

## **B. Material und Methoden**

### 1. Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial stammte von Schlachttieren. Hierbei handelte es sich zum einen um die Klauen von Färsen im Alter von 6-12 Monaten aus einer extensiven Weidehaltung (Hausschlachtung) und zum anderen um die Klauen von Mastbullen im Alter von 14-24 Monaten (kommerzieller Schlachthof). Die distalen Gliedmassenabschnitte wurden direkt nach der Schlachtung im Karpal- bzw. Tarsalgelenk abgetrennt und innerhalb eines Zeitraumes von einer Stunde in das Institut für Veterinär-Anatomie transportiert. Der Transport erfolgte unter Eiskühlung. Nach der Ankunft wurde sofort mit der Isolierung der Zellen begonnen.

### 2. Methoden

#### 2.1 Isolierung der Zellen

Die distalen Gliedmassenabschnitte wurden mit einem Hochdruckreiniger gründlich gesäubert und desinfiziert. Anschließend wurden die Hauptklauen mit einer Tischbandsäge vollständig in 1 bis 2 cm breite Sagittalscheiben zerlegt und oberhalb der Hornkapsel von der restlichen Gliedmasse abgetrennt. Die äußeren Sagittalscheiben wurden verworfen. Bei den inneren Scheiben wurde der äußere Anteil der Hornkapsel vorsichtig mit der Tischbandsäge bis auf 1 mm entfernt.

Für die weiteren Schritte der Isolierung wurden sterile Einmalartikel oder autoklavierte bzw. mit Alkohol desinfizierte Instrumente verwendet. Kurz vor dem Gebrauch wurden sie zusätzlich abgeflammt. Zunächst wurden im Labor alle inneren Strukturen, wie das Klauenbein und Sehnen aus den Sagittalscheiben entfernt. Der verbleibende Anteil der Hornkapsel wurde mit 70 %igem Alkohol gründlich gereinigt. Danach wurden Proben unterschiedlicher Größe aus den jeweiligen Klauensegmenten bzw. segmentübergreifend mit Hilfe eines Skalpells gewonnen und mit 70 %igem Alkohol noch einmal gereinigt. Die durch die Tischbandsäge entstandenen Schnittränder wurden mit einem Skalpell entfernt. Dann wurden die Oberflächen der Proben ebenfalls kurz abgeflammt. Die Trennung von Dermis und Epidermis erfolgte unter der Lupe. Anschließend wurden aus den unteren Schichten der Epidermis ca. 5x5 bis 5x8 mm große Gewebestücke mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die Proben wurden aus drei unterschiedlichen Segmenten gewonnen, dem Kron- und Sohlensegment stellvertretend für den harten Verhornungstyp sowie aus dem proximalen Abschnitt des Ballensegmentes stellvertretend für den weichen Verhornungstyp. Diese Gewebestücke wurden mit steriler PBS-Lösung ohne Calcium- und Magnesium-Ionen (Fa. Biochrom KG, Berlin) dreimal gewaschen. Die weiteren

Schritte der Zellisolierung wurden im Zellkulturlaboratorium durchgeführt. Unter der Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank (Fa. BDK, Sonnenbühl) wurden die ca. 5x5 bis 5x8 mm großen Epidermisstücke mit Skalpell in Glaspetrischalen weiter in möglichst kleine (angestrebt 1x1 mm) Stücke zerschnitten. Diese Epidermisstückchen wurden in einem sterilen 50 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Zefa Labortechnik GmbH, Harthausen) mit 0,25%igem Trypsin (Fa. Sigma, Taufkirchen) bei 37°C im Wasserbad 30 Minuten inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Proben mehrmals mit der Hand geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung des Trypsins zu gewährleisten. Anschließend wurde nur der Überstand weiterverarbeitet, indem er zentrifugiert wurde (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das entstandene Zellpellet im Nährmedium resuspendiert und auf Kultivierungsgefäßen ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der neu kultivierten Zellen, um ihre Adhärenz und Vitalität zu überprüfen. Ferner wurden sie einmal mit PBS gewaschen und danach mit neuem Medium versorgt.

Bei einigen Isolierungen wurden nachfolgend beschriebene Zwischenschritte durchgeführt, um schon während der Isolierung der Zellen den Anteil der Fibrozyten in der Primärkultur zu verringern. Hierfür wurden die mit dem Skalpell herausgeschnittenen größeren Klauenstücke nach mehrmaligem Waschen mit sterilem PBS für eine Stunde im Medium, das mit Penicillin-Streptomycin Lösung (Fa. Sigma, Taufkirchen) supplementiert wurde, inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Gewebstücke erneut mit sterilem PBS gewaschen und anschließend in einer Dispaselösung (5 U/ml) bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Die Dispaselösung wurde mit Dispase (7 U/mg, Fa. Sigma, Taufkirchen) angesetzt. Im Anschluss an die Inkubation in der Dispaselösung wurde die Dermis vorsichtig mit einer sterilen Pinzette und einem sterilen Skalpell von der Epidermis abgetrennt. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

Neben den epidermalen Keratinozyten wurden auch Fibrozyten aus der Dermis bzw. der tiefen Beugesehne isoliert. Die Vorgehensweise bei der Isolierung dieser Zellen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei den Keratinozyten.

## 2.2 Anzüchtung der Zellen

### 2.2.1 Verwendete Medien

Zur Kultivierung der Zellen wurden sowohl serumhaltige als auch serumfreie Nährmedien verwendet, des weiteren ein Gemisch aus serumfreien und serumhaltigen Medien in unterschiedlichen Mengenverhältnissen. Auch konditioniertes Medium wurde hergestellt und für die Ernährung der epidermalen Keratinozyten benutzt.

Für die Ernährung der Zellen wurden zwei kommerziell erhältliche, serumhaltige Medien verwendet, zum einen DMEM+ und zum anderen RPMI+. DMEM+ setzte sich zusammen aus Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4500 mg Glukose, L- Glutamin und Natriumbikarbonat (D 5796, Fa. Sigma, Taufkirchen), dem 10 % fetales bovines Serum (FBS) (Fa. Sigma, Taufkirchen) und 2 % Kanamycin (5 mg/ml, Fa. Biochrom, Berlin) zugesetzt wurden. RPMI+ bestand aus RPMI 1640 mit L-Glutamin und Natriumbikarbonat (R 8758, Fa. Sigma, Taufkirchen), das mit 10 % FBS (Fa. Sigma, Taufkirchen) und 2 % Kanamycin (5 mg/ml, Fa. Biochrom, Berlin) supplementiert wurde.

