abbildung 45: Kultur aus kryo. Gewebe nach 4 Wochen..... | 85 |
| Abbildung 46: Kultur aus kryo. Gewebe nach 5 Wochen..... | 85 |
| Abbildung 47: Kultur aus kryo. Gewebe nach 3 Wochen..... | 86 |
| Abbildung 48: Kultur aus kryo. Gewebe nach 16 Wochen..... | 86 |
| Abbildung 49: Fettzellkonglomerate in der Basisplatte (4x)..... | 86 |
| Abbildung 50: Fettzellkonglomerate in der Basisplatte | 86 |
| Abbildung 51: Fettzellen in Kulturplatte | 86 |
| Abbildung 52: Fettzellen in Kulturplatte | 86 |
| Abbildung 53: Fibroblasten | 87 |
| Abbildung 54: Fibroblasten | 87 |
| Abbildung 55: Fibroblasten | 87 |
| Abbildung 56: Fibroblasten | 87 |
| Abbildung 57: Fibroblasten | 87 |
| Abbildung 58: Fibroblasten | 87 |
| Abbildung 59: Fibroblast in der Entwicklung zum Präadipozyt | 88 |
| Abbildung 60: Präadipozyt in konfluenter Zellkultur..... | 88 |
| Abbildung 61: Präadipozyt in konfluenter Zellkultur..... | 88 |
| Abbildung 62: Präadipozyten Cluster um Fettzellkonglomerat | 88 |
| Abbildung 63: Präadipozytencluster | 88 |
| Abbildung 64: Präadipozytencluster | 88 |
| Abbildung 65: Fettzellkonglomerate auf Basisplatte mit Fibroblasten..... | 89 |
| Abbildung 66: Fettzellkonglomerat mit mehreren Kernen..... | 89 |
| Abbildung 67: Große Fettzelle mit Fibroblasten | 89 |
| Abbildung 68: Fettzellen mit konfluent gewachsenen Fibroblasten | 89 |
| Abbildung 69: Konfluent gewachsene Fibroblasten mit Fettzelle und Präadipozyt..... | 89 |
| Abbildung 70: Mehrere Präadipozyten | 89 |
| Abbildung 71: Erfolgreiches Anwachsen nach 72 h | 90 |
| Abbildung 72: Erfolgreiches Anwachsen nach 72 h | 90 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 73: Schlechtes Anwachsen nach 72 h..... | 90 |
| Abbildung 74: Schlechtes Anwachsen nach 72 h..... | 90 |
| Abbildung 75: Anwachsen nach Kryokonservierung nicht erfolgreich..... | 90 |
| Abbildung 76: Anwachsen nach Kryokonservierung nicht erfolgreich..... | 90 |
| Abbildung 77: Passage 12 der Kultur..... | 91 |
| Abbildung 78: Passage 12 der Kultur..... | 91 |
| Abbildung 79: Passage 4, Kultur wächst schlecht..... | 91 |
| Abbildung 80: Passage 4, Kultur wächst schlecht..... | 91 |
| Abbildung 81: Kultur aus kryokonserviertem Gewebe..... | 91 |
| Abbildung 82: Kultur aus kryokonserviertem Gewebe..... | 91 |
| Abbildung 83: Schlechtes Wachstum nach zu großer Trypsinmenge..... | 92 |
| Abbildung 84: Schlechtes Wachstum nach zu großer Trypsinmenge..... | 92 |
| Abbildung 85: Kontamination mit unbekanntem Pilz..... | 92 |
| Abbildung 86: Kontamination mit Pilz..... | 92 |
| Abbildung 87: Fibroblasten vor Beginn der Stimulation (10x)..... | 93 |
| Abbildung 88: Fibroblasten nach 6 h Stimulation..... | 93 |
| Abbildung 89: Fibroblasten nach 24 h Stimulation..... | 93 |
| Abbildung 90: Fibroblasten nach 48 h Stimulation..... | 93 |
| Abbildung 91: Ausschnitt einer Zellzählung mit der Neubauerkammer und Trypanblau Färbung..... | 94 |
| Abbildung 92: Ausschnitt einer Zellzählung mit Neubauerkammer und Trypanblau Färbung..... | 94 |
| Abbildung 93: Ausschnitt einer Zellzählung mit dem LunaFI mit Trypanblaufärbung..... | 95 |
| Abbildung 94: Ausschnitt einer Zellzählung mit dem LunaFI mit Trypanblaufärbung..... | 95 |
| Abbildung 95: Ausschnitt einer Zellzählung mit dem LunaFI mit Fluoreszenzfärbung..... | 96 |
| Abbildung 96: Ausschnitt einer Zellzählung mit dem LunaFI mit Fluoreszenzfärbung..... | 96 |
| Abbildung 97: Stoffwechselaktivität von Subkulturen gemessen im MTT Assay..... | 97 |
| Abbildung 98: Stoffwechselaktivität bei Stimulation gemessen im MTT Assay..... | 98 |
| Abbildung 99: Hyaluronsäure Standardkurve..... | 100 |
| Abbildung 100: Hyaluronsäure Stimulation - Kultur 36..... | 100 |
| Abbildung 101: Hyaluronsäure Stimulation - Kultur 39..... | 101 |
| Abbildung 102: Hyaluronsäure Stimulation - Kultur 35..... | 101 |
| Abbildung 103: Hyaluronsäure Stimulation - Kultur 78..... | 102 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Literaturvergleich - orbitale Fibroblasten in der Zellkultur, Fokus auf: Anlegen der Kultur, verwendetes Medium und Kulturbedingungen | 31 |
| Tabelle 2: Literaturvergleich - orbitale Fibroblasten in der Zellkultur, Fokus auf verwendete Passagen, Methode der Subkultivierung, Zellzahlen, Kulturgefäße | 37 |
| Tabelle 3: Literaturvergleich - orbitale Fibroblasten in der Zellkultur, Fokus auf Stimulation und Nebenfaktoren..... | 38 |
| Tabelle 4: Literaturvergleich - orbitale Fibroblasten in der Zellkultur, Fokus auf Differenzierung..... | 41 |
| Tabelle 5: Verwendetes Equipment | 42 |
| Tabelle 6: Basis - Labormaterialien..... | 43 |
| Tabelle 7: Weitere Reagenzien..... | 45 |
| Tabelle 8: Verwendete Medien | 46 |
| Tabelle 9: Übersicht - Verwendete Kulturgefäße..... | 47 |
| Tabelle 10: Versuchsplan für die Untersuchung des Einflusses der ausgewählten Faktoren auf die HA Sezernation | 69 |
| Tabelle 11: Wachstumsgeschwindigkeit in Basisplatten frischer Gewebeproben..... | 72 |
| Tabelle 12: Wachstumsgeschwindigkeit der Subkulturen..... | 73 |
| Tabelle 13: Wachstumsgeschwindigkeit in Basisplatten kryokonservierter Gewebeproben . | 74 |
| Tabelle 14: Mittlere Anwachsgeschwindigkeit - frisches gegen kryokonserviertes Gewebe . | 74 |
| Tabelle 15: Mittlere Anwachsgeschwindigkeit - frisches gegen kryokonserviertes Gewebe . | 75 |
| Tabelle 16: Kulturen bei welchen kein erfolgreiches Wachstum erreicht werden konnte | 77 |
| Tabelle 17: Trypsinprotokolle | 93 |
| Tabelle 18: Zellzahlen nach Mehrfachmessungen mit dem LunaFl und Trypanblau Färbung | 95 |
| Tabelle 19: Signifikanz der verglichenen Stoffwechselaktivitäten..... | 99 |
| Tabelle 20: Vergleich der Kultivierungsbedingungen | 105 |
| Tabelle 21: Datentabelle Abbildung 9 | 127 |
| Tabelle 22: Datentabelle Abbildung 11 | 127 |
| Tabelle 23: Datentabelle Abbildung 96 | 127 |
| Tabelle 24: Datentabelle Abbildung 97 | 128 |
| Tabelle 25: Deskriptive Daten der verwendeten Gewebeproben..... | 128 |

1. Einleitung

1.1. Etablierung einer Zellkultur

Seit den 1950er Jahren sind Zellkulturen Standard in der Zell- und Molekularbiologie sowie in der Biomedizin (1 S.1). Arbeiten mit Zellkulturen umfassen das Studium der Physiologie, Biochemie sowie von Vorgängen und Abläufen innerhalb einer Zelle und Reaktionen auf verschiedenste externe Stimuli. In der Medizin werden sie vielseitig in der Diagnostik, beispielsweise bei der Suche nach Mutationen oder Karzinogenese eingesetzt. Ein weiteres Anwendungsfeld ist das sogenannte *Tissue Engineering*. Dort ermöglichen sie das Züchten von Zellimplantaten, um Gewebeschäden, wie Verbrennungen, mit Hilfe von Hautzellen zu heilen (2).

In der Biotechnologie können mit Hilfe von genetisch veränderten Zellen rekombinante Proteine oder monoklonale Antikörper hergestellt werden. Etablierte *in vitro* Zytotoxizitätstests stellen mittlerweile sogar eine Alternative zu Tierversuchen dar (1 S.1). Auch wenn die *in vivo* Bedingungen bestmöglich in der Kultur nachempfunden werden, handelt es sich trotzdem um ein künstlich geschaffenes System. So kann sich das Verhalten der Zellen, herausgelöst aus ihrem oft heterogen zusammengesetzten Zellverband, deutlich von dem *in vivo* unterscheiden. Vor allem in Langzeitkulturen genetisch unveränderter Zellen mit hohen Zellteilungsraten kann es zu genetischen Veränderungen kommen, bei denen die Zellen spezifische Merkmale verlieren (1 S.154-60).

Bei den in dieser Arbeit etablierten Zellen handelt es sich um Primärzellen orbitaler Fibroblasten. Primärzellen sind Zellen, welche direkt und unverändert von *in vivo* in Kultur gebracht werden (1 S.151). Durch die extreme Veränderung ihrer Lebensbedingungen sind Primärzellkulturen besonders empfindlich.

Ziel der Etablierung dieser Primärzellkultur war es stabil wachsende Kulturen zu erarbeiten, mit welchen unter gleichbleibenden Bedingungen reproduzierbare Versuche durchgeführt werden können. Dafür ist es notwendig die Bedingungen an die jeweilige Zellart anzupassen, da inadäquate Lebensbedingungen schneller zum Altern und Sterben der Zellen führen. Anpassen der Bedingungen beginnt bei Erhalt und Verarbeitung des Gewebes, aus welchem die Zellen in Kultur gebracht werden, und betrifft im weiteren Verlauf alle Schritte wie beispielsweise Subkultivierung oder Kryokonservierung. Während dieses Prozesses wurden Wachstum und Morphologie der Kultur dokumentiert, um bei etwaigem Abweichen von der Norm direkt eingreifen zu können.

Es sollte bestimmt werden, ob kryokonserviertes Gewebe ebenso gut für die Durchführung von Versuchen geeignet ist wie Gewebe, welches direkt nach der operativen Entnahme kultiviert wird. Des Weiteren wurde untersucht, wie häufig die Zellen passagiert werden können, bevor sie nicht mehr für Versuche geeignet sind. Außerdem sollte überprüft werden, ob die Zellkulturen ohne Qualitätsverlust kryokonserviert werden können. Abschließend sollte evaluiert werden, ob sich die Zellen stimulieren lassen und welche Versuchsbedingungen für Stimulationsversuche am besten geeignet sind.

Neben den oben genannten Einsatzmöglichkeiten von Zellkulturen ist es auch möglich Zellen zu kultivieren, welche als ausschlaggebend für die Entstehung einer Erkrankung identifiziert wurden. Anschließend können mit Hilfe dieser Zellkulturen wichtige Einblicke in die Pathogenese der jeweiligen Erkrankung gewonnen werden. Dies ist essenziell, um potenzielle therapeutische Ansätze entwickeln zu können.

Die in dieser Arbeit etablierten orbitalen Fibroblasten wurden bereits als die Schlüsselzellen der sogenannten Endokrinen Orbitopathie identifiziert (3, 4). Auch wenn die Pathogenese der Erkrankung noch nicht vollständig aufgeklärt wurde, konnten mit Hilfe von Kulturen dieser Zellen bereits wichtige Informationen gewonnen werden (3, 5).

Für das weitere Verständnis ist die Etablierung der Zellkultur im Labor für Schilddrüsen- und Stoffwechselerkrankungen am Universitätsklinikum Mainz ein wichtiger Faktor. Gegebenenfalls könnte es möglich sein, mit Hilfe dieser Zellen ein Bioassay zu generieren, bei welchem nicht nur die Stimulanz, sondern auch die zu stimulierenden Zellen variabel untersuchbare Faktoren wären. So können möglicherweise vergleichbar zu einem Thyreotropinrezeptor Immunglobulin Stimulationsbioassay (TSI Bioassay) Prognosen bezüglich des Krankheitsverlaufs gemacht werden (6, 7).

1.2. Orbitale Fibroblasten

Bei Fibroblasten handelt es sich um spezifische ortsständige Zellen des Bindegewebes. Sie sind mitunter am Stoffwechsel extrazellulärer Matrixbestandteile beteiligt. Morphologisch ist ein gestreckter Zelleib mit langen Ausläufern typisch (8). Fibroblasten galten lange als ubiquitäre, ausdifferenzierte, inaktive Bindegewebszellen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sie in unterschiedlichen Geweben im Körper unterschiedliche Stoffwechseleigenschaften aufweisen (9, 10).

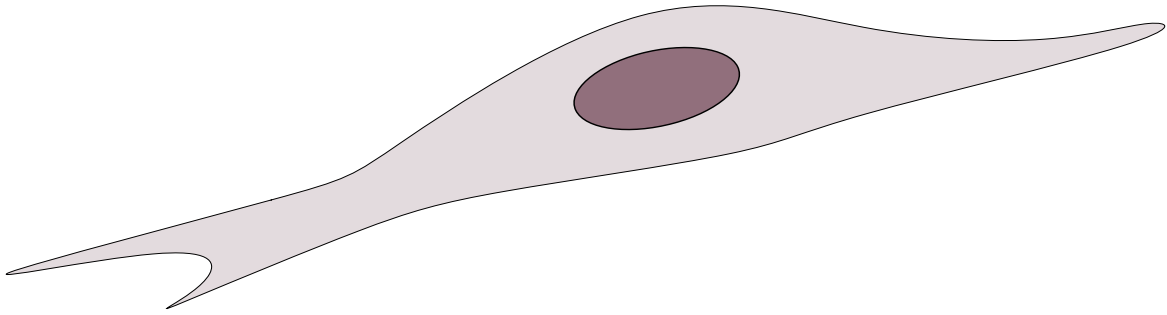


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Fibroblasten

Besonders orbitale Fibroblasten sind in der Lage charakteristische Abläufe der Adipogenese, Chondrogenese, sowie Myogenese zu durchlaufen, wodurch sie Kriterien von mesenchymalen Stammzellen erfüllen (11, 12).

Die verwendeten orbitalen Fibroblasten befinden sich im retro- sowie periorbitalen Binde- und Fettgewebe. Dieses Gewebe wurde während Operationen der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz gewonnen. Das Gewebe beider Kollektive (Patientenkollektiv & Kontrollkollektiv) wurde im Rahmen von funktionellen oder plastischen Operationen gewonnen.

Orbitale Fibroblasten von Patienten, welche an einer Endokrinen Orbitopathie (siehe Kapitel 2) leiden stellen das Patientenkollektiv dar. Gewebe wurde hier primär bei Dekompressionsoperationen oder bei Lidkorrekturen gewonnen. Im Rahmen der Erkrankung kann es durch neu entstandenes und ödematos geschwollenes Fettgewebe hinter dem Bulbus zu funktionellen und kosmetisch-ästhetischen Einschränkungen kommen. Entlastung bzw. kosmetische Rehabilitation kann durch Dekompressionsoperationen mittels Fettgewebsresektion und Reduktion der knöchernen Begrenzung der Orbita erreicht werden.

Kontrollgewebe entstand meist bei plastischen Eingriffen wie Xanthelasma, Blepharoplastiken oder Ptosis Operationen. Diese Patienten litten nicht unter einer Endokrinen Orbitopathie.

Fettgewebe im oberen Augenlid wird durch die Sehne des Musculus obliquus superior in nasal und zentral gelegene Fettdepots geteilt. Weiß erscheinendes nasales Fettgewebe ebenso wie das Fettgewebe welches bei Dekompression (intrakonal) entfernt wird stammt von der Neuralleiste ab. Während gelblichere zentrale Fettdepots von mesodermaler Herkunft sind (13, 14). Kontrollgewebe sollte dementsprechend von nasalen Depots stammen. Nach Erhalt wird das Gewebe mechanisch und enzymatisch präpariert und eine Zellkultur angelegt.

2. Literaturdiskussion

2.1. Endokrine Orbitopathie

2.1.1. Allgemeines

Bei der Endokrinen Orbitopathie (EO) handelt es sich um die häufigste extrathyreoidale Manifestation des Morbus Basedow (3). Der Morbus Basedow ist eine Autoimmunerkrankung, bei welcher Autoantikörper den Thyrotropin Rezeptor der Schilddrüse überstimulieren und es so in der Folge zu einer Schilddrüsenüberfunktion kommt. Selten tritt die EO auch in Verbindung mit einer Hashimoto-Thyreoiditis (15, 16) oder bei euthyreoter Stoffwechsellage auf (17). In Europa zeigt sich eine Prävalenz von 10/10.000 Patienten mit EO (18).

Im Laufe der Erkrankung kommt es zu einer entzündlichen Veränderung des retro- sowie periorbitalen Gewebes. Retroorbitale Fibroblasten produzieren große Mengen an Glykosaminoglykanen (GAGs). Hierbei handelt es sich um Extrazellulärmatrixbestandteile aus repetitiven Disacchariden verbunden mit einer Uronsäure sowie einem Aminozucker (8). Diese sind in der Lage große Mengen an Wasser zu binden. Hyaluronsäure (HA) ist hierbei das am häufigsten produzierte GAG.

Die so entstehende Gewebeswellung, verbunden mit einer Neubildung von Fettgewebe und Anschwellen der externen Augenmuskeln führt zu einer kritischen Gewebeerweiterung innerhalb der mit Knochen begrenzten Orbita (5).

Die Symptome der Erkrankung ergeben sich aus den Folgen der Gewebeerweiterung. Durch die knöchernen Begrenzung kann der Druck nur nach ventral ausgeglichen werden und es kommt zum Exophthalmus. Verbunden mit einer auftretenden Lidretraktion kann es zum unvollständigen Lidschluss und zu Konjunktividen, Hornhautdefekten und lokalen Infektionen kommen. Die Patienten leiden unter Schmerzen, Lichtempfindlichkeit, Augentränen, Druckgefühl hinter dem Auge und Fremdkörpergefühl (19). Entzündliche und fibrotische Veränderungen der Augenmuskeln führen zu Motilitätseinschränkungen und zum Auftreten von Doppelbildern (5)



Abbildung 2: Darstellung der Symptome der Endokrinen Orbitopathie: Lidretraktion, Lidödeme, entzündlich geschwollene Karunkula

In 2 % der Fälle entwickeln Patienten eine schwere Form der EO (20) hierbei kann es im schlimmsten Fall durch den unvollständigen Lidschluss zur Expositionskeratopathie kommen oder durch den hohen Druck zur Kompressionsneuropathie (21). In beiden Fällen kann dies zu einem Verlust der Sehkraft führen. Hinzu kommt die psychische Belastung durch verändertes Aussehen und ggf. reduzierter Sehfähigkeit. Es kann zu eingeschränkter Erwerbstätigkeit sowie Bedarf an Psychotherapie kommen (22).

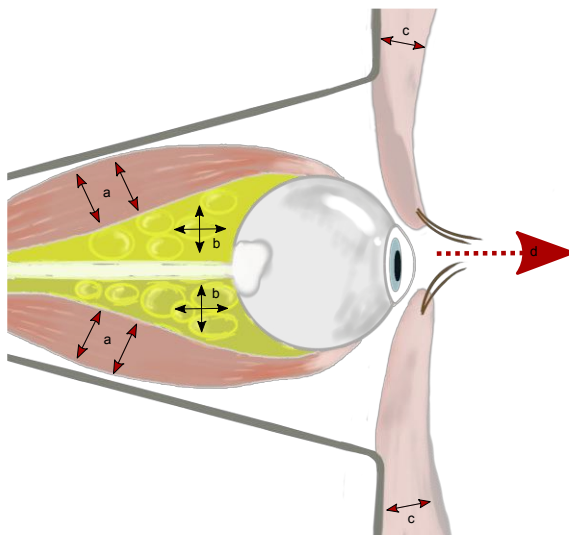


Abbildung 3: Entwicklung der Symptome der Endokrinen Orbitopathie: (a) Muskelverdickung durch Einlagerung von Glykosaminoglykanen, wie der Hyaluronsäure, zwischen die Muskelfasern (b) Zuwachs des Fettgewebes durch de novo Adipogenese sowie wasserbindende Hyaluronsäure

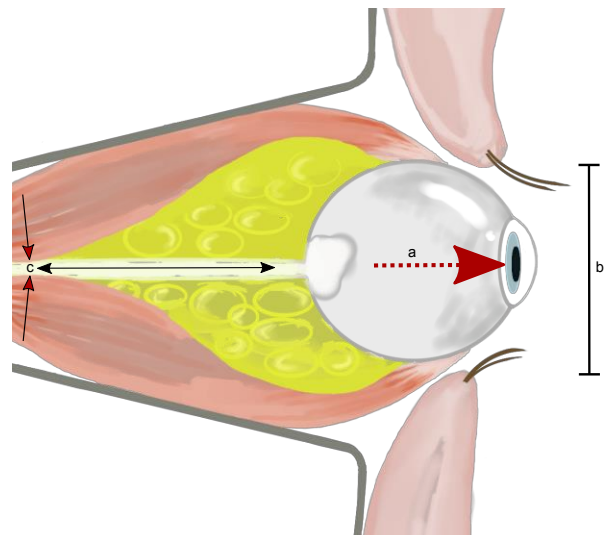


Abbildung 4: Symptome der Endokrinen Orbitopathie: (a) Prolaps des Bulbus (b) Insuffizienter Lidschluss durch Retraktion der Lider sowie Protusio des Bulbus (c) Kompression des Sehnervs durch verdickte Muskulatur sowie Zug am Nerv durch Exophthalmus

2.1.2. Pathogenese der Endokrinen Orbitopathie

Grundsätzlich stehen im Mittelpunkt der Pathogenese die Differenzierung von Fibroblasten zu Fettzellen, sowie deren Produktion großer Mengen an HA. Die hohe Wasserbindungskapazität von HA führt zu ödematösen Schwellungen. Ebenso kommt es zur GAG Einlagerung zwischen den Fasern der äußeren Augenmuskeln, wodurch diese anschwellen und an Beweglichkeit verlieren (23).

Auch wenn die Pathogenese der EO noch nicht gänzlich verstanden ist, haben Studien ihren Fokus zu Beginn auf den TSH-Rezeptor (TSHR) als Autoantigen gesetzt.

Der zeitliche Zusammenhang zwischen einer Erkrankung mit EO und Morbus Basedow legt die Vermutung nahe, dass für beide Erkrankungen derselbe Auslösefaktor verantwortlich ist. Die für Morbus Basedow verantwortlichen TSHR Autoantikörper können bei nahezu allen Patienten mit EO nachgewiesen werden (24).

Es konnte weiterhin eine Korrelation zwischen Aktivität sowie Prognose der EO und der TSHR Autoantikörper Level, im Serum von Patienten festgestellt werden (25, 26).

Auch wenn der TSHR ebenso in gesundem Gewebe nachgewiesen werden konnte (27) zeigen Studien, dass orbitales Gewebe von EO Patienten, vor allem solcher mit klinisch aktiver Erkrankung, deutlich erhöhte TSHR Expressionen aufweisen (28, 29).

Höchste Evidenz liefert ein EO Tiermodell, hier konnte mittels Elektroporation ein Plasmid mit einer TSHR A Untereinheit *in vivo* in Mäuse implantiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Mäuse anschließend Symptome einer EO entwickelten.

Ebenso konnten TSHR- und *Insulin like Growth Faktor 1* Rezeptor (IGF-1-R) Antikörper nachgewiesen werden (30).

Der IGF-1R hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung in der Forschung gewonnen. Vermehrt noch, seit dem Teprotumumab, ein monoklonaler Antikörper des IGF-1R, welcher den Rezeptor vollständig blockiert, in klinischen Studien deutliche Ergebnisse zeigt. Es wurden Reduktion der Proptosis, der Doppelbilder und klinischer Aktivität der EO gezeigt (31).

Ebenso wie der TSHR wird auch der IGF-1R vermehrt in Orbita Gewebe von EO Patienten exprimiert (32). Es konnte gezeigt werden, dass Signalkaskaden der beiden Rezeptoren überlappen und das beide zusammen funktionell die orbitalen Fibroblasten beeinflussen können (33) (siehe: Abbildung 5)

Auch wenn nachgewiesen werden konnte, dass IGF-1 in orbitalen Fibroblasten zur HA Produktion führt (33), konnte nicht sicher gezeigt werden, dass IGF-1R Antikörper immer im Serum von Patienten enthalten sind und ob diese den IGF-1R aktivieren (34, 35).

Studien legen die Vermutung nahe, dass Immunglobuline von Patienten mit EO den TSHR aktivieren und es über einen Synergismus der beiden Rezeptoren zur Aktivierung der IGF-1R Signalkaskaden kommt (36).

Im Gegensatz zum verantwortlichen Autoantigen gilt die Rolle der orbitalen Fibroblasten als Zielzellen der Erkrankung als gesichert (3, 4, 37). Unklar bleibt, wie es zum Verlust der Selbsttoleranz kommt.

Eine Theorie vermutet, dass die TSHR A Untereinheit bei Spaltung des Rezeptors von T-Zellen erkannt wird und es so zu einer Aktivierung der Immunzellen kommt.

Im retroorbitalen Gewebe findet sich eine diffuse Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen, Plasma- sowie B-Zellen (38, 39). B-Zellen scheinen eher zu Beginn der Erkrankung eine wichtige Rolle zu spielen. Frühe Therapie mit Rituximab, einem monoklonalen Antikörper des CD20 Membranoberflächen Proteins von B-Zellen, zeigte in einer Studie einen deutlichen positiven Effekt (40). Eine weitere Studie hierzu konnte jedoch keinen Effekt nachweisen (41).

T-Zellen sind zusätzlich in der Lage direkt mit den orbitalen Fibroblasten in Kontakt zu treten. Mit ihrem CD40 Liganden bilden sie mit dem von orbitalen Fibroblasten exprimierten CD40 Rezeptor sogenannte CD40-CD40L Brücken und aktivieren diese darüber. Es kommt zur Proliferation (4) und Produktion proinflammatorischer Zytokine (Beispielsweise: Interleukin(IL)-8, IL-6 (42) und IL-1 (43)). Aktivierung der T-Zellen sowie die Zytokinproduktion resultieren in einer erhöhten Produktion von HA (43) sowie Rekrutierung weiterer Immunzellen (44).

HA wird von drei membrangebundenen Synthetasen (HAS-1, HAS-2, HAS-3) produziert (45). Während HAS-3 zumeist konstitutiv aktiv ist konnte gezeigt werden, dass die Expression von HAS-1 und HAS-2 durch Aktivierung des TSHR mit anschließendem Anstieg des cAMP-Spiegels steigt (46).

In der Vielfältigkeit der Pathogenese stellen Anstieg des cAMP Spiegels durch TSHR Stimulation sowie HA Sekretion relativ sichere Marker für eine Aktivierung der orbitalen Fibroblasten dar. Dadurch sind beide Parameter geeignet, um die Aktivierung der Fibroblasten in Assays zu messen. Da Immunglobuline von EO Patienten nicht nur stimulierende Antikörper aufweisen (47, 48) hat sich die Verwendung von M22 als sichere Stimulanz etabliert. Bei M22 handelt es sich um einen humanen monoklonalen Antikörper (Mak), welcher hohe Affinität zum TSHR aufweist (49).

Aufgrund der hohen Potenz des Antikörpers muss beachtet werden, dass erfolgreiche Stimulation von orbitalen Fibroblasten mit Hilfe des Antikörpers ggf. nicht der physiologischen Stimulation mit EO Antikörpern entspricht.

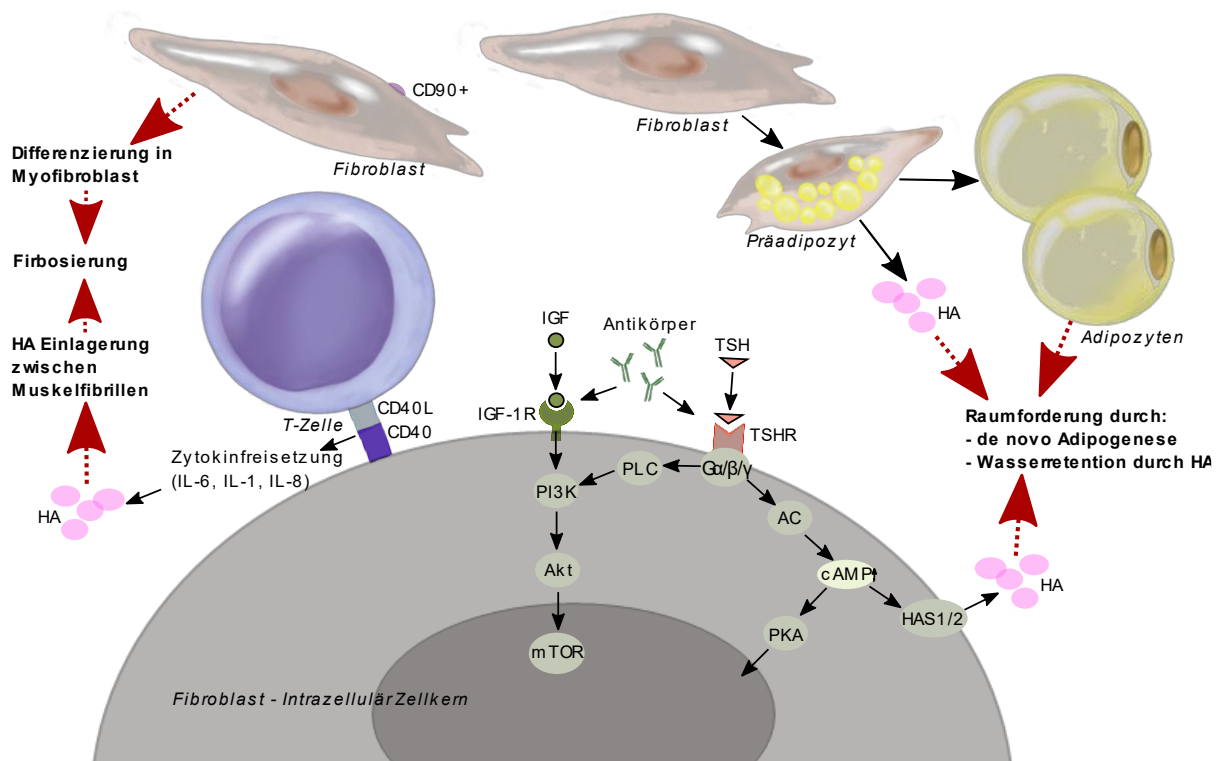


Abbildung 5: Pathogenese der Endokrinen Orbitopathie

Die Abbildung zeigt die Differenzierung der CD90+/- Fibroblasten in Myofibroblasten oder Präadipozyten. Weiterhin die Differenzierung zu reifen Fettzellen und Produktion von Hyaluronsäure (HA) durch Fibroblasten sowie Präadipozyten. HA wird durch die membranständigen, cAMP induzierbaren Hyaluronsynthetasen (HAS) 1 und 2 hergestellt. Stimulation des TSHR durch TSH oder Autoantikörper führt zur Aktivierung der Adenylylcyclase (AC). Es kommt zum cAMP Anstieg und Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Diese führt im Zellkern zur Transkription von proadipogenen Faktoren. Eine weitere Signalkaskade führt über Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Im Folgenden überlappen sich die Signalkaskaden des TSHR und IGF-1R. Es kommt zur Aktivierung der Phosphoinosid-3-Kinase (PI3K), anschließend Aktivierung der Proteinkinase B (Akt). Diese aktiviert wiederum mTOR. Bei mTOR handelt es sich um einen Bestandteil eines Proteinkomplexes, welcher verschiedene Signalwege wie Zellwachstum und Zellzyklus reguliert. Die Bildung von CD40-CD40L Brücken führt zur Ausschüttung von Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-8), dies führt ebenso zu einer erhöhten Produktion von Hyaluronsäure.

2.1.3. Aktueller Stand der Therapie bei Endokriner Orbitopathie

Die Therapie der Patienten erfolgt je nach Schwere und Aktivität der Erkrankung. Einstufung erfolgt nach Kriterien festgelegt durch die *European Group of Graves' Orbitopathy* (EUGOGO) in geringgradig, moderat bis schwer und Sehkraft-gefährdend (50). Innerhalb dieser Gruppen wird mit Hilfe des *Clinical Activity Scores* (CAS) (51) weiter zwischen aktiver und inaktiver Erkrankung unterschieden. Bei beiden Einteilungen muss immer der persönliche Leidensdruck des Patienten mit beachtet und ggf. die Therapie angepasst werden (52).

Generell steht das Erreichen einer euthyreoten Stoffwechsellage sowie bei Rauchern das Einstellen des Nikotinkonsums im Vordergrund. Es wurden schwerere Krankheitsverläufe und schlechteres Ansprechen auf Therapie bei Rauchern festgestellt (53, 54).

Bei geringgradiger EO erfolgt die Therapie weitgehend symptomatisch mit Hilfe von Tränenersatzmitteln, sowie Prismenfolien bei leichten Doppelbildern oder Sonnenbrillen bei Photophobie (3). Ebenso konnte der Gabe von Selen ein positiver Effekt nachgewiesen werden (55).

Schwere aktive Verläufe werden aktuell zumeist immunsuppressiv mit Glukokortikoiden behandelt. Etabliert hat sich die intravenöse Injektion als Therapie der Wahl (56). Weitere Therapieoptionen bestehen in Bestrahlung der Orbita oder Verwendung neuerer Therapieansätze wie beispielsweise Teprotumumab oder Retuximab.

Zeigt bei drohender Optikusneuropathie eine hochdosierte intravenöse Gabe von Glukokortikoiden in 1-2 Wochen keine Verbesserung muss chirurgisch dekomprimiert werden (50). Im Normalfall wird chirurgisch rehabilitativ therapiert, wenn bei inaktiver EO residuelle funktionelle oder kosmetisch-ästhetische Beschwerden vorliegen (57).

Trotz des aktuellen Forschungsstandes ist die Therapie der EO immer noch weitgehend symptomatisch und nicht kausal. Neue Erkenntnisse der Pathogenese liefern zahlreiche neue Ansatzpunkte für potenzielle Therapeutika. Deren Wirksamkeit muss nun in weiteren klinischen Studien ermittelt werden.

2.2. Zellkulturen

2.2.1. Allgemeines

Transferiert man tierische oder humane Zellen aus dem Organismus (*in vivo*) in eine Kultur außerhalb eines biologischen Organismus so spricht man von „Zellkulturen“. Diese *In vitro* gehaltenen Zellpopulationen können unter geeigneten Bedingungen über längere Zeiträume kultiviert werden und finden mittlerweile vielfältige Verwendung in unterschiedlichsten Gebieten (1 S.1).

Grundsätzlich werden zeitlich begrenzt kultivierbare Zellkulturen (finite Zellkulturen) von zeitlich unbegrenzt kultivierbaren Kulturen (permanente Zelllinien) unterschieden (58). Diese permanenten Zelllinien entstehen zumeist aus immortalisierten, transformierten Zellen. Auch wenn die Zellen dadurch meist prägnante Eigenschaften verlieren eignen sie sich deutlich besser für lang andauernde Studien oder exakt reproduzierbare Versuche (59 S.32). Auch eine wiederholt geteilte Primärkultur wird als Zelllinie bezeichnet (58), auch wenn der Begriff Zelllinie eigentlich für immortalisierte, transformierte Zellen steht.

Abgesehen von der variablen Lebensdauer lassen sich Zellkulturen auch anhand ihres Wachstums unterscheiden. Sogenannte Monolayerkulturen benötigen zum Wachstum Adhärenz am Boden ihres Kulturgefäßes. Monolayerkulturen proliferieren, bis das Kulturgefäß in einer Schicht konfluent bewachsen ist, dann tritt die sogenannte Kontaktinhibition ein und es kommt zum Wachstumsstopp der Zellen. Das Gegenteil stellt die Gruppe der Suspensionskulturen dar, hier wachsen die Zellen freischwimmend im Medium. Meist lässt sich vom Ursprungsort der Zellen auf die Kulturform schließen (60). So wachsen Zellen des blutbildenden Systems in Suspension während Zellen in Gewebsverbänden wie die in dieser Arbeit untersuchten orbitalen Fibroblasten eine Monolayerkultur bilden (60).

2.2.2. Primärzellkulturen

Werden Kulturen aus Körperflüssigkeiten oder Gewebeproben angelegt, welche direkt und unverändert von *in vivo* in Kultur gebracht werden, spricht man von sogenannten „Primärzellkulturen“. Durch die enorme Veränderung ihrer Lebensbedingungen sind diese Zellen besonders empfindlich (1 S.150).

Das in Kultur geforderte Wachsen und Teilen der unveränderten Zellen führt im Laufe der Kultivierung vergleichsweise schnell zum Altern (Seneszenz) und schließlich zum Sterben der Zellen (61).

Inadäquate Kulturbedingungen beschleunigen diese Vorgänge. Auch wenn dies einen Nachteil gegenüber permanenten Zelllinien darstellt, sind sie aufgrund der nahezu unveränderten Eigenschaften der Zellen besser für Forschungszwecke geeignet (59 S.32).

Um eine Primärzellkultur anzulegen, müssen die Zellen aus dem Gewebe beziehungsweise der Flüssigkeit herausgelöst werden. Alternativ kann das gesamte Gewebeexplantat in ein Kulturgefäß gebracht werden. Hierbei wachsen die Zellen aus den Rändern des Explantats heraus. Allerdings ist die Ausbeute an Zellen so wesentlich geringer. Aufgrund der Empfindlichkeit von Primärzellen sind Methoden, bei denen zum Anlegen der Kultur viele Zellen genutzt werden erfolgreicher. Dies kann erreicht werden, indem das Gewebestück entweder mechanisch zerkleinert oder die Extrazellulärmatrix enzymatisch angedaut wird (62 S.207-9).

2.2.3. Kulturbedingungen

Ein Abschneiden der Zelle von ihrer physiologischen Umgebung und somit Versorgung durch Nährstoffe, Wachstums- oder Differenzierungsstimuli, stellt einen der essenziellen Vorteile der Zellkultur dar. Versuchs- und Wachstumsbedingungen können individuell für die jeweilige Kultur erstellt werden. Gleichzeitig stellt dies einen Nachteil dar, denn auch wenn alle Bedingungen so physiologisch wie möglich nachempfunden werden entsprechen sie nicht denen im Körper (62 S.11).

Gerätschaften wie der Inkubator sorgen für konstante Temperatur, Luftfeuchte sowie Oxygenierung. Vor allem Säugerzellen reagieren empfindlich auf Temperaturschwankungen sowie Schwankungen im CO₂ Gehalt der Atmosphäre. Die im Inkubator eingestellte CO₂ Konzentration steht im Austausch mit den im Wachstumsmedium enthaltenen Puffersystemen und ist somit bei Einstellung und Erhalt des pH-Wertes maßgeblich beteiligt (63). Die Wasserdampfsättigung sorgt dafür, dass auch bei langer Inkubation im Inkubator kein Nährmedium verdunstet. Dies würde zu einer Veränderung der Osmolarität führen und könnte zu Beeinträchtigung des Zellwachstums, wenn nicht sogar Absterben der Zellen führen (1 S.9).

Neben dem Inkubator ist vor allem das Nährmedium für das Imitieren der *in vitro* Lebensbedingungen der Zellen verantwortlich. Es müssen Osmolarität, pH-Wert und die Versorgung mit essenziellen Nährstoffen bestmöglich simuliert werden.

Zu sogenannten „Standardmedien“ wie beispielsweise dem *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) (64) können individuell an die Bedürfnisse der Zellen oder die Anforderungen eines Versuchs angepasst, einzelne Zusatzstoffe hinzugefügt werden. Standardmedien bestehen aus isoton gepufferten Salzlösungen mit anorganischen Salzen, sowie Aminosäuren, Vitaminen, Nährstoffen und Spurenelementen (60).

Bei den wichtigsten Energiequellen handelt es sich um Glucose, Pyruvat und Glutamin. Je nach Bedarf können unterschiedliche Medien zum Einsatz kommen. Es wird unterschieden zwischen Kulturmedien welche nur ein unmittelbares Überleben, ein verlängertes Weiterleben oder unbegrenztes Wachstum und Proliferation ermöglichen sollen (1 S.68).

Grundsätzlich wird zwischen serumfreien und serumhaltigen Medien unterschieden, wobei am häufigsten fetales bovines Serum (FBS) verwendet wird. Da es eine Vielzahl von Aminosäuren, Vitaminen, Hormonen, Adhäsions- sowie Wachstumsfaktoren enthält, ist es ein hervorragender Zusatz für Nährmedien (60). Besonders empfindliche Primärzellen profitieren von den enthaltenen Adhäsionsfaktoren bereits beim Anwachsen. Sind die Wachstumsbedingungen eindeutig definiert, wie beispielsweise beim Herstellen therapeutischer Proteine muss in der jeweiligen Kultur auf den Zusatz von Serum verzichtet werden, da bis heute nicht alle Inhaltsstoffe eindeutig definiert sind (60). Da einige Zusätze nicht über einen längeren Zeitraum stabil sind, sollte ein komplexes Vollmedium nach Komplementierung nicht länger als sechs Wochen bei 4 °C gelagert werden (1 S.95)

Ebenso verhält es sich mit Antibiotika, welche meist prophylaktisch einer Kultur hinzugefügt werden. Da Antibiotika bei Inkubationstemperaturen um 37 °C nach 3-4 Tagen zerfallen wird ein regelmäßiger Mediumwechsel empfohlen. Zur Vermeidung rascher Resistenzbildungen sollte eine ausreichend hohe Dosierung gewählt werden, wobei zu hohe Dosierungen wiederum toxisch auf die Zellen wirken (59 S.37).

Eine Kombination aus Dihydrostreptomycinsulfat und Penicillin-G-Natrium gegen grampositive sowie gramnegative Bakterien hat sich als üblicher Zusatz etabliert und bleibt in Lösung ca. drei Tage stabil. Als Alternative oder Erweiterung wird meist auf Gentamycin zurückgegriffen, welches fünf Tage stabil bleibt und dessen Spektrum grampositiv sowie gramnegative Bakterien enthält (1 S.25, 65).

Um eine Kontamination mit Pilzen zu vermeiden wird auf Amphotericin zurückgegriffen (1 S.25). Jeglicher Einsatz zuvor erwähnter Zusätze darf nicht dazu führen, dass die erforderliche Steriltechnik vernachlässigt wird.

