

C. Material und Methoden

1. Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial dienten Klauen von einem regionalem Schlachtbetrieb. Es wurden ausschließlich Klauen von weiblichen Rindern im Alter von ein bis zwei Jahren verwendet. Die Klauen wurden nach der Schlachtung der Tiere zwischen den Gelenkreihen des Fesselgelenkes abgetrennt. Anschließend wurden sie auf Eis gekühlt und innerhalb von 45 Minuten in das Institut für Veterinär-Anatomie transportiert, wo unverzüglich mit der Isolierung der Zellen begonnen wurde.

2. Isolierung der Zellen

Die Klauen wurden mittels Hochdruckreiniger gesäubert, die Oberfläche mit Alkohol desinfiziert und mit einer Bandsäge in Sagittalscheiben zerteilt, wobei die äußeren Scheiben verworfen wurden. Knochen und Fettgewebsanteile wurden vom Hornschuh getrennt. Das Klauenhorn wurde mit 70%igem Alkohol gereinigt und leicht abgeflammt. In der Folge wurde mit sterilen Instrumenten gearbeitet, wobei zunächst der Rand der Sägeschnitte großzügig entfernt wurde.

Zum Einsatz kamen in dieser Phase der Isolierung zwei Methoden zur Dissoziation von Zellen. Die erste Methode erfolgte nach den Vorgaben von NEBEL (2005), bei der zunächst kleine Probestücke entnommen wurden und anschließend in Trypsin weiter zerkleinert wurden. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit den feinen Stücken zentrifugiert, das Pellet in Medium resuspendiert und die Zellen auf Petrischalen ausgesät.

Bei der zweiten Methode wurden ca. 1 cm x 1 cm x 1 cm große Stücke aus der Hornkapsel von verschiedenen Segmenten gelöst (s. Abb. 7).



Abb. 7 Dermoepidermales Gewebestück vor der Behandlung mit Dispase

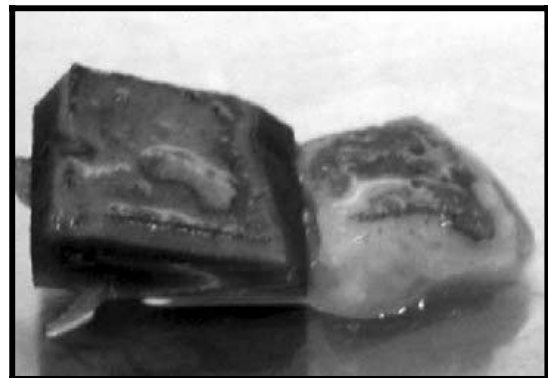


Abb. 8 Dermoepidermales Gewebestück nach der Behandlung mit Dispase, Dermis (dunkel, links) und Epidermis (hell, rechts) sind voneinander getrennt

Diese Stücke wurden mehrmals in PBS Dulbecco (Biochrom AG, Berlin) gespült. Danach wurden sie bei 37° C in DMEM mit 0,5% Kanamycin + 0,25 % Streptomycin eine Stunde inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurden sie in einer Dispaselösung (14 Units/ml) (Gibco, USA) weitere zwei Stunden inkubiert. Im Anschluss an diese Inkubationen konnte man die Dermis von der Epidermis mit Hilfe von zwei chirurgischen Pinzetten durch leichten Zug voneinander trennen (s. Abb. 8).

Die Dermis wurde in 6-well Platten überführt und mit Medium (DMEM + 0,5% Kanamycin + 10% FBS) versorgt. Die Epidermis wurde mit einem sterilen Einmalskalpell abgeschabt und in eine weitere 6-well-Platte überführt und mit Medium (Quantum + 0,5% Kanamycin) versorgt.

2.1 Anzüchtungen der isolierten Zellen

2.1.1 Nährmedien

Es wurden zwei unterschiedliche Nährmedien verwendet. Zum einen *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Biochrom AG, Berlin), welchem fetales Kälberserum (FBS) zugesetzt wurde und zum anderen Quantum (Fa. Biotechnologies, Heidelberg). Beiden Nährmedien wurde 2% Kanamycin zugesetzt.

