

3 Material und Methoden

Die Charakterisierung der vH⁺-ATPase bei ovinen Pansenepithelzellen erfolgte im Rahmen von in vitro-Versuchen. Hierfür wurden aus dem Pansengewebe frisch geschlachteter Schafe Primärkulturen von Pansenepithelzellen angelegt. Die Messung des pH_i erfolgte mittels eines fluoreszenzspektroskopischen Messverfahrens unter Nutzung des Fluoreszenzfarbstoffes 2',7'-Bis(2-Carboxylethyl)-5(6)-Carboxyfluorescein (BCECF).

3.1 In vitro-Kultivierung primärer Pansenepithelzellen

3.1.1 Material

Medium 199, Trypsin, Glutamin und Antibiotika (Gentamycin, Kanamycin und Nystatin) wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), die gepufferten Salzlösungen (Dulbecco's phosphat buffered saline, DPBS), Kollagen und Fetales Kälberserum (FKS) wurden von Biochrom (Berlin) bezogen.

3.1.2 Versuchsgewebe

Das Pansengewebe wurde in einem brandenburgischen Schlachthof bzw. von institutseigenen Versuchstieren von frisch geschlachteten Schafen gewonnen. Die Schafe waren unterschiedlicher Rasse und ihr Alter variierte zwischen 6 und 12 Monaten. Auch die Fütterung der Tiere war verschieden (Weidegras bzw. Heu und Krafffutter).

3.1.3 Zellkultur

Primärkulturen von Pansenepithelzellen wurden im Wesentlichen, wie bei Galfi *et al.* (1981) beschrieben, mit geringer Modifizierung der Methode angelegt. Aus dem kaudalen Pansenblindsack wurden Gewebestreifen einer Größe von maximal 5 x 10 cm² entnommen und mindestens dreimal in eiskalter, Ca²⁺- und Mg²⁺-freier, gepufferter Salzlösung (DPBS) mit 4% Penicillin-Streptomycin (4 x 10⁵ Units Penicillin/l und 400 mg Streptomycin/l) gewaschen und anschließend in dieser Lösung bei 4°C eine Stunde inkubiert. Die Präparation der Pansenzotten sowie alle weiteren Isolierungsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-flow-Bank. Die einzelnen Gewebestücke wurden zunächst in sterile, eiskalte DPBS verbracht und die Pansenzotten mittels einer Präparierschere vom Bindegewebe abgetrennt. Die gewonnenen Pansenzotten wurden mehrmals in der

oben beschriebenen antibiotikahaltigen (1% Penicillin-Streptomycin) DPBS und anschließend zweimal in antibiotikafreier DPBS gewaschen.

Anschließend wurden die Pansenzotten einer fraktionierten Trypsinierung (0,25% Trypsin-EDTA-Lösung mit 2,5 g Schweinetrypsin, 0,2 g EDTA·l⁻¹ und 1% Penicillin-Streptomycin; rühren bei 38°C) unterzogen. Die zellhaltige Trypsinlösung wurde alle 30 Minuten gewonnen und durch frische, 38°C warme Trypsinlösung ersetzt. Der zellhaltige Überstand wurde jeweils durch 4-lagige Gaze gefiltert, um Gewebereste und Pflanzenbestandteile zu entfernen, und mit einigen Millilitern eines serumhaltigen Mediums versetzt, um die Trypsinwirkung zu stoppen. Die Menge des zugesetzten serumhaltigen Mediums richtete sich nach dem Volumen der gewonnenen Zellfraktion. Es wurde ein Viertel bis ein Drittel des Volumens hinzugegeben. Die Zellfraktionen wurden bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert.

Von jeder Zellfraktion wurde eine Probe von 20 µl zur mikroskopischen Beurteilung auf einen Objektträger gegeben und mit Trypanblau eingefärbt, um die Vitalität und das Verhältnis von Zellen der basalen und parabasalen Zellschicht (Stratum basale und Stratum spinosum) zu den Zellen aus oberen Zellschichten (Stratum corneum und Stratum granulosum) zu überprüfen (Abbildung 3). Anhand dieser mikroskopischen Untersuchung wurden die Fraktionen ausgewählt, die einen hohen Anteil an Zellen aus dem Stratum basale und Stratum spinosum enthielten, da nur diese Zellen in der Kulturschale anheften und proliferieren.