Je nach Stoffwechselaktivität, Proliferation der Zellen und Nährstoffgehalt des Mediums muss dieses nach angemessener Zeit gewechselt werden.

Der Zeitpunkt kann mit Hilfe des jedem Medium zugesetzten Farbindikators Phenolrot festgestellt werden. Ein Farbumschlag von rot zu orange oder gelb zeigt an, dass der pH-Wert in den sauren Bereich gefallen ist.

Bei Suspensionskulturen wird für einen Mediumwechsel ein Teil der Kultur in ein neues Gefäß gegeben und anschließend neues Medium in beide Gefäße hinzugegeben. Bei adhärennten Kulturen wird das Medium mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Neues Medium sollte vorgewärmt und idealerweise bereits im Inkubator durch CO₂ Begasung den gewünschten pH-Wert erreichen (62 S.241-43).

2.2.4. Kontamination

Trotz oben genannter Zusätze kann es zu einer Kontamination mit Bakterien und Pilzen kommen. Virusinfektionen sind sehr selten, weshalb üblicherweise keine Vorkehrungen bezüglich dieser getroffen werden. Bakterielle Kontaminationen führen zu einem raschen Abfall des pH-Werts mit Farbumschlag des Indikators und zu einer deutlichen Trübung des Mediums. Ist eine Kultur betroffen, kann aufwändig mit alternativen Antibiotika und Fungiziden versucht werden diese zu erhalten. Die sicherste Methode bleibt jedoch das Verwerfen der betroffenen Kulturen (62 S.294-303).

Schwieriger festzustellen ist eine Kreuzkontamination oder ein Befall mit Mykoplasmen. Beim Etablieren einer Kultur im Labor sollte deswegen darauf geachtet werden beides weitestgehend zu verhindern und ein entsprechendes Qualitätsmanagement einzuführen.

Bei Mykoplasmen handelt es sich um 0,2-2 µm große Prokaryoten. Durch ihre geringe Größe sind sie in der Lage Sterilfilter mit Porengrößen um 0,2 µm zu passieren (66). Erst neuere Sterilfilter mit Größen um 0,1 µm trennen Mykoplasmen sicher ab. Für proteinhaltige Lösungen wie Serum sind diese Filtergrößen jedoch zu gering.

Häufigste Quelle für Mykoplasmen sind Trypsin-, Serumlösungen oder andere Kulturen (1 S.27). Ersetzen der Lösungen, sofern möglich, oder steril filtrieren bildet somit als präventive Maßnahme die wohl beste Möglichkeit.

Mykoplasmen wachsen parasitär auf den Zelloberflächen, dies zeigt nicht immer eine Auswirkung auf die Kultur. Durch den bakterieneigenen Stoffwechsel kann es trotzdem zu veränderten Versuchsergebnissen kommen (1 S.27-37, 66).

Da sie unter dem Lichtmikroskop schwer und erst spät zu erkennen sind (typisch: weniger adhärentes Wachstum, abgerundete Morphologie), muss auf Nachweis Tests zurückgegriffen werden.

Mit Hilfe von Fluoreszenzfärbung, ELISA oder PCR Verfahren kann die Mykoplasmen DNA oder spezifische Enzyme nachgewiesen werden (1 S.28-35, 67).

Bei der Kreuzkontamination gelangen Zellen einer fremden Kultur in ein Kulturgefäß eines anderen Individuums. Sollte eine Kreuzkontamination nicht rechtzeitig bemerkt werden kann es sein, dass Versuche mit falschen Zellen durchgeführt werden (68). Diese Art von Kontamination findet sich eher bei schnell proliferierenden Zelllinien.

2.2.5. Kulturgefäße

Adhärenz wachsende Kulturen benötigen eine Haftung am Kulturgefäßboden. Prinzipiell kann auf Glas, Metall und Kunststoff gezüchtet werden. Aufgrund guter optischer Eigenschaften und Entsorgungsmöglichkeiten wird fast ausschließlich Kunststoff, meist Polystyrol verwendet. (1 S.53-54).

Die hydrophobe Oberfläche wird entweder durch den Hersteller verändert oder kann bei Bedarf im Labor beschichtet werden. Zum Beschichten eignen sich Bestandteile der Extrazellulärmatrix, wie Kollagene, Fibronectin oder basische Aminosäure-Polymere welche eine positive Oberflächenladung erzeugen (69).

Bei physiologischem pH-Wert von 7,2-7,4 tragen die Zellen an ihrer Oberfläche negative Ladungen. Um ein Metabolisieren und Verschieben des Aminosäure Gleichgewichts zu verhindern, werden vor allem D-Aminosäure Polymere verwendet (62 S.112). Durch eine Beschichtung des Kulturgefäßbodens kann bereits zu Beginn die Anhaftung der Zellen und somit das Anwachsen der Kultur deutlich verbessert werden. Haften direkt mehr Zellen am Kulturgefäßboden kann sich die Kultur schneller entwickeln.

Kulturgefäße werden in verschiedenen Größen und Formen verwendet. Standard sind Zellkulturflaschen mit größeren Volumina und gaspermeablen Verschlüssen sowie Multiwell Platten mit mehreren Vertiefungen pro Platte (6,12,24,48 oder 96) oder Petrischalen mit beliebigen Durchmessern (1 S.58-9).

2.2.6. Subkultivierung

Nach dem Anwachsen durchlaufen Zellkulturen unterschiedliche Stadien. In der Anlaufphase (lag-Phase) müssen sich die Zellen an die neuen Kulturbedingungen anpassen. Anschließend kommt es in der exponentiellen Phase (log-Phase) zum Teilen in regelmäßigen Abständen. Zum Ende geht die Kultur in die Stationäre Phase (Plateau Phase) über (64). Hier bleibt die Zellzahl konstant da die Zellen in die Ruhephase des Zellzyklus übergehen.

Um eine Kontaktinhibition mit Eintreten der Ruhephase zu vermeiden, sollte in der späten log-Phase bei 70-80 % Konfluenz eine Subkultur erstellt werden. Hierbei werden die Zellen auf neue Kulturgefäße aufgeteilt (59 S. 38)

Während bei Suspensionskulturen das Medium mit den darin enthaltenen Zellen auf neue Kulturgefäße aufgeteilt wird, müssen adhärenente Kulturen zunächst von ihrem Untergrund gelöst werden.

Standard bei adhärenenten Kulturen ist das Ablösen mit Hilfe von Enzymen wie Trypsin, Accutase oder Kollagenase, wobei sich diese in ihrer Wirksamkeit aber auch ihrer Zellschädigung unterscheiden (62 S.146). Bei dem am häufigsten verwendeten Trypsin handelt es sich um eine Protease mit einem Wirkmaximum bei 37 °C und 7,5-8,5 pH (59 S.38)

Da viele Zell-Matrix Kontakte, zwischen Zelle und Gefäßboden über Kalzium Ionen verbunden sind, reicht bei leicht adhärenenten Kulturen auch eine Inkubation mit EDTA, welches als Komplexbildner die Kalzium Ionen umschließt.

Jede Behandlung mit den oben genannten Enzymen schädigt auch die Zellen und deren extrazelluläre Domänen. Deswegen sollten eine möglichst geringe Konzentration und Inkubationszeit gewählt werden. Allgemein wird Trypsin in Konzentrationen von 0,1-0,25 % ohne EDTA und 0,025-0,1 % mit EDTA bei Einwirkzeiten von 2-10 Minuten je nach Zellkultur verwendet (59 S.38). Konzentration und Einwirkzeit sollten individuell auf die jeweiligen Zellen abgestimmt werden.

Die Trypsinreaktion kann durch die Zugabe von Serum und den darin enthaltenen Proteasehemmern gestoppt werden. Reste von Serum im Wachstumsmedium müssen deshalb vor dem Trypsinisieren mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) restlos entfernt werden. Bei serumfreien Kulturen wird auf den gezielten Einsatz von Trypsininhibitoren zurückgegriffen (1 S.116).

Bei jeder Subkultivierung sollte darauf geachtet werden, dass beim Ablösevorgang alle Zellen restlos abgelöst werden, um ein selektieren von schlecht haftenden Zellen zu vermeiden (1 S.115).

2.2.7. Benötigtes Equipment

Unentbehrlich für das Arbeiten mit Zellkulturen ist ein mit Wasserdampf gesättigter Inkubator, bei welchem Temperatur und CO₂ Begasung individuell eingestellt werden können (64).

Um die Zellkulturen vor Kontaminationen zu bewahren sollten trotz Antibiotikazusatz stets alle Arbeitsschritte unter einer Sterilbank durchgeführt werden. Die speziellen Belüftungsmechanismen schützen die Kultur sowie die an ihr arbeitende Person vor Mikroorganismen, Stäuben und Aerosolen (66).

Ein weiteres Standardgerät im Zellkulturlabor ist die Zentrifuge. Sie wird verwendet um Zellen oder Zellbestandteile wie die DNA von Versuchslösungen zu trennen (64).

Ebenso werden ein Wasserbad zum Vorwärmen der verwendeten Lösungen oder Auftauen gefrorener Zellen, sowie der Autoklav zum Sterilisieren von Materialien oder hitzebeständigen Lösungen benötigt (59 S.28).

Zum Absaugen sowie hinzugeben von Lösungen werden Pipetten unterschiedlicher Größe benötigt (0,1 µl-15 ml). Für verbrauchte Wachstumsmedien oder Überstände nach Zentrifugation ist eine Vakuumpumpe mit dazugehörigen autoklavierten Pasteurpipetten zu verwenden.

Kunststoffröhrchen (15-50 ml) und Eppendorf Gefäße (1,5 ml) sind Voraussetzung, um separat Lösungen und Zellen miteinander zu vermischen oder kleine Mengen an Lösungen vorzuwärmen. Ebenso können durch Vorlegen von Lösungen Mehrfachentnahmen aus Stammlösungen vermieden werden. Jede Entnahme kann zu einer Verunreinigung führen.

Bei jeder Entnahme der Zellkulturen aus dem Inkubator sollte eine Kontrolle des pH-Werts mit Hilfe des Farbindikators vorgenommen werden. Zusätzlich sollte die Kultur makroskopisch sowie mikroskopisch nach Zeichen einer mikrobiellen Kontamination untersucht werden. Auch die Morphologie der Zellen sollte regelmäßig mikroskopisch begutachtet werden, so kann ein untypisches Wachstum schnell erkannt werden und umgehend eine mögliche Fehlersuche beginnen. Für optimale Dokumentationsmöglichkeiten sollte das Mikroskop mit einer Software und Einrichtung zur Fotodokumentation mit einem Computer verbunden sein (1 S.121).

Zur Lagerung von Lösungen und Wachstumsmedien, sowie Zell- oder Gewebeproben werden abschließend Kühl- und Gefrierschränke von 4 °C bis -80 °C sowie ein Flüssigstickstofftank benötigt.

2.2.8. Kryokonservierung

Aus Sicherheitsgründen sollten regelmäßig Proben kryokonserviert werden. Es kann jederzeit passieren, dass trotz steriler Arbeitstechnik eine Kontamination auftritt oder die bestehenden Zellkulturen durch einen Ausfall von Geräten verloren gehen. Werden regelmäßig Proben eingefroren, kann dies den Fortbestand einer Kultur oder Versuchsreihe sicher stellen (64).

Einfrieren sollte in einem speziellen Einfriermedium erfolgen. Dabei handelt es sich um eine speziell hergestellte Lösung meist aus FBS und einem Gefrierschutzmittel wie Glycerin oder Dimethylsulfoxid (DMSO). Durch die Zugabe eines der Stoffe kann die Bildung von Eiskristallen verhindert werden. Diese würden beim Auftauen zum Platzen der Zellen führen (59 S.39).

Die Proben können für begrenzte Zeit bei -80 °C oder für nahezu unbegrenzte Zeit bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Laut Studien der Kryobiologie finden sich unter -130 °C keine Eiskristalle mehr, ebenso finden innerhalb der Zelle keine molekularbiologischen Vorgänge mehr statt (70).

Beim Abkühlen sollte eine Abkühlrate von 1 °C pro Minute eingehalten werden (71). Nach Lagerung bei -80 °C über Nacht können die Proben in den Stickstofftank überführt werden.

Das Auftauen der Zellen sollte möglichst zügig im Wasserbad erfolgen. Um die Zellen anschließend von den zelltoxischen Gefrierschutzmitteln zu reinigen, kann ein Mediumwechsel nach 24 h vorgenommen werden oder die Zellen können vor dem Anlegen der Kultur zentrifugiert werden (1 S.140)

2.2.9. Qualitätssicherung in der Zellkultur

Ergebnisse von durchgeführten Versuchen hängen maßgeblich von der Qualität der kultivierten Zellen ab. Qualitätsmanagement betrifft Reinheit, Identität und Stabilität (1 S.143). Kulturen sollen frei von mikrobiellen Kontaminationen und Kreuzkontamination sein. Auch sollten die Zellen sicher ihrem jeweiligen Ursprung zugeordnet werden können. Dies erfordert eine lückenlose Dokumentation beim Erhalt von Gewebeproben. Ebenso sollte darauf verzichtet werden Kulturen verschiedener Patienten gleichzeitig zu bearbeiten (68).

Abschließend sollten die Zellen auch bei längerer Kultivierung möglichst geno- sowie phänotypisch stabil bleiben. Dies kann durch die Zugabe von, auf die jeweiligen Zellen abgestimmten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren erreicht werden.

Eine langsamere Dedifferenzierung kann zusätzlich durch längere Subkultivierungsintervalle oder höhere Einsaatdichten erreicht werden (1 S.147).

Soll mit einer neuen Zellkultur gearbeitet werden ist es deshalb wichtig Referenzparameter und grundsätzliche Handlungsabläufe festzulegen. Das Qualitätsmanagement sollte Kontrolle von Kontaminationen, Zellmorphologie, Stoffwechselaktivität und Versuchsbedingungen beinhalten. Vor allem Zellzahl und Vitalität stellen bei der Qualitätskontrolle einen wichtigen Faktor dar.

Zellzählungen können manuell mit Hilfe einer Neubauerkammer durchgeführt werden oder mit automatisierten Zellzählgeräten (1 S.120-27). Zusätzlich lässt sich durch eine Färbung der Zellen mit Trypanblau, während des Zählvorgangs, eine Aussage über die Vitalität der Kultur treffen.

Bei Trypanblau (C.I. Direkt blue) handelt es sich um einen anionischen Bisazofarbstoff, welcher zur Bestimmung der Zellviabilität verwendet wird. Der Farbstoff durchdringt Zellmembranen abgestorbener Zellen und sorgt somit für eine dunkelblaue Färbung der gesamten Zelle. Vitale Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf (72).

Eine Alternative stellt eine Färbung mit Acridin-Orange und Propidiumjodid dar. Die Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren in die DNA der Zellen, wobei Propidiumjodid wie Trypanblau nur eine beschädigte Zellmembran durchdringen kann (73 S.32,45, 74). Zellzählgeräte können bei anschließender Messung die Zellzahl sowie Vitalität bestimmen, je nachdem welcher Farbstoff aufgenommen wurde.

2.3. Endokrine Orbitopathie: Fibroblasten in der Zellkultur

2.3.1. Anlegen der Kultur und verwendete Medien

An der Pathogenese der EO wird weitläufig mit Hilfe von Zellkulturen orbitaler Fibroblasten geforscht. Es wurde ein Vergleich aus fünf Forschungsgruppen erstellt. Je nach Fokus der Forschung zeigen sich bei den betrachteten Gruppen Unterschiede in der Art der Kultivierung, vom Anlegen der Kultur bis zur Stimulation.

Bei den verglichenen Testverfahren werden vornehmlich Tests zur Messung der Proliferation bzw. Stoffwechselaktivität, sowie Messung des cAMP und HA Anstiegs betrachtet, da diese Parameter im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, oder im Weiteren mit der etablierten Kultur erhoben werden sollen.

Es zeigt sich, dass die Gruppen je nach Fokus der Forschung einzelne Parameter verändern. Alle Gruppen arbeiten mit Gewebe von Patienten mit EO, welches in Dekompressions- oder Lidchirurgischen Operationen gewonnen wurde.

Da es selten möglich ist Gewebe von Patienten zu erhalten, welche aufgrund einer aktiven Erkrankung notentlastet werden müssen, handelt es sich meist um Gewebe von Patienten mit inaktiver Erkrankung nach 6-monatiger Glukokortikoid Karenz. Van Zeijl *et al.* weisen darauf hin, dass bei von ihnen durchgeführten Stimulationsversuchen, mit Gewebe einer aktiven Erkrankung, der höchste Anstieg von cAMP und Hyaluronsäure gemessen werden konnte (75, 76). Bei Kontrollgewebe wird zumeist Orbita Gewebe verwendet, nur Bahn *et al.* verwenden in einer Publikation abdominelles Bauchfett (77).

Alle betrachteten Gruppen zerkleinern das erhaltene Gewebe mechanisch und geben die Gewebestücke mit Wachstumsmedium in ein Kulturgefäß. Kahaly *et al.* verwenden zusätzlich den enzymatischen Verdau von Gewebe (78-80).

Es zeigt sich, dass sich Neumann & Krieger *et al.* sowie Van Zeijl *et al.* beim Anlegen der Kulturen an grundlegende Forschung von Bahn *et al.* halten. Bei Verwendung von Wachstumsmedien verwenden die beiden Gruppen jedoch eigene Protokolle.

Bei allen Gruppen zeigt sich eine Verwendung von serumhaltigen Medien, teils sogar 20 % FBS zu Beginn der Kultivierung (81). Diese hohe Konzentration wird nach erfolgreichem Anwachsen reduziert. Kahaly *et al.* verwenden zu Beginn 5 % FBS.

Neumann & Krieger *et al.* verwenden nach Anwachsen der Zellkultur das sogenannte F-Medium. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus DMEM und 25 % Ham's F-12, angereichert mit weiteren Differenzierungsfaktoren (s.u.). Dieses komplexe Medium soll eine Dedifferenzierung der Zellen verhindern (82).

Bahn *et al.* beschreiben, dass Gewebestücke nach 2-3 Wochen von der Kulturplatte entfernt werden. In dieser Zeit sind genügend Fibroblasten herausgewachsen (83). Da weitere Zeitangaben oder Angaben zu Gewebemengen fehlen ist es nicht möglich eine Aussage über die Eignung der unterschiedlichen Kulturmedien zu treffen.

Je nach verwendetem Medium finden sich an die Puffermenge des Mediums angepasste CO₂ Konzentrationen des Inkubators.

Tabelle 1: Literaturvergleich - orbitale Fibroblasten in der Zellkultur, Fokus auf: Anlegen der Kultur, verwendetes Medium und Kulturbedingungen

| | Kahaly <i>et al.</i> | Neumann & Krieger <i>et al.</i> | Van Zeijl <i>et al.</i> | Smith <i>et al.</i> | Bahn <i>et al.</i> |
|--|--|---|--|--|--|
| Anlegen der Kultur | - Gewebe in PBS spülen - mechanisches Zerkleinern - Kollagenaseverdau (1g/l Kollagenase) Anschließend zentrifugieren und filtern (78-80, 84) | Mechanisch zerkleinerte Gewebestücke mit Medium inkubieren (82, 85) Nach Protokoll von Bahn <i>et al.</i> (81, 82, 86, 87) | Nach Protokoll von Bahn <i>et al.</i> (83) | Mechanisch zerkleinerte Gewebestücke mit Medium inkubieren (88) | Mechanisches Zerkleinern in ca. 2 x 2 mm große Stücke anschließend in Wachstumsmedium inkubieren (81, 83, 89, 90) |
| Verwendetes Medium und Kulturbedingungen | RPMI 1640 mit 5 FBS, Antibiotika 37°C; 5 % CO ₂ (78, 79, 84) Ham's F-12 mit 10 % FBS, Pen/Strep, Amphotericin B, 37°C; 6 % CO ₂ (80) | DMEM mit 10 % FBS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin (82, 85) | Medium 199 mit 10 % FBS, 10U/ml Pen/Strep, Fungizone 37°C; 5 % CO ₂ (75, 76) | Earle's Salze mit 10 % FBS, Antibiotika, Glutamin, Amphotericin C 37°C; 5 % CO ₂ (91, 92) Alternativ: DMEM mit Serum und Antibiotika (93, 94) Alternativ: Medium 199 mit Zusätzen (77, 95) | Medium 199 mit FBS 20 %, Gentamycin (20µg/ml), Penicillin G (100U/ml) 37°C; 5 % CO ₂ (83, 89, 90) Alternativ: Streptomycin 100µg/ml und Penicillin G 100U/ml (77, 96) |
| Nach Anwachsen der Zellen | | F-Medium 37°C; 7 % CO ₂ (siehe unten) (82, 85, 97) | | | 10 % FBS (77, 81, 89, 90) |

RPMI 1640, Ham's F-12, DMEM, Medium 199, Earle's Salze sowie Eagle's Medium: Eigennamen verschiedener Fertigmedien, Pen/Strep = Penicillin und Streptomycin kombiniert; bei fehlenden Mengenangaben konnten diese Veröffentlichungen der Gruppen nicht entnommen werden.

2.3.2. Verwendete Passagen

Große Differenzen zwischen den Arbeitsgruppen zeigen sich in der Anzahl an durchgeführten Subkultivierungen. Durch die Dedifferenzierung der Zellen eignen sich je nach Forschungsfokus spätere Passagen durch Verlust spezifischer Eigenschaften nicht mehr für Versuche. Neumann & Krieger *et al.*, deren Forschung sich vor allem auf Expression des TSHR und IGF-1R bezieht, verwenden Kulturen bis zur 5. Passage. Es wird angegeben, dass bereits nach der 4. Passage eine kritische Reduktion in der Expression des TSHR stattfindet und die Zellen nicht mehr verwendet werden können (85).

Ein Verlust der TSHR Expression ab Passage 4.-5. bestätigt auch Bahn *et al.* (81). Im Gegensatz dazu verwenden van Zeijl und Kahaly *et al.* in Versuchen mit TSHR Stimulation Passagen 3.-7./8. und 5.-7. ohne Verluste in der Stimulierbarkeit der Zellen festzustellen (75, 98). Bahn und Smith *et al.* geben an, dass bei Versuchen, bei welchen nicht der TSHR stimuliert wird Zellen zwischen 3. und 12. Passage verwendet werden können. Nach Angabe der Autoren verändert sich keiner der untersuchten Parameter mit steigender Passagenzahl (88). Auch berichten Bahn *et al.* dass morphologisch stabile Ergebnisse definitiv bis Passage 10. erreicht werden können (83).

Subkultiviert wird weitgehend mit Trypsin, teils in Kombination mit EDTA. Neumann & Krieger *et al.* geben an, dass durch den Trypsinverdau der TSHR verdaut wird und Versuche somit frühestens 48 h nach Trypsin Verwendung durchgeführt werden sollten (99).

2.3.3. Kulturgefäße und Zellzahlen

Bahn und Smith *et al.* züchten die Zellen zunächst in großen Zellkulturflaschen und setzen diese anschließend für Versuche in kleinere Multiwell Platten um (33, 81). Während Smith und Kahaly *et al.* für HA Stimulationsversuche 24 Well Platten verwenden (33, 84) verwenden Bahn und Van Zeijl *et al.* 6 Well Platten und somit größere Zellmengen (75, 81, 98). Neumann & Krieger *et al.* verwenden in früheren Arbeiten ebenfalls 24 Well Platten (87), stimulieren jedoch in aktuelleren Arbeiten erfolgreich in 48 Well Platten (97).

Bezüglich der verwendeten Zellzahlen bei Ausplattieren und Versuchsbeginn finden sich nur unvollständige Angaben.

2.3.4. Zellfärbungen

Anlegen einer Zellkultur aus Fettgewebstücken generiert zu Beginn eine heterogene Kultur aus Fibroblasten und Fettzellen. Zusätzlich sind die Fibroblasten selbst in der Lage sich in Präadipozyten und Adipozyten zu differenzieren. Fettzellfärbungen ermöglichen eine Dokumentation der durchlaufenen Differenzierung. Ebenso ist eine Verifizierung von, zu Beginn mit in der Kultur angewachsenen, Fettzellen möglich. Am häufigsten wird von den betrachteten Gruppen der Farbstoff Oil red O verwendet. Bei Oil red O handelt es sich um einen roten Bisazofarbstoff, welcher ausschließlich neutrale Fette wie Triacylglyceride färbt (100). Polare Fette wie die der Zellmembran werden nicht gefärbt (101). Optional ist eine zusätzliche Kernfärbung mit Hematoxylin (96, 102). Alternativen bieten der ältere Farbstoff Sudanrot (103) sowie Nile Red (95). Als Alternative messen Kahaly *et al.* die Enzymaktivität fettspezifischer Enzyme wie die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase oder die Lipoproteinlipase (103). Ebenso messen Neumann & Krieger *et al.* in einer Arbeit den Adiponectin Anstieg (87).

2.3.5. Verwendete Assays

Für die Dokumentation der Stoffwechselaktivität wird zumeist auf den MTT Test zurückgegriffen. In früheren Publikationen von Kahaly *et al.* wird auch die Aufnahme von ³H-Thymidin gemessen. Beim ³H-Thymidin Test kann die Menge der aufgenommenen Basen gemessen werden und so auf die Stoffwechselaktivität der Zellen geschlossen werden. Neuere Forschungen haben ergeben, dass ³H-Thymidin die DNA Synthese beeinträchtigt und somit die gemessene Stoffwechselaktivität fehlerhaft sein kann (104).

Der MTT Test lässt einen direkten Vergleich der metabolischen Aktivität zu. Beim gelben Tetrazoliumsalz (3-(4,5Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)) handelt es sich um einen wasserlöslichen Farbstoff, welcher von den Zellen in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan verstoffwechselt wird. Die Menge des verstoffwechselten und anschließend photometrisch gemessenen Farbstoffs entspricht der Glykolyserate der Zellen und lässt so einen Rückschluss auf ihre metabolische Aktivität zu. Häufige Verwendung findet der MTT Test bei *in vitro* Zytotoxizitätstest. Hierbei wird die Stoffwechselaktivität vor und nach Applikation einer potenziell toxischen Substanz gemessen und so deren Toxizität festgestellt (105).

Im Rahmen der hier betrachteten Veröffentlichungen wird die Stoffwechselaktivität nach Stimulation gemessen (102, 103).

Weiterhin werden cAMP Assays unterschiedlicher Hersteller verwendet. Bei allen durchgeführten cAMP Assays findet vor Stimulation eine Inkubation mit 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) statt. Hierbei handelt es sich um einen reversiblen Inhibitor der Phosphodiesterase, welche cAMP abbaut. Somit kann im Assay die kumulativ produzierte cAMP Dosis gemessen werden. Es finden sich Inkubationszeiten von 30 Minuten mit 0,5 mM IBMX bei Van Zeijl *et al.* (75, 76, 98) bis 2 h mit 1 mM IBMX bei Bahn *et al.* (81, 96).

Auch bei der Messung der produzierten HA finden sich Unterschiede bei den verwendeten Tests. Zumeist werden HA ELISA Tests verwendet, nur Kahaly *et al.* sowie Smith *et al.* bestimmen in früheren Publikationen HA radiometrisch (84, 88). Neumann & Krieger *et al.* verwenden einen modifizierten HA ELISA. Sie haben festgestellt, dass die Bindung des HA Bindungsproteins im Assay abhängig von der Größe des jeweiligen HA Moleküls ist. Bei HA welche von orbitalen Fibroblasten produziert wird handelt es sich um besonders große Moleküle. Diese sind nicht vergleichbar mit den HA Standards, welche in kommerziellen Kits mitgeliefert werden. Neumann & Krieger *et al.* vermuten, dass geringe HA Mengen durch kommerzielle Kits somit überschätzt und hohe Mengen unterschätzt werden. Die Gruppe verwendet deswegen zu einem kommerziell erhältlichen HA ELISA Kit einen zusätzlich erworbenen HA Standard von 1.000.000 Dalton (87).

2.3.6. Stimulation

Vor Stimulation verwenden Kahaly, Neumann & Krieger, Smith und Bahn *et al.* für zumeist 24 h ein serumreduziertes (0,1-1 % FBS) Hungermedium. Damit wird erreicht, dass die Stoffwechselaktivität der Zellen auf einem vergleichbaren Punkt ist. Smith *et al.* verwenden anschließend auch während der Stimulation nur 1 % FBS um die Stimulation durch Serumbestandteile so gering wie möglich zu halten (88).

Neumann & Krieger *et al.* applizieren in früheren Publikationen vor Stimulation 1h 1U/l Hyaluronidase, um sämtliche HA vor Stimulation aus dem Kulturgefäß zu entfernen (85). Diese Behandlung ist eine Belastung für die Zellen, weswegen anschließend 10 % Serumzusatz sowie Stimulationszeiten von 4-5 Tagen benötigt werden (82). Im Vergleich verwenden andere Gruppen Stimulationszeiten bis zu maximal 72 h. Smith *et al.* zeigen, dass nach 48 h nur noch ein leichter Anstieg im HA Assay zu messen ist (33).

Stimulationszeiten von 4-5 Tagen bedeuten auch, dass die Zellen in ihrem ursprünglichen Kulturmedium (hier: F-Medium) stimuliert werden müssen. Andernfalls würde die Umstellung des Mediums einen deutlichen Effekt auf die Stoffwechselaktivität der Zellen zeigen. In neueren Publikationen verzichten Neumann & Krieger *et al.* auf einen Hyaluronidaseverdau und verwenden während 72 h Stimulation DMEM mit 10 % FBS (97). Die Gruppe gibt an, dass nur in metabolisch aktiven Zellen HA Produktion stattfindet und hierfür 10 % Serum benötigt werden (86). Durch den Einsatz von DMEM fällt eine potenzielle Stimulation durch Zusätze des komplexen F-Mediums weg.

Stimulation wird mit Patienten-/Kontrollseren, isolierten Klasse G Immunglobulinen (IgG), einem monoklonalen Antikörper des TSHR (M22 MAk) und spezifischen Stimulanzen wie TSH, IGF-1 und Forskolin durchgeführt. Bei Forskolin handelt es sich um einen direkten Aktivator der Adenylylcyclase. Dieser unspezifische Stimulator wird als Kontrollstimulanz bei Messungen des cAMP Anstiegs eingesetzt (75).

Da bei Stimulation durch Seren von Patienten und Kontrollen keine klaren Ergebnisse erzielt werden konnten (84), werden in späteren Publikationen von allen Gruppen aus Serum isolierte gesamt IgG verwendet. Isolation wird mittels unterschiedlicher Chromatographieverfahren durchgeführt. Isolierte gesamt IgG werden in Konzentrationen von 100 ng/ml von Smith *et al.* bis 4 mg/ml von Neumann & Krieger *et al.* verwendet (33). Letztere, vergleichsweise hohe Konzentration, wird in einem Inhibitionsversuch verwendet, um nach sicherer Stimulation eine Aussage bzgl. des Inhibitors treffen zu können (82). Van Zeijl *et al.* geben an, dass bei einer Dosis-Wirkungsstimulation 1 mg/ml IgG zu einer signifikanten Stimulation geführt hat (76). Im Gegensatz hierzu geben Smith *et al.* an, dass bei 100ng/ml bereits eine signifikante HA Produktion messbar ist (33). Gegebenenfalls verwenden Smith *et al.* eine effektivere Methode, um die Immunglobuline zu isolieren, eine genaue Angabe hierzu kann den Publikationen nicht entnommen werden.

Bei M22 MAk bezeichnen Neumann & Krieger *et al.* 42 ng/ml als Niedrigdosis und 100 ng/ml als hohe Dosis (82). Bahn *et al.* dokumentieren bei 10 ng/ml einen signifikanten cAMP Anstieg in einer Dosis-Wirkungsstimulation (90).

Stimulationszeiten variieren je nach Arbeit. Deutlich wird, dass eine Stimulation der HA Produktion mit 24 h-72 h von Smith *et al.*; 48 h von Van Zeijl *et al.* sowie 24-48 h von Kahaly *et al.* deutlich länger durchgeführt wird als Stimulationen des cAMP Anstiegs. Stimulation von cAMP wird nach Inkubation mit IBMX für maximal 6 h durchgeführt (75).

Da die Fibroblasten keine Hyaluronidaseaktivität (106) besitzen, sammelt sich produzierte HA im Gegensatz zu produziertem cAMP ohne Verlust im Kulturgefäß. So kann die kumulative Dosis von HA nach längerer Stimulationszeit mit deutlicheren Ergebnissen gemessen werden.

Bei direkter Stimulation der Rezeptoren verwenden alle Gruppen eine Messung des HA- oder cAMP Anstiegs als Nachweis. Da die Gruppen unterschiedliche Kulturgefäße und demzufolge unterschiedliche Zellmengen verwenden ist es schwierig Assays und Ergebnisse zu vergleichen.

Bezüglich der Zellmengen wird zumeist angegeben, dass die Zellen in 2-7 Tagen konfluent ihr Kulturgefäß bewachsen und durch Kontaktinhibition von einer stabilen Zellmenge im Kulturgefäß ausgegangen werden kann (75, 87). Van Zeijl sowie Smith *et al.* erheben nach Stimulation die gesamte Proteinmenge der stimulierten Zellen und korrigieren damit ihre Messergebnisse (33, 76, 98).

Findet eine reine Stimulation der Differenzierung in Präadipozyten und Fettzellen statt, wird diese mit Hilfe des Mikroskops und Fettfärbungen gemessen (76). Alle Gruppen, welche mit Differenzierungszusätzen arbeiten, geben an, dass hiermit deutlichere Ergebnisse erreicht werden können (75, 76). Bahn *et al.* geben beispielsweise einen 2-5 fachen cAMP Anstieg in differenzierten Kulturen im Vergleich zu undifferenzierten Kulturen an (81).

Tabelle 2: Literaturvergleich - orbitale Fibroblasten in der Zellkultur, Fokus auf verwendete Passagen, Methode der Subkultivierung, Zellzahlen, Kulturgefäße Färbemethoden sowie verwendete Testverfahren

| | Kahaly <i>et al.</i> | Neumann & Krieger <i>et al.</i> | Van Zeijl <i>et al.</i> | Smith <i>et al.</i> | Bahn <i>et al.</i> |
|--|---|--|---|--|---|
| Verwendete Passagen | 5.-7. Passage (78, 79) 3.-10. Passage (80) | 3.-4. Passage (85) 3.-5. Passage (82) | 3.-9. Passage (76) 3.-8. Passage (75) 3.-7. Passage (98) | > 11. Passage (91) 2.-10. Passage (77) 2.-12. Passage (107) 3.-12. Passage (88, 95) | 2.-10. Passage (77, 96) |
| Methode der Subkultivierung | Trypsin 0,1 % (78-80, 84) | Trypsin/EDTA (82) | Keine Angabe | Trypsin/EDTA (33, 77, 88, 91, 95, 107) | Trypsin/EDTA (83, 96) |
| Zellzahlen (in Zellen/Well) und Kulturgefäße | 5.000/Well in 96 Well Platte (78, 79, 84) 20.000/Well in 96 Well Platte (79) 50.000/ Well in 24 Well Platte (84) | 6 Well Platte (86) 12 Well Platte (87) 48 Well Platte (97) 10 cm Petrischale (97) | 50.000/Well in 6 Well Platte (75, 76, 98) | 400.000 in 60 mm Platte (92) 6 Well Platte (95) 24 Well Platte (33) 75 cm ² Flasche (33) | 60 mm Platte (77, 96) 35 mm Platte (83) 75 mm ² Flasche (89, 90) 80mm ² Flasche (81) |
| Färbemethoden | Sudan III/Hematoxylin (103) Oil red O/Hematoxylin (79) | Keine Angabe | Oil red O (76) | Oil red O (91) Nile Red (95) | Oil red O (81, 90, 96) |
| Verwendete Assays | ³ H-Thymidin Aufnahme (78, 102, 103) Radiometrische HA Bestimmung: ³ H-Glucosamin Aufnahme (84) MTT Test (79, 102, 103) HA ELISA (84) | Modifizierter HA ELISA (82, 85, 86) | cAMP Assay (75, 76, 98) mRNA Isolation (75, 76) HA ELISA (75, 76) | Radiometrische HA Bestimmung mittels ³ H-Glucosamin Aufnahme (88) HA ELISA (33) | cAMP Assay (90, 96) |

Bei unvollständigen Angaben konnten diese den Veröffentlichungen der Gruppen nicht entnommen werden

Tabelle 3: Literaturvergleich - orbitale Fibroblasten in der Zellkultur, Fokus auf Stimulation und Nebenfaktoren

| | Kahaly <i>et al.</i> | Neumann & Krieger <i>et al.</i> | Van Zeijl <i>et al.</i> | Smith <i>et al.</i> | Bahn <i>et al.</i> |
|-------------|--|---|--|---|---|
| Stimulation | <p>24 h oder 48 h Inkubation mit ³H-Thymidin (78)</p> <p>24 h oder 48 h Inkubation mit IgG (1 g/l) und Patienten sowie Kontrollserum (80, 84)</p> | <p>4 mg/ml EO IgG (82)</p> <p>M22 MAk 42-100 ng/ml (82, 87)</p> <p>Stimulation mit M22 MAk, IGF-1 und IgG jeweils in F-Medium für 4-5 Tage (82, 85, 86)</p> <p>Stimulation mit M22 MAk, EO IgG in DMEM, 10 % FBS für 3 Tage (97)</p> <p>Vor Stimulation Inkubation mit Hyaluronidase 1 U/ml für 1 h (82, 85-87)</p> | <p>1 mg/ml EO IgG</p> <p>1 mg/ml Kontroll IgG</p> <p>50 µM Forskolin (75, 76)</p> <p>500 ng/ml M22 MAk (98)</p> <p>Vor cAMP Stimulation: Inkubation für 30 min mit IBMX (0,5 mM) (75, 76, 98)</p> <p>Stimulation für cAMP Versuch: 6 h (75, 76)</p> <p>Stimulation für HA Versuch: 48 h (75, 76)</p> | <p>10 - 100 ng/ml EO IgG (33)</p> | <p>Inkubation mit M22 MAk 100ng/ml IGF 10ng/ml für 15 min (89)</p> <p>Inkubation mit: M22 MAk 0,1-100 ng/ml IGF 10 ng/ml Für 1-30 min (90)</p> <p>Vor cAMP Stimulation: Inkubation für 2 h mit IBMX (1 mM) (81, 96)</p> |
| Weiteres | <p>Hungermedium mit 0,1 % FBS 24 h vor Stimulation (80, 84)</p> <p>Hungermedium mit 1 % FBS 24 h vor Stimulation (79)</p> | <p>Hungermedium mit 1 % FBS für 24 h vor Inkubation (82, 87)</p> <p>Ausplattieren und in 7 Tagen auf Konfluenz wachsen lassen (82)</p> | <p>Ausplattieren und in 48 h vor Versuch auf Konfluenz wachsen lassen (75, 98)</p> | <p>Hungermedium 16 h oder 24 h vor Stimulation (33, 88)</p> <p>1 % FBS während Stimulation (88)</p> | <p>Hungermedium 24 h vor Stimulation (90)</p> |

IBMX = 3-Isobutyl-1-methylxanthin

Bei unvollständigen Angaben konnten diese den Veröffentlichungen der Gruppen nicht entnommen werden

2.3.7. Differenzierung

Bei Prüfung der Differenzierungsfähigkeit von Fibroblasten, werden verschiedenste Wachstumsstimuli eingesetzt. Die Differenzierungsprotokolle von Van Zeijl, Bahn sowie Smith *et al.* weisen eine weitgehend ähnliche Zusammensetzung auf.

Die Gruppe Neumann & Krieger *et al.* verwendet standardmäßig das F-Medium mit proadipogenen Stimulantien. Die Gruppe untersucht jedoch nicht den Effekt des erhöhten Differenzierungsgrades. Sie geben an, mit Verwendung des Mediums nur eine vorzeitige Dedifferenzierung verhindern zu wollen (82).

Bei den Supplementen des F-Mediums handelt es sich um L-Glutamin, ein zusätzliches Energiesubstrat, wobei die L-Form der Aminosäure länger in Lösung stabil bleibt (1 S.69). *Epidermal Growth Factor* (EGF) findet in Präadipozytenkulturen als hochpotenter Wachstumsfaktor Verwendung (108, 109). Ebenso wird Cholera Toxin als weiterer Wachstumsfaktor und Stimulator der cAMP Produktion verwendet (110). Y-27632 reduziert Differenzierung in Myofibroblasten (111).

Insulin und Hydrocortison, welche auch in den Differenzierungsprotokollen von Bahn und Smith *et al.* verwendet werden, wirken zusammen mit Trijodthyronin positiv auf die Fettakkumulation in Präadipozyten (112). Hydrocortison kontrolliert zusätzlich die Expression von Adipozyten spezifischen Genen sowie Expression der Hyaluron-synthetasen (81, 88, 113). Hierbei zeigt die Verwendung von Dexamethason, ebenfalls ein Glukokortikoid, eine höhere Wirksamkeit als Hydrocortison (109).

Mit Dexamethason, IBMX und Carbaprostacyclin ist es möglich Präadipozyten vollständig in Adipozyten zu differenzieren (113). Nach Angaben von Bahn *et al.* konnte bei Versuchen ohne IBMX sowie Trijodthyronin keine Adipogenese ausgelöst werden (90).

Insulin ermöglicht in Kombination mit Transferrin bei gleichbleibendem Wachstum eine Reduktion des Serumgehalts im Medium (108). Die Vitaminzusätze Biotin und Pantothensäure unterstützen die Lipogenese aus Glucose (114).

Smith, Bahn und Van Zeijl *et al.* inkubieren nur die Kulturen im Differenzierungsmedium, mit welchen Versuche durchgeführt werden sollen. Smith und Van Zeijl *et al.* stimulieren dabei für 14 Tage (76, 91). Bahn *et al.* stimulieren für 10 Tage (81).

Die Autoren geben an, dass die Fibroblasten währenddessen ihre längliche Form verlieren. Die Zellen werden rundlicher und es häufen sich intrazelluläre Vakuolen (76, 81). Dabei differenzieren sich morphologisch nicht mehr als 5-20 % der Zellen in Präadipozyten (76, 81).

Smith *et al.* beschreiben hierbei eine clusterförmige Anordnung der differenzierten Zellen. Die Gruppe vermutet, dass es sich um Klone von Zellen handelt, welche sich in Adipozyten differenzieren können. Alternativ könnte auch eine parakrine Stimulation durch bereits differenzierte Zellen möglich sein (91).

In einem erweiterten Protokoll von Smith *et al.*, in dem Insulin in höherer Konzentration und des Weiteren Rosiglitazon hinzugefügt werden, differenzieren sich bis zu 50 % der Zellen in Präadipozyten (95). Rosiglitazon stimuliert die Differenzierung der Zellen über Aktivierung des Transkriptionsfaktors Peroxisom Proliferator aktivierten Rezeptor- γ (PPAR- γ). Dieser kontrolliert direkt die Expression von Adipozyten spezifischen Genen (114).