Das Medium DMEM wurde teilweise auch durch Fibrozyten konditioniertes Medium das für die Anzüchtung von Keratinozyten verwendet wurde, ersetzt (s. NEBEL, 2005). Desweiteren wurde DMEM in Verbindung mit 20µl/ml Mitomycin (Sigma, Taufkirchen) eingesetzt, um mit Hilfe von Fibrozyten einen „*feeder layer*“ zu bilden, auf dem die Keratinozyten wachsen sollten. Das Mitomycin verblieb zwei Stunden auf den Fibrozyten. Die Proliferation der Zellen wurde unterbrochen, die Zellen blieben weiterhin vital.

2.1.2 Kultivierungsbedingungen

Die Zellen wurden in Brutschränken der Firmen Memmert und Heraeus kultiviert. Die Kultivierungstemperatur betrug 33° C bzw. 37° C in einer feuchten Atmosphäre mit einem CO₂ Gehalt von 5%. Die Nährmedien wurden zweimal pro Woche gewechselt. Bei frisch isolierten bzw. aufgetauten Zellen wurde das Nährmedium zunächst zwei Tage hintereinander gewechselt und danach zweimal pro Woche.

2.1.3 Kultivierungsgefäße

Zum Einsatz kamen mehrere Kunststoffschalen der Firma Iwaki (Tokio, Japan), die sich in ihrer Größe unterschieden (p30, p60, p100). Die frisch isolierten Zellen wurden zunächst auf kleinen so genannten 6-well Platten angezchtet. Waren die Zellen zu einem konfluenten *monolayer* gewachsen, wurden sie in eine nächst größere Schale überführt.

2.1.4 Dokumentation der Untersuchungsbefunde

Die Dokumentation der Untersuchungsbefunde erfolgte mit einem Invert-Mikroskop Olympus CKX 14 (Olympus, Hamburg) und der damit verbundenen Digitalkamera Camedia (C-40402 ZOOM Olympus, Hamburg).

2.1.5 Subkultivierung

Wie bereits in Punkt 2.1.3 beschrieben, wurden die Zellen subkultiviert, nachdem sie einen konfluenten *monolayer* gebildet hatten. Das Medium wurde abgesaugt und die Kulturen mit PBS einmalig gespült. Danach wurden einige Tropfen 0,25%iges Trypsin (Biochrom AG, Berlin) zu der Kultur gegeben, um die Zellen durch die Enzymwirkung vom Kultivierungsgefäß zu lösen (=abtrypsinieren). Unter mikroskopischer Kontrolle wurde dieser Vorgang nach vollständiger Ablösung der Zellen durch serumhaltiges Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit einer Pipette aufgesaugt und unter leichtem Druck wieder ausgeblasen (=trituiert), um eine optimale Durchmischung der Zellen zu erreichen.

2.2 Kryokonservierung

2.2.1 Einfrieren der Zellen

Alle isolierten Zellen wurden in verschiedenen Passagen eingefroren und in flüssigem Stickstoff (-196° C) gelagert. Um eine Kristallbildung im Medium zu vermeiden, wurde dem Medium 10% DMSO (ICN Biomedicals, Eschwege) beigemischt.

Die Zellen wurden zunächst (wie unter Punkt 2.1.5 beschrieben) „abtrypsiniert“ und anschließend mit 10ml Medium zentrifugiert (5min, 1050 U/min, Raumtemperatur). Der

Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Medium mit DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend bei -70°C eingefroren und nach ca. einer Woche in flüssigen Stickstoff gelagert.

2.2.2 Auftauen der Zellen

Nachdem die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff genommen wurden, kamen sie in ein Wasserbad mit 37°C Temperatur. Danach wurden sie vorsichtig in 10ml vorgewärmtes Medium überführt und anschließend zentrifugiert (5 min., 1050 U/min, Raumtemperatur). Das überschüssige Medium wurde verworfen, das Zellpellet in Medium resuspendiert und in einem Kultivierungsgefäß verteilt. Die Adhärenz und Vitalität der Zellen wurde am nächsten Tag mikroskopisch kontrolliert und das Medium erneuert.