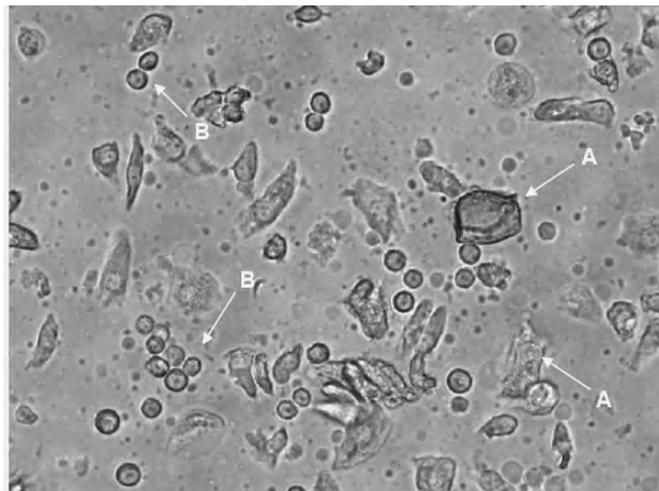


Abbildung 3: Mikroskopisches Bild einer Zellfraktion im Rahmen einer Zellisolierung. Die Zellfraktionen wurden nach dem Gehalt verhornter Zellen (**A**) und dem Gehalt lebender Zellen aus dem Stratum germinativum (Stratum spinosum und Stratum basale, **B**) beurteilt. (100-fache Vergrößerung)

Die ausgewählten Zellfraktionen wurden drei bis vier Mal bei 4°C in DPBS mit 1% Penicillin-Streptomycin gewaschen und anschließend in einem Wachstumsmedium (Medium 199 mit 15 % FCS, 6.8 ml·l⁻¹ Glutamin, 20 ml·l⁻¹ Hydroxyethylpiperazin-ethansulfonsäure (HEPES) und als Antibiotikazusatz 50 mg·l⁻¹ Gentamycin sowie 100 mg·l⁻¹ Kanamycin) aufgenommen. Die Einsaat der Zellen erfolgte in einer Dichte von 5 x 10⁵ Zellen/ml in collagenbeschichtete Kulturschalen (Ø 6 cm). Die weitere Kultivierung wurde im Brutschrank bei 100% Wasserdampfsättigung in einem Luft-CO₂-Gemisch (5% CO₂) und bei einer Temperatur von 38°C durchgeführt. Es erfolgte eine tägliche mikroskopische Beurteilung der Kulturen. 24 Stunden nach der Aussaat der Zellen wurde das Zellkulturmedium 1 gegen das Zellkulturmedium 2 (Nystatin-frei) getauscht. Tabelle 4 zeigt die genaue Zusammensetzung der zur Kultivierung verwendeten Medien. An jedem 2. Tag wurde das Kulturmedium erneuert. Gegebenfalls wurden hierbei die Schalen mit warmer antibiotikafreier DPBS abgespült, um nicht angewachsene Zellen zu entfernen. Für Experimente wurden Zellen aus 4-7 Tage alten Kulturen verwendet.

Substanz	Zellkulturmedium 1	Zellkulturmedium 2
Medium 199	Basismedium	Basismedium
Fetales Kälberserum	150 ml/l	100 ml/l
L-Glutamin (200 mmol/l)	6,8 ml/l	6,8 ml/l
HEPES-Puffer (1mol/l)	20ml/l	20ml/l
Nystatin	2,4 x 10 ⁵ U/l	-
Gentamycin	50mg/l	50mg/l
Kanamycin	100mg/l	100mg/l