Smith *et al.* geben an, dass die verwendeten Protokolle mit weiteren Veränderungen gegebenenfalls noch mehr Zellen beeinflussen könnten (91).

Tabelle 4: Literaturvergleich - orbitale Fibroblasten in der Zellkultur, Fokus auf Differenzierung

| | Kahaly <i>et al.</i> | Neumann & Krieger <i>et al.</i> | Van Zeijl <i>et al.</i> | Smith <i>et al.</i> | Bahn <i>et al.</i> | |
|-----------------|-----------------------------|--|--|---|---|---|
| Differenzierung | -- | F-Medium: DMEM mit 10 % FBS, Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, L-Glutamin 2 mM, Ham's F-12 25 % Hydrocortison 25 ng/ml, EGF 0,125 ng/ml, Insulin 5 µg/ml, Cholera Toxin 11,7 nM, Gentamycin 10 µg/ml, Fungizone 250 ng/ml, Y-27632 5 µM (82, 85, 86) | Differenzierungsmedium: Nach Bahn <i>et al.</i> : DMEM/Ham's F 12 Medium mit Biotin 33 µmol/l, Insulin 1 µmol/l, Pantothensäure 17 µM, Transferrin 10 µg/ml, Triiodothyronin 0,2 nM, cPGI ₂ 0,2 µmol/l | Differenzierungsmedium: DMEM/Ham's F 12 Medium mit Biotin 33 µmol/l, Pantothensäure 17 µM, Transferrin 10 µg/ml, Triiodothyronin 0,2 nM, cPGI ₂ 0,2 µmol/l Insulin 1 µmol/l oder | Differenzierungsmedium: DMEM/Ham's F 12 Medium mit Biotin 33 µmol/l, Insulin 1 µmol/l, Pantothensäure 17 µM, Transferrin 10 µg/ml, Triiodothyronin 0,2 nM, cPGI ₂ 0,2 µmol/l | Differenzierungsmedium: DMEM/Ham's F 12 Medium mit Biotin 33 µmol/l, Insulin 1 µmol/l, Pantothensäure 17 µM, Transferrin 10 µg/ml, Triiodothyronin 0,2 nM, cPGI ₂ 0,2 µmol/l |
| | | | während Differenzierung Mediumwechsel alle 3-4 Tage (76) Differenzierungsprotokoll über 14 Tage durchführen (76) | während Differenzierung Mediumwechsel alle 3-4 Tage (91, 107) Differenzierungsprotokoll über 14 Tage durchführen (91, 95) | während Differenzierung Mediumwechsel alle 3-4 Tage (90) Differenzierungsprotokoll über 10 Tage durchführen (81) | |

Ham's F-12, DMEM = Eigennamen unterschiedlicher Fertigmedien, Pen/Strep = Penicillin und Streptomycin kombiniert, EGF = Endothelialer Wachstumsfaktor, Y-27632 = (R)-(+)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)-cyclohexancarboxamid Dihydrochlorid, cPGI₂ = Carbaprostacyclin, IBMX = 3-Isobutyl-1-methylxanthin

Bei unvollständigen Angaben konnten diese den Veröffentlichungen der Gruppen nicht entnommen werden

3. Material und Methoden

3.1. Material

Tabelle 5: Verwendetes Equipment

| | |
|---|---|
| Inkubator 37 °C, 5 % CO ₂ CO ₂ Incubator MCO-18AIC | Sanyo, Moriguchi Japan Seriennummer: 60407257 |
| Inkubator 37 °C, 5-7 % CO ₂ HERAcell 240i CO ₂ Incubator | Thermo Fisher Scientific Inc. Massachusetts, USA Art.Nr: 51026331 |
| Automatisches Zellzählgerät Luna™ fl Dual Fluorescence Cell Counter | Logos Biosystems, South Korea Art.Nr: L20001 |
| Einweg-Zählkammer für Zellzählgerät PhotonSlide™ Ultra-low Fluorescence Counting Slides | Logos Biosystems, South Korea Art.Nr L12005 |
| Neubauerkammer | Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen Art.Nr 0640110 |
| CoolCell Box | Biocision, Kalifornien USA Art.Nr BCS-4050 |
| Styropor Transportbox | Schaumplast GmbH & Co. KG, Reilingen |
| Eppendorf Reaktionsgefäß | Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster Österreich Art.Nr 616201 |
| Petrischale 10cm | Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster Österreich Art.Nr 633181 |
| 6-Well-Platte | Orange Scientific, Braine-l'Alleud Belgien Art.Nr 4430500 |
| 24-Well-Platte | Orange Scientific, Braine-l'Alleud Belgien Art.Nr 4430300 |
| 96-Well-Platte | Corning® Inc., New York USA Art.Nr 3603 |
| Whatman™ Filter Papier | Tisch Scientific, Cleves USA Art.Nr 1002-185 |

| | |
|--|---|
| Sterile Einmalskalpelle No. 10 | Feather®, Osaka Japan |
| Kryoröhrchen, (2 ml) | Brand GmbH + Co KG, Wertheim Art.Nr. 114832 |
| Flüssigstickstoff Tank | AIR LIQUIDE Kryotechnik GmbH, Düsseldorf |
| Mikrotiterplatten-Schüttler | Grant Instruments LTD., Cambridge UK Modell: PMS-1000i |
| Tecan Infinite M200 Absorptionsreader | Tecan Trading AG, Schweiz |
| Hyaluronsäure Sandwich ELISA | Echelon Biosciences, Salt Lake City USA K-4800 |
| Mykoplasmen Nachweistest MycoBlue Mycoplasma Detector | Vazyme biotech Co., Ltd, Nanjing China |
| MTT Assay Kit | Abcam®, Cambridge UK Ab211091 |

Tabelle 6: Basis - Labormaterialien

Die hier aufgeführten Materialien werden im Folgenden als „Basis Labormaterialien“ bezeichnet.

| | |
|---|--|
| Wasserbad | Köttermann GmbH, Uetze |
| Zentrifuge Heraeus Biofuge Primo R Centrifuge | Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts |
| Lichtmikroskop Primo Vert | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena Seriennummer: 3842003425 |
| Mikroskop-Kamera AxioCam ERc 5s | Carl ZEISS AG, Oberkochen |
| Fotodokumentation Computer Programm ZEN 3.1 blue | Carl ZEISS AG, Oberkochen |
| Sterilbank BSB 4A | Gelaire®, Sydney Australien Seriennummer: 10407 |
| Vakuumpumpe AF 204 | HLC Biotech, Bovenden |
| Pasteurpipetten Varicon RK | Schuett-biotech GmbH, Göttingen Art.Nr3.521 233 |

| | |
|--|---|
| Diverse Pipetten 0,5µl-1000 µl | Eppendorf Research plus, Hamburg |
| Digitaler Pipettierhelfer 0,1-100 ml | Sunlab®, Mannheim SU1700 |
| Filterpipettenspitzen 10 µl TipOne® | STARLAB International GmbH, Hamburg Art.Nr S1122-1830 |
| Filterpipettenspitzen 1000 µl TipOne® | STARLAB International GmbH, Hamburg Art.Nr S1121-3810 |
| Serologische Pipette 10 ml CELLSTAR® | Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster Österreich Art.Nr 607 180/10ml |
| Falcon® 50 ml CELLSTAR® | Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster Österreich Art.Nr 227261 |
| Falcon® 15 ml BLUE MAX™ Jr. | Beckton Dickinson Labware, New Jersey USA Art.Nr 352096 |
| Abwurfbehälter Sharpsafe® | P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln Art.Nr 12.000.04.100 |
| Autoklavierte Pinzetten | Aesculap AG, Tuttlingen |
| Waage | Sartorius AG, Göttingen L.2200 P |
| Feinstwaage Sartorius Handy H110 | Sartorius AG, Göttingen WH-6007.n90023 |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach Art.Nr P60-36720100 |
| Ethanol absolut p.A. | AppliChem Panreac, Darmstadt A1613 |
| Ethanol 70 % | Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe Art.Nr: T 913.3 |
| Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr: 14190-094 |

Tabelle 7: Weitere Reagenzien

| | |
|--|--|
| Oil Red O – Farbstoff C.I. Solvent Red 27 | Sigma-Aldrich, Missouri USA Art.Nr O0625-25G |
| Isopropylalkohol 99 % | Aug. Hedinger GmbH &Co., Stuttgart Art.Nr: 070 |
| Formalin Lösung, neutral gepuffert, 10 % | Sigma-Aldrich, Missouri USA HAT501128-4L |
| Trypanblau 0,4 % C.I. Direct blue | Logos Biosystems, South Korea Art.Nr: T13001 |
| Acridinorange/ Propidiumjodid | Biozym Scientific GmbH, Oldendorf Art.Nr: 872045A |
| Trypsin / EDTA 0,05 % / 0,02 % in PBS | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach Art.Nr: P10-023100 |
| Poly D-Lysin 1 mg/ml in H ₂ O | Sigma-Aldrich, Missouri USA Art.Nr: A-003-E |
| Destilliertes Wasser | Cayman Chemical Company, Michigan USA |
| Stimulierender humaner monoklonaler TSH- Rezeptor Antikörper M22 MAk 40 µg | RSR Limited, Cardiff UK |
| Thyretain® Reaktionspuffer | Diagnostic Hybris, Inc., Ohio USA |
| Kollagenase Typ IV 1 g 275 Units/mg | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr: 171040-19 |

Tabelle 8: Verwendete Medien

| F-Medium | | 500 ml |
|--|--|---------------|
| Advanced Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) / F12 | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr: 12634010 | 250 ml |
| Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr: 41966052 | 188,15 ml |
| Fetales Bovines Serum | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr: 10500-064 | 50 ml |
| Penicillin Streptomycin | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr 15140122 | 5 ml |
| L-Glutamin 200 mM | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr 25030-024 | 5 ml |
| Hydrocortison 0,5 mg/ml in 100 % Ethanol | Sigma-Aldrich, Missouri USA Art.Nr: H0888-1G | - |
| Rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) | PeptoTech, New Jersey USA Art.Nr: AF-100-15 | - |
| Hydrocortison EGF Mix 1 ml Hydrocortisonlösung (0,5 mg/ml) + 2,5 µl EGF Lösung in 19 ml DMEM | | 0,5 ml |
| Y-27632 Dihydrochlorid 10 mg | Tocris Bioscience, USA Art.Nr 1254 | 0,5 ml |
| Fungizone/Amphotericin B 250 µg/ml | Thermo Fisher Scientific, New Hampshire USA Art.Nr: BP264520 | 0,5 ml |
| Insulin Lösung 10 mg/ml | Sigma-Aldrich, Missouri USA Art.Nr: I0516-5ML | 0,25 ml |
| Gentamycin 50 mg/ml | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr: 15-750-060 | 0,1 ml |
| Cholera Toxin 0,5 mg | Sigma-Aldrich, Missouri USA Art.Nr: C8052-.5MG | 4,5 µl |

| Wachstumssmedium | | 500 ml |
|---|--|---------------|
| Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr: 41966052 | 445 ml |
| Fetales Bovines Serum | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr: 10500-064 | 50 ml |
| Penicillin Streptomycin | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr 15140122 | 5 ml |

| Medium 199 | | 500 ml |
|-------------------------|--|---------------|
| Medium 199 | Sigma-Aldrich, Missouri USA Art.Nr: M4530-500ML | 444,9 ml |
| Fetales Bovines Serum | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr: 10500-064 | 50 ml |
| Penicillin Streptomycin | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr 15140122 | 5 ml |
| Gentamycin | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr: 15-750-060 | 0,1 ml |

| Einfriermedium | | 50 ml |
|-------------------------|--|--------------|
| Fetales Bovines Serum | Gibco™, Massachusetts USA Art.Nr: 10500-064 | 45 ml |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach Art.Nr P60-36720100 | 5 ml |

Tabelle 9: Übersicht - Verwendete Kulturgefäße

| | Einsaatdichte | Medium- menge |
|---------------------------|------------------------|------------------|
| Petrischale | 180.000-200.000 Zellen | 7 ml |
| 6 Well Platte (pro Well) | 100.000 Zellen | 2 ml |
| 24 Well Platte (pro Well) | 60.000-80.000 Zellen | 1 ml |
| 96 Well Platte (pro Well) | 8.000 Zellen | 0,15 ml |

3.2. Orbitagewebe

Gewebe für die Primärkulturen wurde bereitgestellt von der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz. Vor Beginn der Operation wurde von den Patienten eine Einverständniserklärung abgegeben, dass das entfernte Gewebe für Forschungszwecke verwendet werden darf.

Patientengewebe stammte von Patienten, welche an EO erkrankt sind. Das Gewebe wurde im Rahmen von Dekompressionsoperationen oder rehabilitativen Lidchirurgischen Operationen gewonnen.

Kontrollgewebe entsprang bei Eingriffen unterschiedlicher Art, zumeist Blepharoplastiken, Ptosis- oder Xanthelasmaoperationen.

3.3. Methoden

Sämtliche Versuche sowie routinemäßige Arbeiten an den Zellkulturen wurden unter Beachtung der Richtlinien des *Standard Operating Procedure* (SOP) des Schilddrüsen Labors XXX, unter der Sterilbank durchgeführt.

Die Arbeitsfläche sowie alle Utensilien, welche mit unter die Sterilbank genommen wurden, sollten vorher mit 70 %igem Ethanol gereinigt werden, wobei die Mindesteinwirkzeit von 30 Sekunden eingehalten werden musste (115).

3.3.1. Erhalt des Gewebes

Verwendete Materialien:

- Styropor Transportbox
- Eis
- 50 ml Zentrifugen Röhrchen je nach Menge an erwartetem Gewebe mit jeweils 25 ml PBS Lösung

In Absprache mit den Operateuren/-innen der Augenklinik wurde von Mitarbeitern des Schilddrüsenlabors eine Styroportransportbox mit Probenröhrchen, gelagert auf Eis, sowie darin enthaltener PBS Lösung bestückt und in der Augenklinik abgegeben.

Das im Rahmen der Operation gewonnene Gewebe wurde direkt nach der Entnahme unter sterilen Bedingungen in ein mit PBS befülltes Zentrifugenröhrchen gegeben und in der Transportbox auf Eis gelagert. Nach telefonischer Absprache wurde die Transportbox von einem Labormitarbeiter abgeholt, um die schnellstmögliche Verarbeitung zu gewährleisten.

Im Labor wurde das Gewebe, je nach Bedarf, entweder direkt zum Anlegen einer Kultur verwendet oder, bestand kein Bedarf an frischem Gewebe, bei -80 °C in Einfriermedium kryokonserviert.

3.3.2. Kryokonservierung von Gewebe

Bestand kein Bedarf eine neue Kultur anzulegen wurde frisches Gewebe verarbeitet, um es bei -80 °C einzufrieren.

Auch wenn Gewebe direkt für eine neue Kultur verwendet wird empfiehlt es sich überschüssiges Gewebe einzufrieren, um ggf. später auf Proben zurückgreifen zu können.

Verwendete Materialien:

- Basis-Labormaterialien
- Gewebeprobe in PBS auf Eis
- Zwei Zentrifugenröhrchen mit jeweils 25 ml PBS Lösung
„Gewebspülung 1“ und „Gewebspülung 2“
- Petrischale 10 cm
- Kryoröhrchen je nach Gewebemenge (ca. 0,5-1 g Gewebe pro Röhrchen)
- Einfriermedium
- CoolCell Box

Protokoll:

1. Nach Gewebeerhalt die jeweilige Excel Datentabelle für Orbitagewebe mit den Patientendaten erweitern, um für die Beschriftung eine verschlüsselte Patientenummer zu erhalten
2. Kryoröhrchen eindeutig mit Patientenummer, Datum und Gewebeart („K“ für Kontrolle oder „EO“ für Endokrine Orbitopathie) beschriften
3. Gewebe mit Hilfe der Skalpelle in „Gewebspülung 1“ transferieren und durch leichtes Schwenken des Röhrchens säubern
4. Schritt 3 mit „Gewebspülung 2“ wiederholen
5. Gewebe ohne PBS in die Petrischale geben und darin mit Hilfe der Skalpelle in feine Stücke zerteilen, um ein besseres Durchdringen des Gewebes mit Einfriermedium zu gewährleisten. Gewebestücke sollten ca. 3 x 3 mm groß sein
6. Gewebestücke in Kryoröhrchen geben. Pro Röhrchen ca. 0,5-1 g Gewebe, anschließend Einfriermedium bis zur 1,8 ml Markierung auffüllen
7. CoolCell Box mit den Röhrchen bestücken und bei -80 °C einfrieren
8. Am folgenden Tag Kryoröhrchen aus der CoolCell Box in einen beschrifteten Styroporsammelbehälter geben

3.3.3. Anlegen einer Zellkultur

Nach diesem Protokoll wurden alle Kulturen angelegt, bei welchen im Folgenden unterschiedliche Faktoren untersucht wurden. Anhand der angelegten Kulturen sollte mittels regelmäßiger Beobachtung von Wachstum und Morphologie festgestellt werden, welche Art von Gewebe und welche Wachstumsbedingungen am besten geeignet sind, um eine Kultur anzulegen.

Verwendete Materialien:

- Basis-Labormaterialien
- Inkubator (37 °C; 5 % CO₂)
- „Ethanol Bad“: Zentrifugenröhrchen mit 25 ml Ethanol (70 %)
- „Instrumentenspülung 1“ = Zentrifugen Röhrchen mit 35 ml PBS Lösung
- „Instrumentenspülung 2“ = Zentrifugen Röhrchen mit 45 ml Wachstumsmedium
- „Gewebspülung 1“ = Zentrifugen Röhrchen mit 25 ml PBS
- „Gewebspülung 2“ = Zentrifugen Röhrchen mit 25 ml PBS
- Petrischale 10 cm
- 6 Well Platte
- Zwei sterile Einmalskalpelle
- 8,5 ml angewärmtes F-Medium (Wasserbad 37 °C)
- 8,5 ml angewärmtes Wachstumsmedium (Wasserbad 37 °C)
- 5 ml angewärmte Kollagenase Typ IV Arbeitslösung (Wasserbad 37 °C)

Stammlösung Kollagenase IV: 27500 U/ml

1 g Kollagenase Typ IV gelöst in 11 ml PBS:

1 ml Aliquots eingefroren bei -20 °C

Arbeitslösung: 200 U/ml

730 µl Kollagenase Stammlösung in 99,27 ml PBS lösen

Protokoll:

„Ethanol Bad“ sowie die beiden Instrumentenspülungen können für das Anlegen mehrerer Kulturen verwendet werden, die anderen Materialien werden einmal pro angelegte Kultur verwendet.

Pinzette zwischen einzelnen Arbeitsschritten mit gleichem Gewebe jeweils vorher in „Instrumentenspülung 1“ und anschließend in „Instrumentenspülung 2“ tauchen, um diese zwischendurch zu reinigen.

Sollten mehrere Kulturen nacheinander angelegt werden, muss die Pinzette vor der Verwendung bei einer anderen Probe zuerst in das „Ethanol Bad“ getaucht werden und anschließend in die beiden Instrumentenspülungen.

Um eine Kultur aus gefrorenem Gewebe anzulegen sollte das Kryoröhrchen mit Gewebe im Wasserbad zügig aufgetaut werden.

1. Nach Gewebeerhalt die jeweilige Excel Datentabelle für Orbitagewebe mit den Patientendaten erweitern, um für die Beschriftung eine verschlüsselte Patientenummer zu erhalten
2. Petrischale und 6 Well Platte mit Patientenummer und Datum eindeutig beschriften
3. Gewebe aus Kryoröhrchen (gefrorenes Gewebe) oder aus Zentrifugen Röhrchen auf PBS in Eis (frisches Gewebe) mit Hilfe der Pinzette in „Gewebspülung 1“ transferieren und durch leichtes Schwenken säubern
4. Schritt 3 mit „Gewebspülung 2“ wiederholen
5. Gewebe in die Petrischale geben und wiegen
6. Gewebe mit Hilfe der beiden Skalpelle in kleine Stücke zerteilen. Die Stücke sollten eine Größe von 2 x 2 mm oder kleiner aufweisen, dies erleichtert ein Einwirken der Kollagenase Typ IV Arbeitslösung
7. 5 ml der angewärmten Kollagenase Typ IV Arbeitslösung auf das Gewebe geben und für 2 h bei 37 °C inkubieren
8. Kollagenase Typ IV Lösung mit Restgewebe abnehmen und in das Zentrifugenröhrchen geben
9. Bei 300 x g für 5 min zentrifugieren
10. Fettgewebe, welches im Zentrifugen Röhrchen oben schwimmt, mit der Pinzette abnehmen und in die Petrischale geben

11. 6,5 ml angewärmtes Wachstumsmedium in die Petrischale geben,
Kultur bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren
12. Überstand im Zentrifugenröhrchen absaugen, Zellpellet in Wachstumsmedium resuspendieren und in ein Well der 6 Well Platte geben
13. 6 Well Napf mit Wachstumsmedium auf 2 ml auffüllen
14. 6 Well Platten ebenso in den Inkubator stellen
Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂

Nach 16 - 20 h:

15. F-Medium im Wasserbad vorwärmen
16. Wachstumsmedium aus Petrischale sowie 6 Well Napf abpipettieren und
jeweils in ein Zentrifugenröhrchen geben
17. Bei 300 x g für 5 min zentrifugieren
18. Oben schwimmendes Fettgewebe zurück in die Kulturplatte geben,
anschließend Überstand absaugen
19. Zellpellet in F-Medium resuspendieren und in die jeweilige Kulturplatte geben
20. Petrischale mit F-Medium auf 7 ml auffüllen, 6 Well Vertiefung mit F-Medium
auf 2 ml auffüllen
21. Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂

Mediumwechsel mit F-Medium alle 7 Tage oder vorzeitig, sollte der im Medium enthaltene Phenolrot Indikator einen schnellen Nährstoffverbrauch und pH Umschlag anzeigen.

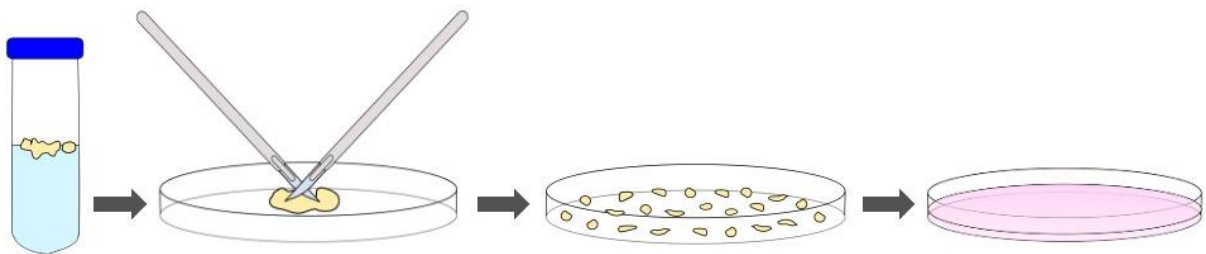


Abbildung 6: Schematische Darstellung: Verarbeitung des Orbita Gewebes

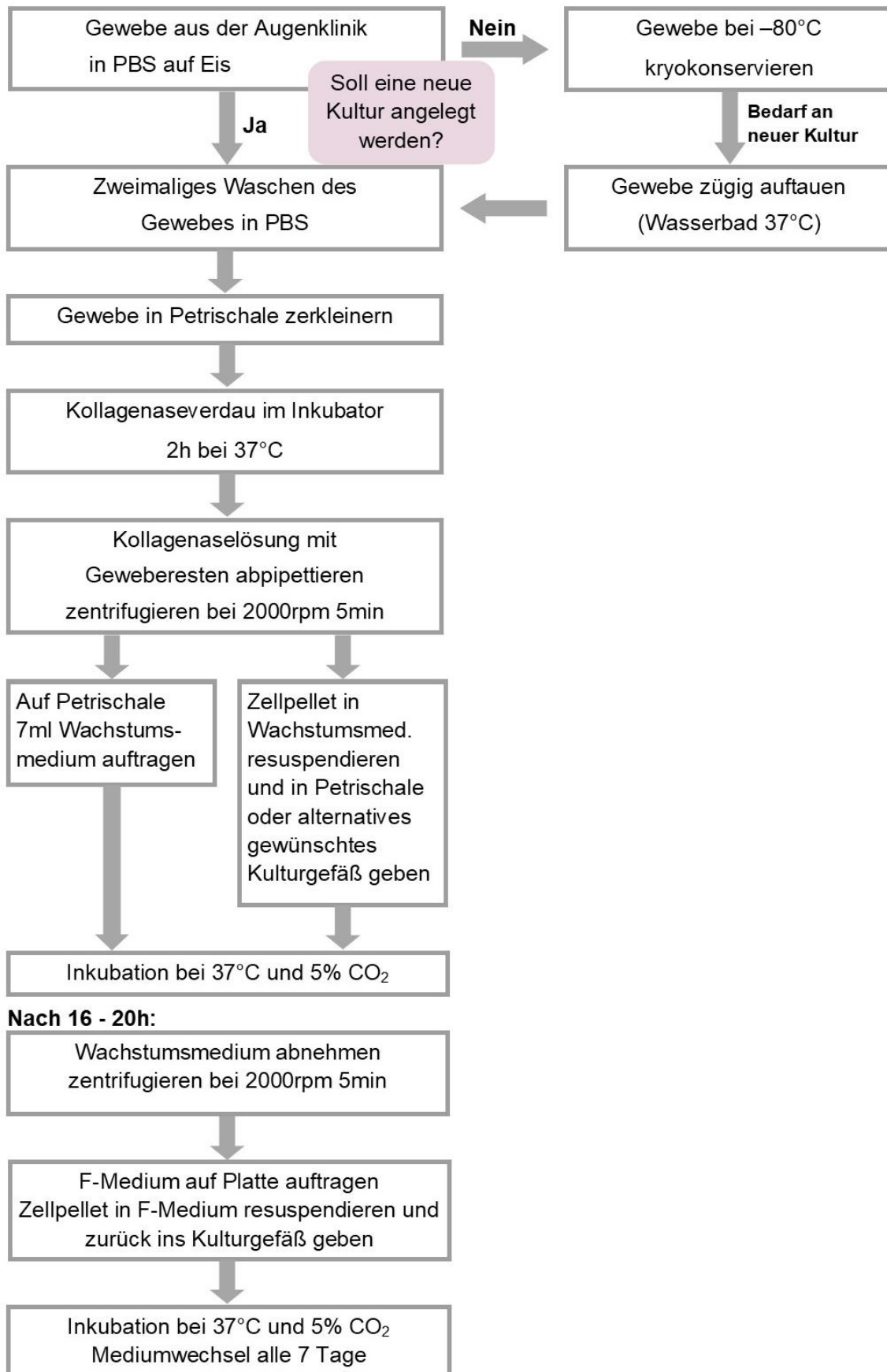


Abbildung 7: Flowchart: Arbeitsschritte beim Anlegen einer Zellkultur

3.3.4. Wachstum der Primärkulturen aus frischem Gewebe

Es wurde die Dauer des Wachstums der Zellen bis zur Konfluenz in Petrischale oder 6 Well Platte dokumentiert. Ebenso wurde die Gewebemenge festgestellt, welche benötigt wird, um eine Kultur erfolgreich anzulegen.

3.3.5. Vergleich: Wachstum von Kulturen aus frischem oder kryokonserviertem Gewebe

Vergleich des Wachstums der Kulturen, welche aus unterschiedlichen Gewebeproben angelegt wurden. Es sollte festgestellt werden, ob Kulturen vornehmlich aus frischem Gewebe angesetzt werden sollten, oder ob es möglich ist ohne Qualitätsverlust gefrorenes Gewebe zu verwenden. Ebenso wurde die Gewebemenge festgestellt, welche benötigt wird, um eine Kultur erfolgreich anzulegen.

Verwendetes Gewebe:

- 5 Kulturen direkt angelegt aus frischem Gewebe
- 5 Kulturen aus über 4 Wochen bei -80 °C kryokonserviertem Gewebe, dabei handelte es sich um die gleichen Gewebeproben aus welchen Kulturen frisch angelegt wurden
- 11 Kulturen aus 2 Jahre bei -80 °C kryokonserviertem Gewebe

3.3.6. Einstellen des Trypsinprotokolls

Es wurde eine Kombination aus Trypsin und EDTA verwendet. Zum Einstellen des Trypsinprotokolls wurde die geringstmögliche Trypsinmenge bestimmt, welche eine vollständige Bedeckung des Kulturgefäßbodens ermöglicht. Es folgte die Inkubation mit steigenden Einwirkzeiten, um für das jeweilige Kulturgefäß die Trypsin Wirkzeit zu ermitteln, nach welcher alle Zellen vom Boden gelöst sind.

3.3.7. Fotodokumentation

Regelmäßige Dokumentation der Kulturen mit Hilfe der Mikroskop Kamera AxioCam Erc 5s, welche verbunden ist mit dem Zeiss Mikroskop, sowie dem Computer und dem Dokumentationsprogramm Zen 3.1 blue.

Besonderes Augenmerk lag auf Morphologie und Entwicklung der Zellen.

Verwendete Vergrößerungsstufen 4-, 10-, 20- und 40-fach (4 x, 10 x, 20 x, 40 x).

3.3.8. Beschichtung der Petrischalen mit Poly-D-Lysin

Verwendete Materialien:

- Basis-Labormaterialien
- Poly-D-Lysin Lösung
- Petrischale 10 cm

Protokoll:

1. Sterile 0,1 mg/ml Poly-D-Lysin herstellen
2. 8 ml Poly-D-Lysin Lösung (1 ml pro 10 cm²) in die Petrischale geben und 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
3. Poly-D-Lysin Lösung absaugen
4. Platte dreimal mit PBS Spülen und direkt im Anschluss verwenden
5. Anlegen der Kultur nach Protokoll (siehe 3.3.3 „Anlegen einer Zellkultur“)

3.3.9. Mediumwechsel

Bei jedem Mediumwechsel musste die Kultur makroskopisch sowie mikroskopisch auf Kontamination kontrolliert werden. Zusätzlich musste die Morphologie der Zellen unter dem Mikroskop begutachtet werden, um eine Veränderung im Wachstum frühzeitig zu erkennen. Vor einem Mediumwechsel musste errechnet werden welche Menge an Medium voraussichtlich benötigt wird und diese in 50 ml Zentrifugenröhrchen abgefüllt werden. Die Zentrifugenröhrchen wurden anschließend im Wasserbad angewärmt. So wurde gewährleistet, dass kein überflüssiges Medium wiederholt aufgewärmt und anschließend wieder abgekühlt wird.

Verwendete Materialien:

- Basis Labormaterialien
- Angewärmtes F-Medium (Wasserbad 37 °C)

Protokoll:

1. Altes Medium mit Hilfe der Pasteurpipette und Vakuumpumpe absaugen
2. Frisches angewärmtes F-Medium langsam am Rand einlaufen lassen

3.3.10. Erstellen einer Subkultur

Eine Subkultur sollte erstellt werden sobald die Fibroblasten im Kulturgefäß 70-80 % Konfluenz aufweisen. Kontrolle des Wachstums erfolgte mit Hilfe des Mikroskops.

Verwendete Materialien:

- Basis-Labormaterialien
- PBS Lösung (6 ml bei Petrischale, 1 ml bei einem Well einer 6 Well Platte)
- Angewärmte Trypsin Lösung: (Wasserbad 37 °C)
 - 3 ml Trypsin Lösung bei Subkultivierung einer Kultur in einer Petrischale
 - 1 ml Trypsin Lösung bei Subkultivierung einer Kultur in einem 6 Well Napf
- zwei neue Kulturgefäße, gleiche Größe wie die zu teilende Kultur
- angewärmtes Wachstumsmedium (Wasserbad 37 °C)
- Angewärmtes F-Medium (Wasserbad 37 °C)

Protokoll:

1. Neue Kulturgefäße eindeutig beschriften mit Patientennummer, Datum und Passagenzahl (P1, P2, ...)
2. Altes Medium mit Hilfe der Vakuumpumpe und Pasteurpipette absaugen
3. PBS Lösung auf die Kultur geben
4. PBS durch leichtes Rotieren der Kulturplatte verteilen
5. PBS Lösung absaugen
6. Trypsin auf die Kultur geben
bei 37 °C inkubieren:
 - 8,5 min: Kulturgefäß in welcher die Kultur angelegt wurde
 - 6 min: Subkultur in einer 6 Well Platte
 - 3 min: Subkultur in einer Petrischale
7. Wachstumsmedium in äquivalenter Menge zur Trypsin Lösung hinzugeben und rotierend vermischen
8. Lösung vollständig abpipettieren und in ein Zentrifugenröhrchen geben
9. Bei 300 x g für 5 min zentrifugieren

10. Handelt es sich bereits um eine Subkultur, so kann die vorherige Platte verworfen werden.

Handelt es sich bei der Platte, welche subkultiviert wurde, um die Platte, in welcher die Kultur angelegt wurde, kann diese weiter kultiviert werden.

Haften noch genügend Zellkonglomerate am Boden der Platte an, können daraus erneut Fibroblasten herauswachsen. Hierzu wieder 7 ml F-Medium auf die Platte geben und bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Inkubator geben

11. Überstand im Zentrifugenröhrchen absaugen

12. Zellpellet in F-Medium resuspendieren und Zellsuspension auf zwei neue Kulturplatten aufteilen. Anschließend Medium auf 7 ml bzw. 2 ml auffüllen

13. Subkulturen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren.

Mediumwechsel oder erneute Subkultivierung nach 7 Tagen, ggf. kann erneute Konfluenz bereits früher erreicht werden.

3.3.11. Kryokonservierung einer Subkultur

Befand sich eine Zellkultur kurz vor dem Erreichen der Konfluenz, sollte aber nicht weiter geteilt und vermehrt werden, wurde diese zur späteren Verwendung in Einfriermedium eingefroren.

Verwendete Materialien:

- Basis-Labormaterialien
- PBS Lösung (6 ml bei Petrischale, 1 ml bei einem Well einer 6 Well Platte)
- Angewärmte Trypsin Lösung: (Wasserbad 37 °C)
3 ml Trypsin Lösung bei Subkultivierung einer Kultur in einer Petrischale
1 ml Trypsin Lösung bei Subkultivierung einer Kultur in einem 6 Well Napf
- angewärmtes F-Medium (Wasserbad 37 °C)
- Angewärmtes Wachstumsmedium (Wasserbad 37 °C)
- Kryovial
- Einfriermedium

Protokoll:

1. Beschriften des Kryoröhrchens mit Patientenummer, Datum, Passagenzahl und Gewebeart („K“ für Kontrolle, „EO“ für Endokrine Orbitopathie)
2. F-Medium mit Hilfe der Vakuumpumpe und Pasteurpipette absaugen
3. PBS Lösung auf die Kultur geben und Platte leicht rotieren
4. PBS Lösung wieder absaugen
Jeweils benötigte Trypsin Lösungsmenge auf die Kultur geben und bei 37 °C inkubieren:
6 min: Subkultur in einer 6 Well Platte
3 min: Subkultur in einer Petrischale
5. Wachstumsmedium in äquivalenter Menge zur Trypsinlösung hinzugeben und durch leichtes Rotieren der Platte vermischen
6. Lösung vollständig abnehmen und in Zentrifugen Röhrchen geben.
7. Bei 300 x g für 5 min zentrifugieren
8. Handelt es sich bei der Platte, welche subkultiviert wurde, um die Platte, in welcher die Kultur angelegt wurde, kann diese weiter kultiviert werden. Haften noch genügend Zellkonglomerate am Boden der Platte an, können daraus erneut Fibroblasten herauswachsen. Hierzu wieder 7 ml F-Medium auf die Platte geben und bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Inkubator geben
9. Überstand im Zentrifugenröhrchen absaugen. Zellpellet in Einfriermedium resuspendieren und in Kryoröhrchen geben. Kryoröhrchen mit Einfriermedium auf 1,8 ml auffüllen und gut verschließen.
10. Kryoröhrchen in die CoolCell Box geben und in die -80 °C Kühltruhe geben
11. Am darauffolgenden Tag Kryoröhrchen bei -80 °C in die Styroporsammelbox geben oder in den flüssigen Stickstofftank überführen

3.3.12. Anlegen einer kryokonservierten Subkultur

Wurde eine Subkultur aus dem gefrorenen Zustand wieder angelegt, war es zum einen wichtig, die Zellen im Einfriermedium zügig aufzutauen und die Zellen mittels Zentrifugation vollständig vom zytotoxischen DMSO zu trennen.

Verwendete Materialien:

- Basis-Labormaterialien
- Neues Kulturgefäß, angepasst an das ursprüngliche der Subkultur
- Angewärmtes Wachstumsmedium (Wasserbad 37 °C)
- Angewärmtes F-Medium (Wasserbad 37 °C)

Protokoll:

1. Kulturgefäß mit Patientenummer, Datum und Passagenummer beschriften
2. Subkultur zügig im Wasserbad auftauen
3. 1 ml angewärmtes Wachstumsmedium in Zentrifugenröhrchen vorlegen
4. Subkultur im Einfriermedium vollständig aus dem Kryoröhrchen heraus pipettieren und in Zentrifugenröhrchen geben, mit Wachstumsmedium mischen
5. Bei 300 x g für 5 min zentrifugieren
6. Überstand mittels Vakuumpumpe und sterilen Pasteurpipetten absaugen
7. Angewärmtes F-Medium in Kulturgefäß geben
8. Zellpellet mit 1 ml F-Medium resuspendieren und in Kulturgefäß geben
9. Inkubieren bei 37 °C und 5 % CO₂

Mediumwechsel oder erneute Subkultivierung nach 7 Tagen, gegebenenfalls kann erneute Konfluenz bereits früher erreicht werden.

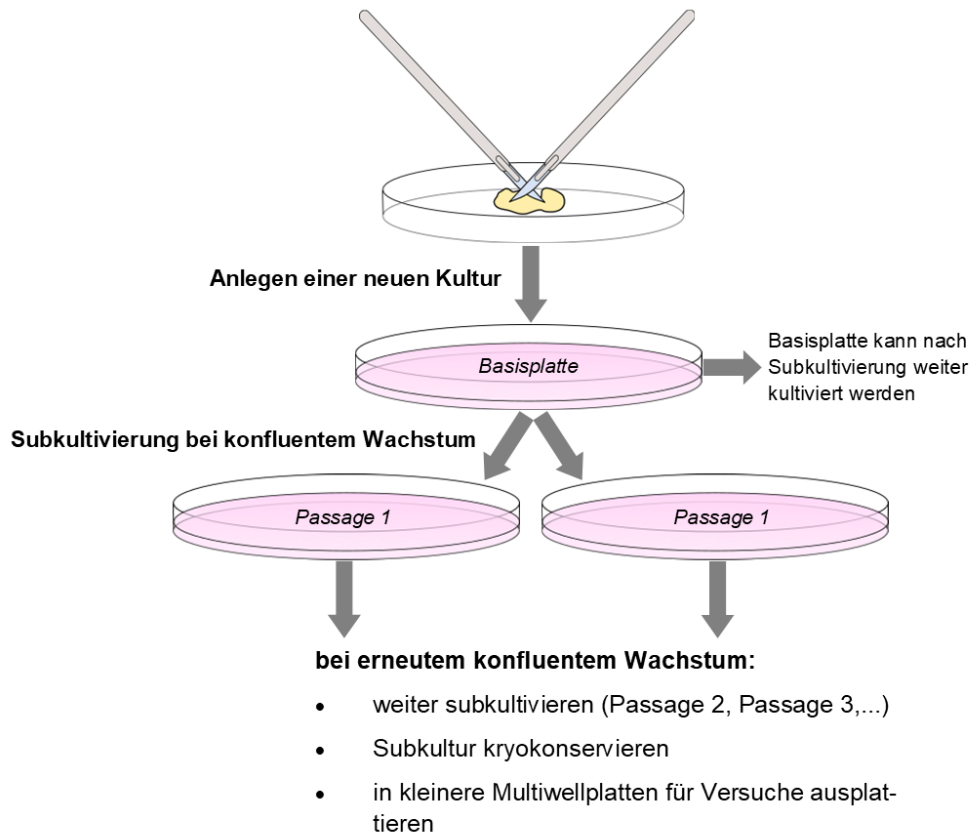


Abbildung 8: Flowchart - Arbeitsabläufe während der Kultivierung der Zellen

3.3.13. Zellzählung

Eine Zellzählung kann maschinell mit Hilfe eines automatischen Zellzählers erfolgen oder manuell mit einer Neubauer Zählkammer. In beiden Fällen wurde zunächst die Zelllösung mit der Farblösung gemischt und anschließend die Zählkammer beschickt. Die Einweg-Zählkammer für den automatischen Zellzähler wurde in das Gerät eingeführt, der Zählmodus (*Brightfield* oder *Floureszenz*) sowie das Zählprotokoll „Fibroblasten“ ausgewählt und der Fokus eingestellt. Die Zellzählung erfolgte automatisch.

Beim Zählen mit der Neubauerkammer wurden nach Beschicken der beiden Kammern in der oberen und unteren Kammer jeweils vier Rechtecke ausgezählt und anschließend die Zellzahl sowie die Vitalität errechnet.

Errechnung der Zellzahl:

Pro Eckquadrat: $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ }\mu\text{l}$

Zellzahl der Eckquadrate addieren und durch Anzahl der ausgezählten Quadrate teilen.

Zellzahl mit 10^4 multiplizieren (=10.000) = Zellzahl pro Milliliter

$$\text{Vitalität in \%} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} * 100$$

Verwendete Materialien:

- Basis Labormaterialien
- Bereits trypsinisierte sowie zentrifugierte Zellkultur
- Ein Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 ml)
- Trypanblau oder Acridinorange/Propidiumjodid Lösung
- Neubauer Zählkammer oder automatisches Zellzählgerät mit Einweg-Zählkammern

Verhältnisse: Farblösung - Zellsuspension

- 10 μl Trypanblau Lösung mit 10 μl Zellsuspension
- 2 μl Acridinorange/Propidiumjodid Lösung mit 18 μl Zellsuspension

Protokoll:

1. In Eppendorf Reaktionsgefäß 10 μl Trypanblau oder 2 μl Acridinorange/Propidiumjodid vorlegen
2. Zellpellet in 1 ml F-Medium resuspendieren
3. Zelllösung mit Pipette durch auf- und abpipettieren gut vermischen
4. Vorgegebene Menge Zelllösung zur vorgelegten Farblösung hinzugeben
5. Zell- und Farblösung durch auf- und abpipettieren gut vermischen
6. Gewünschte Zählkammer beschicken und auslesen
7. Mit der restlichen Zelllösung weiter Verfahren nach Protokoll (siehe 3.3.10 „Erstellen einer Subkultur“ oder 3.3.11 „Kryokonservierung einer Subkultur“)

3.3.14. Oil red O Färbung

Färben der Zellen mit Oil red O (C.I. Solvent red 27) Farbstoff sowie Hematoxylin.

Nach der Färbung wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Mikroskop Kamera Axiocam Erc 5s dokumentiert.