2.3 Nachweis von Proteinen mit dem *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Um die isolierten Zellen zu charakterisieren, wurde von jeder Isolierung ein ELISA durchgeführt. Dafür wurden die epidermalen Zellen auf 96-well Platten angezüchtet, bis sie einen subkonfluenten *monolayer* gebildet hatten. Für vier Stunden wurden sie anschließend in 4%igen wässrigem Formalin fixiert. Am darauf folgenden Tag wurden sie mit PBS gespült und für 30 Minuten mit Triton X-100 (Sigma, Taufkirchen) inkubiert. Anschließend wurden sie mehrmals mit PBS gespült.

Für den Nachweis von Keratinen wurden die monoklonalen Antikörper gegen saure/basische Zytokeratine AE1 und AE3 (beide Chemicon, USA) verwendet, deren Kreuzreaktion mit boviner Klauenepidermis aus Untersuchungen von NEBEL (2005) bekannt ist. Als Negativkontrollen wurden Pufferkontrollen, bzw. ein monoklonaler Antikörper gegen Laminin (Sigma, Taufkirchen) mitgeführt, der nicht mit den Zellen reagieren sollte. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C im Kühlschrank mit den Antikörpern inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gespült.

Als Sekundärantikörper wurde *peroxidase-conjugated affinipure sheep-antimouse IgG* (Dianova, Hamburg) eingesetzt. Mit diesem Antikörper wurde die primäre Antikörperbindung mittels einer Farbreaktion visualisiert. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C mit dem Sekundärantikörper inkubiert und anschließend mehrmals mit PBS gespült.

Für den Nachweis der Farbreaktion diente eine Zusammensetzung aus 5mg 3-Amino-9-Ethylcarbazole (Sigma, Taufkirchen), die in 2,5ml DMSO gelöst wurde (ICN Biomedicals,

Eschwege) und mit Acetatpuffer (pH 5) auf 25ml aufgefüllt wurde. Diese Farblösung wirkte eine Stunde bei Dunkelheit ein und wurden zwischendurch im Hinblick auf die Farbreaktion im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Danach wurde die Farbreaktion mit Leitungswasser gestoppt.

3. Perfusionskammersysteme

3.1 Perfusionskammermodelle im Überblick

Insgesamt wurden vier verschiedene Perfusionskammermodelle verwendet:

- 3.1.1 Perfusion Chamber System (PSC3c) (Oligene, Berlin)
- 3.1.2 Kulturcontainer (Minucell, Bad Abbach)
- 3.1.3 Metallkammersystem (Eigenentwicklung)
- 3.1.4 Acrylkammersystem (Eigenentwicklung)

3.1.1 Perfusion Chamber System (PSC3c) (Oligene, Berlin) (Abb. 9a + 9b)

Bei der Perfusionskammer PCS3c handelt es sich um ein Zweikammersystem, in welches Millicell[®] Einsätze eingefügt werden (s. Abb. 10). Beide Kammerseiten sind durch den Einsatz voneinander getrennt und können dadurch mit unterschiedlichen Medien perfundiert werden. Zudem kann man bei bestimmten Einsätzen das Wachstum der Zellen durch die Glasscheiben im Invert Mikroskop beobachten.