Tabelle 4: Zusammensetzung der zur Kultivierung verwendeten Medien

3.1.4 Immunzytochemischer Nachweis von Zellen epithelialen Ursprungs

Zum Nachweis ihres epithelialen Ursprungs wurden PEZ mit Hilfe eines indirekten Immunfluoreszenzverfahrens auf die Existenz von Zytokeratinen untersucht. Hierzu erfolgte eine Aussaat der Zellen auf Kammerdeckgläser. Nach Anheftung wurden die Zellen 10 Minuten lang bei -20°C in Methanol fixiert. Nach Entfernung des Methanols durch Waschen mit DPBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit fötalem Kälberserum geblockt (15 Minuten bei 37°C). Danach wurden die mit DPBS gespülten Deckgläser (Entfernung des Kälberserums) bei Zimmertemperatur mit dem primären Antikörper (Maus-anti-Cytokeratin-Pan-Antikörper, Klon Lu5 von Chemicon International, Temecula, CA, USA) inkubiert und nach 60 Minuten dreimal für je drei Minuten mit DPBS gewaschen. Die Sichtbarmachung der antikörpermarkierten Strukturen erfolgte mit einem Fluorescein-konjugierten Schaf-Anti-Maus-Ig-Antikörper (20 $\mu\text{g/ml}$, 60 Minuten, Zimmertemperatur). Nach dem Entfernen der Kammerstruktur (siehe Abbildung 4) wurden die Deckgläser mehrmals gründlich mit DPBS gewaschen, in phosphatgepuffertem Glycerin eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch beurteilt (Abbildung 5).



Abbildung 4: Nunc Kammerdeckgläser, Kammerstruktur entfernbare

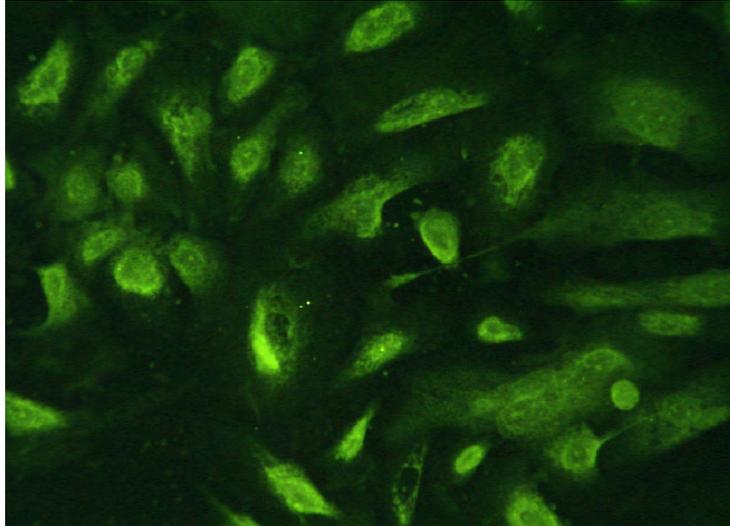


Abbildung 5: Nachweis von Zytokeratinen mittels indirekter Immunfluoreszenz an primärkultivierten PEZ (400-fache Vergrößerung)

3.2 Messung der intrazellulären Wasserstoff-Ionen-Konzentration

Zur Bestimmung der intrazellulären Wasserstoff-Ionen-Konzentration wurde 2',7'-Bis(2-Carboxylethyl)-5(6)-Carboxyfluorescein (BCECF) als spezifischer Fluoreszenzindikator (Fluoreszenzfarbstoff, „fluorescent dye“) eingesetzt. BCECF ändert seine Excitationscharakteristika, wenn sich Wasserstoff-Ionen reversibel an das Molekül binden.

3.2.1 Messgeräte und Software

Die Messungen erfolgten mit dem computergesteuerten Fluoreszenzspektrometer LS 50-B der Firma Perkin-Elmer (Perkin-Elmer Instruments, Shelton, CT, USA). Die Basisversion des Messplatzes wurde um die Schnellfiltereinheit und den Biokinetik-Küvettenhalter ergänzt. Die Schnellfiltereinheit ermöglicht die Verkürzung des zeitlichen Abstandes zwischen zwei Messpunkten von 1,9 s auf 40 ms; der Biokinetik-Küvettenhalter sorgt für eine kontinuierliche Durchmischung der Zellsuspension bei einer konstanten Temperatur.

Die Steuerung des Messplatzes und die Ermittlung der Versuchsdaten erfolgte mittels der Software FL-Winlab von Perkin-Elmer Instruments.