Verwendete Materialien:

- Basis-Labormaterialien
- Zu färbende Zellkultur
- Oil red O Farbstoff
- Isopropylalkohol 99 %
- Isopropylalkohol 60 %
- Hematoxylin
- 10 % neutral gepuffertes Formalin
- Destilliertes Wasser
- Filterpapier
- Mikrotiterplatten-Schüttler

Erstellen der Oil red O Stammlösung:

300 mg Oil red O Farbstoff in 100 ml Isopropylalkohol 99 % lösen

Erstellen der Oil red O Arbeitslösung:

6 ml destilliertes Wasser mit 9 ml Oil red O Stammlösung mischen.

Protokoll:

1. Oil red O Arbeitslösung erstellen und filtern
2. Kulturmedium absaugen und zweimal mit PBS spülen
3. 6 ml Formalin (10 %) auf die Kultur geben, 1 h bei Raumtemperatur inkubieren
4. Formalin (10 %) absaugen und zweimal mit destilliertem Wasser spülen
5. 6 ml Isopropylalkohol (60 %) auf die Kultur geben, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
6. Isopropylalkohol absaugen
7. 6 ml Oil red O Arbeitslösung auf die Kultur geben und auf den Mikrotiterplatten-Schüttler stellen, 10 min inkubieren
8. Oil red O Arbeitslösung absaugen und Kultur fünfmal mit 6 ml destilliertem Wasser spülen
9. 6 ml Hematoxylin Lösung auf die Kultur geben, 3 min bei Raumtemperatur inkubieren
10. Hematoxylin Lösung absaugen und erneut Kultur fünfmal mit destilliertem Wasser spülen
11. Zum Betrachten der Kultur unter dem Mikroskop einen dünnen Film aus destilliertem Wasser auf der Kultur belassen, um ein Austrocknen zu verhindern.

3.3.15. MTT Test

Vergleich der metabolischen Aktivität von Subkulturen, welche unter verschiedenen Bedingungen inkubiert oder erstellt wurden.

Die verwendeten Kulturen wurden in jeweils 3 Wells einer 96 Well Platte mit 8.000 Zellen pro Well ausplattiert. Die Zellen wurden anschließend für 72 h in F-Medium bei 37 °C; 5 % CO₂ inkubiert.

Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Inkubation mit der Farbstoffreagenz wurde DMEM ohne Serumzusatz verwendet.

Bei allen verwendeten Kulturen handelte es sich jeweils um die 2. Passage.

Untersuchte Kulturen:

1. 10 Subkulturen von Kulturen, welche mit frischem Gewebe angelegt wurden
2. 10 Subkulturen von Kulturen, welche mit kryokonserviertem Gewebe angelegt wurden
3. 10 Subkulturen welche für 2 Wochen bei -80 °C kryokonserviert wurden
4. 10 Subkulturen welche für 16 Wochen bei -80 °C kryokonserviert wurden

Für einen Vergleich der Subkulturen untereinander wurde die Stoffwechselaktivität der Subkulturen von Kulturen, welche mit frischem Gewebe angelegt wurden als Kontrolle gewertet.

3.3.16. Wachstum und Stoffwechselaktivität in Medium 199

Vergleich des Wachstums und der Vitalität bei Kultivierung in F-Medium und Medium 199.

Vitalität bei Umstellung von F-Medium auf Medium 199 gemessen mit Trypanblau Färbung. 72 h nach Anlegen der Subkulturen in einer 24 Well Platte, wurde jeweils ein Well pro Kultur, pro Medium ausgezählt und die Zellzahl sowie Vitalität bestimmt.

Gemessene Subkulturen:

- Insg. 24 Wells:
 - 12 Wells mit F-Medium
 - 12 Wells mit Medium 199
- Einsaatdichte 80.000 Zellen pro Well
- Alle gemessenen Subkulturen in Passage 2

Zusätzlich Messung der Stoffwechselaktivität mittels MTT Test nach Mediumwechsel. 10 Subkulturen in Passage 2 wurden jeweils in 6 Wells einer 96 Well Platte mit 8.000 Zellen pro Well ausplattiert. Jeweils 3 Wells pro Kultur wurden anschließend für 72 h in F-Medium oder Medium 199 bei 37 °C; 5 % CO₂ inkubiert.

Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Inkubation mit der Farbstoffreagenz wurde DMEM ohne Serumzusatz verwendet.

Der MTT Test wurde in gleicher Ausführung ein weiteres Mal mit einer Umstellung auf DMEM mit 10 % FBS durchgeführt.

Für einen Vergleich der Subkulturen untereinander wurde die Stoffwechselaktivität der Subkulturen, welche in F-Medium inkubiert wurden als Kontrolle gewertet.

3.3.17. Stoffwechselaktivität nach Stimulation

Vergleich der Stoffwechselaktivität nach Stimulation unter unterschiedlichen Bedingungen. Stoffwechselaktivität wurde mit Hilfe eines MTT Tests bestimmt.

10 Subkulturen in Passage 2 wurden jeweils in 6 Wells einer 96 Well Platte mit 8.000 Zellen pro Well ausplattiert und für 72 h in F-Medium bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen mit 50 ng/ml M22 MAk unter verschiedenen Bedingungen stimuliert.

Stimulationsbedingungen:

- Inkubation in DMEM mit 1 % FBS für 24 h vor Stimulation. Anschließend Stimulation mit 50 ng/ml M22 MAk in DMEM mit 10 % FBS
- Stimulation mit 50 ng/ml M22 MAk in DMEM mit 10 % FBS
- Stimulation mit 50 ng/ml M22 MAk in Thyretain Reaktionspuffer

3.3.18. Mykoplasmentest

Um mögliche Kontaminationen mit Mykoplasmen schnell erkennen und beseitigen zu können wurde ein Testkit erworben. Mit diesem kann routinemäßig, nach Herstellerangaben, im Intervall von drei Monaten oder bei Verdacht auf Kontamination ein Test durchgeführt werden.

3.3.19. Hyaluronsäure Sandwich ELISA Assay

Bei Stimulation des von den orbitalen Fibroblasten exprimierten TSHR, mit M22 MAk, kommt es zur Produktion und Sezernation von Hyaluronsäure. Diese kann mit Hilfe eines Sandwich ELISAs nachgewiesen werden.

Um die idealen Versuchsbedingungen für spätere Stimulationsversuche bestimmen zu können, wurden unterschiedliche Einflussgrößen untersucht.

Untersuchte Faktoren:

- Stimulationszeiten (6 h, 24 h, 48 h)
- M22 MAk Konzentrationen (50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml)
- Kulturen:
 - angelegt aus frischem Gewebe
 - Kultur angelegt aus kryokonserviertem Gewebe
 - Kryokonservierte Subkultur
- In unterschiedlichen Passagen (P3/P4/P5)

Verwendete Materialien:

- Basis Labormaterialien
- Materialien zum Subkultivieren sowie Zählen der Zellen
- Zwei 24 Well Platten pro Kultur und Passage
- Reaktionspuffer (Thyretain, Quidel, CA, USA)
- M22 MAk 10 µg/ml in PBS Stammlösung
- F-Medium
- Eppendorf Reaktionsgefäße zum Sammeln der Überstände
- Hyaluronsäure Sandwich ELISA

Verwendete Stimulationslösungen:

- 50 ng/ml M22 MAk in Reaktionspuffer
- 100 ng/ml M22 MAk in Reaktionspuffer
- 500 ng/ml M22 MAk in Reaktionspuffer

Protokoll:

1. Ausplattieren der Zellen mit 80.000 Zellen pro Well:
 Pro Kultur und Passage jeweils 9 Wells
 Wells am Rand werden aufgrund der erhöhten Verdunstung nicht belegt
2. Zellen in 1 ml F-Medium bei 37 °C; 5 % CO₂ für 72 h inkubieren
3. Herstellen der Stimulationslösungen in den ausgewählten Konzentrationen
4. F-Medium mit Vakuumpumpe und sterilen Pasteurpipetten absaugen
5. Jedes Well dreimal mit 1 ml PBS spülen
6. Jeweils 3 Wells mit 1 ml der gleichen Stimulationslösung befüllen
7. Überstand der 3 Stimulationslösungen nach 6 h, 24 h, 48 h abnehmen und in einem beschriftetem Eppendorf Reaktionsgefäß bei -20 °C einfrieren.
8. Sobald alle Proben vorliegen, Proben auftauen und Assay nach Herstellerangaben durchführen

Tabelle 10: Versuchsplan für die Untersuchung des Einflusses der ausgewählten Faktoren auf die HA Sezernation

| | | Konzentrationen von M22 MAk | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|------|-----------------------------|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|
| | | 50 ng/ml | | | | | 100 ng/ml | | | | | 500 ng/ml | | | | |
| | | K1 | K2 | K3 | K4 | SK | K1 | K2 | K3 | K4 | SK | K1 | K2 | K3 | K4 | SK |
| Stimulationszeit | 6 h | P3 | P3 | P3 | x | P3 | P3 | P3 | P3 | x | P3 | P3 | P3 | P3 | x | x |
| | | P4 | x | x | x | x | P4 | x | x | x | x | P4 | x | x | x | x |
| | | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| | 24 h | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | x |
| | | P4 | P4 | P4 | P4 | x | P4 | P4 | P4 | P4 | x | P4 | P4 | P4 | P4 | x |
| | | P5 | P5 | P5 | x | x | P5 | P5 | P5 | x | x | P5 | P5 | P5 | x | x |
| | 48 h | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | P3 | x |
| | | P4 | P4 | P4 | P4 | x | P4 | P4 | P4 | P4 | x | P4 | P4 | P4 | P4 | x |
| | | P5 | P5 | P5 | x | x | P5 | P5 | P5 | x | x | P5 | P5 | P5 | x | x |

K1 (Kultur 1), K2 (Kultur 2) sowie K3 (Kultur 3) wurden aus frischem Gewebe angelegt

K4 (Kultur 4) wurde aus Gewebe angelegt, welches über 2 Jahre kryokonserviert wurde

SK (Subkultur) ist eine Subkultur von Kultur 1, welche für 4 Wochen bei -80 °C kryokonserviert wurde

P3/4/5 = Passagen 3, 4 und 5

3.4. Auswertung

Statistische Auswertung der Daten erfolgte in Absprache mit Herrn Kuchen im Rahmen der biometrischen Beratung des Instituts für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Universitätsmedizin Mainz.

Verwendete Programme:

SPSS Software Version 26

Die Signifikanz von Proben gleicher Patienten wurden mit dem Wilcoxon Test überprüft. Bei Kulturen aus Gewebe unterschiedlicher Patienten erfolgte der Test mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests.

Wertetabellen zu Boxplotgraphen befinden sich im Anhang.

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden Kulturgefäße, in welchen aus Gewebeexplantaten eine neue Kultur angelegt wurde, als Basisplatten bezeichnet.

4.1. Wachstumsverhalten

Für das F-Medium wird eine CO₂ Konzentration von 7 % CO₂ empfohlen. Bei 5 % CO₂ inkubierte Kulturen zeigten jedoch keinen Unterschied im Wachstumsverhalten, sofern die Kulturen in der jeweiligen CO₂ Konzentration angelegt wurden. Fand ein Wechsel der Kulturen von 5 % auf 7 % oder entgegengesetzt statt, zeigte sich ein deutlich reduziertes Wachstum. Um bei möglichem Geräteausfall ein Ersatzgerät zu besitzen wurde die CO₂ Konzentration in beiden Inkubatoren auf 5 % herabgesetzt. Anpassung des 5 % CO₂ Inkubators an das höhere CO₂ Niveau war nicht möglich, da andere im Labor kultivierte Zellen 5 % CO₂ benötigen.

Generell zeigte sich beim Anlegen einer Kultur, dass zu Beginn Zellkonglomerate und Fettzellen am Kulturgefäßboden anhafteten, aus denen die Fibroblasten herauswuchsen. Diese besiedelten im Folgenden den gesamten Boden des Kulturgefäßes.

4.1.1. Wachstumsgeschwindigkeit in Basisplatten - Kulturen aus frischem Gewebe

Es wurde die Zeit dokumentiert, welche die Fibroblasten benötigten, um aus den Zellkonglomeraten herauszuwachsen und den Boden des Kulturgefäßes konfluent zu bewachsen.

Tabelle 11: Wachstumsgeschwindigkeit in Basisplatten frischer Gewebeprouen
Vergleich: Wachstum in Petrischalen gegen Wachstum in 6 Well Platten bis zu konfluenter Besiedelung des Kulturgefäßbodens

| Zeit [Tag] | relative Häufigkeit | |
|------------|---------------------|--------------------------|
| | Petrischale | Well einer 6 Well Platte |
| 21 | 13,3 % | 0 % |
| 24 | 6,7 % | 0 % |
| 28 | 26,7 % | 26,7 % |
| 35 | 26,7 % | 53,3 % |
| 42 | 0 % | 20 % |
| 49 | 26,7 % | 0 % |
| Mittelwert | 34,27 Tage | 34,46 Tage |
| insgesamt | 15 Kulturen | 13 Kulturen |

Bei den betrachteten Kulturen handelte es sich um Gewebe der gleichen Patienten, jeweils in Petrischalen und 6 Well Platten. Es konnte kein signifikanter ($p=0,20$) Unterschied bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt werden.

Da bei Subkultivierung nur die Fibroblasten, nicht aber die Fettzellkonglomerate vom Kulturgefäßboden abgelöst werden, können die Basisplatten weiter kultiviert werden. Im Folgenden wachsen aus den Zellkonglomeraten erneut Fibroblasten heraus. Diese können bei erneuter Konfluenz wieder subkultiviert werden.

Kam es nicht zu deutlichen Zeichen der Zellerterung oder Kontamination konnten in jedem Fall bis zu drei Subkultivierungen mit der Basisplatte durchgeführt werden.

Erneut subkultivierte Zellen wiesen Morphologie sowie Wachstum einer frischen Passage 1 auf.

4.1.2. Wachstumsgeschwindigkeit der Subkulturen aus frischem Gewebe

Es wurde die Zeit dokumentiert, welche die Fibroblasten benötigten, um nach Teilung der Zellen auf neue Kulturgefäße, erneut konfluentes Wachstum zu erreichen.

Tabelle 12: Wachstumsgeschwindigkeit der Subkulturen
Vergleich: Wachstum in Petrischalen gegen Wachstum in 6 Well Platten bis zu konfluenter Besiedelung des Kulturgefäßbodens

| Zeit [Tage] | relative Häufigkeit | |
|-------------|---------------------|--------------------------|
| | Petrischale | Well einer 6 Well Platte |
| 5 | 25 % | 0 % |
| 7 | 46,6 % | 71,1 % |
| 10 | 20,5 % | 5,3 % |
| 12 | 8 % | 0 % |
| 14 | 0 % | 23,7 % |
| Mittelwert | 7,51 Tage | 8,82 Tage |
| insgesamt | 88 Kulturen | 38 Kulturen |

Es treten signifikant ($p=0,017$) längere Wachstumsintervalle bei Subkulturen in 6 Well Platten auf. Langsam wachsende Kulturen wurden verworfen und nicht für weitergehende Versuche verwendet, weshalb deutlich mehr Subkulturen in Petrischalen erstellt wurden.

Aufgrund der spätestens in Passage 12 auftretenden Anzeichen für Zellalterung wurden keine Passagen über 12 erstellt. In 6 Well Platten konnten keine höheren Passagen als Passage 6 erstellt werden.

Subkulturen, welche für Versuche in kleinere Wells ausplattiert wurden, zeigten bei allen Versuchen in 96 Well und in 24 Well Platten nach 72 h konfluentes Wachstum.

4.1.3. Wachstumsgeschwindigkeit in Basisplatten - Kulturen aus kryokonserviertem Gewebe

Es wurden Kulturen aus Gewebe angelegt, welches vier Wochen, drei Monate oder zwei Jahre bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert wurde. Es wurde die Zeit dokumentiert, welche die Fibroblasten benötigten, um aus den Zellkonglomeraten herauszuwachsen und den Boden des Kulturgefäßes konfluent zu bewachsen.

Tabelle 13: Wachstumsgeschwindigkeit in Basisplatten kryokonservierter Gewebeproben
Zeit von Beginn der Kultur bis zu konfluenter Besiedelung des Kulturgefäßbodens

| Zeit [Tage] | relative Häufigkeit |
|-------------|---------------------|
| 28 | 11,1 % |
| 35 | 44,4 % |
| 42 | 11,1 % |
| 49 | 33,3 % |
| Mittelwert | 39,67 Tage |
| insgesamt | 18 Kulturen |

Gewebeproben von fünf Patienten wurden direkt nach Operation verarbeitet und Kulturen aus den frischen Gewebeproben angelegt. Aufgrund der Menge des erhaltenen Gewebes konnte der überschüssige Anteil bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden. Nach vier Wochen Kryokonservierung wurden diese Gewebeproben aufgetaut und erneut eine Kultur erstellt.

Bei den frischen sowie den kryokonservierten Proben wurde die Zeit dokumentiert, welche die Fibroblasten benötigten, um aus den Zellkonglomeraten herauszuwachsen und den Boden des Kulturgefäßes konfluent zu bewachsen.

Bei vier dieser Kulturen benötigten die gefrorenen Gewebeproben länger bis zu konfluentem Fibroblastenwachstum. Bei Kultur fünf benötigte das frische Gewebeexplantat zwei Wochen länger, um konfluentes Fibroblastenwachstum zu erreichen. Es zeigt sich kein signifikanter ($p=0,13$) Unterschied in der Anwachs-geschwindigkeit.

Tabelle 14: Mittlere Anwachs-geschwindigkeit - frisches gegen kryokonserviertes Gewebe
Vergleich gleicher Gewebeproben

| | Frisches Gewebe | Kryokonserviertes Gewebe |
|------------|-----------------|--------------------------|
| Mittelwert | 30,8 Tage | 44,8 Tage |

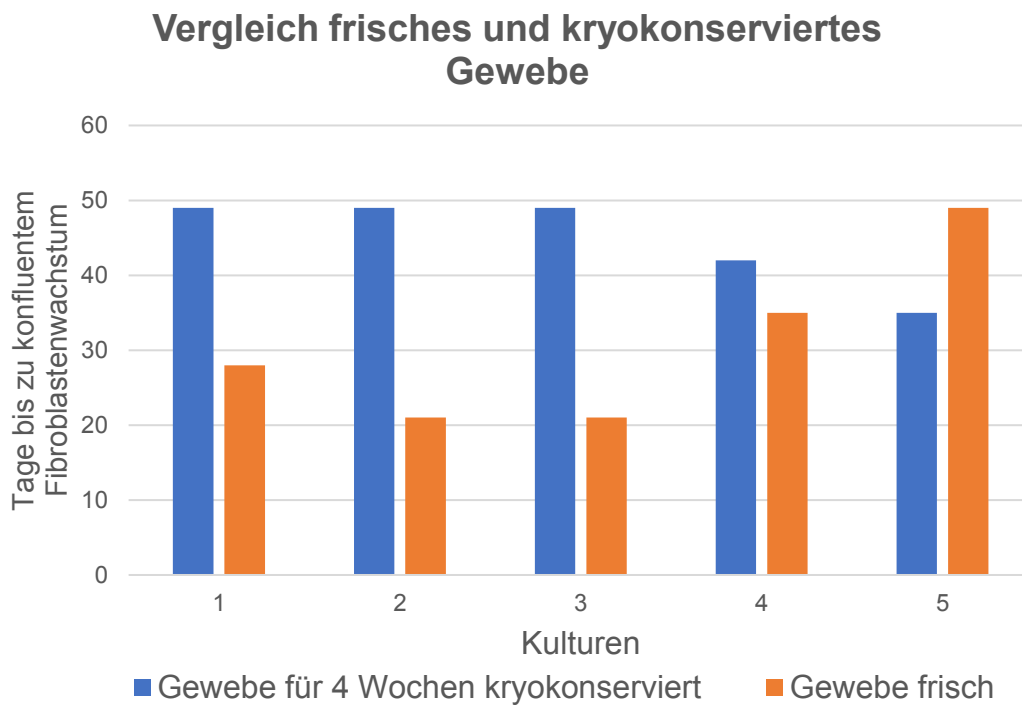


Abbildung 9: Vergleich von frischem und kryokonserviertem Gewebe gleicher Gewebeproben

Vergleicht man die Wachstumsgeschwindigkeiten aller Kulturen, aus frischem Gewebe mit denen von kryokonserviertem Gewebe, zeigt sich ein signifikanter ($p=0,024$) Unterschied in der Anwachsgeschwindigkeit.

Bei den betrachteten Kulturen aus kryokonserviertem Gewebe handelt es sich um:
 4 Kulturen aus Gewebe, welches drei Monate kryokonserviert wurde
 9 Kulturen aus Gewebe welches zwei Jahre kryokonserviert wurde.

Subkulturen, der Kulturen aus kryokonserviertem Gewebe, wiesen weder morphologisch noch bei der Wachstumsgeschwindigkeit Unterschiede auf.

Tabelle 15: Mittlere Anwachsgeschwindigkeit - frisches gegen kryokonserviertes Gewebe
 Vergleich aller Gewebeproben

| | Frisches Gewebe | Kryokonserviertes Gewebe |
|------------|-----------------|--------------------------|
| Mittelwert | 34,35 Tage | 39,67 Tage |

4.1.4. Vergleich: Stoffwechselaktivität der Subkulturen

In einem MTT Assay wurde die Stoffwechselaktivität unterschiedlicher Subkulturen bestimmt. Verglichen wurde die Stoffwechselaktivität der Subkulturen von Kulturen aus frischem oder gefrorenem Gewebe. Je höher die Lichtabsorption, desto höher die Stoffwechselaktivität

Bei den für das MTT Assay ausgewählten Subkulturen zeigte sich eine höhere Stoffwechselaktivität der Subkulturen von Kulturen, welche aus kryokonserviertem Gewebe angelegt wurden. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,053$).

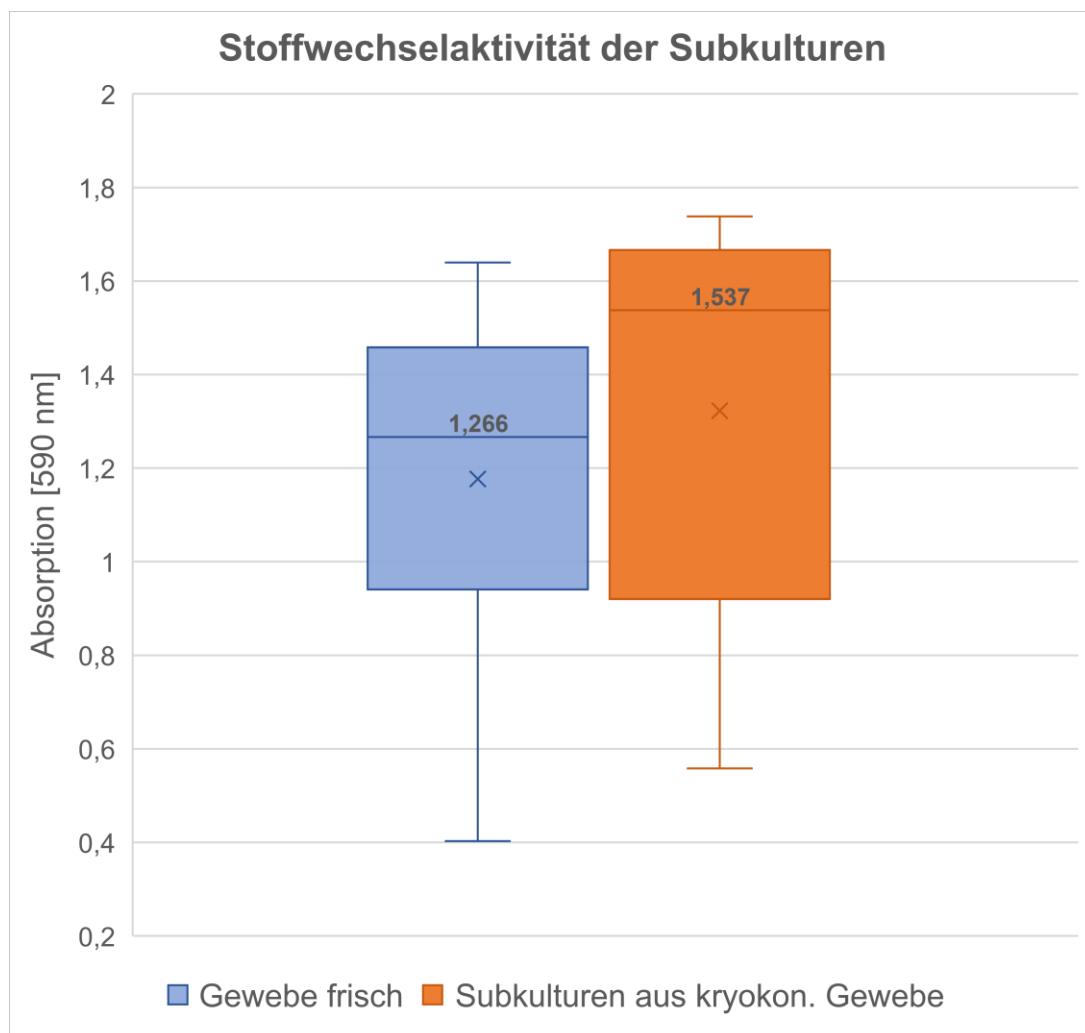


Abbildung 10: Stoffwechselaktivität der Subkulturen von Kulturen aus frischem oder kryokonserviertem Gewebe
Median über dem grafischen Element

4.1.5. Nicht erfolgreich angewachsene Kulturen

Nicht in allen Fällen konnte ein erfolgreiches Zellwachstum erreicht werden.

In den Fällen, in denen kein eindeutiger Grund ausgemacht werden konnte, weswegen die Kulturen nicht erfolgreich angewachsen sind, handelte es sich vermutlich um zu geringe Gewebemengen. Dieses Problem trat nur bei kryokonservierten Gewebeproben auf.

In diesen Fällen lagerten sich ausschließlich Fettzellen am Boden der Kulturplatte ab. Es fanden sich jedoch auch nach mehreren Wochen keine Fibroblasten im Kulturgefäß. Die Fettzellen zeigten deutlich zerfurchte Zellmembranen und in den weiteren Wochen keine morphologischen Veränderungen. Im Vergleich hierzu zeigte sich ein bakterieller Befall der Kultur bereits am Tag nach Anlegen der Kultur. Das Medium war trüb mit einem deutlichem pH-Wert Abfall.

Auch wenn kein Unterschied in der Anwachsengeschwindigkeit zwischen Kulturen in Petrischalen oder 6 Well Platten festgestellt werden konnte, zeigte sich doch, dass zwei Kulturen unter den gleichen Bedingungen in einer 6 Well Platte nicht angewachsen sind.

Tabelle 16: Kulturen bei welchen kein erfolgreiches Wachstum erreicht werden konnte

| | Nicht erfolgreich angewachsen |
|--|-------------------------------|
| Bakterielle Kontamination nach Anlegen | 2 |
| Unbekannter Grund | 8 |
| In Petrischale erfolgreich angewachsen aber nicht in 6 Well Platte | 2 |
| Insgesamt | 12 |
| Anteil aller angelegten Kulturen (n=56) | 21,43 % |

4.1.6. Verwendete Gewebemengen

Vor dem Kollagenaseverdau wurde die Gewebemenge bestimmt mit welcher eine Kultur angelegt wurde.

Alle Kulturen aus frischem Gewebe wuchsen erfolgreich an. Bei frischen Proben wurden Gewebemengen von 0,2 – 0,67 g verwendet.

Es zeigte sich ein wahrscheinlicherer Misserfolg beim Anlegen einer Kultur, wenn weniger Gewebe verwendet wurde. Nur wenn dieses Gewebe vorher kryokonserviert wurde. Jedoch wuchsen auch geringe Mengen zuvor gefrorenen Gewebes erfolgreich an.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Zeit bis zum Anwachsen der Kultur mit größeren oder geringeren Gewebemengen festgestellt werden.

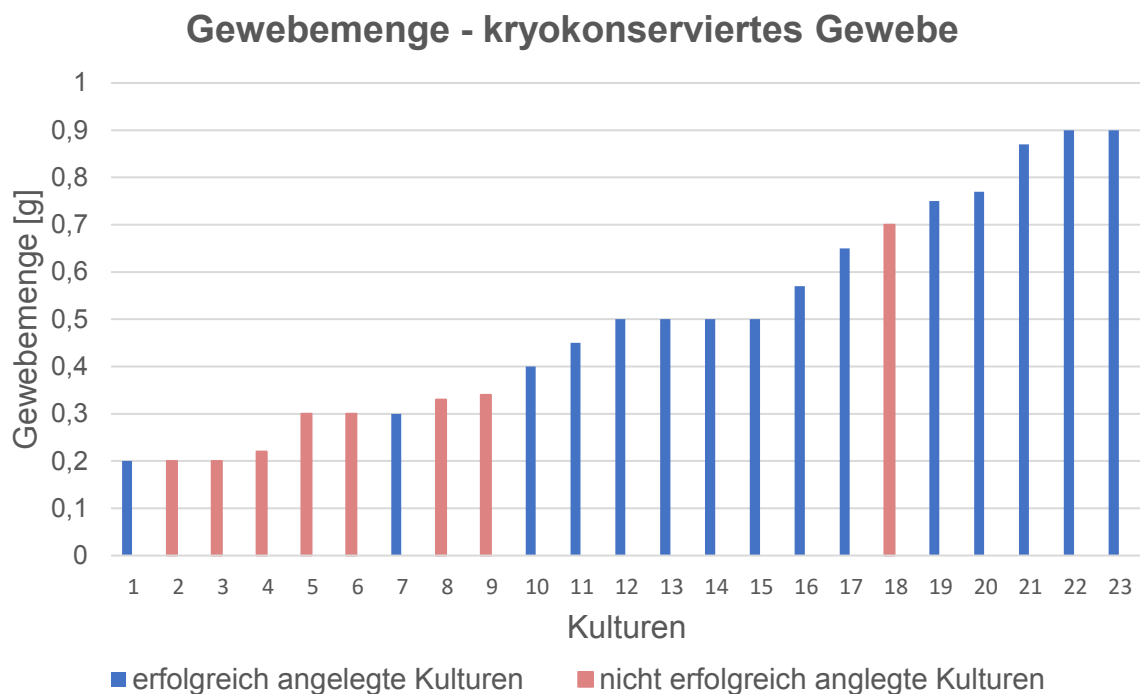


Abbildung 11: Verwendete Gewebemenge in Gramm [g] beim Anlegen einer neuen Kultur mit kryokonserviertem Gewebe

Mit Bezug zu erfolgreichem oder nicht erfolgreichem Wachstum der jeweiligen Kultur. Es handelt sich um 23 verschiedene Gewebeproben

4.1.7. Beschichtung der Platten mit Poly-D-Lysin

Es wurden jeweils zehn Kulturen in beschichteten, sowie unbeschichteten Petrischalen angelegt. Fünf Kulturen aus frischem Gewebe sowie fünf Kulturen aus zwei Jahre bei -80 °C kryokonserviertem Gewebe. Bei keiner der zehn untersuchten Zellkulturen konnten Unterschiede in Wachstum oder Morphologie festgestellt werden.

4.1.8. Anlegen kryokonservierter Subkulturen

Es wurden 20 kryokonservierte Subkulturen angelegt. 70 % der Kulturen zeigten nach 72 h konfluentes Fibroblastenwachstum. Über der konfluenten Zellschicht konnten viele abgestorbene Zellen beobachtet werden.

4.1.9. Stoffwechselaktivität kryokonservierter Subkulturen

In einem MTT Assay wurde die Stoffwechselaktivität verschiedener Subkulturen bestimmt. Verglichen wurde die Stoffwechselaktivität von Subkulturen, welche über 4 bzw. 16 Wochen oder gar nicht kryokonserviert wurden. Je höher die Lichtabsorption, desto höher die Stoffwechselaktivität.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Stoffwechselaktivität der untersuchten Subkulturen festgestellt werden.

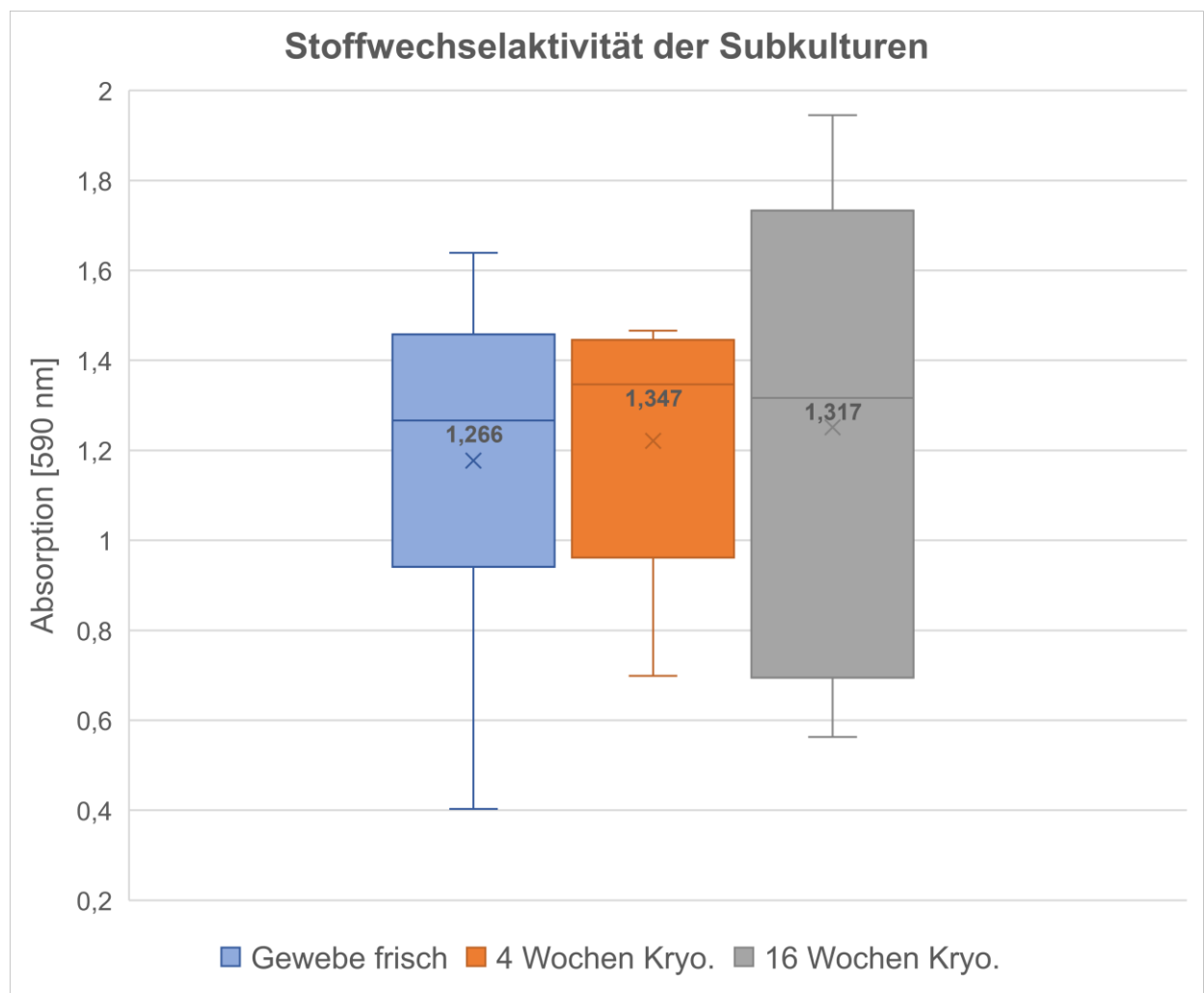


Abbildung 12: Stoffwechselaktivität der Subkulturen ohne und mit Kryokonservierung
Median über dem grafischen Element

4.2. Fotodokumentation

Die folgenden Abbildungen zeigen unterschiedliche Fibroblasten Kulturen aus Patientengewebe. In unterschiedlichen Stadien, welche für alle Kulturen als repräsentativ angesehen werden können.

4.2.1. Anwachsen einer Kultur aus frischem Gewebe

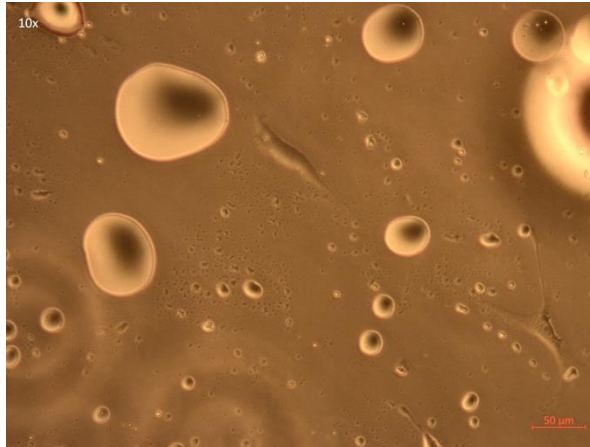


Abbildung 13: Kultur nach 1 Woche: Fettzellen, sowie vereinzelt erste Fibroblasten in der Petrischale sichtbar (10x)



Abbildung 14: Kultur nach 1 Woche: unterschiedliche Morphologien bei Fettzellen in der Petrischale, zerrufte Zellen zeigen im weiteren Verlauf kein Wachstum (10x)

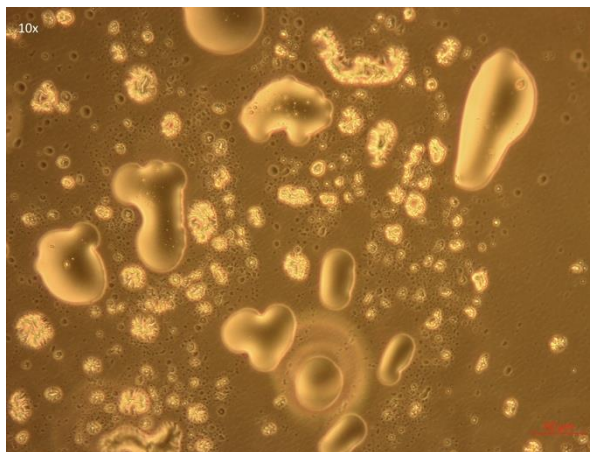


Abbildung 15: Kultur nach 1 Woche: unterschiedliche Morphologien bei Fettzellen in der Petrischale, zerrufte Zellen zeigen im weiteren Verlauf kein Wachstum (10x)



Abbildung 16: Kultur nach 1 Woche: Fettzellen, sowie vereinzelt erste Fibroblasten in der Petrischale sichtbar (4x)

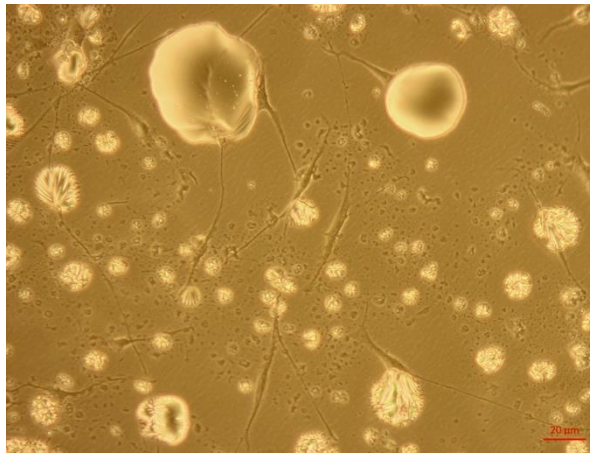


Abbildung 17: Kultur nach 2 Wochen: Fettzellen sowie Fibroblasten in der Petrischale sichtbar (10x)

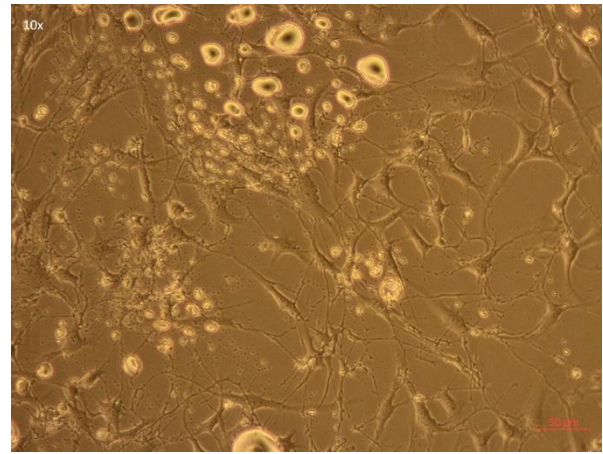


Abbildung 18: Kultur nach 2 Wochen: teilweise bereits dichteres Fibroblasten Wachstum in der Petrischale (10x)

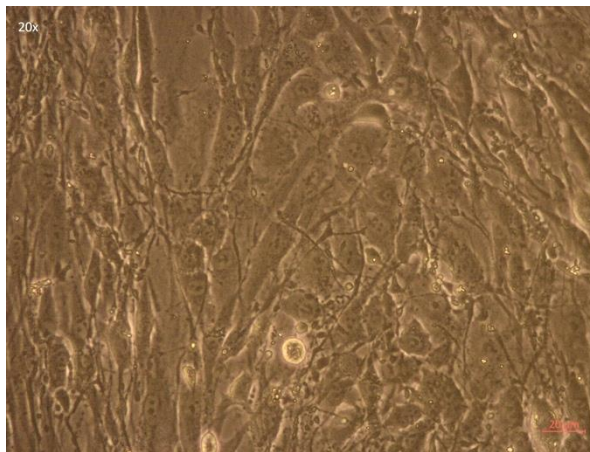


Abbildung 19: Kultur in 6 Well Platte nach 2 Wochen: teilweise bereits konfluentes Wachstum (20x)

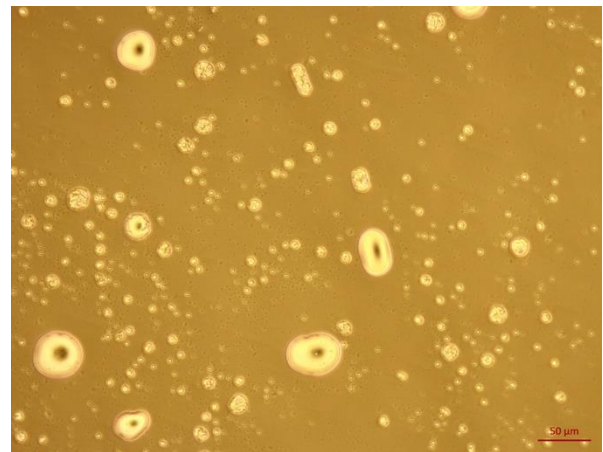


Abbildung 20: Kultur in 6 Well Platte nach 2 Wochen: es bestehen noch vollständig unbewachsene Bereiche (4x)