Abb. 9a PCS3c (Oligene, Berlin) zusammengesetzt

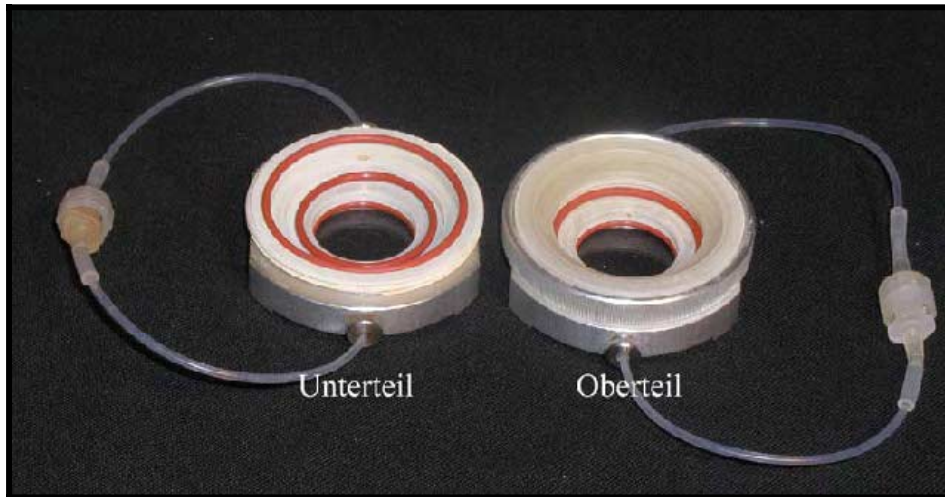


Abb. 9b PCS3c (Oligene, Berlin) Unterteil und Oberteil getrennt

3.1.1.1 Einsätze Perfusion Chamber System (PSC3c) (Oligene, Berlin)

Bei der PCS3c wurden Millicell[®] Einsätze (Millipore[®], Schwalbach im Taunus) verwendet (s. Abb. 10). Um Zellen auf der Unterseite der Millicell[®] Einsätze anzüchten zu können, wurde eigens eine spezielle Metallhalterung entwickelt, in die die Einsätze umgekehrt eingelassen wurden (s. Abb. 11).



Abb. 10
Millicell[®] Einsatz (Millipore[®], Schwalbach i. Ts.)
6-well Kultivierungsgefäß (IWAKI, Tokio)



Abb. 11
Metallhalterung für Millicell[®] Einsätze
(Millipore[®], Schwalbach i. Ts.)

In den Millicell[®] Einsätzen wurden die Zellen in einem 6-well Kultivierungsgefäß (Abb. 10) zunächst angezüchtet und nachdem sie zu einem konfluenten Zellrasen herangewachsen waren in das Kammersystem überführt.

3.1.1.2 Verwendete Membranen (PCS3c-Kammer)

Hersteller	Filtername	Filtercode	Material	Porengröße
Millipore® (Schwalbach)	MF-Millipore	HA	Cellulose Mischester	0,45µm
Millipore® (Schwalbach)	Isopore	PCF	Polycarbonat	0,40µm

3.1.2 Kulturcontainer (Minucell, Bad Abbach)

Der Kulturcontainer der Firma Minucell (s. Abb. 12) wurde hauptsächlich für die praktische Anwendung des Systems eingesetzt. Vorteilhaft bei dieser Art der Perfusion war, dass sechs Minusheet Einsätze (s. Abb. 13) gleichzeitig perfundiert werden können.



Abb. 12 Kulturcontainer (Minucell, Bad Abbach) mit insgesamt sechs Minusheets Einsätzen (s. Abb. 13)

3.1.2.1 Einsätze Kulturcontainer (Minucell, Bad Abbach)

Bei dem Kulturcontainersystem kann praktisch jedes Material als Träger verwendet werden, wenn es in Scheiben mit einem Durchmesser von 12 mm vorliegt. Diese Scheiben wurden in die Minusheets (s. Abb. 13) eingelegt und nach Anzuchtung der Zellen in den Kulturcontainer überführt.



Abb. 13 Minusheets (Minucell, Bad Abbach)

3.1.2.2 Verwendete Einsätze

Hersteller	Einsatzname	Einsatzcode	Material	Porengröße
Millipore [®] (Schwalbach)	Isopore	HTTP	Polycarbonat	0,40µm
Millipore [®] (Schwalbach)	MF-Millipore	HAWP	Cellulose Mischester	0,45µm
Roth (Karlsruhe)	Deckglas	-	Glas	-
Nunc (Naperville, IL)	Thermanox	-	Polyethylenterephatalat	-

3.1.3 Metallkammersystem (Eigenentwicklung)

Um eine leichtere Handhabung zu erzielen und Luftblasenwirkung zu vermeiden, wurde ein eigenes Metallkammersystem entwickelt. Zudem konnten bei diesem System größere Filtereinsätze mit einem Durchmesser von 50 mm verwendet werden. Es handelt sich um ein Zweikammersystem. Beide Kammern werden durch einen Filtereinsatz voneinander getrennt.