Des Weiteren wurde Quantum 286 (U15-818, Fa. PAA Laboratories, Cölbe), ein neues Spezialmedium für Epithelzellen verwendet. Dies ist ein Kompletmedium auf der Basis von DMEM, das ausgewählte Serumbestandteile und zusätzliche Proteinkomponenten aus Hefen und Sojabohnen enthält. Diesem Medium wurden nur 2 % Kanamycin (5 mg/ml, Fa. Biochrom, Berlin) zugesetzt.

Folgende serumfreie Medien wurden verwendet: EpiLife<sup>®</sup> Medium supplementiert mit Keratinocyte Medium Supplement (100X) (beides Fa. Sigma, Taufkirchen), sowie Keratinocyte Medium Kit (Fa. Sigma, Taufkirchen), das aus Keratinocyte Basalmedium supplementiert mit Keratinocyte Medium Supplement (100X) (Fa. Sigma, Taufkirchen) bestand. Außerdem wurde MCDB 153 Kompletmedium (Fa. Biochrom, Berlin) mit L- Glutamin und Natriumbicarbonat, sowie EGF, bovinem Insulin, Hydrokortison, Ethanolamin und Phosphoethanolamin verwendet.

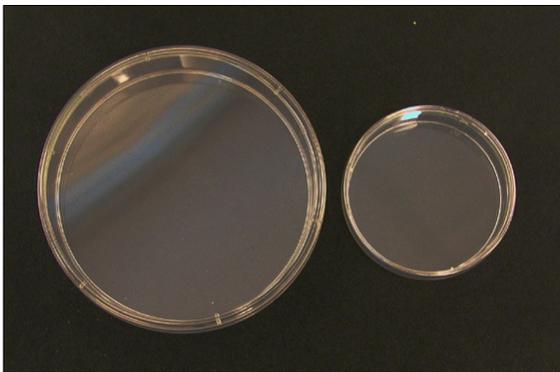
Aus der Dermis und Subkutis isolierte Fibrozyten dienten zur Herstellung von konditioniertem Medium. Diese Zellen wurden über einen Zeitraum von drei oder vier Tagen mit einem der oben beschriebenen Medien inkubiert. Das verwendete Medium wurde anschließend abgesaugt und gesammelt. Danach wurde das gesammelte Medium zentrifugiert (5 min, 1050 U/min, Raumtemperatur), um eventuell abgesaugte Zellen oder andere größere Bestandteile zu entfernen. Bevor Keratinozyten mit diesem Medium „gefüttert“ wurden, wurde es sterilfiltriert (Filter easypet, Fa. Eppendorf, Köln).

### 2.2.2 Kultivierungsbedingungen

Die Zellen wurden in den Brutschränken CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank BK5060 (Fa. Heraeus, Hanau) und INCO 2 (Fa. Memmert, Schwabach) in einem offenen System inkubiert. Die Bebrütungstemperatur betrug 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5 %. Über einen Zeitraum von vier Monaten wurden die Zellen parallel bei 34°C und 37°C angezüchtet, wobei alle anderen Parameter unverändert blieben.

In der Regel wurde das Nährmedium zweimal pro Woche erneuert. Bei Primärkulturen und aufgetauten Zellen wurde das Medium mindestens über einen Zeitraum von einer Woche jeden zweiten Tag gewechselt.

### 2.2.3 Kultivierungsgefäße



**Textabbildung 1:**  
Zellkulturschalen: links p100, rechts p60



**Textabbildung 2:**  
Millicell® Zellkulturplatten-Einsätze

In Abhängigkeit vom Versuchsaufbau wurden unterschiedliche, sterile Kultivierungsgefäße aus Plastik für die Anzuchtung der Zellen verwendet, zum einen Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 60 mm (p60) und 100 mm (p100) (Textabbildung 1), zum anderen Lochplatten mit 24 Vertiefungen (24-well), einem flachen Boden und einem Durchmesser von 15,5 mm, sowie Platten mit 6 Vertiefungen (6-well), einem flachen Boden und einem Durchmesser von 34,6 mm. Alle genannten Kultivierungsgefäße wurden von der Firma Iwaki (Tokio, Japan) bezogen. Für ELISA und single well cloning wurden Lochplatten mit 96 Vertiefungen (Fa. Nunc, Wiesbaden), einem flachen Boden und einem Durchmesser von 6,6 mm benutzt.

Weiterhin wurden Millicell® Zellkulturplatten-Einsätze (Fa. Millipore, Schwalbach) mit einem Durchmesser von 30 mm und einer schneidbaren Membran verwendet. Diese Einsätze passten in Lochplatten mit 6 Vertiefungen, in denen sie während der Zellanzüchtung aufbewahrt wurden (Textabbildung 2).

#### 2.2.4 Beschichtete Kultivierungsgefäße

Mit verschiedenen Materialien beschichtete Kultivierungsgefäße wurden für die Anzucht der Zellen verwendet, diese sollten die Adhärenz der Keratinozyten steigern. Zum einen wurden fertig beschichtete Gefäße eingesetzt, zum anderen die Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 60 mm oder Millicell® Zellkulturplatten-Einsätze selbst beschichtet.

Zu den Hauptbestandteilen von BD Matrigel™-Matrix (Fa. BD Biosciences Discovery Labware, Heidelberg) gehören Laminin, Kollagen Typ IV und Proteoglykane, daneben enthält es auch einige Wachstumsfaktoren wie TGF-β und FGF. Für die Beschichtung mit BD Matrigel™-Matrix mussten alle verwendeten Gerätschaften inklusive der Kultivierungsgefäße auf Eis gekühlt werden, denn nur bei Temperaturen um den Gefrierpunkt ist die BD Matrigel™-Matrix flüssig. Die gekühlten Kultivierungsgefäße wurden entweder direkt mit der BD Matrigel™-Matrix beschichtet, oder die BD Matrigel™-Matrix konnte vor der Beschichtung mit serumfreiem Medium bis zu einem Verhältnis von 1:3 verdünnt werden. Mit unverdünnter BD Matrigel™-Matrix beschichtete Gefäße wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, in dieser Zeit wurde die BD Matrigel™-Matrix zu einem Gel und konnte direkt zur Anzucht von Zellen benutzt werden. Wenn die BD Matrigel™-Matrix vorher mit Medium verdünnt worden war, erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurde das entstandene Gel vorsichtig mit Medium gespült, um noch vorhandenes ungebundenes Material zu entfernen. Anschließend konnten Zellen in dem beschichteten Kultivierungsgefäß direkt angezchtet werden.