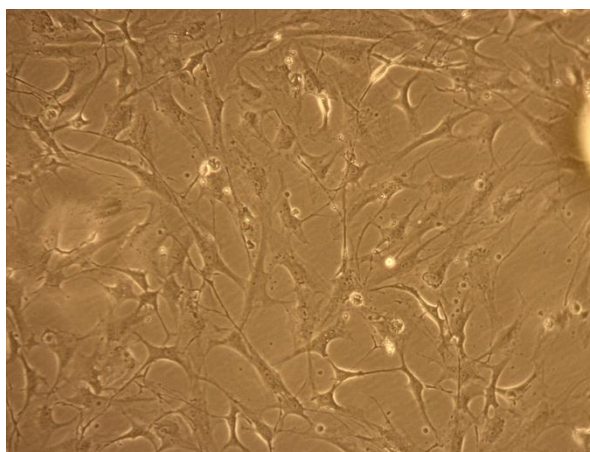


Abbildung 21: Kultur in Petrischale nach 3 Wochen: dichteres Fibroblasten Wachstum sichtbar (10x)

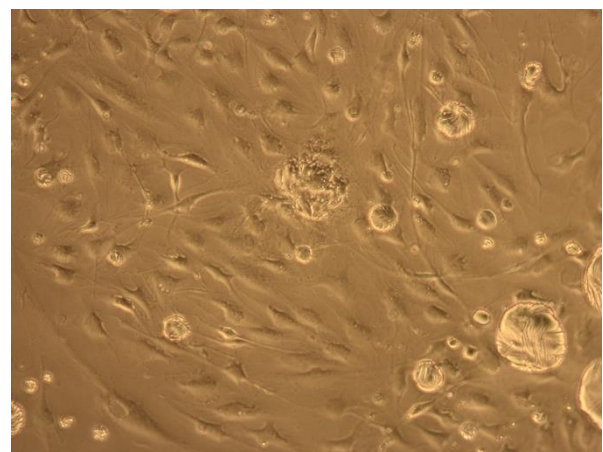


Abbildung 22: Kultur in Petrischale nach 3 Wochen: dichteres Fibroblasten Wachstum sichtbar (10x)

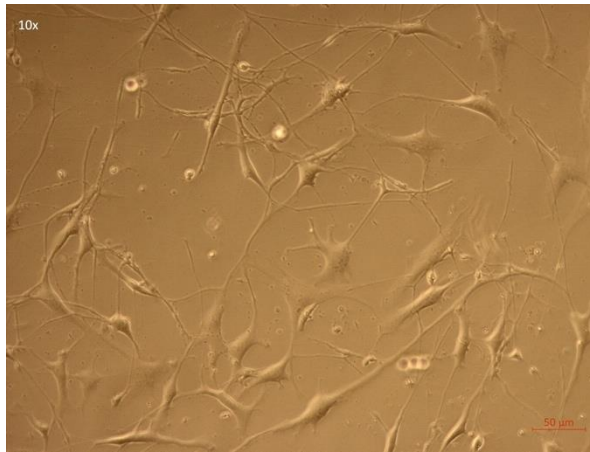


Abbildung 23: Kultur in 6 Well Platte nach 3 Wochen: gleichmäßiges Fibroblastenwachstum (10x)

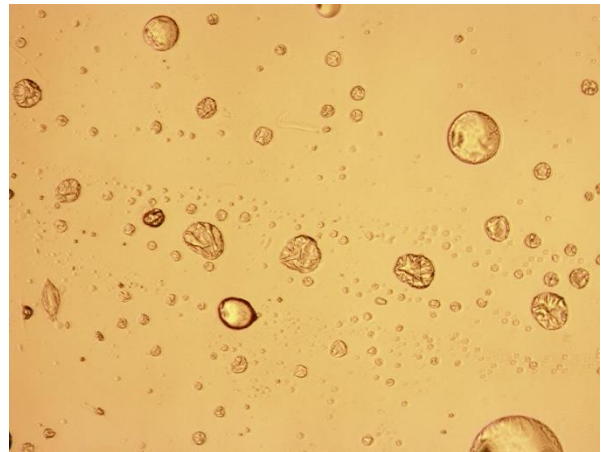


Abbildung 24: Kultur in 6 Well Platte nach 3 Wochen: nicht alle Kulturen wachsen gleichmäßig wie in Abb. 21, teilweise noch leere Bereiche (4x)

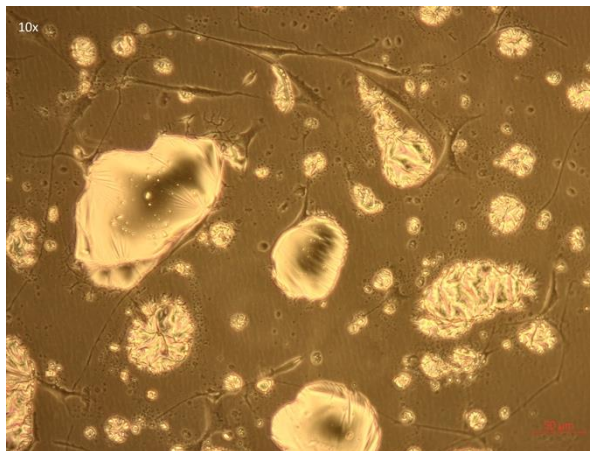


Abbildung 25: Kultur in Petrischale nach 3 Wochen: ebenso wie in 6 Well Platten finden sich auch hier nach drei Wochen unbewachsene Bereiche in der Platte (10x)



Abbildung 26: Kultur in Petrischale nach 3 Wochen: ebenso wie in 6 Well Platten finden sich auch hier nach 3 Wochen unbewachsene Bereiche in der Platte (10x)

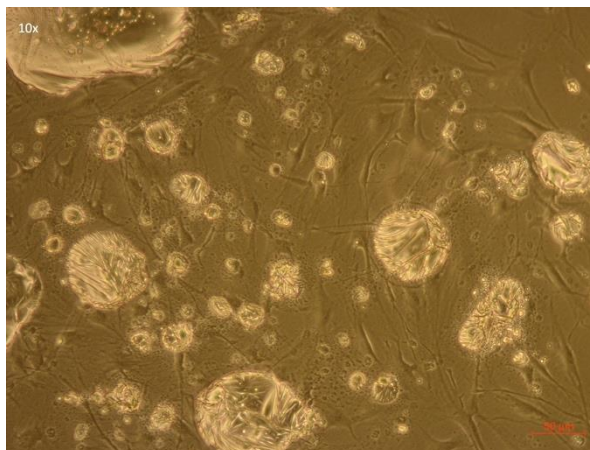


Abbildung 27: Kultur in Petrischale nach 4 Wochen: wenn eine Kultur erfolgreich anwächst sind nach vier Wochen alle Bereiche bewachsen (10x)

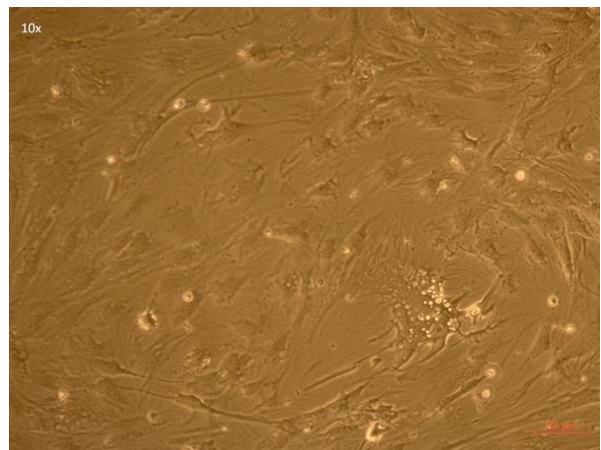


Abbildung 28: Kultur in 6 Well Platte nach 4 Wochen: auch hier zeigt sich wie in Abb. 26 regelmäßiges Zellwachstum (10x)

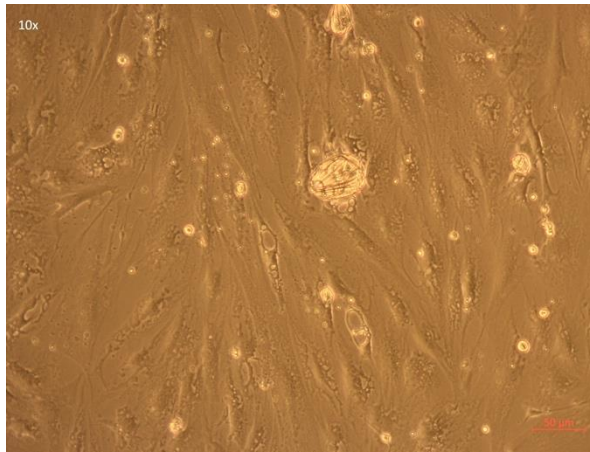


Abbildung 29: Kultur in 6 Well Platte nach 4 Wochen: gleichmäßiges Fibroblasten Wachstum (10x)

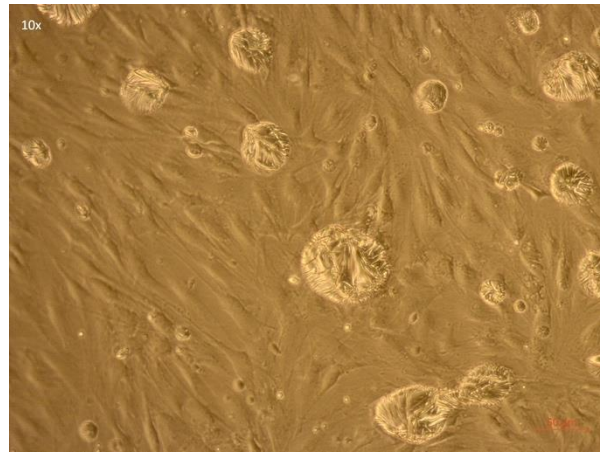


Abbildung 30: Kultur in Petrischale nach 4 Wochen: gleichmäßiges Fibroblasten Wachstum (10x)

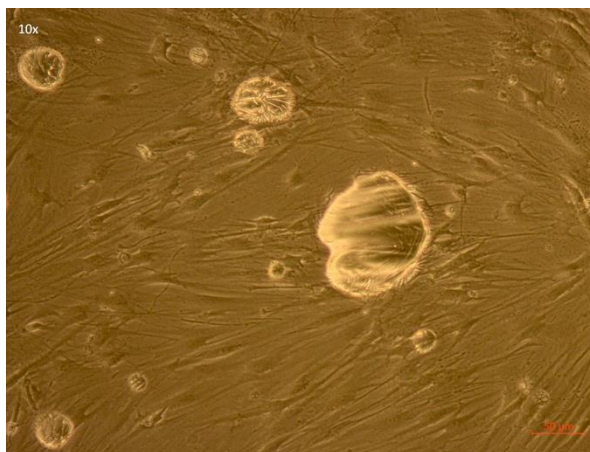


Abbildung 31: Kultur in Petrischale nach 5 Wochen: in der Regel gleichmäßiges konstantes Fibroblasten Wachstum sichtbar (10x)

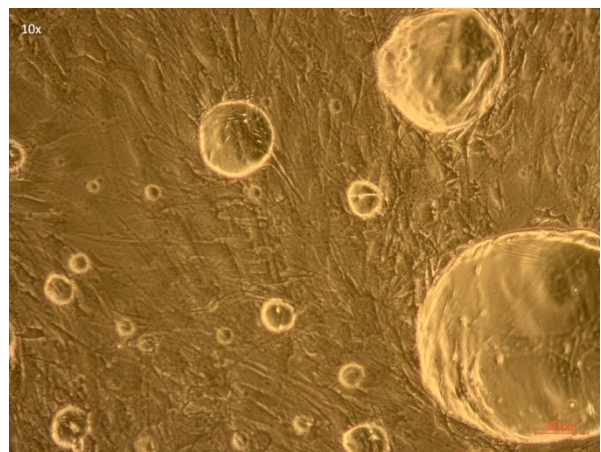


Abbildung 32: Kultur in Petrischale nach 5 Wochen: bereits konfluentes Wachstum in diesem Bereich der Platte sichtbar (10x)

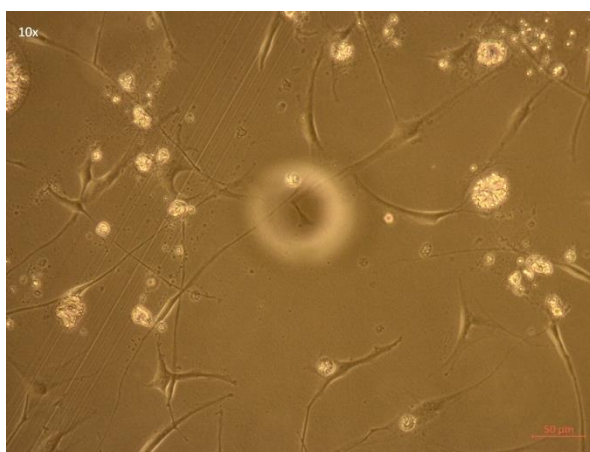


Abbildung 33: Kultur in Petrischale nach 5 Wochen: nicht in jeder Kultur findet sich nach 5 Wochen in der gesamten Platte eine konfluente Besiedelung mit Fibroblasten (10x)

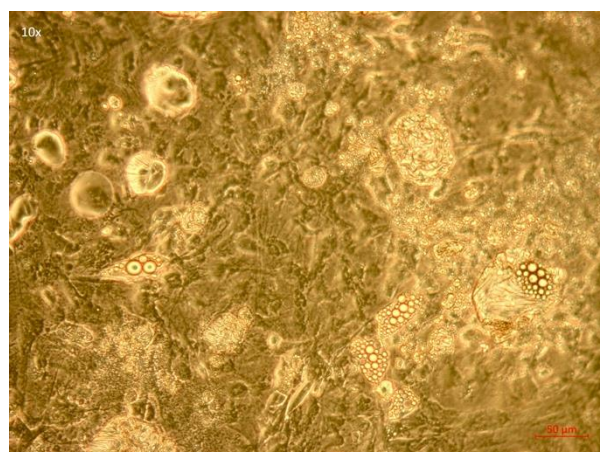


Abbildung 34: Kultur in Petrischale nach 5 Wochen: konfluentes Wachstum sowie Präadipozyten sichtbar (10x)

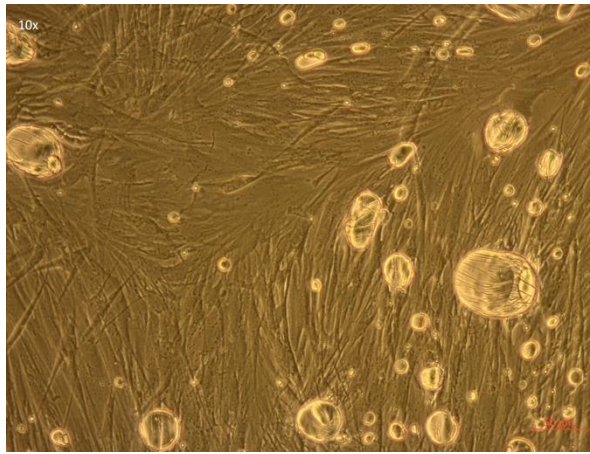


Abbildung 35: Kultur in Petrischale nach 5 Wochen: konfluentes Fibroblasten Wachstum sichtbar (10x)

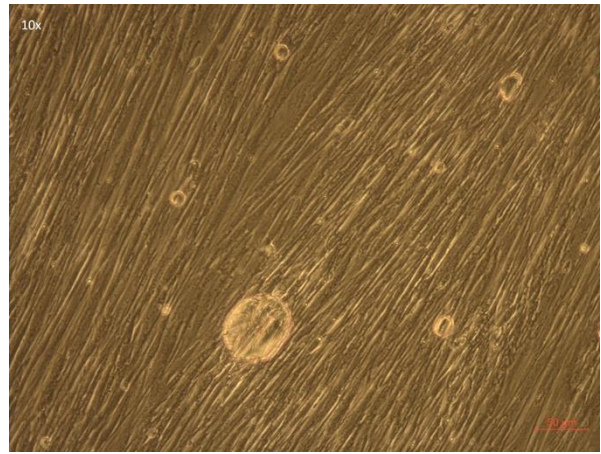


Abbildung 36: Kultur in Petrischale nach 5 Wochen: konfluentes Fibroblasten Wachstum sichtbar (10x)

4.2.2. Vergleich: Kultur aus frischem Gewebe versus kryokonserviertem Gewebe

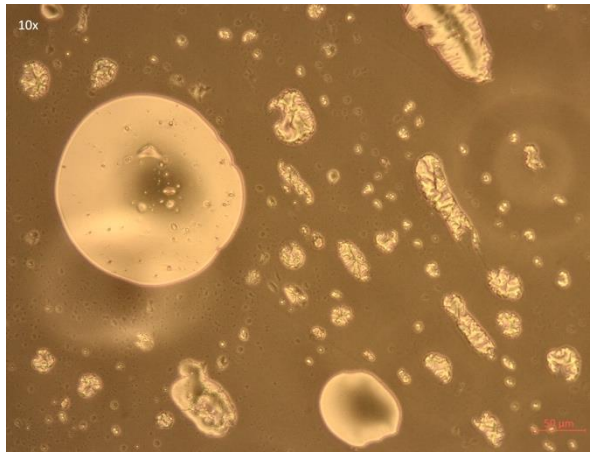


Abbildung 37: Kultur aus kryo. Gewebe nach 1 Woche: viele Zellmembranen der Fettzellen sind zerfurcht; diese Zellen weisen im weiteren Verlauf keine Vitalitätszeichen auf (10x)

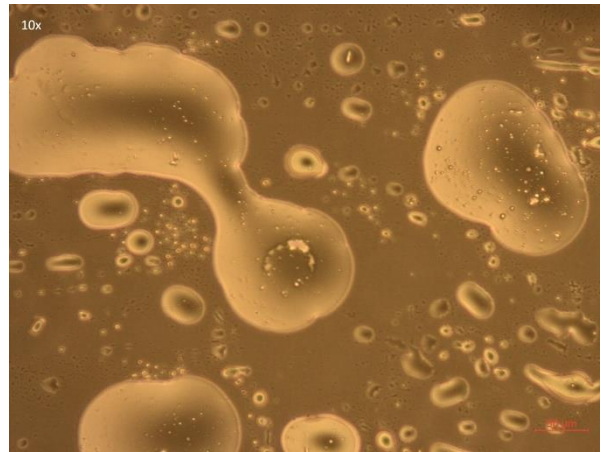


Abbildung 38: Vergleich: Kultur aus frischem Gewebe nach 1 Woche: viele vitale Fettzellen sichtbar (10x)

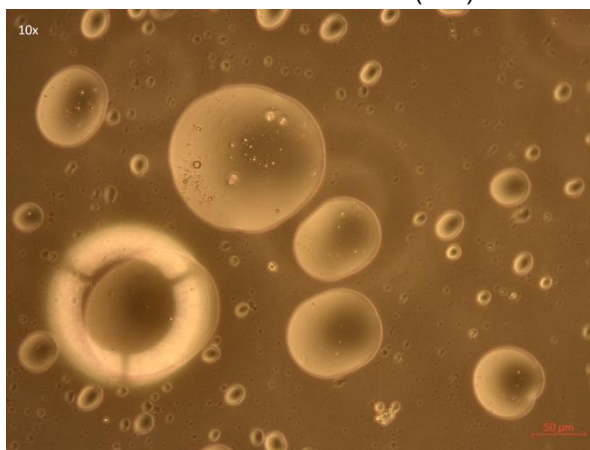


Abbildung 39: Kultur aus kryo. Gewebe nach 1 Woche: nicht alle Kulturen weisen die Menge an beschädigten Fettzellen aus wie in Abb.36 (10x)

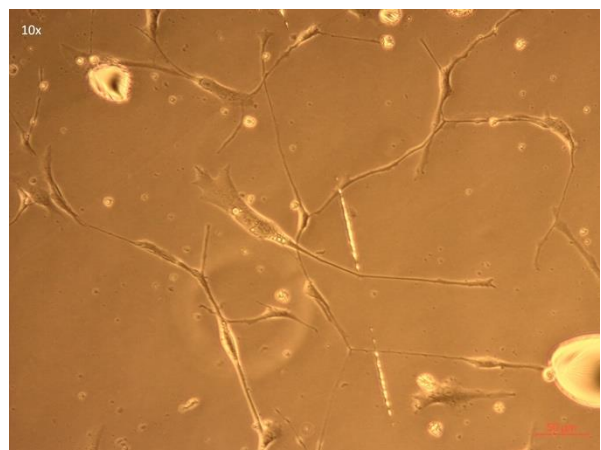


Abbildung 40: Kultur aus kryo. Gewebe nach 2 Wochen: erste Fibroblasten sichtbar (10x)

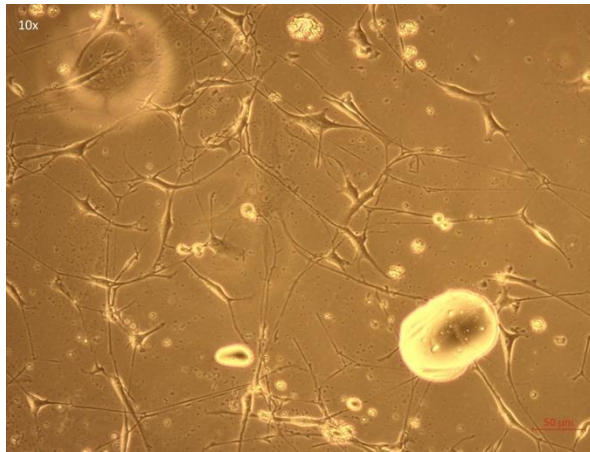


Abbildung 41: Kultur aus kryo. Gewebe nach 2 Wochen: erste Fibroblasten sichtbar (10x)

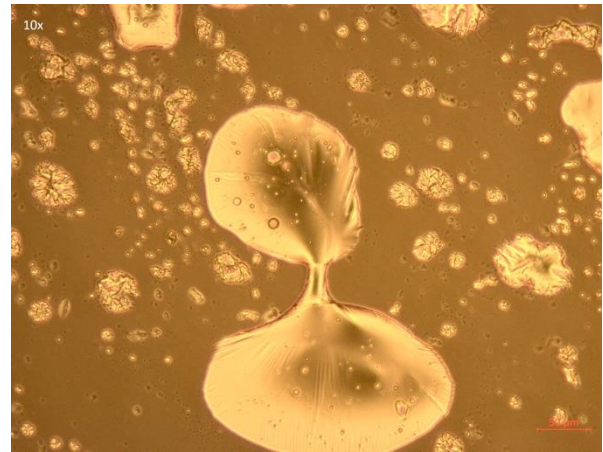


Abbildung 42: Kultur aus kryo. Gewebe nach 3 Wochen: nicht in allen Bereichen finden sich Fibroblasten (10x)

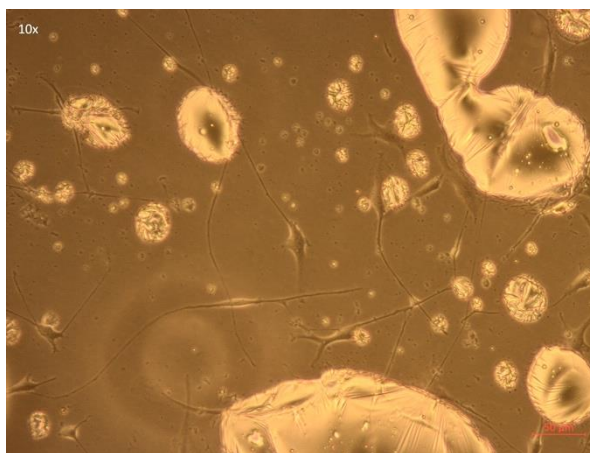


Abbildung 43: Kultur aus kryo. Gewebe nach 3 Wochen: Fibroblasten zwischen Fettzellen sichtbar (10x)

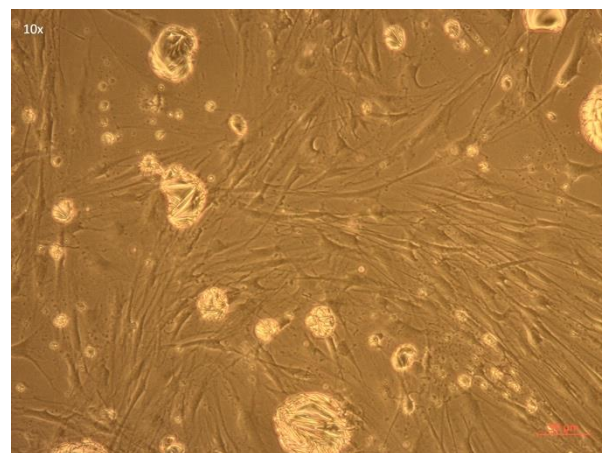


Abbildung 44: Kultur aus kryo. Gewebe nach 4 Wochen: dichteres Fibroblasten Wachstum sichtbar (10x)

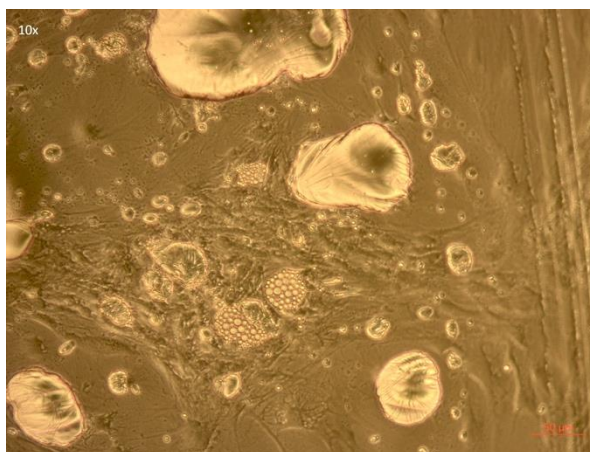


Abbildung 45: Kultur aus kryo. Gewebe nach 4 Wochen: dichteres Fibroblasten Wachstum sichtbar; ebenso Präadipozyten sichtbar (10x)

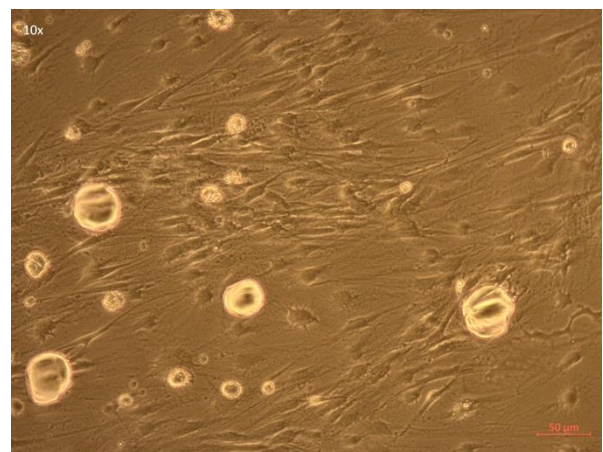


Abbildung 46: Kultur aus kryo. Gewebe nach 5 Wochen: zeigt die Kultur erfolgreiches Wachstum finden sich hier konfluent bewachsene Bereiche, welche sich auf die vollständige Kulturplatte ausweiten (10x)

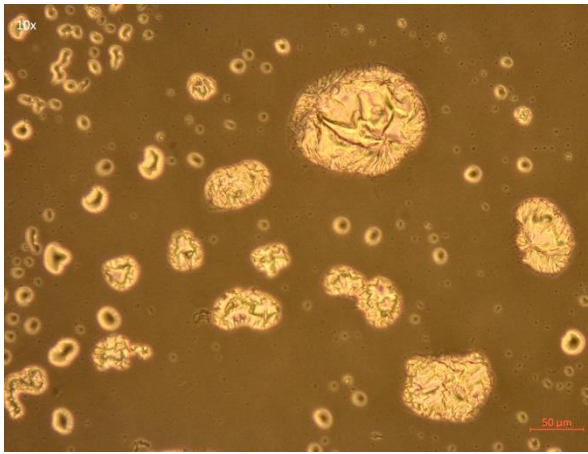


Abbildung 47: Kultur aus kryo. Gewebe nach 3 Wochen. Die Kultur zeigt nach 3 Wochen kein Fibroblasten Wachstum, es kann davon ausgegangen werden, dass bei dieser Morphologie kein weiteres Wachstum auftritt (10x)

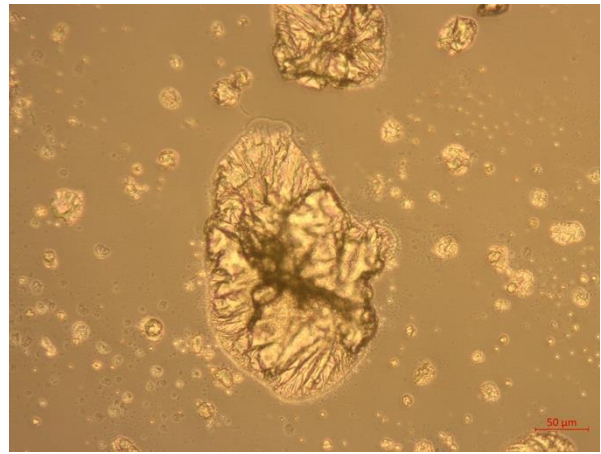


Abbildung 48: Kultur aus kryo. Gewebe nach 16 Wochen: zeigt eine Kultur wie in Abb 46. kein Wachstum verbleiben die Fettzellen zerfurcht am Boden haften; es findet über mehrere Wochen keine Veränderung in der Kulturplatte statt (10x)

4.2.3. Fettzellkonglomerate und Fettgewebe



Abbildung 49: Fettzellkonglomerate in der Basisplatte (4x)

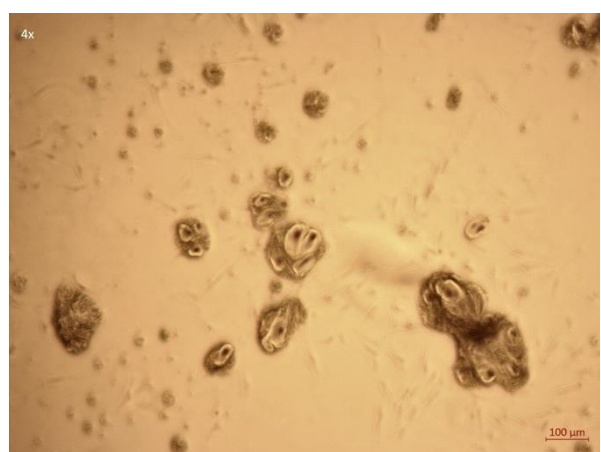


Abbildung 50: Fettzellkonglomerate in der Basisplatte: mehrere Kerne im Zellzusammenschluss sichtbar (4x)

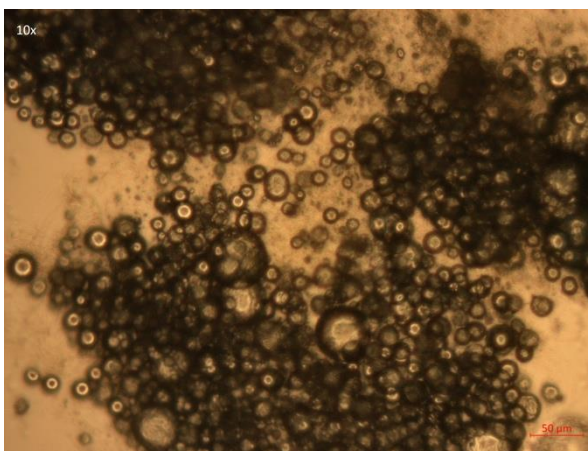


Abbildung 51: Fettzellen in Kulturplatte verbunden über Extrazellulärmatrix (10x)

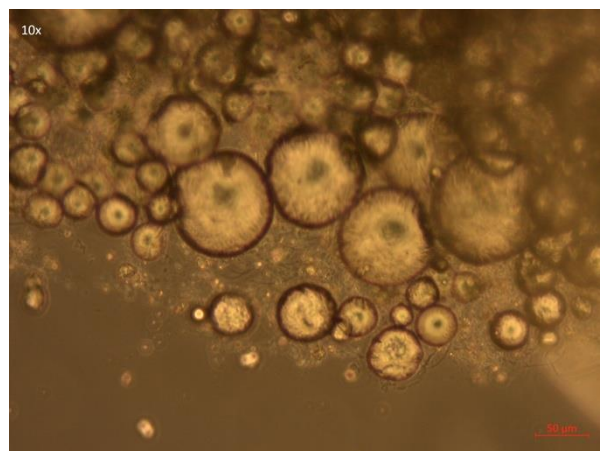


Abbildung 52: Fettzellen in Kulturplatte verbunden über Extrazellulärmatrix (10x)

4.2.4. Unterschiedliche Morphologien der Fibroblasten

Hierbei handelt es sich um Aufnahmen von Kulturen unterschiedlicher Patienten.

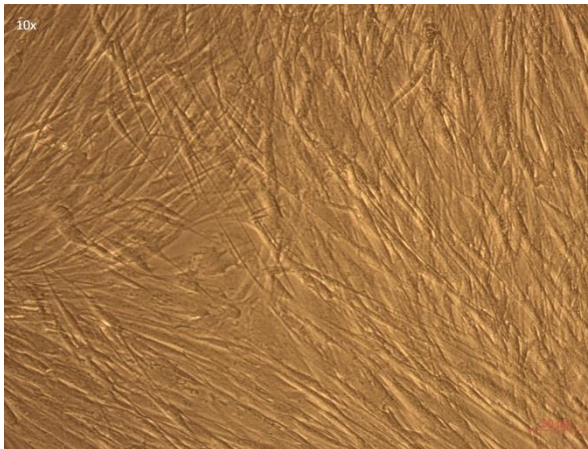


Abbildung 53: Fibroblasten: gleichmäßiges Wachstum (10x)

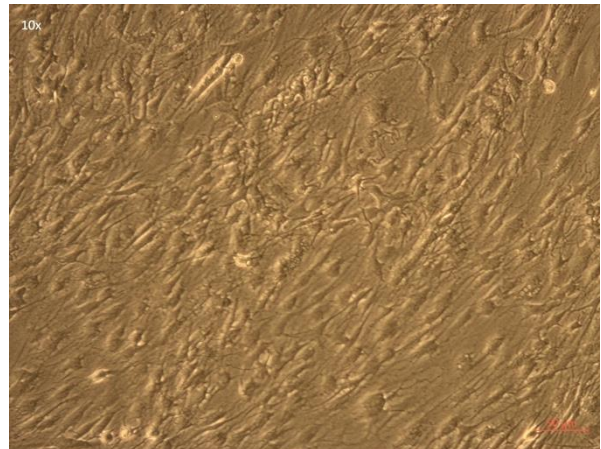


Abbildung 54: Fibroblasten: Zellkörper verzweigt (10x)

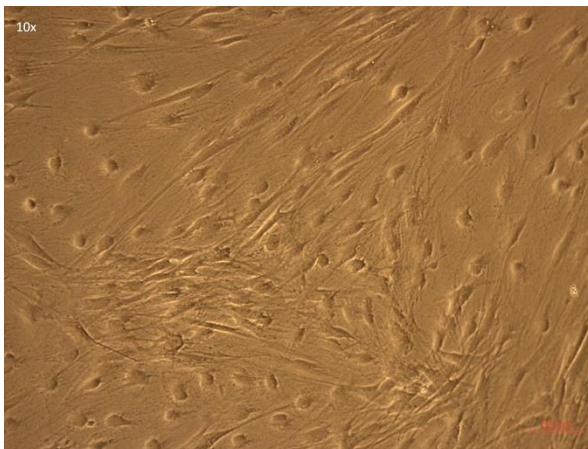


Abbildung 55: Fibroblasten: Zellkörper rundlicher mit Ausläufern rund um die Zelle (10x)

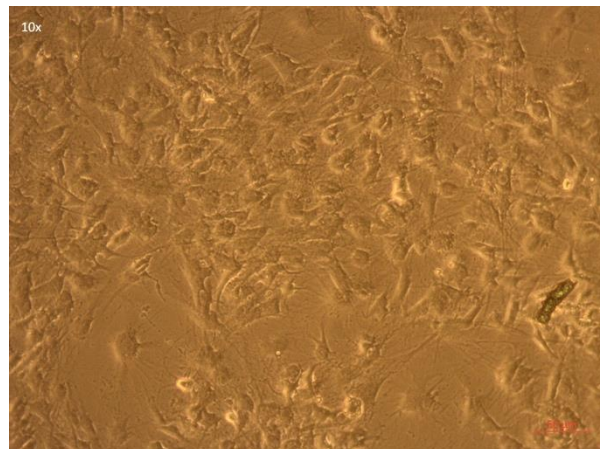


Abbildung 56: Fibroblasten: Zellkörper mit vielen Ausläufern rund um die Zelle, vereinzelt deutliche große Ausläufer, welche ein Wachstum der Zellkörper im direkten Kontakt verhindern (10x)

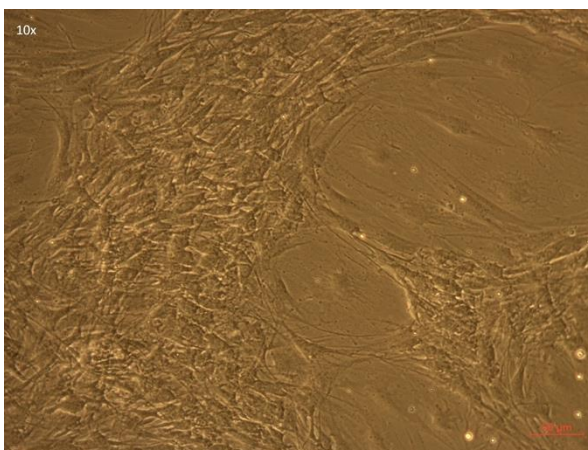


Abbildung 57: Fibroblasten: Zellkörper mit vielen Ausläufern rund um die Zelle (siehe Abb. 55) (10x)

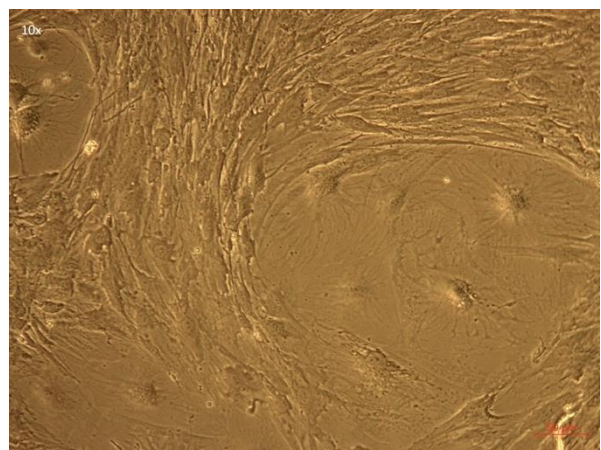


Abbildung 58: Fibroblasten: Zellkörper mit vielen Ausläufern rund um die Zelle (siehe Abb. 55) (10x)

4.2.5. Präadipozyten

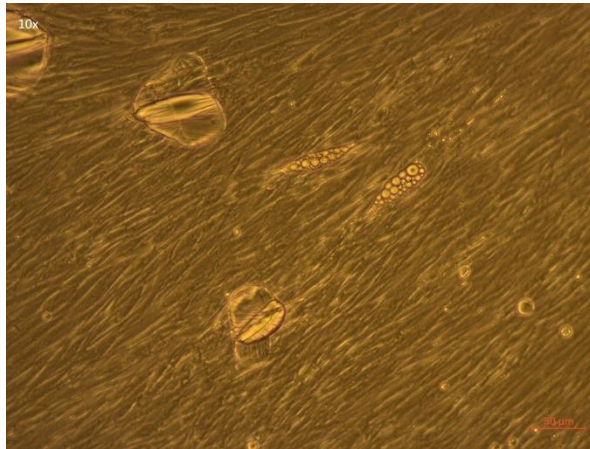


Abbildung 59: Fibroblast in der Entwicklung zum Präadipozyt (10x)

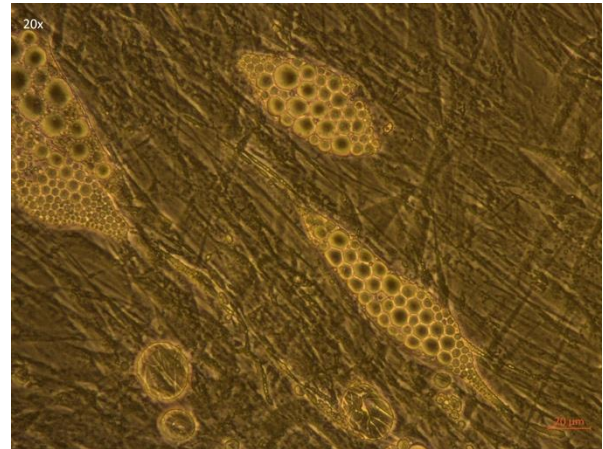


Abbildung 60: Präadipozyt in konfluenter Zellkultur (20x)

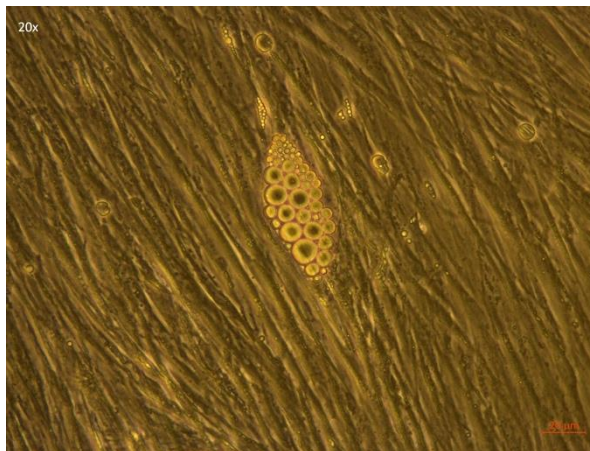


Abbildung 61: Präadipozyt in konfluenter Zellkultur (20x)

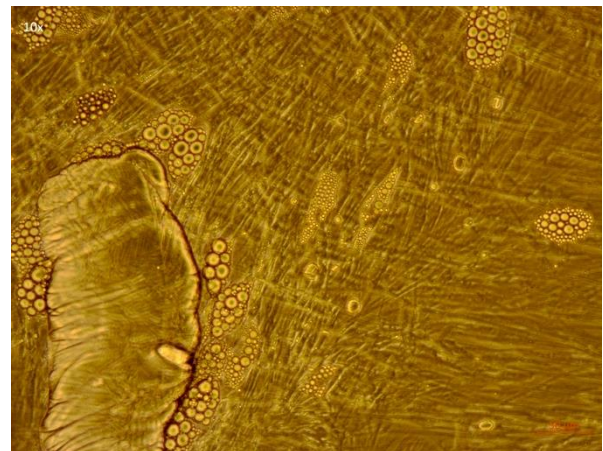


Abbildung 62: Präadipozyten Cluster um Fettzellkonglomerat (10x)

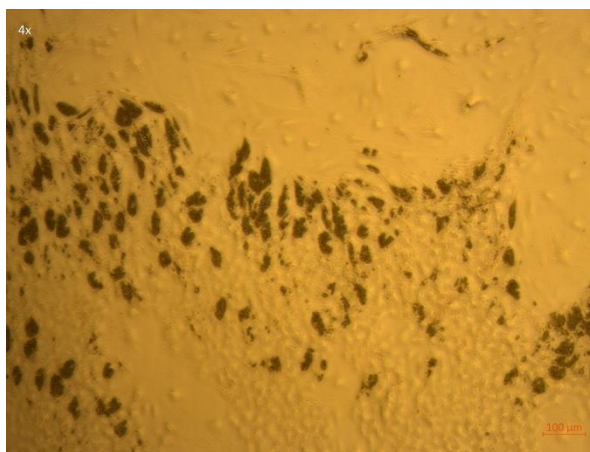


Abbildung 63: Präadipozytencluster (4x)