Abb. 14 Metallkammersystem

3.1.4 Acrylkammersystem (Eigenentwicklung)

Dieses System ist ebenfalls eine Eigenentwicklung und stellt eine leichte Modifikation der Metallkammer (s. Punkt 3.1.3) dar. Sie besteht aus Acrylglas und hat den Vorteil, dass man das Wachstum auch von außen mikroskopisch kontrollieren kann. In Abbildung 15 sieht man auch einen Cellulose Filtereinsatz, der die beiden Kammerteile voneinander trennt.



Abb. 15 Acrylkammersystem

3.1.4.1 Einsätze für das Metallkammersystem und das Acrylkammersystem

Da beide Kammersysteme den gleichen Durchmesser haben, konnten hier die gleichen Membranfilter (Bsp. NL 17, Abb. 16) verwendet werden.

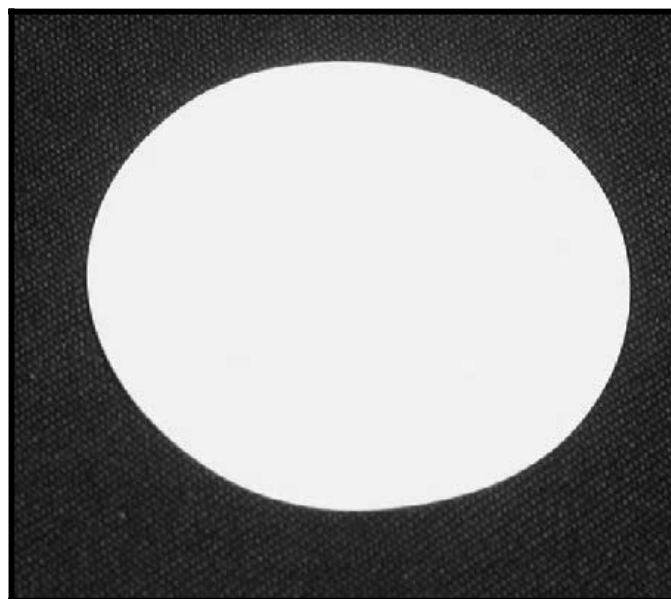


Abb. 16 Membranfiltereinsatz NL 17
(Schleicher & Schuell, Dassel)

3.1.4.2 Verwendete Filtereinsätze

Hersteller	Filtername	Filtercode	Material	Porengröße
Schleicher & Schuell (Dassel)	S&S Membranfilter	ME 25	Mischester	0,45µm
Schleicher & Schuell (Dassel)	S&S Membranfilter	NL 17	Polyamid	0,45µm
Schleicher & Schuell (Dassel)	S&S Membranfilter	PC 40	Polycarbonat	0,40µm

3.2 Schlauch- und Pumpensystem

Als Pumpensystem diente eine Ismatec® 8-Kanal Schlauchpumpe IPC (Ismatec, Wertheim-Mondfeld) (s. Abb. 17).

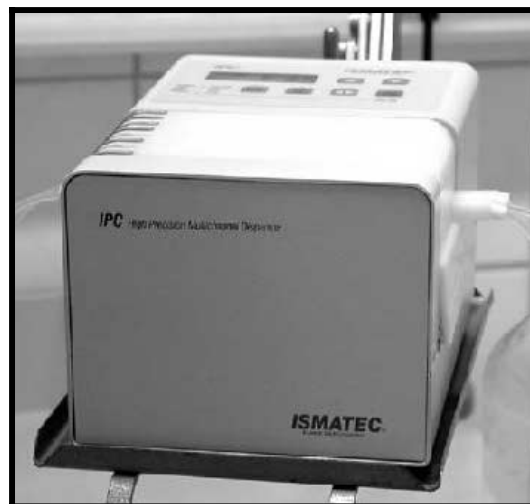


Abb. 17 Ismatec® 8-Kanal Schlauchpumpe

Als Schlauchsystem diente bei dem Kulturcontainer (Minucell®, Bad Abbach) ein vom Hersteller mitgeliefertes Tubing-System mit gaspermeablen Silikonschläuchen (s. Abb. 18). Bei allen anderen Kammern wurden Tygon Schläuche (Roth, Karlsruhe) verwendet, die über ein Luer-Lock System (Roth, Karlsruhe) miteinander verbunden waren.