Gekauft wurden BD BioCoat™ Collagen Typ I Schalen mit einem Durchmesser von 60 mm (Fa. BD Biosciences Discovery Labware, Heidelberg).

#### 2.2.5 Dokumentation der Zellproliferation

Eine Dokumentation des Zellwachstums in allen Wachstumsstadien erfolgte mit zwei unterschiedlichen Mikroskopen und Kamerasystemen. Zum einen mit dem Invert-Mikroskop Axiovert 25 (Fa. Zeiss, Jena), der Videokamera Inteq 000610 (Fa. Inteq, Berlin) und dem daran angeschlossenen Bildverarbeitungsprogramm Axiovision (Fa. Zeiss, Jena). Zum anderen mit dem Invert-Mikroskop Olympus CKX 14 (Fa. Olympus, Hamburg) und der Camedia digital Kamera C-40402ZOOM (Fa. Olympus, Hamburg).

### 2.2.6 Subkultivierung

Eine Subkultivierung erfolgte, nachdem die Zellen zu einem konfluenten Monolayer herangewachsen waren. Zuerst wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und anschließend wurden die Kulturen mit PBS einmal gewaschen. Danach wurden einige Tropfen Trypsin EDTA Lösung (0,5 g porcines Trypsin + 0.2 g EDTA x 4 Na/l HBSS, Fa. Sigma, Taufkirchen) zu der Kultur gegeben, um die Zellen unter der Enzymwirkung von dem Untergrund des Kultivierungsgefäßes abzulösen. Die Enzymwirkung wurde immer wieder mikroskopisch kontrolliert, bis sich alle bzw. der Großteil der Zellen gelöst hatten. War dies der Fall, wurde die Trypsinwirkung durch die Zugabe von Nährmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen trituiert, d.h. mit einer Pipette mehrmals aufgesaugt und unter leichtem Druck wieder ausgeblasen. Damit wurde eine gute Durchmischung der Zellen erreicht, die in der Regel danach auf zwei neue Kultivierungsgefäße aufgeteilt wurden.

## 2.3 Kryokonservierung

### 2.3.1 Einfrieren von Zellen

Zellen aus jeder Isolierung wurden in unterschiedlichen Passagen eingefroren und in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert. Hierfür wurde ein Einfriermedium hergestellt, das sich zu 90 % aus dem für die Anzucht der jeweiligen Zellen verwendeten Nährmedium und zu 10 % aus DMSO (Fa. ICN Biomedicals, Eschwege) zusammensetzte.

Zuerst wurden die Zellen, wie unter dem Punkt 2.2.6 (Subkultivierung) beschrieben, mit Trypsin EDTA Lösung vom Untergrund abgelöst, trituiert und anschließend in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Zefa Labortechnik, Harthausen) mit 10 ml Medium zentrifugiert (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in dem Einfriermedium resuspendiert, gut durchmischt und in Cryogenic wells (Fa. Dunn Labortechnik, Asbach) überführt. Zunächst wurden die Zellen bei -70°C im Tiefkühlschrank für maximal zwei Wochen eingefroren und dann dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.3.2 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C vollständig aufgetaut. Dann wurden sie vorsichtig, tropfenweise in 10 ml vorgewärmtes Medium pipettiert und zentrifugiert (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet im Medium resuspendiert, trituiert und anschließend auf Kultivierungsgefäßen ausgesät. Am nächsten

Tag erfolgte eine mikroskopische Kontrolle, um die Adhärenz und Vitalität der Zellen zu beurteilen. Anschließend wurde das Medium der aufgetauten Zellen erneuert.

#### 2.4 Zellzählung der kultivierten Zellen

Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe eines Hämozytometers nach Neubauer (Fa. GLW, Würzburg). Hierfür wurden die Zellen, wie unter dem Punkt 2.2.6 Subkultivierung beschrieben, mit Trypsin EDTA Lösung von dem Untergrund des Kultivierungsgefäßes abgelöst. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur). Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in einer definierten Menge Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in der Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt, hierbei wurde die Zellzahl in den vier großen Quadraten ermittelt.

#### **Tabelle 3:**

Formeln zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer

$$\text{Zellzahl/ml} = n \times 10^4/\text{ml}$$

(n = Mittelwert der Zellzahl in den 4 ausgezählten Quadraten )

$$\text{Gesamtzellzahl einer Suspension} = \text{Zellzahl/ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension}$$

Mit Hilfe der in Tabelle 3 dargestellten Formeln wurde die Zellzahl pro ml Medium bzw. Zellzahl der Suspension errechnet. Um ein möglichst genaues Ergebnis zu erhalten, wurde jede Zellsuspension viermal ausgezählt und anschließend der Mittelwert errechnet.

#### 2.5 Bestimmung der unterschiedlichen Proliferationsrate der angezüchteten Zellen in Abhängigkeit von den verschiedenen Medien

Um unterschiedliche Proliferationsraten der Zellen aufgrund der verschiedenen verwendeten Nährmedien zu dokumentieren, wurde zunächst die Zellzahl eines oder mehrerer p60 einer Zelllinie, wie unter Punkt 2.4 beschrieben, bestimmt. Anschließend wurde das Volumen der Zelllösung, die 10 000 Zellen enthielt, errechnet und jeweils pro Well eines 6-wells ausgesät.

Parallel wurden für jedes verwendete Medium zwei Versuchsansätze (zwei 6-wells) mit Zellen einer Zelllinie durchgeführt. Über einen Zeitraum von 18 Tagen wurde jeden dritten Tag pro Medium die Zellzahl in zwei Wells bestimmt.