3.2.2 Fluoreszenzindikatoren

Mittels Fluoreszenztechniken ist es möglich, Ionenkonzentrationen nicht nur extrazellulär, sondern auch im Zytosol lebender Zellen zu messen. Zu diesem Zweck müssen die nicht membrangängigen Farbstoffe in nicht-polare, lipidlösliche und somit membrangängige Formen umgewandelt werden, was durch eine Veresterung erreicht wird (Acetoxymethylester, AM-Ester).

Die aktive Form entsteht in der Zelle, wenn intrazelluläre unspezifische Esterasen die Esterbindungen hydrolysieren, so dass freie Carboxylgruppen entstehen. An die Säurereste binden Ionen, wodurch es zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität und einer Verschiebung der Exitations- bzw. der Emissionsmaxima kommt.

3.2.2.1 Eigenschaften des eingesetzten Fluoreszenzindikators

Bei dem in den eigenen Untersuchungen eingesetzten Fluoreszenzindikator BCECF (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) verändert sich durch die Bindung von Wasserstoff-Ionen das Exzitationsmaximum, somit gehört er zu den sogenannten „excitation shift probes“. Abbildung 6 zeigt die Struktur von BCECF.

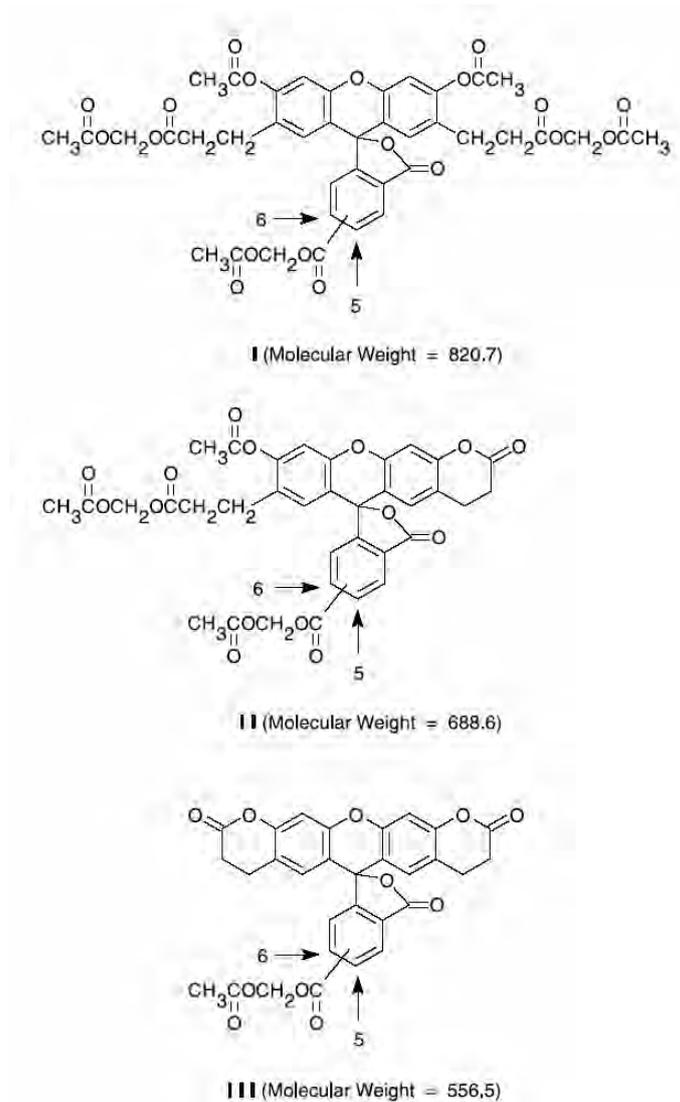


Abbildung 6: 2',7'-Bis(2-Carboxylethyl)-5(6)-Carboxyfluorescein (BCECF)

(entnommen aus "Molecular Probes' Handbook of Fluorescent Probes and Research Products" by Richard P. Haugland; Ninth Edition)

Aufgrund seiner Eigenschaften ist BCECF für Messungen des pH_i bei PEZ besonders geeignet:

- Der pK von 7,0 ist dem physiologischen cytoplasmatischen pH -Bereich von ca. 6,8 bis 7,4 optimal angepasst.
- Das Exzitationsprofil ist pH -abhängig.
- Die AM-Esterform von BCECF ist membrangängig, erst in der Zelle entsteht die aktive Form, dadurch reichert sich diese in der Zelle an.
- BCECF-AM zeigt keine Fluoreszenz, sondern nur BCECF, somit ist die Fluoreszenz auch ein Zeichen für Zellvitalität.