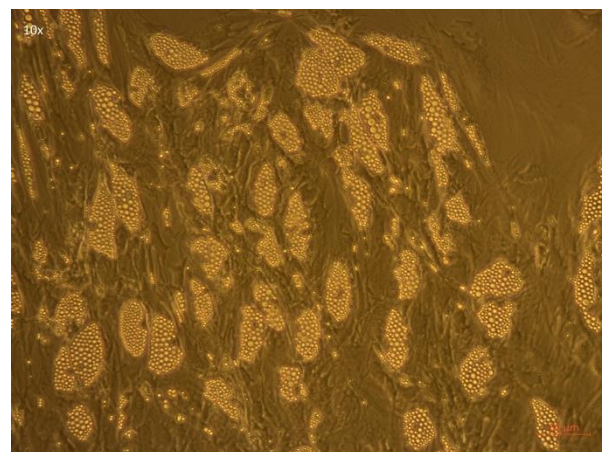


Abbildung 64: Präadipozytencluster (10x)

4.2.6. Oil red O Färbung

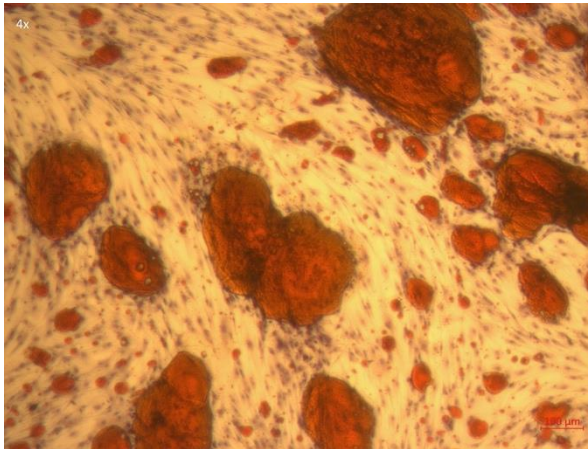


Abbildung 65: Fettzellkonglomerate auf Basisplatte mit Fibroblasten intrazelluläre Fette rot gefärbt (4x)

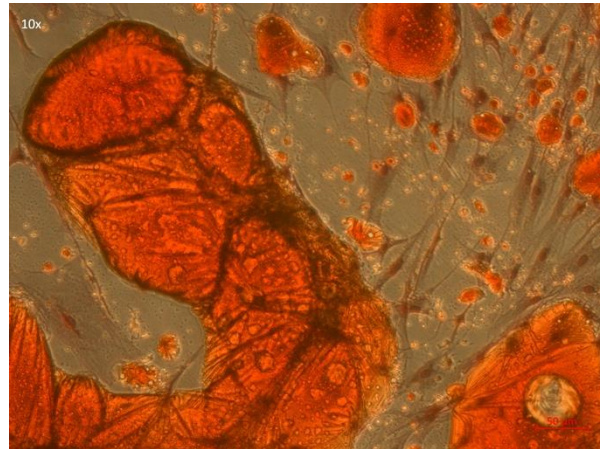


Abbildung 66: Fettzellkonglomerat mit mehreren Kernen zwischen den Fettzellen liegenden Fibroblasten. Intrazelluläre Fette rot gefärbt (10x)

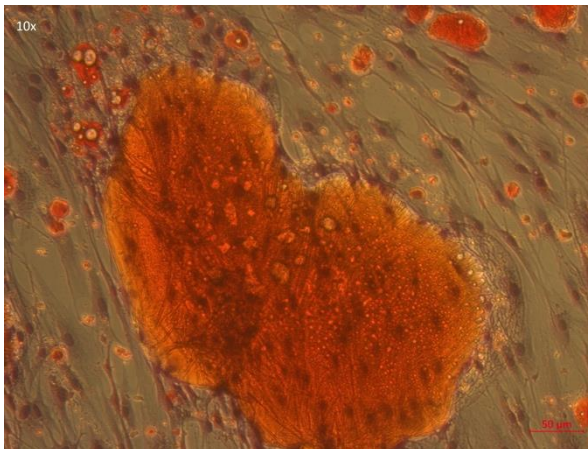


Abbildung 67: Große Fettzelle mit Fibroblasten intrazelluläre Fette rot gefärbt (10x)

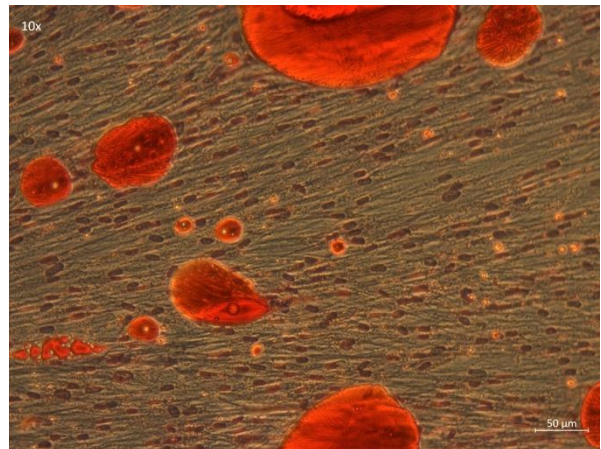


Abbildung 68: Fettzellen mit konfluent gewachsenen Fibroblasten. Links im Bild Präadipozyt, intrazelluläre Fette rot gefärbt (10x)

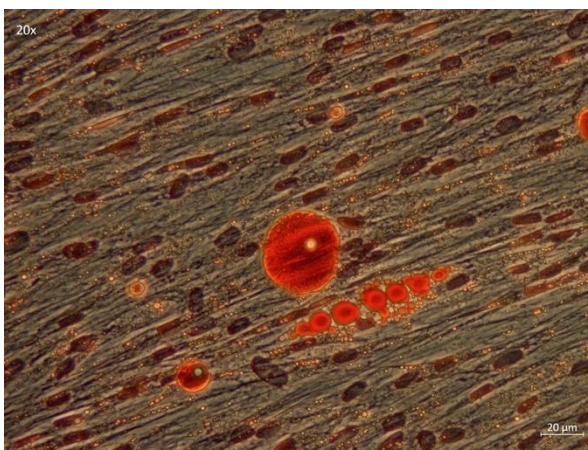


Abbildung 69: Konfluent gewachsene Fibroblasten mit Fettzelle und Präadipozyt, multiple rot gefärbte Fettvakuolen sichtbar, teilweise während Fixation herausgelöst (20x)

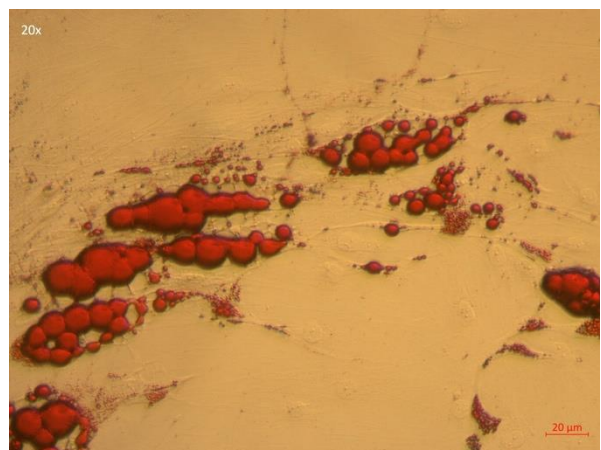


Abbildung 70: Mehrere Präadipozyten: multiple rot gefärbte Fettvakuolen sichtbar, teilweise während Fixation herausgelöst (20x)

4.2.7. Subkultur nach Kryokonservierung

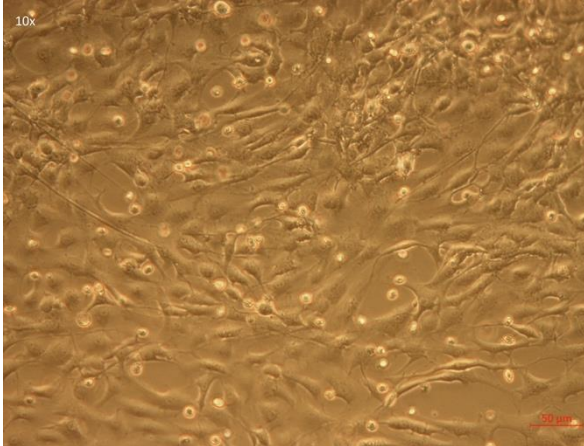


Abbildung 71: Erfolgreiches Anwachsen nach 72 h: Zellen haften am Boden und wachsen konfluent. Vor Mediumwechsel viele abgestorbene Zellen sichtbar (10x)

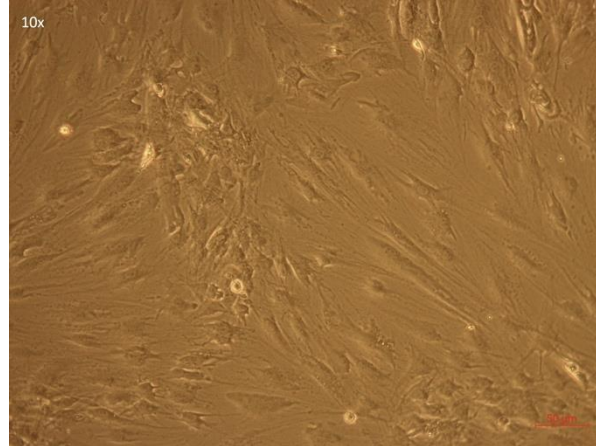


Abbildung 72: Erfolgreiches Anwachsen nach 72 h: Zellen haften am Boden und wachsen konfluent, nach Mediumwechsel nahezu alle schwimmenden toten Zellen entfernt (10x)

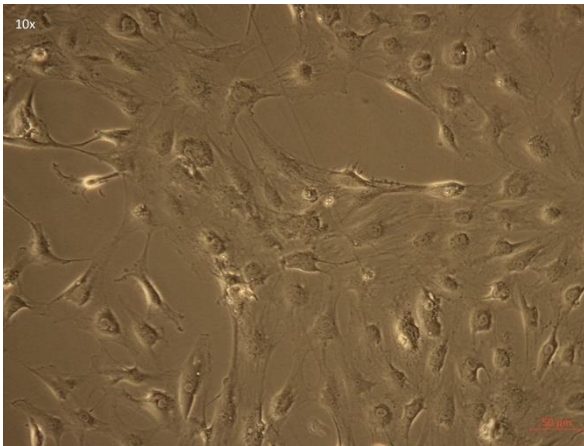


Abbildung 73: Schlechtes Anwachsen nach 72 h. Zellen lückig am Boden angehaftet; Kultur wächst im Folgenden trotz dessen auf Konfluenz (10x)

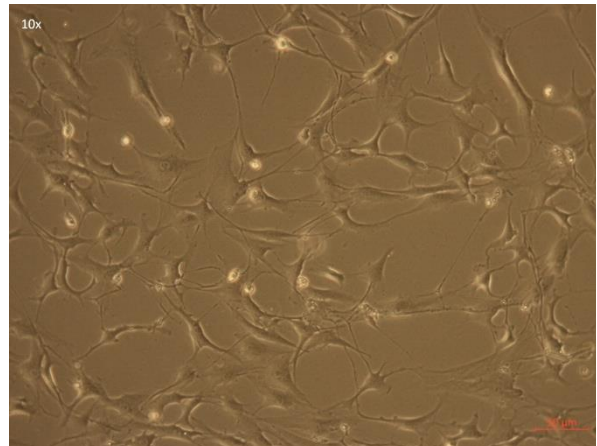


Abbildung 74: Schlechtes Anwachsen nach 72 h. Zellen lückig am Boden angehaftet; Kultur wächst im Folgenden trotz dessen auf Konfluenz (10x)

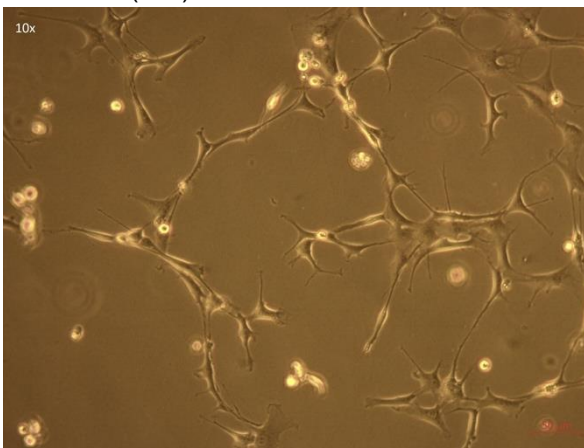


Abbildung 75: Anwachsen nach Kryokonservierung nicht erfolgreich: zu viele Zellen durch Kryokonservierung abgestorben. Zellen wachsen auch im Folgenden nicht auf Konfluenz (10x)

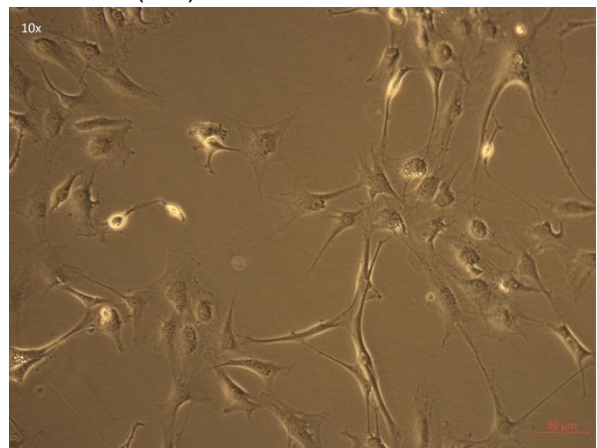


Abbildung 76: Anwachsen nach Kryokonservierung nicht erfolgreich: zu viele Zellen durch Kryokonservierung abgestorben. Zellen wachsen auch im Folgenden nicht auf Konfluenz (10x)

4.2.8. Seneszenz und schlechtes Wachstum

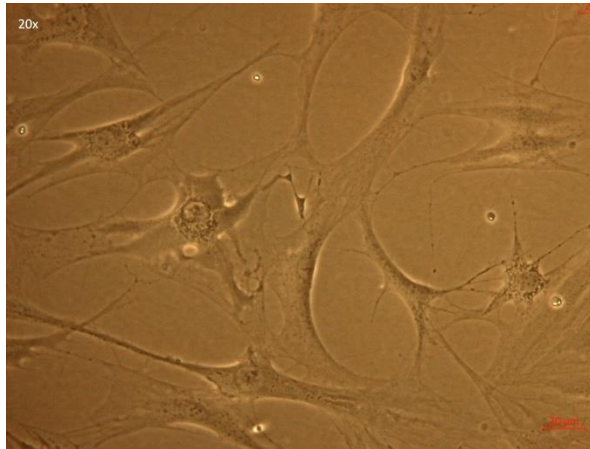


Abbildung 77: Passage 12 der Kultur: Zellen erscheinen größer und flacher, es wird kein konfluentes Wachstum erreicht (20x)

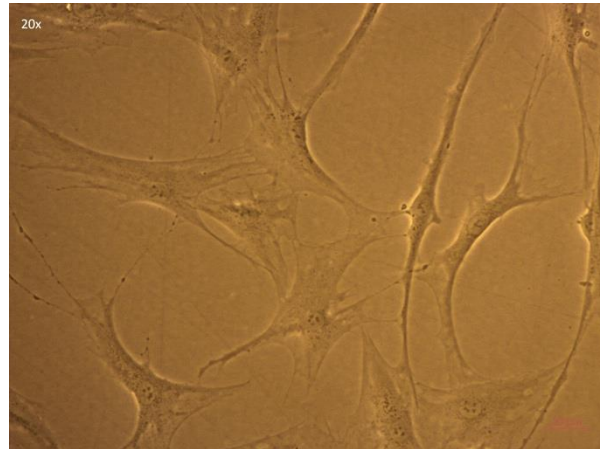


Abbildung 78: Passage 12 der Kultur: Zellen erscheinen größer und flacher, es wird kein konfluentes Wachstum erreicht (20x)

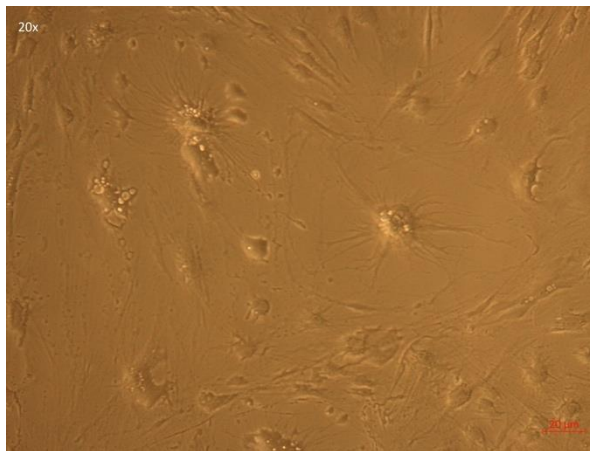


Abbildung 79: Passage 4, Kultur wächst schlecht: bereits in Passage 4 intrazelluläre Vakuolisierung sowie vergrößerte Zellen (20x)

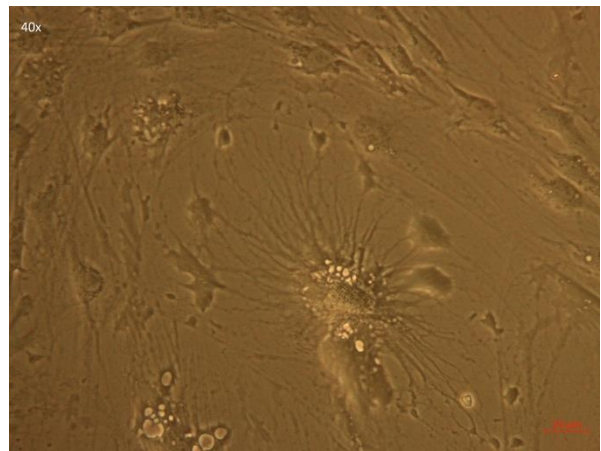


Abbildung 80: Passage 4, Kultur wächst schlecht: bereits in Passage 4 intrazelluläre Vakuolen sowie vergrößerte Zellen (40x)

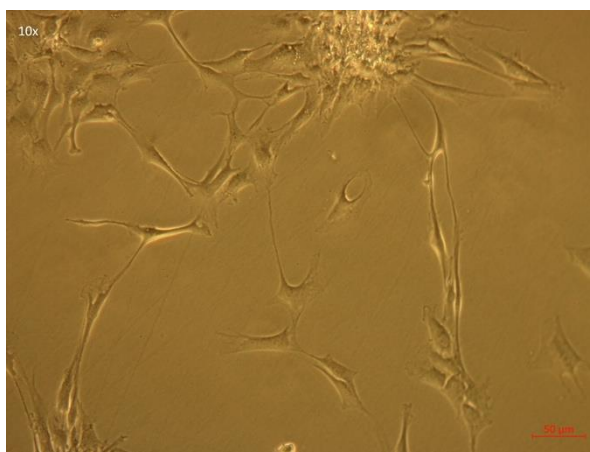


Abbildung 81: Kultur aus kryokonserviertem Gewebe: Kultur wächst schlecht, kein konfluentes Wachstum erreichbar, Wachstum in verdichteten Zellhaufen (10x)

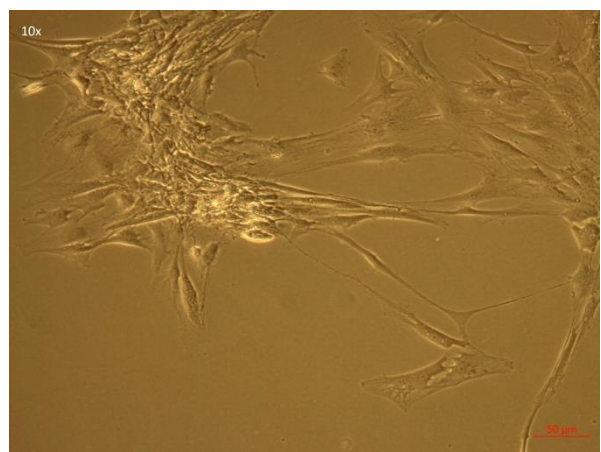


Abbildung 82: Kultur aus kryokonserviertem Gewebe: Kultur wächst schlecht, kein konfluentes Wachstum erreichbar, Wachstum in verdichteten Zellhaufen (10x)

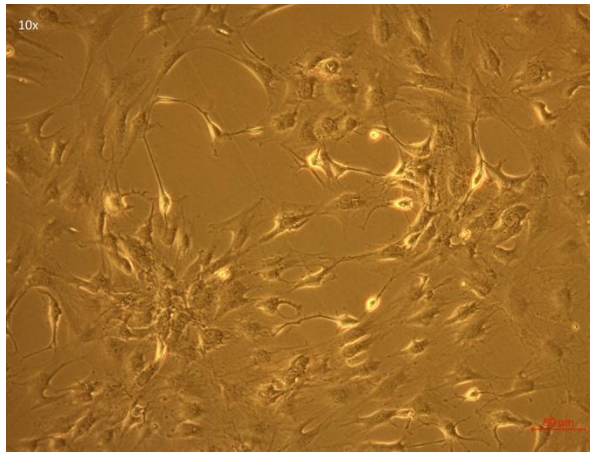


Abbildung 83: Schlechtes Wachstum nach zu großer Trypsinmenge: Zellen wachsen nicht alle am Boden an und lösen sich ab, heller Rand aufgrund Zellkernverdichtung
Trypsinvolumen: 3 ml in 6 Well Vertiefung (10x)

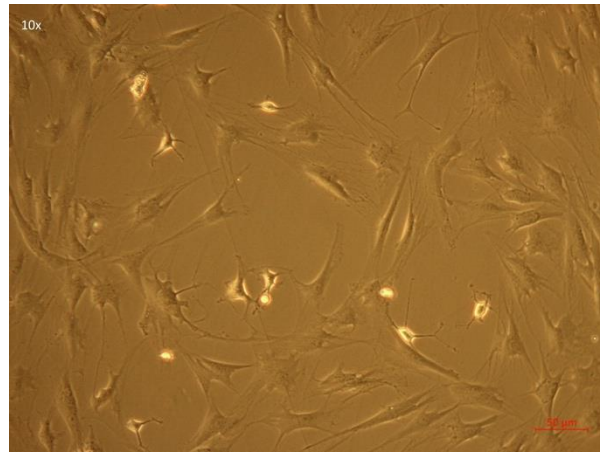


Abbildung 84: Schlechtes Wachstum nach zu großer Trypsinmenge: Zellen wachsen nicht alle am Boden an und lösen sich ab, heller Rand aufgrund Zellkernverdichtung.
Trypsinvolumen: 3 ml in 6 Well Vertiefung (10x)

4.2.9. Kontamination

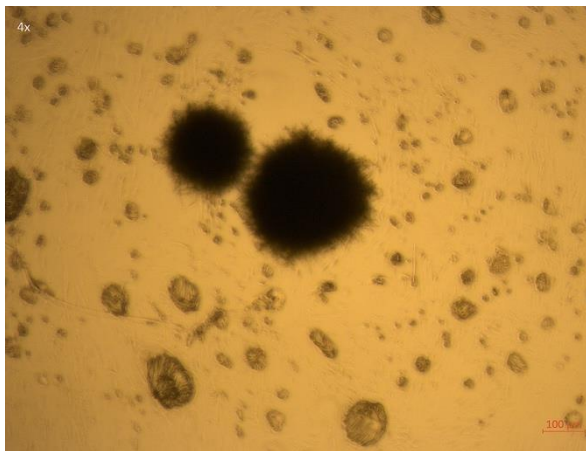


Abbildung 85: Kontamination mit unbekanntem Pilz: trotz Einhalten der Hygienevorschriften und präventiver Behandlung mit Amphotericin (4x)

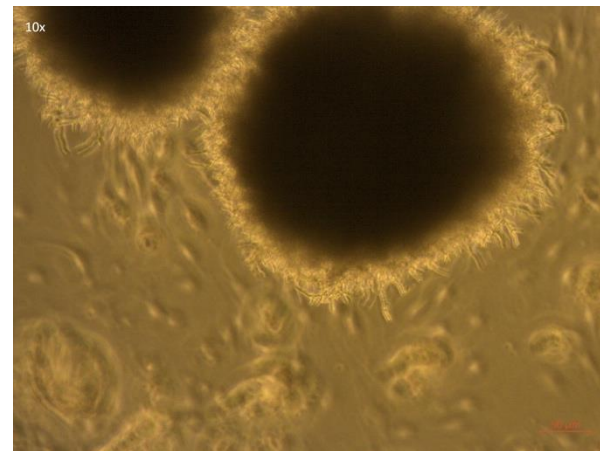


Abbildung 86: Kontamination mit Pilz
Siehe Abb. 84 (10x)

4.2.10. Zellmorphologie nach 6 h, 24 h, 48 h der M22 MAk Stimulation

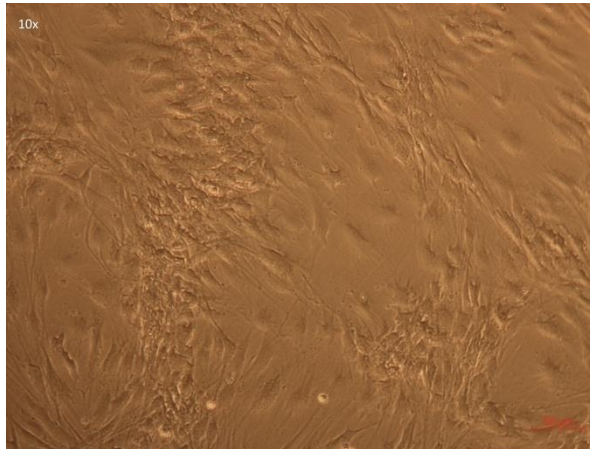


Abbildung 87: Fibroblasten vor Beginn der Stimulation (10x)

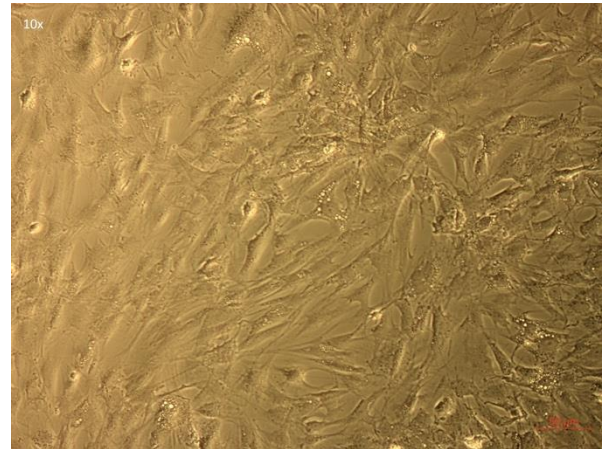


Abbildung 88: Fibroblasten nach 6 h Stimulation mit M22 MAk im Reaktionspuffer (10x)

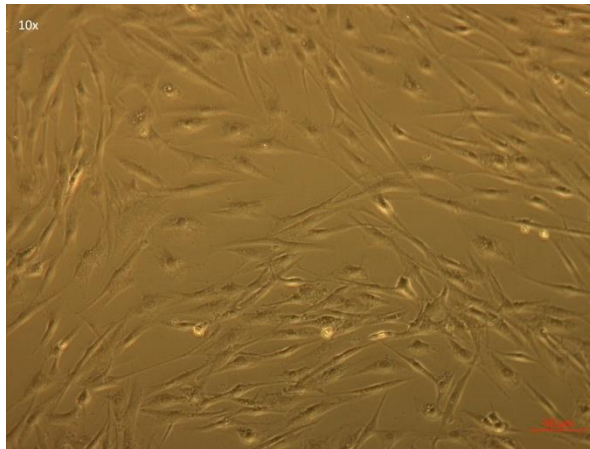


Abbildung 89: Fibroblasten nach 24 h Stimulation mit M22 MAk im Reaktionspuffer (10x)

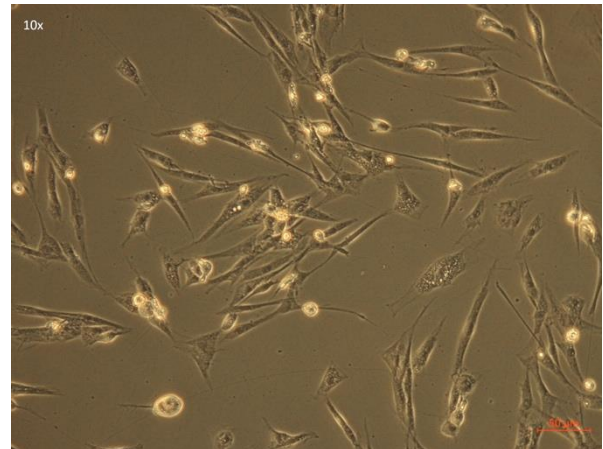


Abbildung 90: Fibroblasten nach 48 h Stimulation mit M22 MAk im Reaktionspuffer (10x)

4.3. Einstellen des Trypsinprotokolls

Empirisch ermittelte Volumina der Trypsinlösung, sowie Inkubationszeiten in unterschiedlichen Kulturgefäßen. Fibroblasten in Basisplatten zeigen eine stärkere Adhärenz am Kulturgefäßboden. Ebenso werden in kleineren Kulturgefäßen längere Einwirkzeiten benötigt.

Tabelle 17: Trypsinprotokolle

| Kultur und Kulturgefäß | Trypsin Menge | Einwirkzeit |
|-----------------------------|---------------|-------------|
| Petrischale - Basisplatte | 3 ml | 8,5 min |
| 6 Well Platte - Basisplatte | 1 ml | 8,5 min |
| Petrischale - Subkultur | 3 ml | 3 min |
| 6 Well Platte - Subkultur | 1 ml | 6 min |
| 24 Well Platte - Subkultur | 0,6 ml | 9 min |

4.4. Zellzählung

4.4.1. Zellzählung mit Neubauerkammer und Trypanblau

Zählung der Zellen sicher durchführbar. Beschickung der Kammer jedoch nicht immer gleichmäßig und blasenfrei. Zellzählung mit der Neubauerkammer abhängig von der Erfahrung des Anwenders.

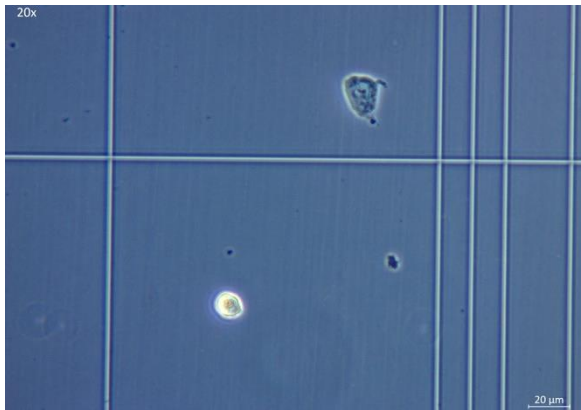


Abbildung 91: Ausschnitt einer Zellzählung mit der Neubauerkammer und Trypanblau Färbung. Unterschied zwischen lebender (hell) und toter (blau) Zelle deutlich erkennbar, zusätzlich Zelldetritus sichtbar.

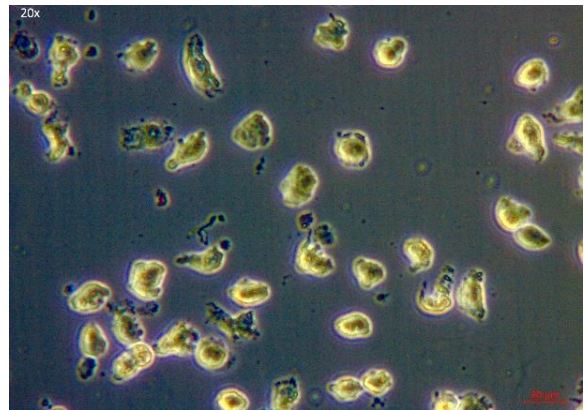


Abbildung 92: Ausschnitt einer Zellzählung mit Neubauerkammer und Trypanblau Färbung. Unterschied zwischen lebenden und toten Zellen sowie Zelldetritus nicht sicher erkennbar.

4.4.2. Zellzählung mit dem Zellzählgerät LunaFI – Färbung: Trypanblau

Zellen werden häufig mehrfach oder nicht erkannt. Ebenso Erkennung von Zellen als zeitgleich lebend und abgestorben. Zellzahlen deutlich höher als bei manueller Zellzählung. Wiederholte Zählungen ergeben unterschiedliche Zellzahlen.

Durchschnittliche Abweichung der Zellzählergebnisse:

Mittelwert: 2409 (0,92 %) Zellen pro Zellzählung mehr im Vergleich zur manuellen Zählung mittels Neubauerkammer

Es wurden fünf Proben jeweils fünfmal hintereinander gemessen und die Standardabweichung bestimmt. Es zeigt sich deutlich, dass das automatische Zellzählgerät die Zellen aufgrund der nicht homogenen Oberflächenmorphologie nicht eindeutig erkennt und deutlich unterschiedliche Zellzahlen errechnet.

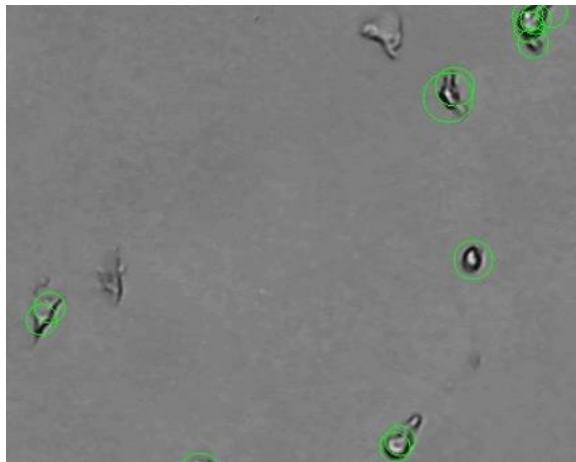


Abbildung 93: Ausschnitt einer Zellzählung mit dem LunaFI mit Trypanblaufärbung, jeder Kreis steht für eine gezählte Zelle, grüne Kreise stellen lebende Zellen dar. Mehrfachzählungen derselben Zelle sichtbar.

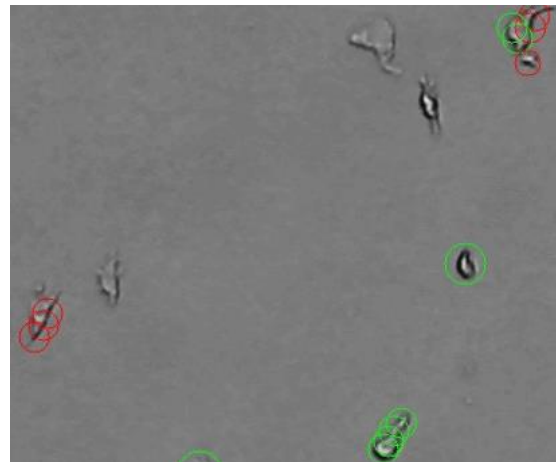


Abbildung 94: Ausschnitt einer Zellzählung mit dem LunaFI mit Trypanblaufärbung, es handelt sich um eine zweite Zählung desselben Ausschnitts wie Abb. 92. Jeder Kreis steht für eine gezählte Zelle, grüne Kreise stellen lebende Zellen dar, rote Kreise stellen als tot gewertete Zellen dar. Mehrfachzählungen derselben Zelle sichtbar.

Tabelle 18: Zellzahlen nach Mehrfachmessungen mit dem LunaFI und Trypanblau Färbung
In Gesamtzellzahl pro ml

| | Probe 1 | Probe 2 | Probe 3 | Probe 4 | Probe 5 |
|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Minimum | 84200 | 323000 | 113000 | 483000 | 119000 |
| Maximum | 178000 | 486000 | 122000 | 659000 | 135000 |
| Standard- abweichung | 39560 | 60685 | 3391 | 72327 | 6595 |

4.4.3. Zellzählung mit Zellzählgerät LunaFI – Färbung: Acridinorange und Propidiumjodid

Zellen werden im Vergleich zur Zählung mit Trypanblau eindeutiger erkannt. Auch hier werden einzelne Zellen nicht erkannt, dies passiert jedoch sehr selten. Ob eine Zellzählung erfolgreich war, kann anhand der Kontrollbilder des LunaFI verifiziert werden. Bei Misserfolg muss eine neue Einweg-Zählkammer beschickt werden. Wiederholte Zellzählungen der gleichen Probe sind nicht möglich, da der Farbstoff durch die Belichtung während der Zählung deutlich an Leuchtkraft verliert.

Durchschnittliche Abweichung der Zellzählergebnisse:

Mittelwert: 1910 (0,49 %) Zellen pro Zellzählung weniger im Vergleich zur manuellen Zählung mittels Neubauerkammer

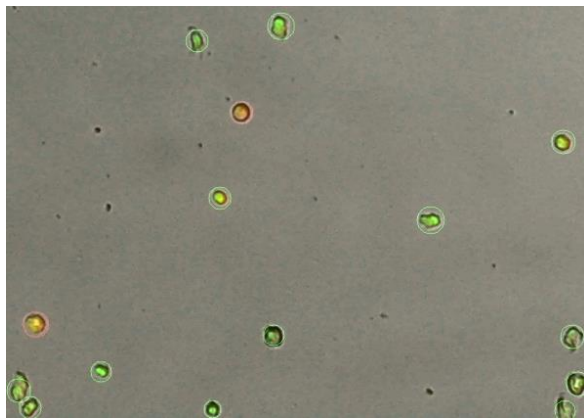


Abbildung 95: Ausschnitt einer Zellzählung mit dem LunaFI mit Fluoreszenzfärbung, jeder Kreis steht für eine gezählte Zelle. Grüne Kreise stellen lebende Zellen dar, rote Kreise stellen als tot gewertete Zellen dar. Zellen werden nur einmal erkannt und gezählt.

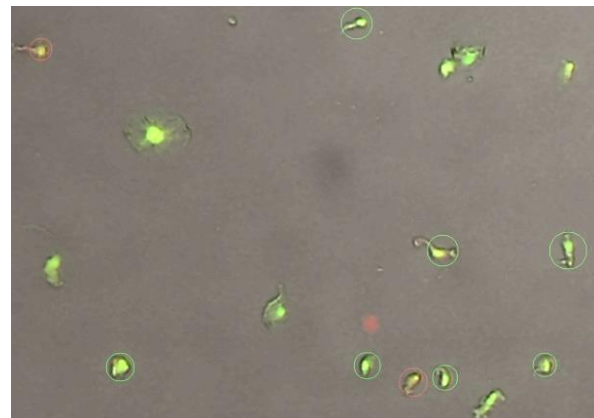


Abbildung 96: Ausschnitt einer Zellzählung mit dem LunaFI mit Fluoreszenzfärbung, jeder Kreis steht für eine gezählte Zelle. Grüne Kreise stellen lebende Zellen dar, rote Kreise stellen als tot gewertete Zellen dar. Zellen werden nur einmal erkannt und gezählt.

4.5. Umstellung des Wachstumsmediums auf Medium 199

4.5.1. Stoffwechselaktivität bei Umstellung des Mediums

In einem MTT Assay wurde die Stoffwechselaktivität von Subkulturen bestimmt, welche in F-Medium oder Medium 199 kultiviert wurden. Je höher die Lichtabsorption, desto höher die Stoffwechselaktivität

Bei einer Umstellung des Mediums von F-Medium auf Medium 199 kam es nach 72 h zu einem signifikanten Abfall ($p < 0,000$) der Stoffwechselaktivität.

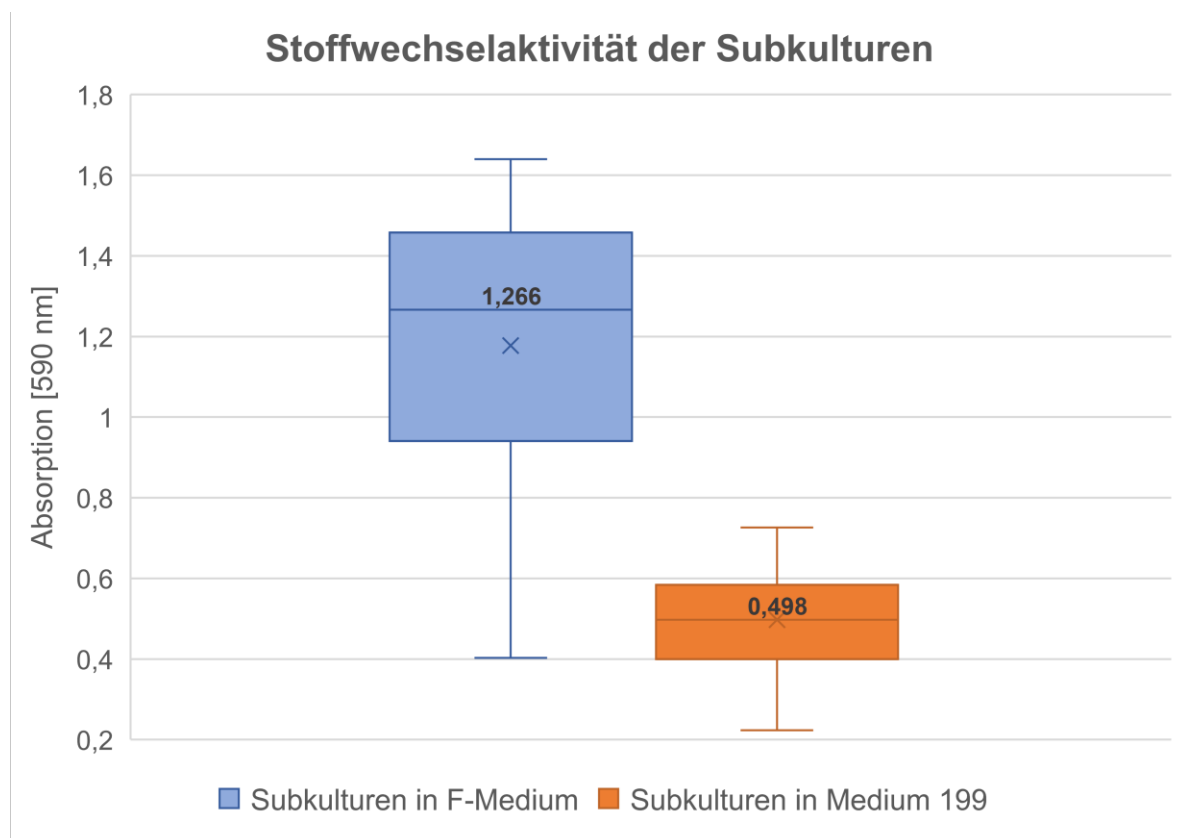


Abbildung 97: Stoffwechselaktivität von Subkulturen gemessen im MTT Assay
Median über dem grafischen Element

4.5.2. Zellwachstum bei Umstellung des Mediums

Es wurden in 32 Wells jeweils 80.000 Zellen ausplattiert und die Zellen nach 72 h manuell mit Hilfe der Neubauerkammer und Typanblaufärbung gezählt. In 16 Wells wurden die Zellen in F-Medium inkubiert. In den anderen 16 Wells wurden die Zellen in Medium 199 inkubiert.