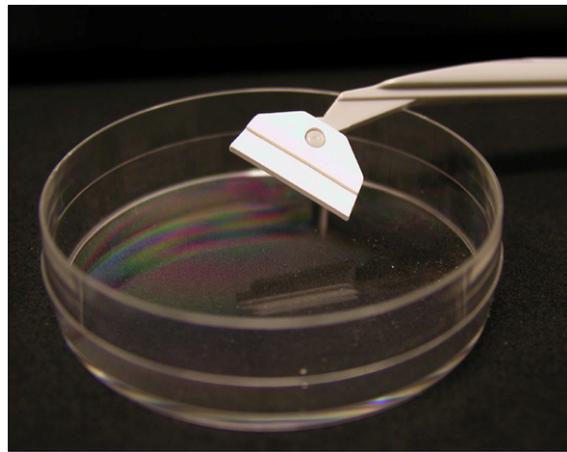
Die Zellzahl eines Wells wurde viermal ermittelt. Anschließend wurde der Mittelwert für jedes Well errechnet. Um eine symmetrische Verteilung der Zellzahlen zu gewährleisten, wurden die gezählten Werte logarithmiert (log<sub>10</sub>). Die statistische Aufarbeitung der Werte erfolgte mit SPSS Version 11.5. Es wurden die mittleren Verläufe der logarithmierten

Zellzahlen für jedes Medium über den Zeitraum von 18 Tagen dargestellt. Die Auswertung erfolgte durch Beschreibung und Vergleich der unterschiedlichen Verläufe. Zusätzlich wurden die mittleren Verläufe der logarithmierten Zellzahl der zwei unterschiedlichen Ansätze für jedes Medium gesondert dargestellt.

## 2.6 Trennung von Keratinozyten und Fibrozyten

### 2.6.1 Trennung mit Hilfe eines Zellschabers

Unter mikroskopischer Kontrolle wurden nach morphologischen Gesichtspunkten Zellen mit einem für Keratinozyten typischen Erscheinungsbild oder von Keratinozyten gebildete Kolonien ausgewählt. Anschließend wurde die Lage dieser Zellen bzw. Kolonien auf der Unterseite des Kultivierungsgefäßes mit einem wasserfesten Stift markiert. Hierbei war es wichtig, dass nur Keratinozyten innerhalb der Markierung erhalten blieben. Alle Zellen außerhalb der Markierung wurden dann mit einem Zellschaber (Fa. Sigma, Taufkirchen, Textabbildung 3) von dem Untergrund des Kultivierungsgefäßes abgelöst. Um sicher zu gehen, dass alle Zellen entfernt worden waren, erfolgte



**Textabbildung 3:** Zellschaber, Fa. Sigma

zwischen durch eine mikroskopische Kontrolle und gegebenenfalls wurden noch auf dem Untergrund festhaftende Zellen erneut mit dem Zellschaber abgelöst. Im Folgenden wurden die abgelösten Zellen zusammen mit dem Medium abgesaugt und die verbleibenden Zellen wurden mit neuem Medium versorgt. Nach zwei Tagen erfolgte eine weitere mikroskopische Kontrolle, bei der die Morphologie der verbleibenden Zellen beurteilt wurde und, wenn notwendig, wurden danach erneut die Zellen außerhalb der Markierung entfernt.

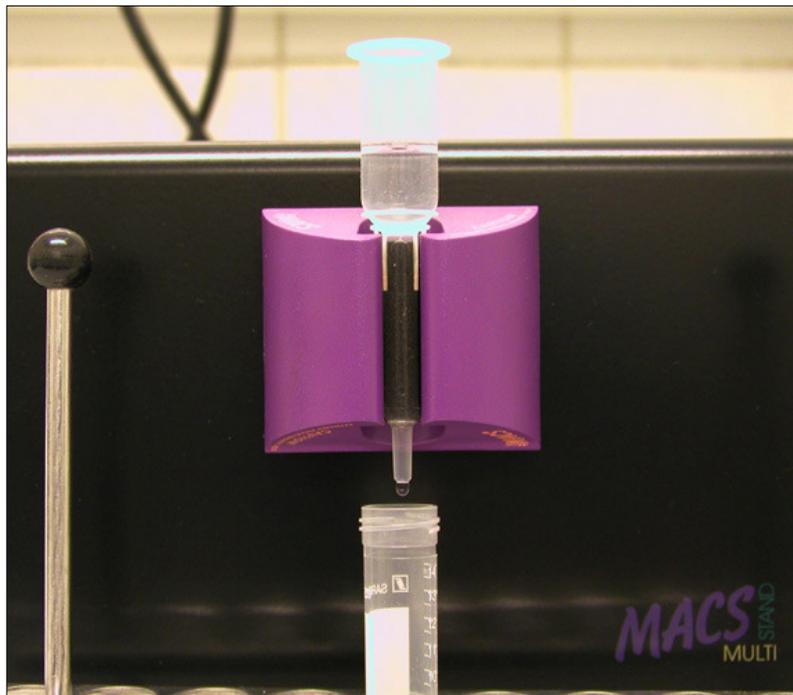
### 2.6.2 Single well cloning

In einer 96 Lochplatte wurden 100  $\mu$ l Medium pro Vertiefung vorgelegt. Anschließend wurden 100  $\mu$ l einer Zellsuspension, bestehend aus einem Gemisch von epidermalen Zellen mit einem Anteil von dermalen Zellen, in die erste Vertiefung pipettiert (Verdünnung 1:2). Medium und Zellsuspension wurden gut durchmischt und 100  $\mu$ l dieser Mischung wurden in die nächste Vertiefung überpipettiert (Verdünnung 1:4). Diese geometrische Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 wurde in 24 Vertiefungen fortgeführt. Am nächsten

Tag wurde unter dem Mikroskop die Adhärenz der Zellen beurteilt und das Medium gewechselt. Nach weiteren drei Tagen wurden die Vertiefungen mit den hohen Verdünnungen, in denen nur einzeln Zellen angezüchtet worden waren, beurteilt. Anhand des morphologischen Erscheinungsbildes wurden die epidermalen Keratinozyten selektiert und nur diese Zellen in den entsprechenden Vertiefungen weiter angezüchtet und passagiert.