Nachteilig ist der weite Abstand zwischen dem „isobestic point“ und dem Exzitationsmaximum (siehe Abbildung 7).

Die Fluoreszenzintensität steigt bei 490 nm mit zunehmendem pH-Wert der Messlösung an. Die zur Bestimmung der Ratio genutzte Wellenlänge von 440 nm führt hingegen kaum zu Veränderungen der Fluoreszenzintensität („isobestic point“). Die Emissionswellenlänge liegt für BCECF bei 535 nm.

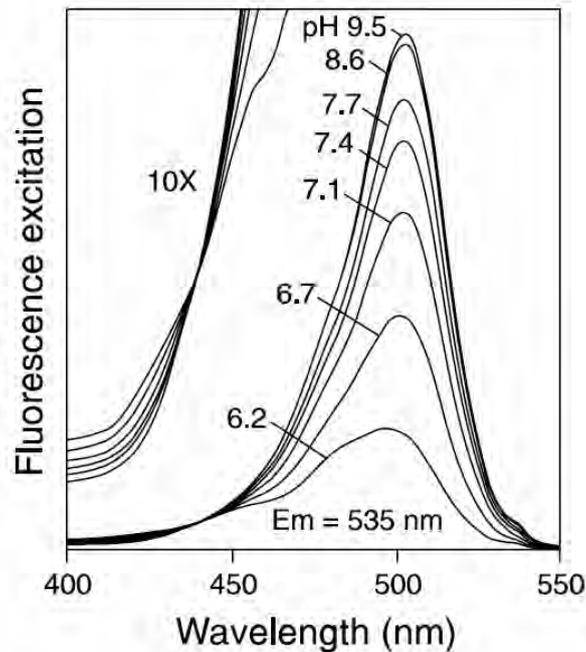


Abbildung 7: Spektren von BCECF in Messlösungen mit verschiedenen pH-Werten (entnommen aus “Molecular Probes’ Handbook of Fluorescent Probes and Research Products“ by Richard P. Haugland; Ninth Edition)

3.2.3 Versuchsablauf

Die Experimente zur Messung der intrazellulären Wasserstoff-Ionen-Konzentration verliefen im Allgemeinen nach folgendem Schema:

- Herstellung einer Zellsuspension
- Beladen der Zellen mit BCECF
- Waschen der Zellen
- Gewinnung von Effektordaten
- Auswertung

3.2.4 Beladen der Zellen

Durch möglichst kurzes Trypsinieren (0,25%ige Trypsin-EDTA-Lösung) wurden die Panseneepithelzellen vom Substrat gelöst. Der Vorgang der Ablösung wurde mikroskopisch verfolgt und durch Zugabe von serumhaltigem Medium beendet. Die isolierten Zellen wurden zweimal in Hanks` Salzlösung (Biochrom) mit HEPES und 1 mmol/l Ca^{2+} gewaschen (10 min, 800 G) und resuspendiert.

Nach einer Erholungsphase von etwa 15 Minuten wurden die Zellen 25 Minuten in einem Beladungsmedium aus Hanks` Salzlösung, Pluronic F-127 (20%ige Lösung in DMSO von Molecular Probes) und 0,5 $\mu\text{mol/l}$ BCECF-AM bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Pluronic F-127 unterstützt die Dispersion der unpolaren Farbstoffmoleküle im Beladungsmedium. Überschüssiger Indikator wurde anschließend durch zweimaliges Waschen (10 min, 800G) in Hanks` Salzlösung mit HEPES und 1 mmol/l Ca^{2+} entfernt. Nach weiteren 25 Minuten ist eine vollständige Farbstoffhydrolyse erreicht und der Farbstoff somit aktiviert. Die freien Spaltprodukte wurden durch erneutes Waschen (10 min, 800G) in Hanks` Salzlösung entfernt.