Abb. 18 Minuthkammern mit angeschlossenem Tubing System und Medienflaschen im Brutschrank

4. Licht- und Elektronenmikroskopie

4.1 Lichtmikroskopie

4.1.1 Paraffineinbettung

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Membranen in wässriger 4%iger Formaldehydlösung maximal für 24 Stunden fixiert. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Membranen entwässert und anschließend zur besseren Aufnahme des Paraffins in Xylol überführt. Die Proben kamen für mindestens vier Stunden in 60° C heißen Paraffins. Anschließend wurden die Membranen am Histocentre (Fa. Shandon, London, UK) senkrecht in Paraffin eingebettet.

Von allen Membranen wurden Schnittserien mit 5µm Dicke am Schlittenmikrotom (Reichert-Jung, Heidelberg) hergestellt.

4.1.2 Einbettung in Technovit 7100/8100

Die Membranteile wurden zunächst in wässriger 4%iger Formaldehydlösung über Nacht fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, sowie dann in eine Vorbereitungslösung Technovit 7100/8100 überführt. Hier verblieben die Proben für mindestens vier Stunden. Danach erfolgte die Einbettung in Technovit 7100/8100 (Fa. Kulzer, Friedrichsdorf). Nach zwei bzw. vier Stunden war der Kunststoff auspolymerisiert.

Auch hier wurden Schnittserien mit dem Schlittenmikrotom (Reichert-Jung, Heidelberg) mit 5µm Dicke hergestellt.

4.1.3 Histologische Übersichtsfärbungen

An den Paraffinschnitten wurde zunächst eine Übersichtsfärbung mit Hämalaun-Eosin nach Mayer (ROMEIS, 1989) durchgeführt. An Technovitschnitten 7100/8100 wurde die Schnellfärbung mit Methylenblau-Azur-II nach Richardson (ROMEIS, 1989) verwendet.

4.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

4.2.1 Einbettung in AGAR 100

Die Membranen wurden zunächst für mindestens vier Stunden in Karnovsky's Lösung (Stammlösung: 2,5 % Glutaraldehyd, 3 % Paraformaldehyd, pH 7,4; vor Gebrauch 1:1 verdünnen) immersionsfixiert und anschließend mehrmals mit 0,1 molarem Cacodylatpuffer gespült. Die Nachfixierung und Kontrastierung erfolgten in einer 1%igen cacodylatgepufferten Osmiumtetroxidlösung (Fa. Roth, Karlsruhe) über mindestens vier Stunden. Anschließend wurden die Membranen mehrmals in Cacodylatpuffer gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Als Intermedium wurde Propylenoxid (Fa. Merck, Darmstadt) verwendet. Anschließend wurde ein Propylenoxid/Agargemisch im Verhältnis 1:1 und am nächsten Tag reines Agar (Agar 100 Resin, Fa. Agar scientific, Stansted, UK) angewendet. Bei zunächst 45° C und später 50° C wurde der Kunststoff im Brutschrank auspolymerisiert.

4.2.2 Semidünnschnitte

Von in Agar 100 eingebetteten Membranproben 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 Ultradünnschnitte (Punkt 4.2.3).

4.2.3 Ultradünnschnitte und Kontrastierung

Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 50 bis 80 nm 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, UK) aufgezogen. Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylazetat und Bleizitrat kontrastiert.

4.2.4 Auswertung und Dokumentation

Alle Untersuchungen, Auswertungen und fotografischen Dokumentationen der Ultradünnschnitte erfolgten am Transmissionselektronenmikroskop EM 10 (Fa. Zeiss, Oberkochen).