### 2.6.3 Magnetic-activated cell sorting (MACS)

Das Prinzip dieser Methode zur Trennung unterschiedlicher Zellarten in einer Suspension beruht darauf, dass eine Zellart mit einem Antikörper gegen ein Oberflächenantigen direkt markiert wird. An diesen Antikörper sind magnetische Mikropartikel gekoppelt. Mit Hilfe einer Trennsäule, die mit einer ferromagnetischen Matrix ausgestattet war und in einen starken permanenten Magneten platziert wurde, konnte die Zellsuspension einem starken Magnetfeld ausgesetzt werden (Textabbildung 4). Die markierten Zellen wurden in der Säule zurück gehalten, und die unmarkierten Zellen konnten die Trennsäule ungehindert passieren.



**Textabbildung 4:**

Versuchsaufbau für MACS, Trennsäule platziert im Permanentmagneten

Für das MACS wurde ein Separationspuffer hergestellt. Er bestand aus sterilem PBS ohne Calcium- und Magnesium-Ionen (Fa. Biochrom KG, Berlin) mit einem Zusatz von 2 mmol EDTA (Fa. Merk, Darmstadt) und 0,5 % bovinem Serumalbumin (Fa. Roth,

Karlsruhe). Vor dem Gebrauch wurde dieser Separationspuffer in einem Vakuumschrank entgast.

Da pro Trennsäule nur eine begrenzte Anzahl von Zellen, in der Regel  $10^7$  Zellen, in der Suspension enthalten sein durfte, wurde als erstes die Zellzahl, wie unter Punkt 2.4 beschrieben, bestimmt. Gegebenenfalls wurde die Zellsuspension weiterverdünnt. Die Zellen wurden anschließend mit Separationspuffer gewaschen und zentrifugiert (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur). Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurde das Zellpellet in 80 µl Separationspuffer resuspendiert. Als Antikörper wurden 20 µl Anti-Fibroblast MicroBeads (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) direkt dazugegeben. Nachdem die Zellsuspension mit dem Antikörper gut durchmischt worden war, folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde erneut mit Separationspuffer gewaschen und zentrifugiert (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 500 µl Separationspuffer resuspendiert. Mit Hilfe einer Separation Column LD (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wurde die Zellsuspension aufgetrennt, wobei die nicht markierten Keratinozyten die Säule passierten und in einem sterilem Zentrifugenröhrchen aufgefangen wurden. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur), der Überstand wurde anschließend abgesaugt und das verbleibende Zellpellet wurde in Nährmedium resuspendiert. Danach wurden die Keratinozyten ausgesät und angezchtet.

Die in der Trennsäule verbliebenen markierten Fibrozyten konnten mit einem Stempel aus der Säule herausgespült werden, nachdem diese aus dem permanenten Magneten entfernt wurde. Auch diese Zellen wurden in sterilen Zentrifugenröhrchen aufgefangen und konnten bei Bedarf weiter angezchtet werden.

## 2.7 Licht- und Elektronenmikroskopie

### 2.7.1 Lichtmikroskopie

#### 2.7.1.1 Paraffineinbettung

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden Kolonien mit einem Durchmesser von bis zu 6 mm mit einem Zellschaber von dem Kultivierungsgefäß abgelöst und anschließend in wässriger 4%iger Formaldehydlösung maximal 24 Stunden fixiert. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Proben entwässert und mit Xylol auf die Aufnahme des Paraffins vorbereitet. Anschließend kamen die Proben für vier Stunden in Paraffin und wurden danach am Histocentre (Fa. Shandon, London, GB) in Paraffin eingebettet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die kleinen Proben an der späteren Schnittfläche lagen.

Am Schlittenmikrotom (Fa. Jung, Heidelberg) wurden mit einem Mikrotommesser mit C-Schliff Paraffinschnitte mit einer Dicke von 5-7 µm angefertigt und anschließend auf Objektträger aufgezogen.

#### 2.7.1.2 Einbettung in Technovit 7100

Für diese Einbettung wurden entweder Kolonien mit einem Durchmesser von bis zu 6 mm oder durch Zentrifugation (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur) gewonnene Zellpellets verwendet. Diese Proben wurden maximal 24 Stunden in wässriger 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in der Vorbereitungslösung Technovit 7100 (Fa. Kulzer, Friedrichsdorf) für 2 Stunden gelagert. Danach erfolgte die Einbettung in Technovit 7100 (Fa. Kulzer, Friedrichsdorf). Nach 2 Stunden war der Kunststoff auspolymerisiert.

#### 2.7.1.3. Histologische Übersichtsfärbungen

An den Paraffinschnitten wurde als Übersichtsfärbung eine Hämalaun-Eosin-Färbung nach Meyer (*Romeis, 1989*) durchgeführt. Bei dieser Färbung werden basophile Strukturen wie z.B. Nukleinsäuren im Zellkern blau dargestellt. Kollagenes Bindegewebe und azidophile Strukturen werden rötlich angefärbt.

Als weitere Übersichtsfärbung wurde für Semidünnschnitte die Methylenblau-Azur-II-Färbung nach Richardson (*Romeis, 1989*) verwendet. Bei dieser Schnellfärbung werden basophile und osmiophile Strukturen blau dargestellt, metachromatische Strukturen färben sich rotviolett an.

## 2.7.2 Elektronenmikroskopie

### 2.7.2.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial wurden entweder Zellpellets oder kleine angezüchtete Gewebestücke verwendet. Die Gewebestückchen wurden direkt aus dem Inkubator genommen, zweimal mit PBS gespült und anschließend fixiert. Im Gegensatz zu den Gewebestücken wurden die ein- oder mehrschichtigen Gewebekulturen mit einem Zellschaber (Fa. Sigma, Taufkirchen) vorsichtig vom Untergrund gelöst. Die Benutzung eines Zellschabers hatte den Vorteil, dass die zwischen den Zellen ausgebildeten Zellkontakte zum größten Teil erhalten blieben. Die abgelösten Kulturen wurden vorsichtig mit etwas PBS in einer Einmalpipette aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurden sie zentrifugiert (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde abgesaugt und die so gewonnenen Zellpellets konnten entsprechend der vorgesehenen Einbettung fixiert werden. Alternativ wurden die Zellkulturen noch auf den Kultivierungsgefäßen fixiert, dann vorsichtig mit einem Zellschaber gelöst und anschließend durch Zentrifugation zu Pellets weiterverarbeitet.