Es konnte ein signifikanter ($p=0,01$) Unterschied im Wachstum festgestellt werden. Bei Inkubation in F-Medium kam es im Mittel zu einer Zellzahlsteigerung von 192,58 % Zellen pro Well. Im Vergleich hierzu kam es bei Inkubation in Medium 199 zu einer Zellzahlsteigerung von 107,03 % Zellen pro Well

4.6. Stoffwechselaktivität bei Stimulation der Zellen

In einem MTT Assay wurde die Stoffwechselaktivität unterschiedlicher Subkulturen bestimmt. Je höher die Lichtabsorption, desto höher die Stoffwechselaktivität.

Verglichen wurde die Stoffwechselaktivität folgender Subkulturen:

- (1) Subkulturen, welche 72 h in F-Medium kultiviert wurden
- (2) Subkulturen, welche 72 h in DMEM mit 10 % FBS kultiviert wurden
- (3) Subkulturen, welche nach 72 h Kultivierung in F-Medium für 24 h in Hungermedium mit 1 % FBS kultiviert wurden. Anschließend wurden diese Zellen für 6 h mit 50 ng/ml M22 MAk in DMEM mit 10 % FBS stimuliert.
- (4) Subkulturen, welche nach 96 h Kultivierung in F-Medium für 6 h mit 50 ng/ml M22 MAk in DMEM mit 10 % FBS stimuliert wurden
- (5) Subkulturen, welche nach 96 h Kultivierung in F-Medium für 6 h mit 50 ng/ml M22 MAk Reaktionspuffer stimuliert wurden

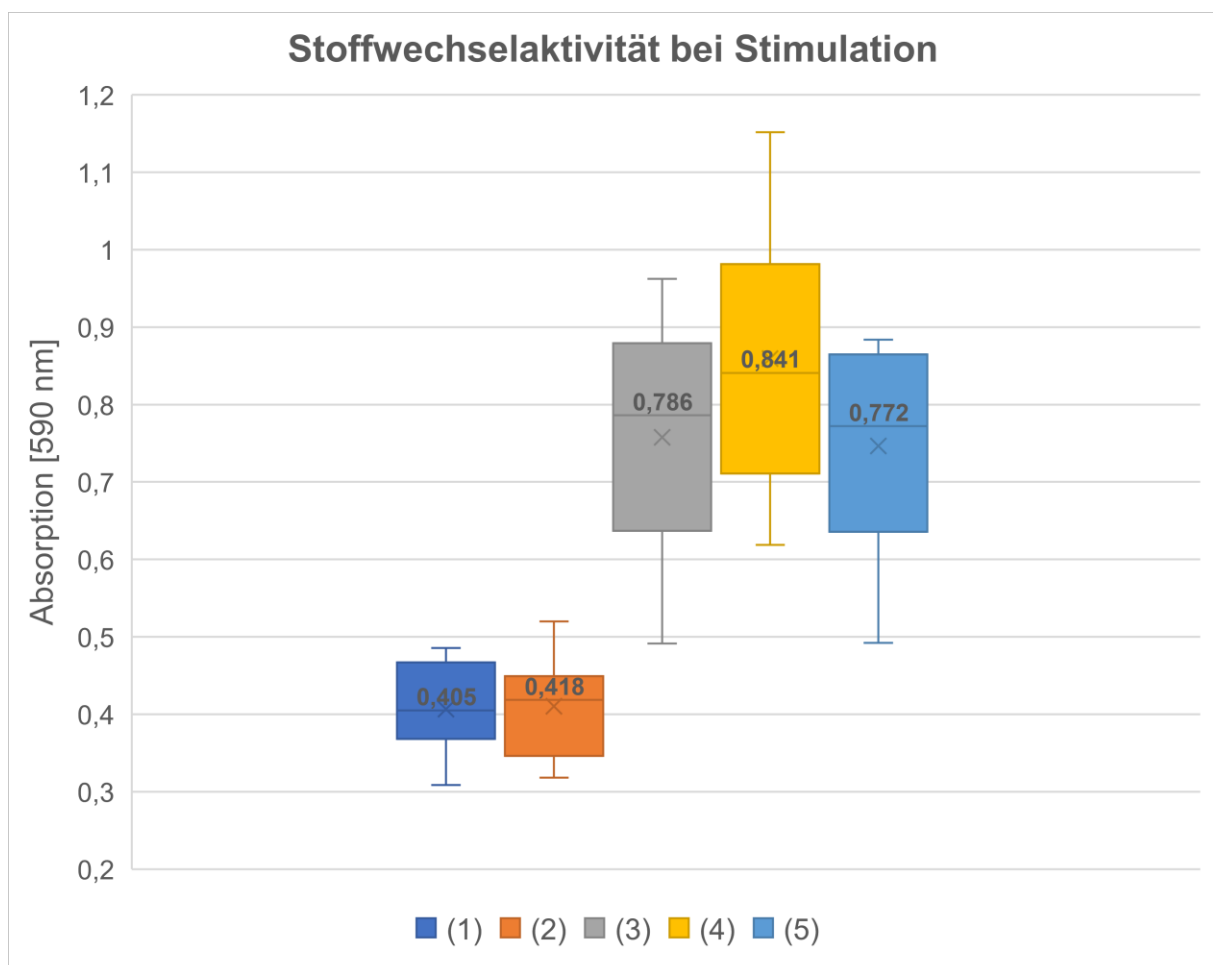


Abbildung 98: Stoffwechselaktivität bei Stimulation gemessen im MTT Assay
Median über dem grafischen Element

Eine reine Umstellung des Mediums von F-Medium auf DMEM mit 10 % FBS zeigt keine deutliche Veränderung der Stoffwechselaktivität. Bei Stimulation mit 50 ng/ml M22 MAk für jeweils 6 h zeigten sich bei allen drei Ansätzen jeweils signifikant gesteigerte Stoffwechselaktivitäten. Zwischen den unterschiedlichen Stimulationsprotokollen zeigte sich jedoch kein deutlicher Unterschied. Das Stimulationsprotokoll mit den geringsten Änderungen der Wachstumsbedingungen (von F-Medium zu Stimulation in DMEM mit 10 % FBS) führte zur höchsten Stoffwechselaktivität während Stimulation mit M22 MAk.

Tabelle 19: Signifikanz der verglichenen Stoffwechselaktivitäten

| | Signifikanzwert |
|--|-----------------|
| F-Medium - 24 h 1 % FBS + Stim. in DMEM mit 10 % FBS | < 0,001 |
| F-Medium - Stim. in DMEM mit 10 % FBS | < 0,001 |
| F-Medium - Stim. in Reaktionspuffer | < 0,001 |

4.7. Stimulation der Zellen mit M22 MAK

Das HA ELISA Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit den fünf HA Standardkonzentrationen, welche vom Hersteller mitgeliefert werden, wurde eine Standardkurve erstellt, mit welcher die Absorptionswerte in HA in ng/ml umgerechnet wurden.

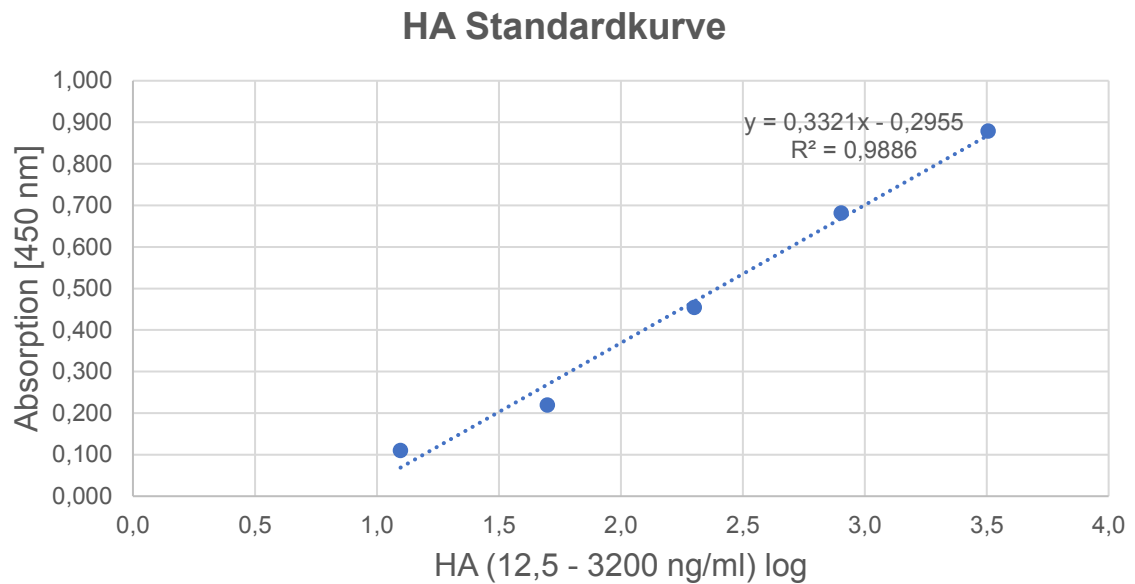


Abbildung 99: Hyaluronsäure Standardkurve

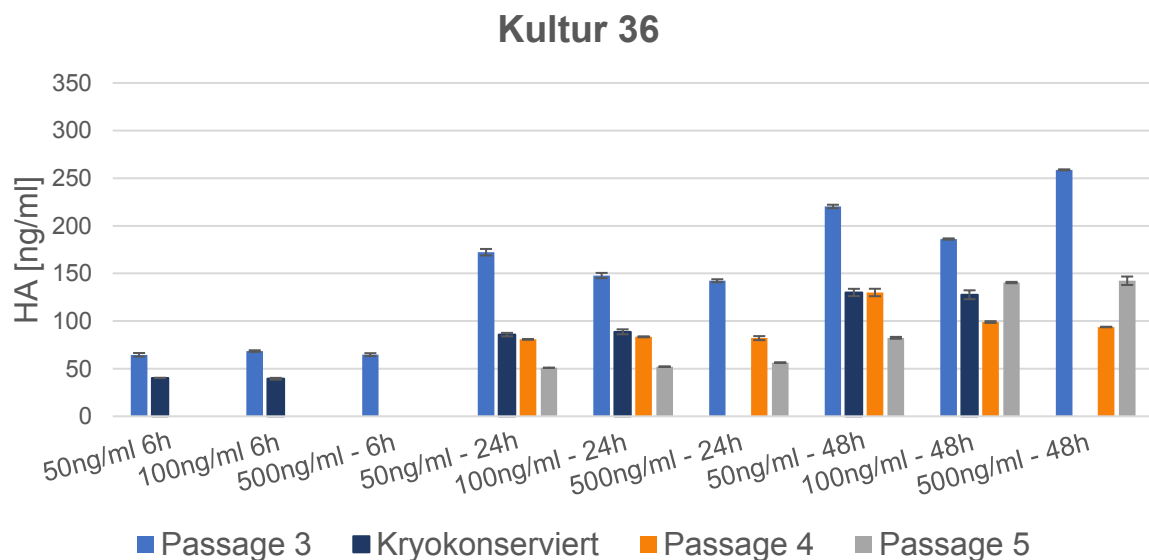


Abbildung 100: Hyaluronsäure Stimulation - Kultur 36

Die Kultur wurde mit 50, 100 und 500 ng/ml M22 MAK über 6, 24 und 48 h stimuliert. Kultur 36 wurde aus frischem Gewebe angelegt, eine Subkultur wurde kryokonserviert und nach erneutem Anlegen ebenfalls stimuliert.

Kultur 39

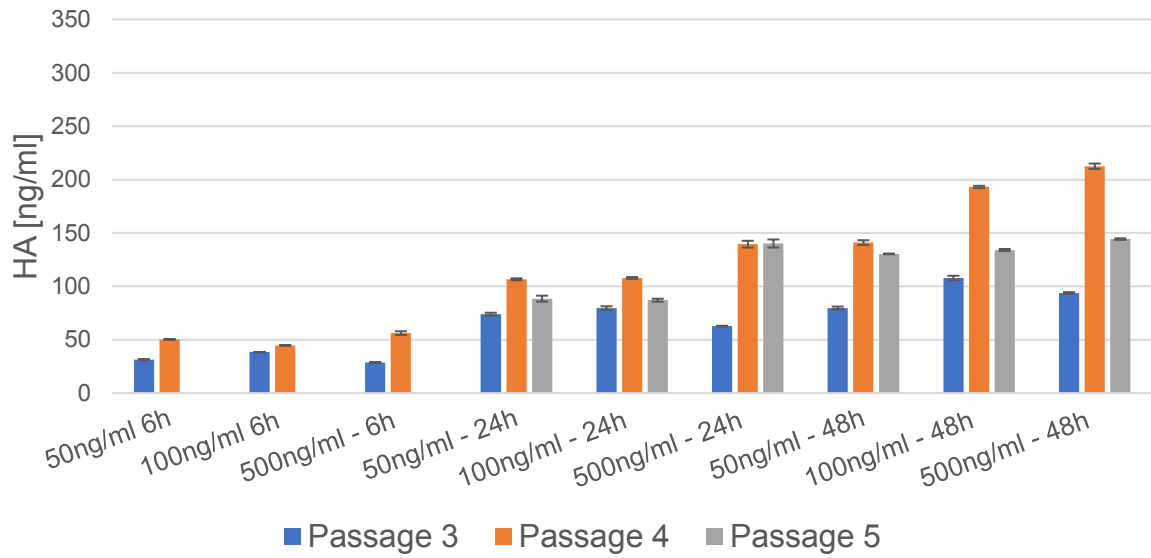


Abbildung 101: Hyaluronsäure Stimulation - Kultur 39

Die Kultur wurde mit 50,100 und 500 ng/ml M22 MAk über 6, 24 und 48 h stimuliert. Kultur 39 wurde aus frischem Gewebe angelegt

Kultur 35

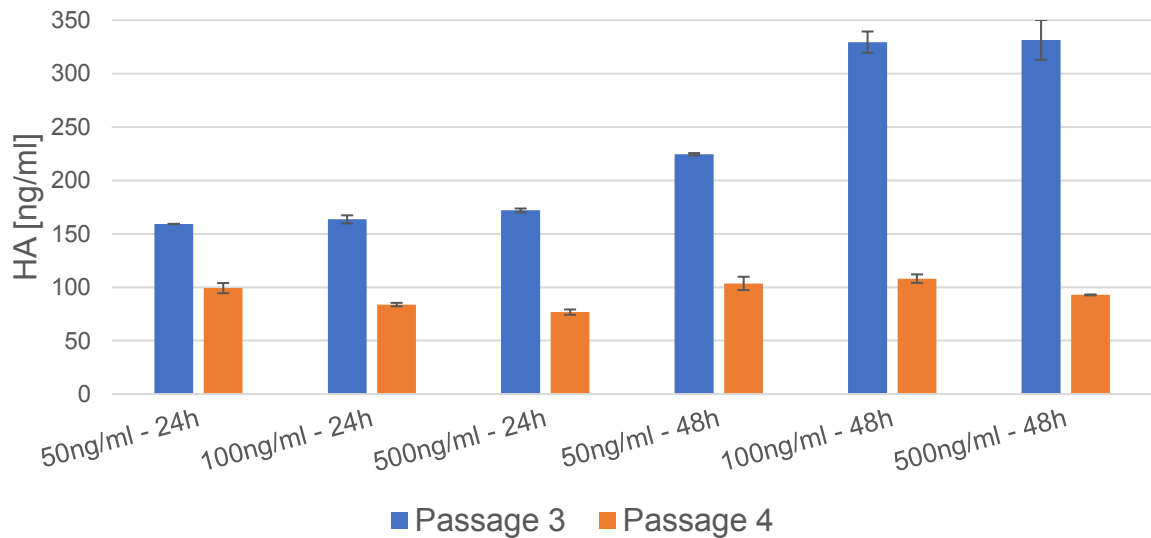


Abbildung 102: Hyaluronsäure Stimulation - Kultur 35

Die Kultur wurde mit 50,100 und 500 ng/ml M22 MAk über 6, 24 und 48 h stimuliert. Kultur 35 wurde aus frischem Gewebe angelegt

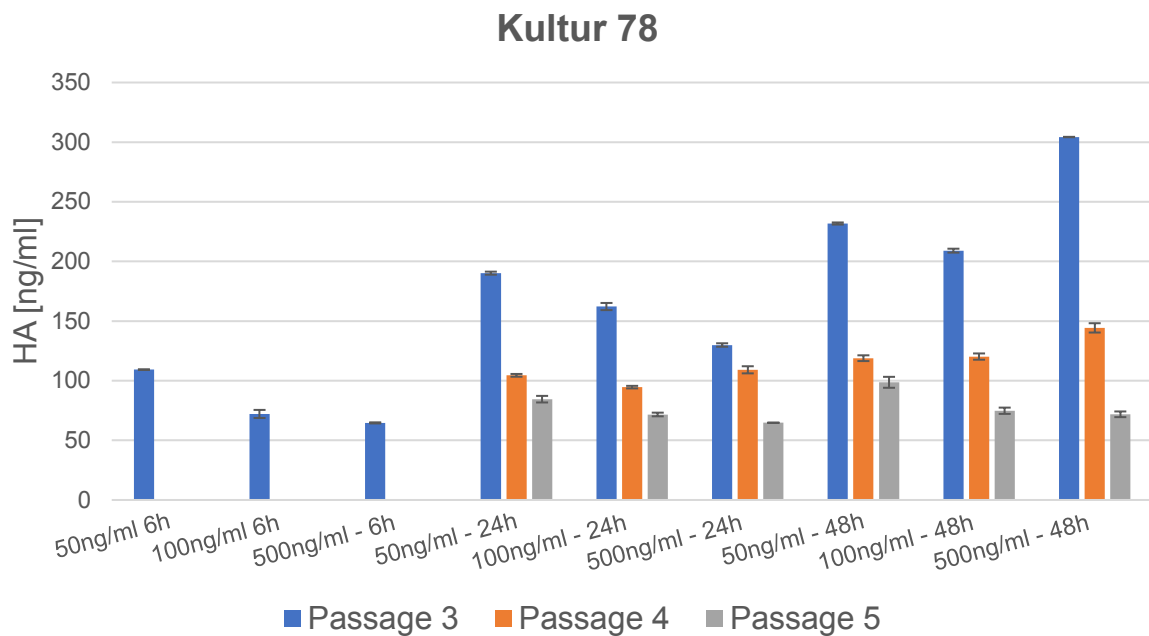


Abbildung 103: Hyaluronsäure Stimulation - Kultur 78

Die Kultur wurde mit 50,100 und 500 ng/ml M22 MAk über 6, 24 und 48 h stimuliert. Kultur 78 wurde aus kryokonserviertem Gewebe angelegt

Bei den Kulturen 35, 36 sowie 78 zeigte sich deutlich, dass in Passage 3 die höchste HA Produktion gemessen werden kann. Nur in Kultur 39 reagierten die Zellen der 4. Passage effektiver auf die Stimulation mit M22 MAk.

Auch wenn eine Dosis-Wirkungsbeziehung bei steigenden M22 MAk Konzentrationen zu erwarten gewesen wäre, zeigte eher die Inkubationszeit einen Einfluss auf die HA Produktion.

Die aus kryokonserviertem Gewebe angelegte Kultur 78, zeigte im Vergleich mit Kulturen aus frischem Gewebe eine vergleichbare Produktion von HA.

Auch wenn die HA Produktionsfähigkeit in den Abbildungen mit steigender Passagenzahl deutlich abnimmt, konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden.

Passage 3 der Kultur 36 wurde frisch sowie kryokonserviert stimuliert. Die Stimulationsfähigkeit der Subkultur nimmt nach Kryokonservierung signifikant ($p=0,028$) ab.

5. Diskussion

Obwohl es zahlreiche Publikationen zu Forschungen mit Zellkulturen orbitaler Fibroblasten gibt, sind die darin enthaltenen Informationen über die Kultivierung oft lückenhaft. Weshalb der Fokus in dieser Arbeit auf der Gewinnung von Grundlageninformationen über die orbitalen Fibroblasten liegt.

Verschiedene Parameter wie die verwendeten Zellzahlen mussten aus Basiswerken über Zellkulturen erlangt und anschließend auf die angelegten Kulturen abgestimmt werden.

Testung der Stoffwechselaktivität oder Dokumentation der Wachstumsgeschwindigkeit unter unterschiedlichen Bedingungen ermöglichen sogar grobe Voraussagen wie sich die Zellen verhalten werden, falls einzelne Parameter doch geändert werden sollten.

Besonders bei der Entwicklung eines Bioassays ist es wichtig die optimalen Bedingungen zu bestimmen, da häufige Änderungen des Protokolls einen Vergleich verschiedener Testreihen erschweren, wenn nicht sogar unmöglich machen können. So zeigt sich in der Literatur, dass durch fehlende Angaben oder auch wechselnde Protokolle innerhalb einer Forschungsgruppe die Ergebnisse der Arbeiten nicht vergleichbar sind.

5.1. Wachstum und Stoffwechselaktivität

5.1.1. Wachstumsbedingungen

Bei Kultivierung der orbitalen Fibroblasten wurde sich maßgeblich am Protokoll der Gruppe Neumann & Krieger *et al.* orientiert (85, 99). Im Vergleich zu dem von der Gruppe verwendeten Protokoll wurde das Gewebe vor dem Anlegen der Kultur mit Kollagenase behandelt. Kollagenaseverdau wird beim Anlegen von Fettvorläuferzellkulturen aus Fettgewebsexplantaten verwendet (114).

Auch wenn der Kollagenaseverdau die Zellen aus ihrer Extrazellulärmatrix herauslösen soll (1 S.152), benötigten die Zellen mindestens drei Wochen, bis sie aus den Zellkonglomeraten herauswachsen. Genauso 6 Well Basisplatten, in denen aus dem Kollagenaseüberstand gewonnene Zellpellets eingesetzt wurden, wiesen nicht von Beginn an reine Zellen auf.

Auch aufgrund dessen, dass ein Kollagenaseverdau über eine Stunde Zellschäden hervorrufen kann, sollte auf diesen Schritt verzichtet werden (116).

Ebenso wurde der mögliche Vorteil einer Beschichtung der Platten mit Poly-D-Lysin getestet. Es konnte jedoch kein positiver Effekt durch die Beschichtung nachgewiesen werden, weswegen auf eine Beschichtung verzichtet werden kann. Vermutlich führen die im Serum enthaltenen Adhäsionsfaktoren bereits zu einer suffizienten Anlagerung (1 S.63).

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Kultur- und Einfriermedien lassen sich Daten sammeln, welche mit Literaturdaten vergleichbar sind. Auch wenn andere Gruppen nicht die gleichen Kultur- und Einfriermedien verwenden (77, 83).

Dementsprechend wäre die Kultivierung der orbitalen Fibroblasten voraussichtlich auch mit Protokollen anderer Gruppen erfolgreich möglich. Verwendung alternativer Protokolle könnte sinnvoll sein, sollte sich herausstellen, dass die im F-Medium erreichte Differenzierung der Zellen für beispielsweise cAMP Stimulationsversuche nicht ausreicht. In diesem Fall könnte auf die Wachstums- und Differenzierungsprotokolle von Smith *et al.* zurückgegriffen werden. Die Gruppe beschreibt, dass mit diesen Protokollen eine Differenzierung in 50 % der Zellen erreicht werden kann (95).

Da differenzierte Zellen eine deutlich erhöhte TSHR Dichte aufweisen, könnten so eindeutigere Signale bei Stimulationsversuchen generiert werden.

Aufgrund der deutlich reduzierteren Kultivierungsdauer erfolgte die Etablierung der Zellen in dieser Arbeit mit dem praktikableren F-Medium. Das F-Medium erlaubt eine zügige Kultivierung mit Differenzierung. Mit der Kombination aus Proliferations- und Differenzierungsfaktoren sind die Zellen direkt für Versuche geeignet. Trotz der Differenzierungsfaktoren wurden Kulturen nur auf zwei neue Kulturplatten aufgeteilt. Aufteilen auf mehr Platten führt zu schnellerem Wachstum mit daraus folgend stärkerer Dedifferenzierung (1 S.147).

Bei Verwendung expliziter Differenzierungsprotokolle von Van Zeijl oder Smith *et al.* folgt der Wachstumsphase eine bis zu zweiwöchige Differenzierungsphase (76). Kommt es in dieser Zeit zum Ausfall von Kulturen können alternative Kulturen, welche sich nicht in der Differenzierungsphase befinden, nicht spontan als Ersatz verwendet werden.

Ein Überblick über die Differenzierung einer Kultur kann auch ohne Färbung der Zellen mit Oil red O Färbung gewonnen werden.

Sollte eine Veränderung der Differenzierungszusätze im Medium vorgenommen werden, könnte eine Färbung mit anschließender Zählung jedoch den Effekt der Veränderung nachweisen.

Alternativ könnte diese Bestimmung sicherer mit dem von Smith *et al.* verwendeten Farbstoff Nile Red erfolgen. Der Fluoreszenzfarbstoff erlaubt eine direkte Mengenbestimmung der gefärbten Fette. (95).

Tabelle 20: Vergleich der Kultivierungsbedingungen

| | Im Rahmen der Arbeit verwendete Kulturbedingungen | Kulturbedingungen orbitaler Fibroblasten in der Literatur |
|--|---|--|
| Anlegen der Kultur | - Mechanisch zerkleinern und anschließender Kollagenaseverdau | - Mechanisch zerkleinern (Neumann & Krieger, Van Zeijl, Smith und Bahn <i>et al.</i> (82, 83, 88)) - Mechanisch zerkleinern und anschließender Kollagenaseverdau (Kahaly <i>et al.</i> (78, 79)) |
| Gewebemenge | - 0,2 - 0,67 g | - Keine Angaben |
| Wachstumsmedium | - F-Medium | - DMEM oder F-Medium (Neumann & Krieger <i>et al.</i> (82)) - Medium 199 (Van Zeijl, Smith und Bahn <i>et al.</i> (75, 77, 83)) - RPMI 1640 (Kahaly <i>et al.</i> (78)) - Variationen sowie Zusätze siehe Tabelle 1 |
| Methode der Subkultivierung | - Trypsin / EDTA 0,05% / 0,02 % | - Trypsin / EDTA (Neumann & Krieger, Smith und Bahn <i>et al.</i> (33, 82, 83)) - Trypsin 0,1 % (Kahaly <i>et al.</i> (78)) |
| verwendete Passagen | - 2. - 5. Passage | - 3.-5. Passage (Neumann & Krieger <i>et al.</i>) (82) - 3.-9-Passage (Van Zeijl <i>et al.</i> (76)) - 2.-12. Passage (Smith <i>et al.</i> (107)) - 2.-10. Passage (Bahn <i>et al.</i> (77)) - 3.-10. Passage (Kahaly <i>et al.</i> (80)) |
| längstes erreichtes Wachstum | - 12. Passage (Petrischale) - 6. Passage (6 Well Platte) | - 10. Passage (Bahn <i>et al.</i> (83)) |
| erneute Subkultivierung der Basisplatten | - Bis zu drei erneute Subkultivierungen | - Keine Angaben |
| Einfriermedium | - 10 % DMSO mit 90 % FBS bei -80 °C | - 50 % FBS, 45 % Medium 199, 5 % DMSO bei -196 °C (Bahn <i>et al.</i> (83)) |

| | Im Rahmen der Arbeit verwendete Kulturbedingungen | Kulturbedingungen orbitaler Fibroblasten in der Literatur |
|--|---|---|
| Kryokonservierung von Subkulturen | - Vitalität nach kryo. = 70 % | - Vitalität nach kryo. = 75 % (Bahn <i>et al.</i> (83)) |
| Zellzahlen (in Zellen/Well) und Kulturgefäße | - 180.000 - 200.000 in 10 cm Petrischale - 100.000/Well in 6 Well Platte - 60.000 - 80.000/Well in 24 Well Platte - 8.000/Well in 96 Well Platte | - 400.000 in 60 mm Platte (Smith <i>et al.</i> (92)) - 50.000/Well in 6 Well Platte (van Zeijl <i>et al.</i> (75)) - 50.000/Well in 24 Well Platte - 5.000/Well in 96 Well Platte - 20.000/Well in 96 Well Platte (Kahaly <i>et al.</i> (78, 79, 84)) - Weitere Kulturgefäße siehe Tabelle 2 |
| Zellzählung | - automatischer Zellzähler und Neubauerkammer | - Keine Angaben |
| Beschichtung der Kulturgefäße | - Poly-D-Lysin | - Keine Angaben |
| Fettfärbung | - Oil red O | - Oil red O (Van Zeijl, Smith, Bahn, Kahaly <i>et al.</i> (76, 79, 81, 91)) - Nile Red (Smith <i>et al.</i> (95)) - Sudan III/Hematoxylin (Kahaly <i>et al.</i> (103)) |
| Stimulanzen | - 50 ng/ml - 500 ng/ml M22 MAk | - 42- 100 ng/ml M22 MAk (Neumann & Kieger <i>et al.</i> (87)) - 500 ng/ml M22 MAk (van Zeijl <i>et al.</i> (98)) - 0,1 - 100 ng/ml M22 MAk (Bahn <i>et al.</i> (90)) - weitere Stimulanzen siehe Tabelle 3 |
| verwendete Assays | - MTT Assay - HA ELSA | - MTT Test (Kahaly <i>et al.</i> (79)) - HA ELISA (Kahaly, Van Zeijl und Smith <i>et al.</i> (33, 75, 84)) - Modifizierter HA ELISA (Neumann & Krieger <i>et al.</i> (85)) - weitere Testverfahren siehe Tabelle 2 |

Bei unvollständigen Angaben konnten diese den Veröffentlichungen der Gruppen nicht entnommen werden. Für Vergleiche zwischen den Gruppen siehe Tabelle 1 - Tabelle 4

5.1.2. Frisches Gewebe

Durch den generellen Wachstumsunterschied zwischen Kultivierung in 6 Well Platten oder Petrischalen, ist es fraglich, ob Kulturen beim Anlegen zeitgleich in beiden Gefäßen angelegt werden sollten. Auch wenn in 6 Well Platten die Kulturen ebenso erfolgreich angewachsen sind, erhält man hierdurch in der gleichen Zeit eine geringere Zellmenge. So ergeben sich auch erst in deutlich höheren Passagen vergleichbare Zellmengen, wie in niedrigeren Passagen der Kulturen in Petrischalen. Nur wenn für Versuche wenig Zellen benötigt werden, wäre dies zu vernachlässigen.

Das langsamere Wachstum der Subkulturen in 6 Well Platten, könnte durch den beim Mediumwechsel auftretenden Scherstress verursacht werden. Dieser ist höher, je kleiner das Kulturgefäß ist (114).

Das würde auch erklären wieso keine Beeinträchtigung des Wachstums in kleineren Versuchsgefäßen festgestellt werden konnte. Die Zellen wurden hier nur ausplattiert und bis zum Versuchsbeginn erfolgte kein Mediumwechsel.

Aufgrund dessen, dass die Basisplatte erneut eine Subkultivierung erlaubt, sollte diese nach Ablösen der Fibroblasten erhalten werden. Bei vitaler Morphologie der Zellen in der Basisplatte konnte so wieder eine Passage 1 erstellt werden. Da die Fibroblasten erneut aus den Zellkonglomeraten herauswachsen, kann davon ausgegangen werden, dass diese Zellen wieder vermehrt zellspezifische Merkmale aufweisen. Dafür spricht auch, dass die Fibroblasten Morphologie und das Wachstumsverhalten einer frühen Passage aufwiesen.

Es wurden jedoch keine Versuche durchgeführt, die diese Vermutung bestätigen. Ebenso finden sich in der Literatur keine Angaben bezüglich erneuter Subkultivierung. Bahn *et al.* geben lediglich an, dass auch bei ihnen die Fettzellkonglomerate in der ersten Platte verbleiben (81).

Bahn *et al.* beschreiben eine erfolgreiche Subkultivierung bis Passage 10. Trotz dessen, dass die Gruppe Medium 199 verwendet (77, 83). Mit dem in dieser Arbeit verwendeten F-Medium konnte bis Passage 12 subkultiviert werden. Aufgrund des Verlusts zellspezifischer Eigenschaften ist es jedoch fraglich, ob die Zellen bis zu Passage 12 kultiviert werden sollten. Es empfiehlt sich die Zellen, in niedrigen Passagen, wie Passage eins und zwei zu kryokonservieren.

5.1.3. Kontrollgewebe

Kultivierung von Kontrollgewebe stellt sich durch die deutlich geringeren Gewebemengen schwieriger dar. Wird Lidgewebe in einer Operation entfernt entspricht dies ähnlichen Gewebemengen, wie denen der Dekompressionsexplantate. Jedoch kann nur das Fettgewebe verwendet werden. War zu wenig Gewebe vorhanden, konnten mehrere Gewebeproben zusammengeführt werden, um eine ausreichende Gewebemenge zu erhalten. Wuchsen die Kulturen trotz dessen erfolgreich an, zeigten diese im Folgenden keine Unterschiede zu Patientenkulturen. Werden bei Operationen Fettgewebeproben zentraler und nasaler Depots entfernt, müssen die Gewebeproben während der Verarbeitung des Gewebes separiert werden, um nur die nasalen weißlichen Fettgewebeproben für Kulturen zu verwenden.

Trotz der Möglichkeit Proben poolen zu können, sollte dies nicht bereits bei Kryokonservierung von Gewebeproben erfolgen. Ein Kontrollpatient könnte eine EO entwickeln, wodurch alle Kontrollproben einer gepoolten Probe nicht mehr verwendet werden könnten. Bei den deutlich größeren Gewebeproben von Patienten empfiehlt es sich diese in kleineren Portionen einzufrieren.

5.1.4. Limitation der Ergebnisse von Kontrollkulturen

Aufgrund der geringen Gewebemengen von nasalen Fettgewebsexplantaten bei Kontrollproben wurden ebenso Kontrollkulturen aus Gewebe von Ptosis- und Xanthelasmaoperationen angelegt.

Vor allem bei Operationen von Xanthelasma entstehen keine Gewebeproben von gleicher embryologischer Herkunft wie das Gewebe von EO Patienten. Bei den Ptosisoperationen kann ebenso wie bei den Blepharoplastiken nasales Fettgewebe anfallen. Im Gegensatz zu letzteren ist dies jedoch sehr selten.

Auch wenn innerhalb der Kontrollkulturen keine Auffälligkeiten im Wachstumsverhalten festgestellt werden konnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Beobachtungen nicht repräsentativ für rein nasale Proben sind.

Wie von Kim *et al.* (117) beschrieben sollten für Versuche, in welchen die Stimulationsfähigkeit unterschiedlicher Kollektive verglichen werden, zum Anlegen einer Kontrollkultur ausschließlich nasale Fettgewebeproben verwendet werden. Bei den in der Literaturdiskussion betrachteten Gruppen wird die Herkunft des Kontrollgewebes nicht beachtet.

5.1.5. Kryokonserviertes Gewebe

Es konnte gezeigt werden, dass Kulturen aus kryokonserviertem Gewebe im Vergleich zu frischen Proben, falls sie konfluentes Wachstum erreichten eine gleichwertige Stoffwechselaktivität aufwiesen. Jedoch wirkt sich die Kryokonservierung negativ auf die Zellgesundheit aus, was zu einer verlängerten Anwachszeit bis hin zum Scheitern der Kultivierung führt. Bei Subkulturen konnte im Vergleich zu den Subkulturen der Kulturen aus frischem Gewebe kein Unterschied im Wachstumsverhalten festgestellt werden.

5.1.6. Gewebemenge

Dass die Gewebemenge der ausschlaggebende Faktor für einen Erfolg beim Anlegen einer Kultur ist, stellt nur eine Vermutung dar. Es finden sich keine Angaben bezüglich verwendeter Gewebemengen bei Zellkulturen orbitaler Fibroblasten in der Literatur. Ebenso könnte es sein, dass die Gewebeproben von älteren Patienten stammten. Zellen älterer Patienten zeigen im Vergleich zu jungen Patienten schlechteres Wachstum, besonders die Migrationsfähigkeit aus Gewebestücken ist eingeschränkt (118). Da Gewebeproben ab 0,8 g bereits nach dem Zerkleinern die gesamte Petrischale ausfüllen, sollte nicht mehr Gewebe verwendet werden. Unter 0,5 g kam es, vor allem bei kryokonserviertem Gewebe, deutlich häufiger zu nicht erfolgreichem Wachstum. Sofern dies möglich ist, sollte demnach eine Mindestgewebemenge von 0,5 g eingesetzt werden.

5.1.7. Kryokonservierte Subkulturen

Nach erfolgreicher Adhäsion der aufgetauten Zellen am Kulturgefäßboden kann anschließend mit gutem Wachstum gerechnet werden. Trotz dessen empfiehlt es sich frühe Passagen zu kryokonservieren, um gegebenenfalls bei den aufgetauten Zellen vor Verwendung in Versuchen durch Subkultivierung einen erneuten Wachstumsreiz zu setzen. Bei Kryokonservierung zeigt sich unter Verwendung eines anderen Einfriermediums die gleiche Erfolgsrate wie bei Bahn *et al.* (83).

Auch wenn kein deutlicher Unterschied zwischen der Stoffwechselaktivität von vier Wochen oder 16 Wochen bei -80 °C kryokonservierten Subkulturen zu finden ist, sollten die Proben bei längerer Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Gewebeproben, welche drei Monate bis zwei Jahre bei -80 °C gelagert wurden, benötigten im Vergleich zu Gewebeproben welche vier Wochen kryokonserviert wurden deutlich mehr Zeit, um anzuwachsen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die im Vergleich zu Gewebeproben, empfindlicheren Subkulturen bei längerer Lagerung unter -80 °C deutlichere Zellschädigungen erleiden.

5.2. Stimulation der Zellen

5.2.1. Wechsel des Mediums

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung stellt das F-Medium keine optimale Grundlage für Versuche dar. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zu Wechselwirkungen zwischen den zu testenden Stimulanzien und Zusätzen des Mediums kommt. Bei hoch serumhaltigen Medien werden die Zellen zusätzlich durch Inhaltsstoffe des Serums stimuliert. Ohne Serumzusatz kann ein bei Stimulation auftretender Effekt eindeutiger bestimmt werden.

Da orbitale Fibroblasten bereits erfolgreich in Medium 199 ohne Wachstumszusätze kultiviert wurden, kann dieses Medium eine weniger komplexe Grundlage für Versuche darstellen.

Bei Wechsel des Mediums von F-Medium zu Medium 199 zeigten die Zellen jedoch eine deutlich reduzierte Stoffwechselaktivität. Allerdings war auch die Proliferation der Zellen in Medium 199 deutlich reduziert, weshalb keine sichere Aussage über die Ursache der Stoffwechselreduktion getroffen werden kann. Da die Stoffwechselaktivität im MTT Assay dadurch bestimmt wird, dass die Zellen den Farbstoff verstoffwechseln wird der Wert auch maßgeblich durch die vorhandene Zellzahl bestimmt.

Für Medium 199 wird eine CO_2 Konzentration von 5 % empfohlen. Was bedeutet, dass sich bei 5 % CO_2 Sättigung im Inkubator ein anderer pH-Wert im Medium einstellt als in F-Medium, welches für 7 % CO_2 konzipiert ist.

Auch wenn die Veränderung des CO_2 Gehalts hier einen Einfluss gehabt haben könnte, zeigt eine Umstellung von F-Medium auf DMEM mit 10 % FBS keine vergleichbare Reduktion der Stoffwechselaktivität. Bei DMEM wird eine Konzentration von 10 % CO_2 empfohlen.

Da das F-Medium bereits zu 75 % aus DMEM besteht dürfte also der Wechsel der Mediuminhaltsstoffe den negativen Effekt auf das Wachstum ausgelöst haben.

Sollte für Versuche auf eine Stimulation in F-Medium verzichtet werden, empfiehlt sich eine Stimulation in DMEM.

Bei direkter Kultivierung in Medium 199 dürfte nach Angaben der Literatur gleichwertiges Wachstum erreicht werden. Dann wäre es möglich wie von der Gruppe Marino *et al.* gezeigt im gleichen Medium zu kultivieren und zu stimulieren (119).

5.2.2. Stimulationsbedingungen

Generell zeigte sich eine deutliche Steigerung der Stoffwechselaktivität bei Stimulation mit M22 MAk. Bei den getesteten Versuchsbedingungen konnte jedoch kein deutlicher Unterschied festgestellt werden.

Durch Vorinkubation mit einem Hungermedium mit 1 % FBS sollte erreicht werden, dass der Startzeitpunkt der Stimulation auf einem vergleichbaren Aktivitätslevel beginnt. Es konnte kein Einfluss durch die Verwendung von Hungermedium gezeigt werden. Da in kleineren Kulturgefäßen der beim Mediumwechsel auftretende Scherstress die Zellen beschädigen kann (114), sollte auf einen Mediumwechsel vor Versuchen möglichst verzichtet werden.

Stimulation in DMEM mit 10 % FBS zeigte im Vergleich zur Stimulation in Thyretainpuffer nur einen gering positiven Effekt. Durch Stimulation im Reaktionspuffer kann eine undefinierte Stimulation der Zellen durch Serum vermieden werden. Aufgrund der bei Inkubation in Reaktionspuffer beobachteten Zellschädigungen könnte eine Inkubation in DMEM mit 10 % FBS während der Stimulation trotzdem hilfreich sein, wenn die Inkubationszeit für einen Versuch die hier betrachteten 48 h übersteigt.

Während beim hier durchgeführten Versuch die kumulative Dosis an stabil vorliegender HA gemessen wird, ist es nicht ausschlaggebend, ob die Zellen gegen Ende des Versuchs vital sind oder nicht. Sollte die Stimulation weniger stabiler Stoffwechselprodukte gemessen werden, muss die Stimulationszeit oder das Stimulationsmedium angepasst werden.

5.2.3. Stimulation mit M22 MAk

Um die Stimulierbarkeit des TSHR sowie der Fibroblasten allgemein testen zu können, wurde M22 MAk in einem HA Assay verwendet. Die Überstände mit der darin enthaltenen HA können bei -20 °C gelagert werden. Die somit zeitlich von der Stimulation unabhängige Messung bietet mehr Flexibilität als ein cAMP Assay, bei welchem aufgrund der Instabilität von cAMP direkt im Anschluss an die Stimulation gemessen werden muss.

Bei der Stimulation mit M22 MAk zeigt sich ein deutlicher Abfall der Stimulationsfähigkeit von Passage 3 zu Passage 4. Die Ausnahme bildet Kultur 39, hier kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Beeinträchtigung durch Wechsel des Inkubators mit dem CO₂ Konzentrationswechsel hervorgerufen wurde. Generell zeigt sich, dass auch in Passage 5 noch eine Stimulation der Zellen möglich ist.

Es zeigt sich eine Zunahme der HA Menge über länger andauernde Stimulation.