3.2.5 Gewinnung und Quantifizierung der Fluoreszenzdaten

Die Messung der Fluoreszenzintensität der indikatorbeladenen Zellen erfolgte mit dem Fluoreszenzspektrometer LS 50-B (Perkin-Elmer) mit der Fast-Filter-Einheit in einer 10 mm- Kuvette bei 37° C unter kontinuierlichem Rühren. Die Kuvette fasst ein Volumen von 3 ml und wurde je nach Versuchsansatz mit 2,0 oder 2,5 ml Zellsuspension (Zytokrit 10%) gefüllt. Die Exzitationswellenlängen lagen bei 490 nm und 440 nm und die Emissionswellenlänge betrug 530 nm.

3.2.5.1 *Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes*

Versuche wurden zwischen dem vierten und siebten Tag nach Aussaat der PEZ durchgeführt. Zellsuspensionen wurden wie oben beschrieben mit 0,5 $\mu\text{mol/l}$ BCECF-AM beladen, um den intrazellulären pH-Wert (pH_i) zu bestimmen. Die Fluoreszenz der farbstoffbeladenen Zellen wurde in 20 ms-Intervallen mit dem computergesteuerten Fluoreszenzspektrometer LS 50-B der Firma Perkin-Elmer unter Nutzung einer fast-filter-Einheit bestimmt. Die Exzitation erfolgte in schnellem Wechsel zwischen 490 nm und 440 nm und die Messung der Emission bei 530 nm. Das Gerät bildet aus den Fluoreszenzsignalen der beiden Exzitationswellenlängen

automatisch die 440/490-Ratio. Dank dieses dualen Messverfahrens sind die pH_i -Messungen weitgehend unabhängig von Schwankungen der Zellzahl, einer heterogenen Farbstoffverteilung und Fluoreszenzverlusten durch „Leakage“ (Ausschleusen des Farbstoffes) oder Ausbleichen des Farbstoffes durch Lichteinwirkung.

Die Messungen wurden mit 2 bzw. 2,5 ml Zellsuspension (ca. 10% Zytokrit) bei 37°C in 3 ml Küvetten unter ständigem Rühren mittels eines Magnetrührers durchgeführt. Eine detaillierte Übersicht über die verwendeten Messmedien befindet sich im Anhang (Kapitel 9).

3.2.5.2 Eichung von BCECF

Für die Berechnung des pH_i aus den BCECF-Fluoreszenzdaten wurden mittels der Nigericin-Methode Eichkurven erstellt. Dazu wurde die extra- und intrazelluläre H^+ -Konzentration mit Hilfe des K^+/H^+ -Ionophores Nigericin äquilibriert. Der Vorgang wurde jeweils für verschiedene pH-Werte (6,0 - 8,0) wiederholt (Boyarsky *et al.*, 1996; Rink *et al.*, 1982; Thomas *et al.*, 1979).

Die Panseneepithelzellen wurden zu diesem Zweck für 10 Minuten in einer nigericinhaltigen Lösung mit hoher K^+ -Konzentration und verschiedenen pH-Werten zwischen 6,0 und 8,0 inkubiert, welche die folgende Zusammensetzung aufwies (in mmol/l): 110 K-Glukonat, 20 KCl, 10 NaCl, 10 Glukose, 1 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 MOPS, und 5 $\mu\text{g/ml}$ (5 $\mu\text{mol/l}$) Nigericin (Molecular Probes). Die Osmolalität der Lösung betrug 288 mosmol/kg. Der pH-Wert wurde mittels entsprechender Puffersubstanzen auf 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 oder 8 eingestellt (Eichlösung und Puffersubstanzen: siehe Anhang (Kapitel 9)).

Anschließend wurden die Zellen zweimal in K^+ -Medien mit identischer Zusammensetzung und pH-Werten aber ohne Nigericin und mit einem Zusatz von 0,5% Bovinem Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) gewaschen, um das Ionophor zu entfernen.