4.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Um einen strukturellen Beweis der Trennung von Dermis und Epidermis durch das Dispaseverfahren zu erhalten, wurde eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung vorgenommen. Hierzu wurde jeweils ein Teil Dermis und ein Teil Epidermis nach der Trennung durch Dispase in wässriger 4%iger Formaldehydlösung für 24 Stunden fixiert. Anschließend wurde die Probe mehrmals mit Aqua bidest. gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend mit Hexamethyldisilazanlösung (HMDS - Fa. Roth, Karlsruhe) getrocknet. Im Anschluss daran wurden die Proben mit dem elektrisch leitfähigen Klebstoff Leit C nach Göcke (Fa. Plano, Marburg) auf Objekteller aus Aluminium geklebt und dann zwei Minuten lang in einem Kathodenzerstäubungsgerät (Fa. Polaron,

Watford, UK) mit Gold besputtert, so dass eine Goldschichtdicke von ca. 50µm entstand. Danach wurden die Proben im Rasterelektronenmikroskop Nanolab 2000 (Fa. Bausch & Lomb, Canada) untersucht und die Befunde als digitale Bilder dokumentiert.

5. Immunhistochemie

5.1 Verwendete Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller	Katalognummer
Mouse Anti Keratin	AE 1	Chemicon (Hampshire, UK)	MAB 1612
Mouse Anti Keratin	AE 3	Chemicon (Hampshire, UK)	MAB 1611
Mouse Anti-Pan Cadherin	CH-19	Sigma (Taufkirchen)	C 1821
Mouse Anti Vimentin	V 9	NeoMarkers (Freemont, USA)	MS-129-P0
Mouse Anti Human CK 19	CK 19	Dako (Hamburg)	M 0772

5.2 Protokolle der Antikörper

Alle Antikörper wurden an Paraffinschnitten angewendet. Als Negativkontrolle wurde auf jedem Objektträger mit jeweils drei Schnitten immer eine Pufferkontrolle gemacht und der Antikörper an den verbleibenden zwei Schnitten angewendet. Als Positivkontrollen dienten bei allen Antikörpern Menschenhaut und ein histologischer Schnitt der Tierart gegen den der Antikörper gerichtet war.

	AE1	AE3	CK 19	Vimentin	Pan-Cadherin
1. Entparaffinieren mit Xylol über eine absteigende Alkoholreihe	X	X	X	X	X
2. Spülen mit Aqua destillata	X	X	X	X	X
3. Vorbehandlung mit Proteinase K/ Kochen in Aqua dest.	10 min.	10 min.	10 min.	10min./ 5 min.	10 min.
4. Spülen in Tris-Puffer	10 min.	10 min.	10 min.	-	10 min.
5. Spülen in PBS-Puffer	X	X	X	X	X
6. Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung	-	-	-	20 min.	-
7. Spülen in PBS	10 min.	10 min.	10 min	10 min	10 min
8. Proteinblock	30 min.	30 min.	30 min	30 min	30 min
9. Primärantikörper	1:200 in PBS über Nacht	1:200 in PBS über Nacht	1:200 in PBS über Nacht	1:400 in PBS über Nacht	1:50 in PBS über Nacht
10. Kontrollserum	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
11. Spülen in PBS	10 min.	10 min.	10 min	10 min.	10 min
12. Sekundärantikörper	30 min.	30 min.	30 min	30 min.	30 min
13. Spülen in PBS	10 min.	10 min.	10 min	10 min	10 min
14. Detektionssystem	30 min.	30 min.	30 min	30 min.	30 min
15. Spülen in PBS	10 min.	10 min.	10 min	10 min.	10 min
16. Chromogen (DAB)	5-20 min.	5-20 min	5-20 min	5-20 min	5-20 min
17. Spülen mit Leitungswasser	10 min	10 min	10 min.	10 min	10 min
18. Gegenfärbung mit Hämalaun	10 sek.	10 sek.	10 sek.	10 sek.	10 sek.
19. Absteigende Alkoholreihe	X	X	X	X	X
20. Xylol	X	X	X	X	X
21. Eindecken mit Eukitt	X	X	X	X	X