### 2.7.2.2 Einbettung in AGAR 100

Die Proben wurden je nach Größe für mindestens ca. 4 Stunden in Karnovsky Lösung (Stammlösung: 2,5 % Glutaraldehyd, 3% Paraformaldehyd, pH 7,4; vor Genrauch 1:1 verdünnen) immersionsfixiert und anschließend mehrmals mit 0,1 molarem Cacodylatpuffer gespült. Darauf folgte die Nachfixierung und Kontrastierung in einer 1%igen cacodylatgepufferten Osmiumtetroxidlösung (Fa. Roth, Karlsruhe) über einen Zeitraum von mindestens 4 Stunden. Anschließend wurden die Proben mehrmals in Cacodylatpuffer gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Das danach folgende Propylenoxid (Fa. Merck, Darmstadt) diente als Intermedium. Darauf folgte ein Propylenoxid/Agargemisch im Verhältnis 1:1 und am nächsten Tag ein reines Agargemisch (Agar 100 Resin, Fa. Agar Scientific, Stansted, UK). Die Polymerisation des Kunststoffes fand im Brutschrank zuerst bei 45 °C und anschließend bei 50 °C statt.

### 2.7.2.3 Einbettung in LR-White Resin®

Diese Einbettung wurde für den immunhistochemischen Nachweis von Keratinen mit dem immunogold labeling benötigt, da bei dieser Methode die Antigene für den späteren immunhistochemischen Nachweis sehr gut erhalten blieben. Für diese Art der Einbettung wurden die Proben für mindestens 2 Stunden in 2%igem Paraformaldehyd mit 0,1 % Glutaraldehyd in Phosphatpuffer fixiert. Die fixierten Proben wurden in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, anschließend folgte ein Alkohol LR-White Resin® (London Resin

Company, Reading, UK) Gemisch im Verhältnis 1:1 für ca. eine Stunde. Die Proben wurden anschließend für ca. 12 Stunden in reines LR-White Resin<sup>®</sup> überführt und danach in Gelatinekapseln eingebettet. Die Polymerisation erfolgte im Brutschrank bei 50 °C für 48 Stunden, oder mit Hilfe von Beschleunigern innerhalb von 10 bis 20 Minuten.

#### 2.7.2.4 Semidünnschnitte

Von in Agar 100 oder LR-White Resin<sup>®</sup> eingebetteten Proben wurden am Ultramikrotom Ultracut E (Fa. Reichert Jung, Wien) mit einem Glasmesser 0,5 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen und anschließend mit einer 1%igen Methylenblau-Azur-II-Lösung nach Richardson (*Romeis, 1989*) gefärbt. Neben der lichtmikroskopischen Auswertung dienten die Semidünnschnitte zum Auswählen geeigneter Areale für die ultrastrukturelle Untersuchung am Elektronmikroskop.

#### 2.7.2.5 Ultradünnschnitte und Kontrastierung

50 bis 80 nm dicke Ultradünnschnitte wurden am Ultramikrotom Ultracut E (Fa. Reichert-Jung, Wien) mit Hilfe eines Diamantmessers Histo-Diatome (Fa. Diatome AG) angefertigt. Anschließend wurden die Ultradünnschnitte auf befilmte Nickelgrids (Fa. Agar Scientific, Stansted, GB) aufgezogen. Die Schnittkontrastierung erfolgte mit Uranylazetat und Bleizitrat.

#### 2.7.2.6 Transmissionselektronmikroskopische Auswertung und Dokumentation

Die Untersuchung, Auswertung und fotografische Dokumentation der elektronmikroskopischen Präparate erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop EM 10 (Fa. Zeiss, Oberkochen).

#### 2.7.2.7 Nachweis von Keratinen am Transmissionselektronenmikroskop mit der Protein A-Gold Technik

Protein A-Gold (Fa. British Biocell International, Cardiff, GB) ist ein aus Bakterien isoliertes Protein, das an der FC-Region der verwendeten Antikörper (IgG) bindet und mit 10 nm großen kolloidalen Goldkörnchen markiert ist. Diese Goldkörnchen lassen sich im Elektronenmikroskop darstellen.

Diese immunhistochemische Untersuchung wurde an auf Nickelgrids aufgezogenen Ultradünnschnitten der in LR-White Resin<sup>®</sup> eingebetteten Proben durchgeführt. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Tropfen der jeweiligen Lösung durchgeführt. Zuerst wurden die Proben mit PBS (Fa. Biochrom, Berlin) gewaschen und anschließend 10 Minuten in einer 1%igen Ovalbumin PBS Lösung

inkubiert. Danach erfolgte über den Zeitraum von einer Stunde die Inkubation mit folgenden monoklonalen Antikörpern: AE 1, AE 3 und Antizytokeratin 16 (alle Fa. Serotec, Düsseldorf). Wobei AE 1 und AE 3 1:200 bzw. 1:100 im PBS verdünnt wurden, Antizytokeratin 16 wurde in einer Verdünnung mit PBS von 1:50 verwendet. Im Folgenden wurden die Proben mehrmals mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit Protein A in einer Verdünnung von 1:50 in PBS inkubiert. Dann wurden die Proben einmal in PBS und anschließend mehrmals mit Aqua bidest gewaschen. Die Schnittkontrastierung erfolgte mit Uranylazetat und Bleizitrat. Als Negativkontrolle für jede Antikörperverdünnung wurden zuvor aus der tiefen Beugesehne angezüchtete und in LR-White Resin<sup>®</sup> eingebettete Fibrozyten mitgeführt.