Danach erfolgte die Messung der BCECF-Fluoreszenz in K^+ -Medien ohne Zusätze mit pH_e von 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 und 8,0. Abbildung 8 zeigt die Originaldaten dieser Messungen.

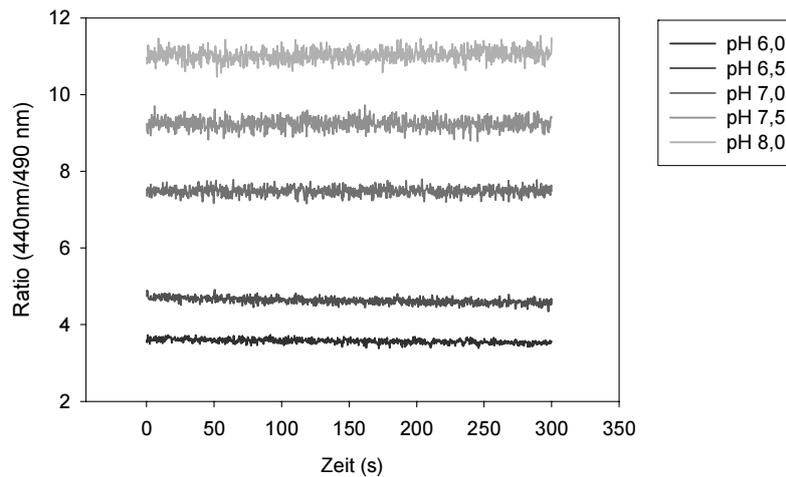


Abbildung 8: Original Eichdaten. Nach Äquilibration von pH_e und pH_i in Lösungen mit verschiedenen pH-Werten (6.0, 6.5, 7.0, 7.5 und 8.0) wurde der pH_i gemessen.

Nach Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten bei 440 nm und 490 nm wurde die 440/490-Ratio ($R_{440/490}$) berechnet und gegen entsprechende pH-Werte aufgetragen.

Die Beziehung zwischen pH_i und $R_{440/490}$ ließ sich durch eine lineare Gleichung mit $pH_i = 5,2 + (0,250427 \times R_{440/490})$ beschreiben. Die Anpassung erfolgte mittels linearer Regression mit der SigmaPlot Statistik-Funktion (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), wobei der Regressionskoeffizient (r^2) 0,985 betrug.

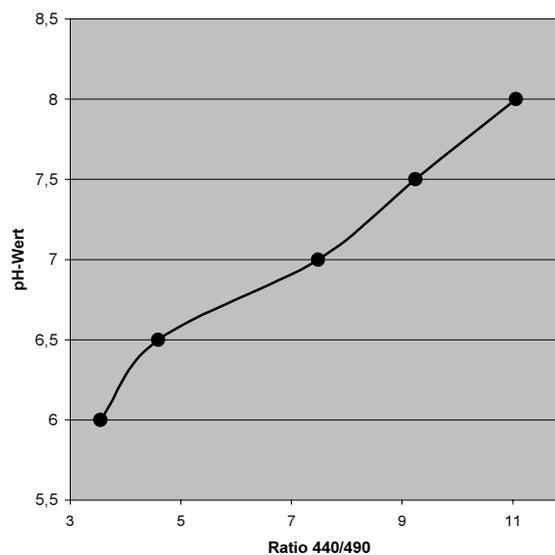


Abbildung 9: Eichkurve. Bei verschiedenen pH-Werten wurde der pH_i gemessen, anschließend wurde mittels linearer Regression aus den gemessenen Daten eine Eichkurve erstellt.

3.3 Graphische Darstellung und Statistik

Die Daten wurden, wenn nicht anders angegeben, als arithmetische Mittel \pm Standardfehler (SE) dargestellt. Die Signifikanzen wurden durch t-Test nach Student oder gepaarten t-Test ermittelt. $P < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

Die graphische Darstellungen der Versuchsergebnisse wurden mit dem Programm SigmaPlot (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms „SigmaStat“ (SPSS Inc.).