5.2.1 Erläuterungen zum Protokoll der immunhistochemischen Untersuchungen und Angabe der Bezugsquellen

- zu 3.** Proteinase K (Sigma, Taufkirchen) 2,5 µl verdünnt mit 1000 µl Tris-Puffer, pH 7,6
- zu 5., 7., 11., 13., 15.** PBS-Puffer nach Dulbecco Kat. Nr. 47302 (Serva, Heidelberg)
- zu 6.** Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung (100 ml Methanol+ 3 ml H₂O₂)
- zu 8.** Protein-Block X0909 (Dako Cytomation, Carpinteria, USA)
- zu 9.** Angaben zu den Primärantikörpern (siehe oben)
- zu 10.** Kontrollserum: Normalserum der Maus, negative control IgG1 Kat. Nr. X0931 (Dako Cytomation, Carpinteria, USA) in einer Verdünnung von 1:200
- zu 12.** Sekundärantikörper ShpXMs (Fab`2) Ig Biotin konjugiert, Kat. Nr. AQ300B, (Fa. Chemicon, Kalifornien, USA)
- zu 14.** Detektionssystem StreptABComplex / HRP K0377 (Dako Cytomation, Carpinteria, USA) bei Raumtemperatur
- zu 16.** POD-Nachweis mit 3,3`-Diaminobenzidine Tablets D-5905 (Sigma, Taufkirchen) bei Raumtemperatur im Dunkeln
- zu 18.** Mayers Hämalaun

6. Anwendung und Auswertung von verschiedenen Faktoren

Die Untersuchungen aller verwendeten Faktoren wurden mit Hilfe der Kulturcontainer nach Minuth (s. Punkt 3.1.2) durchgeführt. Dabei wurden bei jedem Faktor zwei Durchläufe über sechs Tage durchgeführt. Bei jedem Versuchsdurchlauf wurde ein Kulturcontainer mit dem jeweiligen Faktor im Medium perfundiert und der andere als Kontrolle nur mit Medium.

6.1 Anzuchtung der Zellen

Für alle Versuchsdurchläufe wurde die eigene isolierte Zelllinie „Frodo“ in der vierten Passage der Subkultivierung verwendet. Die aus dieser Zelllinie stammenden Zellen wurden für jeden Versuchsdurchlauf zunächst auf 14 Glasplättchen über zwei Tage angezüchtet. Von zwei Glasplättchen wurden nach diesen zwei Tagen die Zellen mit Trypsin (Biochrom AG, Berlin) abtrypsiniert und anschließend ihre Zellzahl, wie unter Punkt 6.2 beschrieben, bestimmt. Diese Zellzahl diente bei jedem Versuchsdurchlauf als Ausgangswert. Die übrigen 12 Glasplättchen wurden in Minusheets (s. Punkt 3.1.2.1) eingespannt und auf zwei Kulturcontainer verteilt. Die Kulturcontainer wurden an ein Schlauchsystem (s. Punkt 3.2) angeschlossen. Ein Kulturcontainer wurde mit einem Medium mit dem jeweiligen Faktor, der andere nur mit Medium perfundiert. Nach jeweils 24 Stunden wurde aus jedem Kulturcontainer ein Glasplättchen entnommen und die Zellzahl bestimmt.

6.2 Zellzählungen

Die Zellzählungen erfolgten mit Hilfe eines Hämozytometers nach Neubauer (Fa. GLW, Würzburg). Die Zellen wurden mit genau 1ml Trypsin abtrypsiniert. Die entstandene Zellsuspension wurde in die Zählkammer überführt und die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt und damit die Zellzahl pro ml bestimmt.

Hierfür wurden folgende Formeln verwendet:

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

(n = Mittelwert der Zellzahl in 4 ausgezählten Quadraten)

Gesamtzellzahl einer Suspension = Zellzahl/ml x Volumen der Zellsuspension

Mit Hilfe dieser beiden Formeln wurde die Zellzahl pro ml der Zellsuspension errechnet. Um ein möglichst genaues Ergebnis zu erhalten, wurde jede Zellsuspension viermal ausgezählt und anschließend der Mittelwert errechnet.

6.3 Verwendete Faktoren

Faktor	Hersteller	Spezifikation	Produktnummer
KGF	Biomol GmbH, Hamburg	Recombinant human keratinocyte growth factor	51566
GM-CSF	Biomol GmbH, Hamburg	Recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor	50449
TNF- α	Biomol GmbH, Hamburg	Recombinant murine tumor necrosis factor-alpha	52624
IL-1 α	Biomol GmbH, Hamburg	Recombinant human Interleukin-1 alpha	50430