## 2.8 Nachweis von Proteinen mit dem enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Hierfür wurden die epidermalen Zellen auf Lochplatten mit 96 Vertiefungen solange angezüchtet, bis sie subkonfluente Monolayer gebildet hatten. Danach wurden das Medium abgesaugt und die Zellen über Nacht in 4%igen wässrigen Formalin fixiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen eine halbe Stunde bei Raumtemperatur mit 1%igem Triton X-100 (Fa. Sigma, Taufkirchen) inkubiert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen. Für den Nachweis von Keratinen wurden die monoklonalen Antikörper AE 1 und AE 3 (beide Fa. Serotec, Düsseldorf) verwendet. Als Negativkontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Laminin (Fa. Sigma, Taufkirchen) mitgeführt, der nicht mit den Zellen reagieren sollte. Mit diesen Antikörpern wurden die Zellen eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde peroxidase-conjugated affinipure sheep anti-mouse IgG (Fa. Dianova, Hamburg) eingesetzt. Mit diesem Antikörper wurde die primäre Antikörperbindung mittels einer Färbreaktion visualisiert. Die Zellen wurden eine halbe Stunde bei 37°C mit dem Sekundärantikörper inkubiert und anschließend mehrmals mit PBS gewaschen. Für den Nachweis der Farbreaktion wurde eine Lösung hergestellt. Hierfür wurden 5 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazole (Fa. Sigma, Taufkirchen) in 2,5 ml DMSO (Fa. ICN Biomedicals, Eschwege) gut gelöst und mit Acetatpuffer (pH 5) auf 25 ml aufgefüllt. Mit dieser Lösung wurden die Zellen in der Regel für eine Stunde ins Dunkle gestellt. Wiederholte Kontrollen der Farbreaktion erfolgten am Phasenkontrastmikroskop. Nach Erreichen der gewünschten Farbtintensität wurde mehrmals mit Leitungswasser gespült und damit die Reaktion gestoppt.

Zusätzlich wurden mit dem ELISA Bausteine der Desmosomen, den zahlreich ausgebildeten Zellkontakten innerhalb der Epidermis, nachgewiesen. Die Methodik blieb dabei unverändert, es wurde aber ein anderer Sekundärantikörper benötigt, da als

Primärantikörper rabbit anti-pan desmoglein (FA. Serotec, Düsseldorf) verwendet wurde. Hier wurde als Sekundärantikörper ein Peroxidase konjugierter goat anti-rabbit IgG (Fa. Dianova, Hamburg) eingesetzt.

## 2.9 SDS-PAGE und Western blot

### 2.9.1. SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat polyacrylamide gel elektrophoresis)

#### 2.9.1.1 Prinzip

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine ausschließlich nach unterschiedlichen Molekülgrößen aufgetrennt. Durch die Beladung mit dem anionischen Detergenz SDS werden die Eigenladungen der Proteine so effektiv überdeckt, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. Zudem werden die unterschiedlichen Molekülformen ausgeglichen, indem die Proteine in ihre Primärstruktur überführt werden (*Westermeier, 1990*).

#### 2.9.1.2 Probenmaterial und Probenvorbereitung

Für die Elektrophorese wurden Zellpellets, gewonnen aus konfluenten und zum Teil auch mehrschichtigen Zellkulturen, verwendet. Da das Zellmaterial eines Kultivierungsgefäßes nicht genügend Protein enthielt, wurde Material der jeweiligen Zelllinien gesammelt und gepoolt. Hierfür wurden die angezüchteten Zellen aus dem Brutschrank entnommen, mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend entweder mit Trypsin oder mit einem Zellschaber abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mit 5 ml Medium in einer sterilen Pipette aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für die Elektrophorese wurden jeweils mehrere Pellets einer Zelllinie bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut, resuspendiert und in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Danach wurden die gesammelten Proben erneut zentrifugiert (10 min, 1050 U/min, Raumtemperatur). Nachdem der Überstand vollständig abgesaugt worden war, wurden aus den großen Zellpellets Proteine für die SDS-PAGE extrahiert.

#### 2.9.1.3 Proteinextraktion

Zu den Zellpellets wurden 1 000  $\mu\text{l}$  Proteinextraktionspuffer (Tab. 4) gegeben. Die mit dem Puffer versetzten Proben wurden 3 bis 4 Stunden unter ständigem Rütteln auf Eis inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Proben zusätzlich in regelmäßigen Abständen resuspendiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Proben

zentrifugiert (15 min, 15 000 U/min, Raumtemperatur) und danach befanden sich die extrahierten Proteine im Überstand.

**Tabelle 4:** Proteinextraktionspuffer

Puffer für die Proteinextraktion	
200 µl	1 molarer TRIS-Puffer pH 7,4 (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Fa. Roth, Karlsruhe)
500 µl	0,5 molare wässrige EDTA Lösung pH 7,4 (Titriplex III, Fa. Merck, Darmstadt)
2 500 µl	1 molare wässrige Succroslösung (D(+)-Saccharose, Fa. Roth, Karlsruhe)
7 µl	2-Mercaptoethanol (PlusOne Mercaptoethanol, Fa. Amersham Biosciences, Freiburg)
ad 9 ml	Aqua bidest.

Der proteinhaltige Überstand wurde gleichmäßig (jeweils 500 µl) auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Es wurde pro Reaktionsgefäß 1 ml Aceton (Fa. Merck, Darmstadt) zugefügt, um die extrahierten Proteine vollständig auszufällen. Durch eine erneute Zentrifugation (30 min, 22 000 U/min, 4°C) wurden die ausgefällten Proteine von dem Puffer/Aceton Gemisch getrennt. An einem der Proteinsedimente wurde eine Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt, siehe Punkt 2.9.1.5.

**Tabelle 5:** Sample Buffer

Sample Buffer	
20 ml	TRIS-Puffer pH 8,0 (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Fa. Roth, Karlsruhe)
0,500 g	SDS (PlusOne Sodium Dodecylsulfate, Fa. Amersham Biosciences, Freiburg)
0,070 g	DTT (PlusOne Dithiothreitol, Fa. Amersham Biosciences, Freiburg)
0,005 g	Bromphenolblau (FA. Merck, Darmstadt)
ad 50 ml	Aqua bidest.

Zu dem zweiten Proteinsediment wurde 1 ml Sample Buffer (Tab. 5) gegeben, und das Proteinsediment wurde unter ständigem Rütteln über Nacht vollständig gelöst. Vor dem

Auftragen wurden die Proben durch dreiminütiges Erhitzen auf 95°C gereinigt, und zur Stabilisierung wurden 10 % Jodacetamid (Fa. Sigma, Taufkirchen) hinzugefügt.