Auch wenn bereits nach 24h Zellschäden zu beobachten waren, produzierten die Zellen weiterhin HA. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die beobachteten Zellschäden durch den Reaktionspuffer oder Entzug des gewohnten F-Mediums hervorgerufen werden.

Die steigende Konzentration von M22 MAk zeigte nicht den erwarteten Dosis-Wirkungseinfluss. Wie von Neumann & Krieger *et al.* beschrieben, handelt es sich bei 100 ng/ml M22 MAk bereits um eine hohe Dosis M22 MAk (82). Bei dieser Dosis liegt der TSHR vermutlich bereits gesättigt vor. Wenn der Rezeptor bei 50 ng/ml gesättigt vorliegt dürften bei Stimulation mit 500 ng/ml weder geringere noch größere Mengen HA produziert werden. Dies könnte jedoch der Fall sein, wenn in den Kulturgefäßen unterschiedliche Mengen an Zellen vorlagen. Aufgrund der Zellschäden werden tote Zellen beim Abnehmen des Überstandes mit der darin enthaltenen HA abgenommen. Die tatsächlich vorliegende Zellmenge kann somit nicht mehr bestimmt werden. Während Neumann & Krieger *et al.* von konstanten Zellmengen ausgehen, sobald die Wells konfluent bewachsen sind (87), korrigieren Van Zeijl *et al.* die gemessene HA Menge mit der nach Stimulation bestimmten gesamt Proteinmenge (76).

Die schwankenden HA Werte lassen vermuten, dass aufgrund der unterschiedlichen Zellmorphologien bei Versuchsbeginn keine gleichen Zellmengen vorlagen. Eine Korrektur mittels der gesamt Proteinmenge kann bei den beschädigten Zellen jedoch nicht durchgeführt werden.

Um die Ergebnisse mit der zu Versuchsbeginn, sowie Versuchsende vorliegenden Zellzahl zu korrigieren, könnten die jeweiligen Zellzahlen mittels optischer Zählverfahren im Kulturgefäß bestimmt werden (1 S.127). Dies ermöglicht jedoch keine Aussage über die Vitalität der Zellen.

Kultur 78, welche aus zwei Jahre lang kryokonserviertem Gewebe angelegt wurde, zeigte eine ebenso hohe HA Produktion wie die Kulturen, welche aus frischem Gewebe angelegt wurden. Im Vergleich hierzu produzierte die kryokonservierte Subkultur der Kultur 36 eine deutlich geringere HA Menge.

Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Zellen generell weniger HA produziert haben oder ob die Subkulturen nach der Kryokonservierung weniger TSHR exprimieren und somit weniger stimuliert wurden.

5.2.4. Ermittlung von Versuchsbedingungen

Mit Hilfe der durchgeführten Versuche lassen sich grundlegende Versuchsbedingungen festlegen.

Bei Bestimmung der Versuchsbedingungen für weitere HA Stimulationsversuche muss beachtet werden, dass es sich bei M22 MAk um einen starken Aktivator des TSHR handelt. Voraussichtlich führt eine Stimulation durch Patientenserum oder aus dem Serum isolierter Antikörper zu einer deutlich geringeren Stimulation des Rezeptors. Demnach sollte die Verwendung kryokonservierter Subkulturen nur in Ausnahmefällen erfolgen.

Kulturen sollten möglichst in Passage 3 ohne vorherige Kryokonservierung verwendet werden. Auch wenn höhere Passagen HA produziert haben sind die gemessenen Mengen in niedrigeren Passagen höher und somit eindeutiger interpretierbar. Aufgrund der zunehmenden Zellschädigung führt eine längere Stimulation (>48 h) im Reaktionspuffer voraussichtlich zu keinem weiteren HA Anstieg. Bei weiteren HA Stimulationen können demnach 48 h Stimulationszeit beibehalten werden. Hierfür sollte bestimmt werden, ob die Vitalität in allen Versuchswells gleichmäßig abnimmt. Nur dann kann dies beim Vergleich der Versuchsergebnisse außer Acht gelassen werden.

Sollte die Stimulationsfähigkeit der Zellen, bei Serum oder Antikörperversuchen, mit M22 MAk kontrolliert werden, reicht hierfür die Verwendung von 100 ng/ml M22 MAk aus. Für neue Versuche wie beispielsweise Messung des cAMP Anstiegs bei Stimulation, müssen Versuchsbedingungen an das jeweilige Assay angepasst werden.

5.2.5. Hyaluronsäure Assay

Die HA Standardbestimmung mit dem in dieser Arbeit durchgeführten Assay wurde mit den mitgelieferten HA Standards durchgeführt. Bei diesen Standards handelt es sich um Hühner HA. Neumann & Krieger *et al.* weisen darauf hin, dass das HA Bindungsprotein der Assays unterschiedliche Affinität zur HA aufweist, je nachdem welche Größe das zu messende HA Molekül besitzt.

Sie verwenden in den von ihnen durchgeführten Messungen einen HA Standard von 1.000.000 Dalton, da die von orbitalen Fibroblasten produzierten HA Moleküle nach ihren Angaben deutlich größer sind, als die von anderen Zellen produzierte HA Moleküle (87).

Werden mit den etablierten Kulturen Versuche durchgeführt, bei welchen die Aktivierung der Zellen nur qualitativ gemessen wird, hat die Verwendung von Hühner HA als Standard keinen Einfluss. Auch wenn die stimulierten Kulturen untereinander verglichen werden wäre der Messfehler, welcher durch Verwendung der Hühner HA auftreten würde, gleich.

Erst wenn sich der Fokus der Forschung auf pathologische Stoffwechsellaspekte der orbitalen Fibroblasten richtet, kann es nötig sein das HA Assay anzupassen.

5.3. Zellzählung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellzählungen zeigen deutlich, dass mit dem *Brightfield Modus* des automatischen Zellzählers unter Trypanblau Färbung nicht gearbeitet werden sollte. Die heterogene Oberfläche der Fibroblasten ist für dieses Verfahren nicht geeignet.

Im Gegensatz hierzu erkennt das Zellzählgerät bei Fluoreszenzfärbung auch eine unregelmäßig geformte Farbmarkierung als einzelne Zelle. Auch hier entsprechen die Zellzahlen nicht exakt denen bei manueller Zählung. Der Unterschied ist jedoch geringer als bei der automatischen Zellzählung mit Trypanblaufärbung.

Bei der Zellzählung mit Fluoreszenzfärbung werden weniger Zellen gezählt. Bei der so ermittelten Zellzahl werden demnach mehr Zellen als gewünscht ausplattiert. Während zu geringe Zellzahlen zu einer deutlich reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit führen können (1 S.118) sollte dies keinen negativen Einfluss zeigen.

Im Vergleich zum Benutzer unabhängigen automatischen Zellzähler spielt die Erfahrung des Benutzers bei einer manuellen Zellzählung mit Neubauerkammer eine entscheidende Rolle.

Zusätzlich wird bei dem in dieser Arbeit verwendeten Zellzähler ein Volumen von 0,5 μ l ausgezählt. Das betrachtete Volumen der Neubauerkammer beträgt 0,4 μ l, somit kann davon ausgegangen werden, dass das Ergebnis des automatischen Zellzählers genauer ist.

5.4. Qualitätsmanagement

Trotz beachteter Steriltechnik traten Kontaminationen von angelegten Kulturen auf. Diese Bakterien- oder Pilzkontaminationen konnten bereits makroskopisch erkannt werden. Da eine Kontamination den vollständigen Verlust der befallenen Kultur bedeutet, gilt es diese so gut wie möglich zu verhindern.

Hier ist besonders die Kommunikation mit den Operateuren/rinnen der Augenklinik wichtig. Liegt zum Zeitpunkt der Operation kein geeignetes Transportgefäß vor muss das Gewebe zwischengelagert werden. Trotz der sterilen OP-Bedingungen erhöht ungekühlte, trockene Lagerung die Gefahr einer Kontamination sowie Zellschäden.

Es traten ebenso Kontaminationen gefrorener Gewebeproben auf. Da beispielsweise Mykoplasmen Temperaturen von -196 °C im Stickstofftank überleben ist es bei Kryokonservierung von Proben wichtig ebenso steril zu arbeiten wie bei frischen Gewebeproben.

Testung auf Mykoplasmenbefall wurde im Rahmen dieser Arbeit bei den Proben des M22 MAk Stimulationsversuchs durchgeführt. Das Ergebnis war bei allen Kulturen negativ.

Tests auf Mykoplasmenbefall sollten routinemäßig durchgeführt werden, oder spätestens vor Versuchsbeginn. Die Versuche könnten bei einem möglichen Befall falsche Ergebnisse liefern.

Vor allem Bilder schlecht wachsender Kulturen verdeutlichen, dass es wichtig ist die Kulturen regelmäßig unter dem Mikroskop zu kontrollieren.

Die zwei Inkubatoren im Labor ermöglichen eine getrennte Inkubation von Patienten- und Kontrollkulturen. Es kann so eine Kreuzkontamination sicher vermieden werden. Ebenso können neu angelegte Kulturen separat von bereits angewachsenen Kulturen inkubiert werden. Sollte direkt eine Kontamination auftreten, kann diese bei getrennter Inkubation nicht auf bestehende Kulturen übergreifen.

Im Rahmen der Arbeit wurde ein SOP für die Zellkultur orbitaler Fibroblasten erstellt. Sollten Änderungen der Kulturbedingungen vorgenommen werden, müssen diese im SOP ergänzt werden. Da Veränderungen der Kulturbedingungen Versuchsergebnisse negativ beeinflussen können, sollten diese nicht während der Inkubation von Versuchskulturen oder an Versuchskulturen eingeführt werden.

5.5. Ausblick

Auch bei erfolgreicher Kultivierung darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich um Primärzellen handelt, deren Reaktion je nach verwendetem Gewebe sowie Passage unterschiedlich ausfallen kann. Bei Versuchen sollte demnach immer mit M22 MAk oder einer alternativen Substanz, die Stimulierbarkeit der jeweiligen Kultur und Passage bestimmt werden.

Sollten andere Assays verwendet werden, für deren Durchführung nur geringe Zellmengen benötigt werden, könnte bereits Passage 2 verwendet werden.

Auch wenn bei Etablierung eines Bioassays die Verwendung nativer Seren den einfachsten Arbeitsablauf gewährleisten würden, zeigen Ergebnisse der betrachteten Gruppen, dass erst bei Verwendung isolierter Antikörper ausreichend Stimulation erreicht werden kann (84). Ein HA Anstieg bei Stimulation konnte, anders als ein cAMP Anstieg, von allen Gruppen sicher nachgewiesen werden (76), weswegen die Verwendung des HA ELISAs bei Etablierung eines Bioassays empfohlen wird.

Für ein Screening potenzieller Therapeutika eignen sich Primärzellkulturen deutlich besser als Zelllinien, welche mit dem TSHR transfiziert wurden.

Bei Inhibitionsversuchen könnte wie von Neumann & Krieger *et al.* bereits durchgeführt eine IgG Konzentration von 4 mg/ml verwendet werden, welche eine gesättigte Stimulation der Zellen erzeugt (85). Anschließend kann die Potenz des Inhibitors anhand der eintretenden Hemmung bestimmt werden.

Bei allen Versuchen sollte, zur Korrektur der Ergebnisse, eine präzise Bestimmung der Zellzahl vor, während und nach dem Versuch durchgeführt werden.

Im weiteren Verlauf soll mit den Zellen ein cAMP Assay durchgeführt werden, um zu evaluieren welches Assay für standardisierte Testungen praktikabler ist.

Ebenso soll getestet werden, ob nur durch isolierte Antikörper oder bereits durch Serum eine ausreichende Stimulation erreicht werden kann.

Auch soll in weiteren Projekten erarbeitet werden, ob sich Alter, CAS oder andere Eigenschaften des Gewebedonors entscheidend auf die Kultur auswirken.

6. Zusammenfassung

Bis heute ist es nicht möglich die Autoimmunerkrankung EO kausal oder präventiv zu behandeln. Dennoch ist es maßgeblich Forschungen mit Zellkulturen orbitaler Fibroblasten zu verdanken, dass in den letzten Jahren deutliche Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt werden konnten.

In dieser Arbeit sollten die optimalen Standardabläufe für die Kultivierung von orbitalen Fibroblasten im Labor für Schilddrüsen- und Stoffwechselerkrankungen Mainz etabliert werden, und deren Stimulationsfähigkeit nachgewiesen werden. Damit diese Kulturen routinemäßig für die Testung potenzieller neuer Therapeutika oder zur Generierung neuer Bioassays verwendet werden können.

Gewebe wurde aus Operationen der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz bereitgestellt. Wobei Kulturen aus Patientengewebe (n = 16) sowie aus Kontrollgewebe (n = 5) angelegt wurden. Kontrollgewebe stammte von Patienten, welche nicht unter einer EO leiden.

Gewebe wurde im Labor frisch verarbeitet oder zur späteren Verwendung bei -80 °C kryokonserviert. Zum Anlegen einer Kultur wurden die Proben mechanisch sowie enzymatisch zerkleinert und anschließend im Inkubator unter Verwendung des Wachstumsmediums „F-Medium“ kultiviert. Morphologie sowie Wachstumsverhalten der Kulturen wurde dokumentiert. Die Eignung verschiedener Kulturbedingungen wurde anhand der Stoffwechselaktivität der Zellen mit Hilfe eines MTT Assays evaluiert. Die Stimulationsfähigkeit des TSHR Rezeptors der Zellen wurde mittels Inkubation mit M22 MAk in einem anschließendem HA ELISA bestimmt.

Es konnte ein konstantes Zellwachstum orbitaler Fibroblasten erreicht werden. Die fortbestehende Zusammenarbeit mit der Augenklinik, sowie die etablierten Handlungsabläufe und -schritte ermöglichen nun die standardisierte Erstellung von Primärzellkulturen orbitaler Fibroblasten.

Kulturen aus frischem Gewebe konnten ebenso gut stimuliert werden wie Kulturen aus kryokonserviertem Gewebe. Auch bei kryokonservierten Subkulturen konnte eine Stimulation über den TSHR erreicht werden, wobei der Stimulationseffekt deutlich geringer ausfiel.

Die gewählten Wachstumsbedingungen mit dem F-Medium sorgen für eine Balance zwischen Differenzierung und Proliferation der Zellen. Somit eignen sich die nach diesem Protokoll kultivierten Zellen für grundlegende Versuche, welche den TSHR benötigen.

Trotz der Differenz zu Kultivierungsprotokollen anderer Forschungsgruppen konnten bezüglich grundlegender Wachstums- sowie Differenzierungsparameter mit Literaturangaben vergleichbare Ergebnisse erreicht werden. Würde der Fokus der Forschung auf Pathogenesevorgänge ausgerichtet werden, sollten die Wachstumsbedingungen angepasst werden.

Da es sich um Primärzellen handelt muss immer beachtet werden, dass zwischen verschiedenen Kulturen deutliche Unterschiede im Wachstum, der Stoffwechselaktivität sowie Stimulierbarkeit auftreten können.

Die etablierten Zellkulturen können nun verwendet werden, um Bioassays zu generieren, weitere Einblicke in die Pathogenese der Erkrankung zu erhalten oder für die Testung potenzieller neuer Therapeutika.

7. Literaturverzeichnis

1. Gstraunthaler G. Zell- und Gewebekultur : allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. In: Lindl T, editor. 7. Aufl. ed. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2013.
2. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2011;2(1):403-30.
3. Taylor PN, Zhang L, Lee RWJ, Muller I, Ezra DG, Dayan CM, et al. New insights into the pathogenesis and nonsurgical management of Graves orbitopathy. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(2):104-16.
4. Feldon SE, Park DJ, O'Loughlin CW, Nguyen VT, Landskroner-Eiger S, Chang D, et al. Autologous T-lymphocytes stimulate proliferation of orbital fibroblasts derived from patients with Graves' ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(11):3913-21.
5. Bahn RS. Current Insights into the Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy. *Horm Metab Res*. 2015;47(10):773-8.
6. Lytton SD, Kahaly GJ. Bioassays for TSH-receptor autoantibodies: an update. *Autoimmun Rev*. 2010;10(2):116-22.
7. Lytton SD, Ponto KA, Kanitz M, Matheis N, Kohn LD, Kahaly GJ. A novel thyroid stimulating immunoglobulin bioassay is a functional indicator of activity and severity of Graves' orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(5):2123-31.
8. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie : 10 Tab. 4., vollst. überarb. Aufl. ed. Stuttgart u.a.: Thieme; 2012: S. 122-130.
9. Pinsky L, Finkelberg R, Straisfeld C, Zilahi B, Kaufman M, Hall G. Testosterone metabolism by serially subcultured fibroblasts from genital and nongenital skin of individual human donors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972;46(2):364-9.
10. Hassell TM, Page RC, Narayanan AS, Cooper CG. Diphenylhydantoin (dilantin) gingival hyperplasia: drug-induced abnormality of connective tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(8):2909-12.
11. Kozdon K, Fitchett C, Rose GE, Ezra DG, Bailly M. Mesenchymal Stem Cell-Like Properties of Orbital Fibroblasts in Graves' Orbitopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015;56(10):5743-50.
12. Brandau S, Bruderek K, Hestermann K, Görtz G-E, Horstmann M, Mattheis S, et al. Orbital Fibroblasts From Graves' Orbitopathy Patients Share Functional and Immunophenotypic Properties With Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015;56(11):6549-57.
13. Korn BS, Kikkawa DO, Hicok KC. Identification and characterization of adult stem cells from human orbital adipose tissue. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*. 2009;25(1):27-32.
14. Johnston MC, Noden DM, Hazelton RD, Coulombre JL, Coulombre AJ. Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp Eye Res*. 1979;29(1):27-43.
15. Wyse EP, McConahey WM, Woolner LB, Scholz DA, Kearns TP. Ophthalmopathy without hyperthyroidism in patients with histologic Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1968;28(11):1623-9.

16. Ponto KA, v. d. Osten-Sacken S, Elflein H, Koutsimpelas D, Pfeiffer N, Kahaly GJ. Versorgungsrelevante Daten einer interdisziplinären Sprechstunde für endokrine Orbitopathie. *Der Ophthalmologe*. 2020;117(11):1105-11.
17. Teng CS, Yeo PP. Ophthalmic Graves's disease: natural history and detailed thyroid function studies. *British Medical Journal*. 1977;1(6056):273-5.
18. Perros P, Hegedüs L, Bartalena L, Marcocci C, Kahaly GJ, Baldeschi L, et al. Graves' orbitopathy as a rare disease in Europe: a European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) position statement. *Orphanet J Rare Dis*. 2017;12(1):72.
19. Ponto KA, Kahaly GJ. Endokrine Orbitopathie – aktuelle Diagnostik und Therapie*. *Medizinische Klinik*. 2008;103(10):717-30.
20. Perros P, Žarković M, Azzolini C, Ayvaz G, Baldeschi L, Bartalena L, et al. PREGO (presentation of Graves' orbitopathy) study: changes in referral patterns to European Group On Graves' Orbitopathy (EUGOGO) centres over the period from 2000 to 2012. *Br J Ophthalmol*. 2015;99(11):1531-5.
21. Saeed P, Tavakoli Rad S, Bisschop P. Dysthyroid Optic Neuropathy. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*. 2018;34(4S Suppl 1):S60-s7.
22. Ponto KA, Pitz S, Pfeiffer N, Hommel G, Weber MM, Kahaly GJ. Endokrine Orbitopathie. *Dtsch Arztebl International*. 2009;106(17):283-9.
23. Smith TJ, Bahn RS, Gorman CA. Connective tissue, glycosaminoglycans, and diseases of the thyroid. *Endocr Rev*. 1989;10(3):366-91.
24. Khoo DH, Eng PH, Ho SC, Tai ES, Morgenthaler NG, Seah LL, et al. Graves' ophthalmopathy in the absence of elevated free thyroxine and triiodothyronine levels: prevalence, natural history, and thyrotropin receptor antibody levels. *Thyroid*. 2000;10(12):1093-100.
25. Gerding MN, van der Meer JW, Broenink M, Bakker O, Wiersinga WM, Prummel MF. Association of thyrotrophin receptor antibodies with the clinical features of Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;52(3):267-71.
26. Eckstein AK, Plicht M, Lax H, Neuhäuser M, Mann K, Lederbogen S, et al. Thyrotropin receptor autoantibodies are independent risk factors for Graves' ophthalmopathy and help to predict severity and outcome of the disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3464-70.
27. Feliciello A, Porcellini A, Ciullo I, Bonavolontà G, Avvedimento EV, Fenzi G. Expression of thyrotropin-receptor mRNA in healthy and Graves' disease retro-orbital tissue. *Lancet*. 1993;342(8867):337-8.
28. Bahn RS, Dutton CM, Natt N, Joba W, Spitzweg C, Heufelder AE. Thyrotropin receptor expression in Graves' orbital adipose/connective tissues: potential autoantigen in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(3):998-1002.
29. Wakelkamp IM, Bakker O, Baldeschi L, Wiersinga WM, Prummel MF. TSH-R expression and cytokine profile in orbital tissue of active vs. inactive Graves' ophthalmopathy patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;58(3):280-7.
30. Moshkelgosha S, So PW, Deasy N, Diaz-Cano S, Banga JP. Cutting edge: retrobulbar inflammation, adipogenesis, and acute orbital congestion in a preclinical female mouse model of Graves' orbitopathy induced by thyrotropin receptor plasmid-in vivo electroporation. *Endocrinology*. 2013;154(9):3008-15.

31. Smith TJ, Kahaly GJ, Ezra DG, Fleming JC, Dailey RA, Tang RA, et al. Teprotumumab for Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *N Engl J Med.* 2017;376(18):1748-61.
32. Pritchard J, Han R, Horst N, Cruikshank WW, Smith TJ. Immunoglobulin activation of T cell chemoattractant expression in fibroblasts from patients with Graves' disease is mediated through the insulin-like growth factor I receptor pathway. *J Immunol.* 2003;170(12):6348-54.
33. Smith TJ, Hoa N. Immunoglobulins from patients with Graves' disease induce hyaluronan synthesis in their orbital fibroblasts through the self-antigen, insulin-like growth factor-I receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(10):5076-80.
34. Marinò M, Rotondo Dottore G, Ionni I, Lanzolla G, Sabini E, Ricci D, et al. Serum antibodies against the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in Graves' disease and Graves' orbitopathy. *J Endocrinol Invest.* 2019;42(4):471-80.
35. Lanzolla G, Ricci D, Nicoli F, Sabini E, Sframeli A, Brancatella A, et al. Putative protective role of autoantibodies against the insulin-like growth factor-1 receptor in Graves' Disease: results of a pilot study. *J Endocrinol Invest.* 2020;43(12):1759-68.
36. Krieger CC, Neumann S, Gershengorn MC. Is There Evidence for IGF1R-Stimulating Abs in Graves' Orbitopathy Pathogenesis? *Int J Mol Sci.* 2020;21(18).
37. Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr Rev.* 2003;24(6):802-35.
38. Felke B, Hansen C, Dienes HP, Otto E, Weckauf H, Beyer J, et al. Immunohistochemische Untersuchungen des retrobulbären Gewebes bei endokriner Orbitopathie. *Aktuelle Endokrinologie.* 1993;14(3-4):127-31.
39. Heufelder AE. Retro-orbital autoimmunity. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1997;11(3):499-520.
40. Salvi M, Vannucchi G, Currò N, Campi I, Covelli D, Dazzi D, et al. Efficacy of B-cell targeted therapy with rituximab in patients with active moderate to severe Graves' orbitopathy: a randomized controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(2):422-31.
41. Stan MN, Salvi M. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Rituximab therapy for Graves' orbitopathy - lessons from randomized control trials. *Eur J Endocrinol.* 2017;176(2):R101-r9.
42. Sempowski GD, Rozenblit J, Smith TJ, Phipps RP. Human orbital fibroblasts are activated through CD40 to induce proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol.* 1998;274(3):C707-14.
43. Cao HJ, Wang HS, Zhang Y, Lin HY, Phipps RP, Smith TJ. Activation of human orbital fibroblasts through CD40 engagement results in a dramatic induction of hyaluronan synthesis and prostaglandin endoperoxide H synthase-2 expression. Insights into potential pathogenic mechanisms of thyroid-associated ophthalmopathy. *J Biol Chem.* 1998;273(45):29615-25.
44. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(4):375-91.
45. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, et al. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem.* 1999;274(35):25085-92.

46. Zhang L, Bowen T, Grennan-Jones F, Paddon C, Giles P, Webber J, et al. Thyrotropin receptor activation increases hyaluronan production in preadipocyte fibroblasts: contributory role in hyaluronan accumulation in thyroid dysfunction. *J Biol Chem*. 2009;284(39):26447-55.
47. Kahaly GJ, Diana T. TSH Receptor Antibody Functionality and Nomenclature. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:28.
48. Morshed SA, Ando T, Latif R, Davies TF. Neutral antibodies to the TSH receptor are present in Graves' disease and regulate selective signaling cascades. *Endocrinology*. 2010;151(11):5537-49.
49. Sanders J, Evans M, Premawardhana LD, Depraetere H, Jeffreys J, Richards T, et al. Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody. *Lancet*. 2003;362(9378):126-8.
50. Bartalena L, Baldeschi L, Dickinson AJ, Eckstein A, Kendall-Taylor P, Marcocci C, et al. Consensus statement of the European group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) on management of Graves' orbitopathy. *Thyroid*. 2008;18(3):333-46.
51. Mourits MP, Prummel MF, Wiersinga WM, Koornneef L. Clinical activity score as a guide in the management of patients with Graves' ophthalmopathy. *Clinical Endocrinology*. 1997;47(1):9-14.
52. Ponto KA, Pitz S, Mann WJ, Weber MM, Pfeiffer N, Kahaly GJ. Management of Graves' orbitopathy: evidence-based recommendations. *Dtsch Med Wochenschr*. 2009;134(49):2521-4.
53. Wiersinga WM. Smoking and thyroid. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(2):145-51.
54. Bartalena L, Martino E, Marcocci C, Bogazzi F, Panicucci M, Velluzzi F, et al. More on smoking habits and Graves' ophthalmopathy. *J Endocrinol Invest*. 1989;12(10):733-7.
55. Marcocci C, Kahaly GJ, Krassas GE, Bartalena L, Prummel M, Stahl M, et al. Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy. *N Engl J Med*. 2011;364(20):1920-31.
56. Kahaly GJ. Management of moderately severe Graves' orbitopathy. In: Wiersinga WM, Kahaly GJ (Hrsg). *Graves' Orbitopathy*. 2 ed. Basel: Karger; 2010. 120-52 p.
57. Baldeschi L. Rehabilitative Surgery In: Wiersinga W.M., Kahaly G.J. (Hrsg). *Graves' Orbitopathy*. 2 ed. Basel: Karger; 2010. 167-70 p.
58. Schaeffer WI. Terminology associated with cell, tissue, and organ culture, molecular biology, and molecular genetics. Tissue Culture Association Terminology Committee. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1990;26(1):97-101.
59. Joppien S. Basics experimentelle Doktorarbeit. In: Maier SLW, Danielle Sabina, editor. *Basics*. 1. Aufl. ed. München: Elsevier, Urban u. Fischer 2011.
60. Bjare U. Serum-free cell culture. *Pharmacol Ther*. 1992;53(3):355-74.
61. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains *Exp Cell Res*. 1965;37:614-36.
62. Freshney RI. *Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 7. Auflage ed. New York, NY: John Wiley & Sons; 2016.
63. Bertoncello I. Optimizing the Cell Culture Microenvironment In: Bertoncello I. (Hrsg.). *Mouse Cell Culture* New York: Springer; 2019. 23-30 p.

64. Philippeos C, Hughes RD, Dhawan A, Mitry RR. Introduction to Cell Culture In: Mitry, Ragai R. Hughes, Robin D. (Hrsg). Human Cell Culture Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. 1-13 p.
65. Kuhlmann I. The prophylactic use of antibiotics in cell culture. *Cytotechnology*. 1995;19(2):95-105.
66. Lincoln CK, Gabridge MG. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. *Methods Cell Biol*. 1998;57:49-65.
67. Chen TR. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res*. 1977;104(2):255-62.
68. Masters JR. False cell lines: The problem and a solution. *Cytotechnology*. 2002;39(2):69-74.
69. Kleinman HK, Luckenbill-Edds L, Cannon FW, Sephel GC. Use of extracellular matrix components for cell culture. *Anal Biochem*. 1987;166(1):1-13.
70. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 1984;247(3 Pt 1):C125-42.
71. Leibo SP, Mazur P. The role of cooling rates in low-temperature preservation. *Cryobiology*. 1971;8(5):447-52.
72. Crowley LC, Marfell BJ, Christensen ME, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Trypan Blue Uptake and Light Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(7).
73. Hoppe T. Untersuchungen zur Entwicklungsphysiologie und molekularen Phylogenetik ausgewählter Vertreter der Myxomyceten und zur Photosynthese fähiger Eugleniden (Organismenreich Protoctista). Kassel: Kassel university press GmbH; 2009.
74. Ringler R. Acridine orange in nucleic acid analysis *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;157:211-24.
75. van Zeijl CJ, Fliers E, van Koppen CJ, Surovtseva OV, de Gooyer ME, Mourits MP, et al. Effects of thyrotropin and thyrotropin-receptor-stimulating Graves' disease immunoglobulin G on cyclic adenosine monophosphate and hyaluronan production in nondifferentiated orbital fibroblasts of Graves' ophthalmopathy patients. *Thyroid*. 2010;20(5):535-44.
76. van Zeijl CJ, Fliers E, van Koppen CJ, Surovtseva OV, de Gooyer ME, Mourits MP, et al. Thyrotropin receptor-stimulating Graves' disease immunoglobulins induce hyaluronan synthesis by differentiated orbital fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy not only via cyclic adenosine monophosphate signaling pathways. *Thyroid*. 2011;21(2):169-76.
77. Bahn RS, Gorman CA, Johnson CM, Smith TJ. Presence of antibodies in the sera of patients with Graves' disease recognizing a 23 kilodalton fibroblast protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;69(3):622-8.
78. Stover C, Otto E, Beyer J, Kahaly G. Cellular immunity and retrobulbar fibroblasts in Graves' ophthalmopathy. *Thyroid*. 1994;4(2):161-5.
79. Stover C, Otto E, Beyer J, Kahaly G. Humoral immunity and retrobulbar fibroblasts in endocrine ophthalmopathy. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1992;126(5):394-8.

80. Beck B, Heintz B, Sewell AC, Krause U, Beyer J, Kahaly G. Glykosaminoglykansynthese retrobulbärer Fibroblasten und humorale Immunität bei endokriner Orbitopathie. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1992;13:17-21.
81. Valyasevi RW, Erickson DZ, Harteneck DA, Dutton CM, Heufelder AE, Jyonouchi SC, et al. Differentiation of human orbital preadipocyte fibroblasts induces expression of functional thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(7):2557-62.
82. Krieger CC, Place RF, Bevilacqua C, Marcus-Samuels B, Abel BS, Skarulis MC, et al. TSH/IGF-1 Receptor Cross Talk in Graves' Ophthalmopathy Pathogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(6):2340-7.
83. Bahn RS, Gorman CA, Woloschak GE, David CS, Johnson PM, Johnson CM. Human retroocular fibroblasts in vitro: a model for the study of Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;65(4):665-70.
84. Kahaly G, Stover C, Beyer J, Otto E. In vitro synthesis of glycosaminoglycans in endocrine ophthalmopathy. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1992;127(5):397-402.
85. Place RF, Krieger CC, Neumann S, Gershengorn MC. Inhibiting thyrotropin/insulin-like growth factor 1 receptor crosstalk to treat Graves' ophthalmopathy: studies in orbital fibroblasts in vitro. *Br J Pharmacol*. 2017;174(4):328-40.
86. Krieger CC, Neumann S, Place RF, Marcus-Samuels B, Gershengorn MC. Bidirectional TSH and IGF-1 receptor cross talk mediates stimulation of hyaluronan secretion by Graves' disease immunoglobulins. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(3):1071-7.
87. Krieger CC, Gershengorn MC. A modified ELISA accurately measures secretion of high molecular weight hyaluronan (HA) by Graves' disease orbital cells. *Endocrinology*. 2014;155(2):627-34.
88. Kaback LA, Smith TJ. Expression of hyaluronan synthase messenger ribonucleic acids and their induction by interleukin-1beta in human orbital fibroblasts: potential insight into the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(11):4079-84.
89. Kumar S, Coenen M, Iyer S, Bahn RS. Forkhead Transcription Factor FOXO1 Is Regulated by Both a Stimulatory Thyrotropin Receptor Antibody and Insulin-Like Growth Factor-1 in Orbital Fibroblasts from Patients with Graves' Ophthalmopathy. *Thyroid*. 2015;25(10):1145-50.
90. Kumar S, Nadeem S, Stan MN, Coenen M, Bahn RS. A stimulatory TSH receptor antibody enhances adipogenesis via phosphoinositide 3-kinase activation in orbital preadipocytes from patients with Graves' ophthalmopathy. *J Mol Endocrinol*. 2011;46(3):155-63.
91. Sorisky A, Pardasani D, Gagnon A, Smith TJ. Evidence of adipocyte differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(9):3428-31.
92. Smith TJ. n-Butyrate inhibition of hyaluronate synthesis in cultured human fibroblasts. *J Clin Invest*. 1987;79(5):1493-7.
93. Lu Y, Atkins SJ, Fernando R, Trierweiler A, Mester T, Grisolia ABD, et al. CD34- Orbital Fibroblasts From Patients With Thyroid-Associated Ophthalmopathy Modulate TNF- α Expression in CD34+ Fibroblasts and Fibrocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(6):2615-22.

94. Fernando R, Atkins SJ, Smith TJ. Intersection of Chemokine and TSH Receptor Pathways in Human Fibrocytes: Emergence of CXCL-12/CXCR4 Cross Talk Potentially Relevant to Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *Endocrinology*. 2016;157(10):3779-87.
95. Smith TJ, Koumas L, Gagnon A, Bell A, Sempowski GD, Phipps RP, et al. Orbital fibroblast heterogeneity may determine the clinical presentation of thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):385-92.
96. Valyasevi RW, Harteneck DA, Dutton CM, Bahn RS. Stimulation of adipogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma), and thyrotropin receptor by PPARgamma agonist in human orbital preadipocyte fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(5):2352-8.
97. Krieger CC, Boutin A, Jang D, Morgan SJ, Banga JP, Kahaly GJ, et al. Arrestin- β -1 Physically Scaffolds TSH and IGF1 Receptors to Enable Crosstalk. *Endocrinology*. 2019;160(6):1468-79.
98. van Zeijl CJ, van Koppen CJ, Surovtseva OV, de Gooyer ME, Plate R, Conti P, et al. Complete inhibition of rhTSH-, Graves' disease IgG-, and M22-induced cAMP production in differentiated orbital fibroblasts by a low-molecular-weight TSHR antagonist. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(5):E781-5.
99. Morgan SJ, Neumann S, Gershengorn MC. Normal Human Thyrocytes in Culture. *Methods Mol Biol*. 2018;1817:1-7.
100. Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U, Falkevall A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc*. 2013;8(6):1149-54.
101. Ramírez-Zacarias JL, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry*. 1992;97(6):493-7.
102. Hansen C, Heussel CP, Otto EA, Stover C, Beyer J, Kahaly G. Retrobulbar adipocytes and humoral immunity in Graves' ophthalmopathy. *Horm Metab Res*. 1993;25(12):618-22.
103. Heußel CP, Hansen C, Koepfel T, Beyer J, Kahaly G. Adulte Adipozytenkulturen in Mikrotiterplatten – Bedeutung für endokrine Erkrankungen
Akt Ernähr-Med. 1994;19:285-90.
104. Hu VW, Black GE, Torres-Duarte A, Abramson FP. 3H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis. *Faseb j*. 2002;16(11):1456-7.
105. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*. 2005;11:127-52.
106. Arbogast B, Hopwood JJ, Dorfman A. Absence of hyaluronidase in cultured human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975;67(1):376-82.
107. Smith TJ, Sempowski GD, Wang HS, Del Vecchio PJ, Lippe SD, Phipps RP. Evidence for cellular heterogeneity in primary cultures of human orbital fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(9):2620-5.
108. Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol*. 2017;16(2):99-117.

109. Hauner H, Röhrig K, Petruschke T. Effects of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) on human adipocyte development and function. *Eur J Clin Invest*. 1995;25(2):90-6.
110. Hatzinger PB, Stevens JL. Rat kidney proximal tubule cells in defined medium: the roles of cholera toxin, extracellular calcium and serum in cell growth and expression of gamma-glutamyltransferase. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1989;25(2):205-12.
111. Akhmetshina A, Dees C, Pileckyte M, Szucs G, Spriewald BM, Zwerina J, et al. Rho-associated kinases are crucial for myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2008;58(8):2553-64.
112. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*. 1989;84(5):1663-70.
113. Bhattacharyya KK, Coenen MJ, Bahn RS. Thyroid transcription factor-1 in orbital adipose tissues: potential role in orbital thyrotropin receptor expression. *Thyroid*. 2005;15(5):422-6.
114. Skurk T, Hauner H. Primary Culture of Human Adipocyte Precursor Cells: Expansion and Differentiation In: Mitry, Ragai R. Hughes, Robin D. (Hrsg). *Human Cell Culture Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. 215-26 p.
115. Koch-Institut R. Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren. Robert Koch-Institut; 2013.
116. Carswell KA, Lee MJ, Fried SK. Culture of isolated human adipocytes and isolated adipose tissue. *Methods Mol Biol*. 2012;806:203-14.
117. Kim JA, Ahn D, Kim BY, Choi YJ, Shin HJ, Jang SY. Characterisation of human orbital fibroblasts cultivated from intraconal, nasal and central adipose tissues. *Br J Ophthalmol*. 2021;105(2):290-6.
118. Schneider EL, Mitsui Y. The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(10):3584-8.
119. Botta R, Lisi S, Marcocci C, Sellari-Franceschini S, Rocchi R, Latrofa F, et al. Enalapril reduces proliferation and hyaluronic acid release in orbital fibroblasts. *Thyroid*. 2013;23(1):92-6.

Anhang

Stoffwechselaktivität der Subkulturen - Vergleich Subkulturen von Kulturen aus frischem oder kryokonserviertem Gewebe

Tabelle 21: Datentabelle Abbildung 9

| | | Statistiken | |
|------------|----|----------------------|---------------------|
| | | Gewebe frisch (n=60) | Gewebe kryo. (n=60) |
| Minimum | | 0,403 | 0,558 |
| Maximum | | 1,640 | 1,738 |
| Mittelwert | | 1,177 | 1,323 |
| Perzentile | 25 | 0,941 | 0,920 |
| | 50 | 1,266 | 1,537 |
| | 75 | 1,458 | 1,666 |

Stoffwechselaktivität der Subkulturen - Subkulturen welche über 4 Wochen, 16 Wochen oder gar nicht kryokonserviert wurden

Tabelle 22: Datentabelle Abbildung 11

| | | Statistiken | | |
|------------|----|----------------------|----------------------|------------------------|
| | | Gewebe frisch (n=60) | 4 Wochen kryo (n=60) | 16 Wochen kryo. (n=60) |
| Minimum | | 0,403 | 0,699 | 0,563 |
| Maximum | | 1,640 | 1,466 | 1,945 |
| Mittelwert | | 1,177 | 1,222 | 1,251 |
| Perzentile | 25 | 0,940 | 0,961 | 0,695 |
| | 50 | 1,266 | 1,347 | 1,317 |
| | 75 | 1,458 | 1,447 | 1,733 |

Stoffwechselaktivität der Subkulturen bei Umstellung auf Medium 199

Tabelle 23: Datentabelle Abbildung 96

| | | Statistiken | |
|------------|----|--------------------------------|----------------------------------|
| | | Subkulturen in F-Medium (n=60) | Subkulturen in Medium 199 (n=60) |
| Minimum | | 0,403 | 0,223 |
| Maximum | | 1,634 | 0,726 |
| Mittelwert | | 1,177 | 0,497 |
| Perzentile | 25 | 0,941 | 0,400 |
| | 50 | 1,266 | 0,498 |
| | 75 | 1,458 | 0,583 |

Stoffwechselaktivität nach Stimulation mit M22 MAK

Tabelle 24: Datentabelle Abbildung 97

| | | Statistiken | | | | |
|------------|----|--------------------|----------------------------|--|--|--|
| | | F-Medium (n=30) | DMEM 10 % FBS (n=30) | 24 h 1 % FBS + Stim. in DMEM 10 % FBS (n=20) | Stim. in DMEM 10 % FBS (n=20) | Stim. in Thyretain- puffer (n=20) |
| Minimum | | 0,308 | 0,318 | 0,491 | 0,619 | 0,492 |
| Maximum | | 0,486 | 0,520 | 0,962 | 1,152 | 0,884 |
| Mittelwert | | 0,407 | 0,410 | 0,757 | 0,860 | 0,747 |
| Perzentile | 25 | 0,368 | 0,346 | 0,637 | 0,711 | 0,636 |
| | 50 | 0,405 | 0,418 | 0,786 | 0,841 | 0,772 |
| | 75 | 0,467 | 0,449 | 0,879 | 0,981 | 0,865 |

Für Kulturen verwendete Gewebeproben

Tabelle 25: Deskriptive Daten der verwendeten Gewebeproben

| Gewebeart | Operation | Anzahl | Alter (in Jahren) | Geschlecht |
|-----------|------------------------------|--------|----------------------------|-----------------------------|
| Patient | Dekompressions- operation | n = 15 | Mittelwert: 56,3 | weiblich: 14 männlich: 1 |
| Kontrolle | Blepharoplastik | n = 2 | Alter 1: 70 Alter 2: 61 | weiblich: 1 männlich: 1 |
| | Ptosis | n = 2 | Alter 1: 55 Alter 2: 73 | weiblich: 1 männlich: 1 |
| | Xanthelasma | n = 1 | Alter 1: 66 | weiblich: 0 männlich: 1 |
| | Insgesamt | n = 5 | Mittelwert: 65,2 | weiblich: 2 männlich: 3 |

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater XXX, welcher mir diese Arbeit ermöglicht hat und von dem ich in diesem Jahr viel lernen durfte. Er stand mir jederzeit mit Rat zur Seite und wusste mich stets zu fördern und zu fordern.

Ebenso möchte ich mich bei XXX für das in Ihrer chirurgischen Tätigkeit gewonnene und bereitgestellte Gewebe bedanken, ohne welches meine Arbeit in dieser Form nicht durchführbar gewesen wäre, sowie für Ihre ausführlichen Anmerkungen zu meiner Arbeit

XXX gilt mein spezieller Dank für die kompetente Betreuung mit größter Hilfsbereitschaft und Geduld.

Mein Dank gilt ebenso meinen Eltern und meinem Bruder, welche mich über die gesamte Zeit unterstützt haben und alles mit größter Geduld Korrektur gelesen haben. Nicht zuletzt gilt mein Dank ebenso meinem Kader, welcher maßgeblich meine Motivation hochgehalten hat, sowie XXX für ihren Laptop!

Lebenslauf

-Aus Datenschutzgründen entfernt-