#### 2.9.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt des Extrakts wurde mit der Biuret Methode (*Robinson und Hodgen, 1940*) bestimmt, dabei wurden die Peptidbindungen in den Proteinen nachgewiesen. Hierfür wurde das unter 2.9.1.3 beschriebene Präzipitat in 1 ml 0,1 molarer Natronlauge gelöst und mit 4 ml Biuret-Reagenz (Fa. Fulka, Buchs) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Proteinkonzentration aufgrund der Intensität der Farbreaktion am Spektralphotometer PMQ II (Fa. Zeiss, Oberkochen) photometrisch bei 550 nm gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration der Proben wurde als Standard fetales bovines Serum (Fa. Sigma, Taufkirchen) mit bekannter Gesamteiweißkonzentration mitgeführt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit folgender Formel berechnet: Proteinkonzentration Probe = Proteinkonzentration Standard/Extinktion Standard x Extinktion Probe.

Diese Bestimmung diente als Grundlage für die später eventuell notwendige Verdünnung für die gelelektrophoretische Trennung der extrahierten Proteine.

#### 2.9.1.5 Auftrennung und Darstellung der Proteine

Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf kommerziell erhältlichen Gradientengelen (ExcelGel SDS Gradient 8-18, Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Multiphor II, Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) mit kommerziell erhältlichen Pufferstreifen (ExcelGel SDS Buffer Strips, Fa. Amersham Biosciences, Freiburg). Die Proben wurden gemeinsam mit einem Marker aus sechs verschiedenen Referenzproteinen mit bekannten relativen Molekulargewichten von 14,4 bis 94 kD (LMW Calibration Kit for Electrophoresis, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Temperatur von 15°C in zwei Phasen durchgeführt. In der Eindringphase (100 V, 50 mA, 30 W, 30 min) wurde ein sanftes Eindringen der Proteine in die Trennzone des Gels ermöglicht, und während der anschließenden zweiten Phase (600 V, 50 mA, 30 W, bis zum Erreichen der Oberkante des Gels) wurden die Proteine aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Gele in 40 % Ethanol, mit einem Zusatz von 10 % Eisessig fixiert und gefärbt. Die Gele wurden entweder mit einer PlusOne Coomassie Blue PhastGel Blue R (Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) Lösung, die für Proben mit einem Proteingehalt von 0,2 – 5,0 mg/ml geeignet ist, oder dem deutlich empfindlicheren PlusOne Silver Staining Kit, Protein

(Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) angefärbt. Die Versilberung eignet sich für Proben mit einem Proteingehalt von 0,01 – 1,0 mg/ml.

Anhand der Markerbanden und den dazu bekannten Molekulargewichten wurde für jedes Gel eine Eichkurve erstellt, mit deren Hilfe die Molekulargewichte der einzelnen Probenbanden errechnet werden konnten.

## 2.9.2 Western Blot

### 2.9.2.1 Prinzip

Beim Western Blot wurden die zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinfractionen auf die Oberfläche einer Blotmembran übertragen. Hier waren sie für den immunologischen Nachweis mit spezifischen Antikörpern gut zugänglich und die Art der Proteine konnte bestimmt werden.

### 2.9.2.2 Proteintransfer

Der Proteintransfer wurde nach der semi-dry blotting Methode durchgeführt. Diese Methode ermöglichte die Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems (*Westermeier, 1990*). Der Proteintransfer fand zwischen zwei horizontal angeordneten Graphitplatten in der auch für die SDS-PAGE verwendeten Elektrophoresekammer (Multiphor II, Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) statt. Hierfür wurde zuerst das Polyacrylamidgel von seiner Trägerfolie gelöst und dann zusammen mit der Blotmembran (Blot Paper 80-6219-65, Fa. Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg) zwischen zwei mit Transferpufferlösungen getränkte Filterpapierstapel gelegt. Dieser Stapel wurde danach zwischen die Graphitplatten gelegt. Der Proteintransfer wurde in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach *Kyhse-Andersen (1984)* bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.9.2.3 Nachweis von Keratinproteinen

Nach dem Blotten wurden die Blotmembran für zwei bis drei Stunden bei 60°C getrocknet. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Blotmembran zu blockieren, wurde sie 45 Minuten bei 37°C in einer 3%tigen Magermilchlösung inkubiert. Hierfür wurde skin milk powder (Fa. Fulka, Buchs) in TBST (Tab. 7) gelöst. Anschließend folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern in einer feuchten Kammer, die über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt wurde. Als Primärantikörper wurden AE 1 und AE 3 (beide Serotec, Düsseldorf) verwendet. Die Antikörper wurden im Verhältnis 1:100 in TBST verdünnt.

**Tabelle 6:** TBS

TBS pH 7,4	
16 g	NaCl (Fa. Merck, Darmstadt)
0,4 g	KCl (Fa. Merck, Darmstadt)
4 g	Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Fa. Roth, Karlsruhe)
ad 2000 ml	Aqua bidest.

**Tabelle 7:** TBST

TBST	
1 ml	Tween 20 (Fa. Sigma, Taufkirchen)
ad 1000 ml	TBS

Am nächsten Tag wurde die Blotmembran mehrmals gründlich mit TBST gewaschen, um nicht gebundene Anteile des Primärantikörpers zu entfernen. Es folgte der Nachweis der an die Proteine gebundenen Primärantikörper mit dem DAKO® StreptAB-Komplex/HRP-Duett Kit (Fa. Dako, Hamburg). Dieses Kit bestand aus zwei Sekundärantikörpern. Zuerst wurde die Blotmembran für eine Stunde mit dem im Verhältnis 1:200 in TBS gelösten, biotinierten Sekundärantikörper inkubiert und anschließend mehrmals gründlich mit TBS (Tab. 6) gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation mit dem ebenfalls im Verhältnis 1:200 in TBS gelösten Komplex aus Streptavidin und biotinylierter Peroxidase. Nach nochmaligem Waschen mit TBS erfolgte der Nachweis der Antikörperbindung mit einer chromogenen Substratlösung (Tab. 8).

**Tabelle 8:** Chromogene Substratlösung

Chromogene Substratlösung	
10 mg	DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid; Fa. Sigma, Taufkirchen)
1,2 ml	1%tige NiCl <sub>2</sub> Lösung (NiCl <sub>2</sub> Fa. Merck, Darmstadt)
20 µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Fa. Merck, Darmstadt)
ad 20 ml	TBS

Als Negativkontrolle wurde parallel zu der Proteinfractionen der bei der SDS-PAGE mitgeführte Marker (LMW Calibration Kit for Electrophoresis, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), in dem keine Keratine vertreten waren, mit allen Antikörpern inkubiert.