

2. Material und Methoden

2.1 Tierhaltung, Behandlung, Probengewinnung

2.1.1 Tierhaltung

Für die Versuche wurden männliche juvenile Marmosets (*Callithrix jacchus*) eingesetzt, die im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes (07DIX22) für diese Experimente verwendet wurden (Genehmigungsnummer G0016/96). Die Tiere stammen aus der Kolonie des Instituts für klinische Pharmakologie und Toxikologie der FU Berlin. Das mittlere Alter betrug 59 Wochen beim ersten Teil des Versuchs und 41 Wochen beim zweiten. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug zwölf Stunden (Kunstlichtphase von 7:00 bis 19:00 Uhr). Das Futter bestand aus einer speziell hergestellten Basisnahrung, welche Getreide- und Milchprodukte sowie Bananen, Möhrensaft und Mineralstoffe enthielt. Dazu erhielten die Tiere Wasser und Altromin-Pelletfutter ad libitum und zusätzlich frisches Obst und Gemüse und gekochtes Ei.

2.1.2 Behandlung

Die Tiere wurden mit einer einmaligen Dosis von 1, 10 oder 100 ng/kg TCDD (Reinheit 99,4%, Lot-Nr. 93/TCDD/010, Ökometric GmbH, Bayreuth) in einem Gemisch mit zwei Volumenanteilen Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt) und einem Volumenanteil Toluol (Merck, Darmstadt) behandelt. Die Konzentrationen betrugen 0,01 ng/ μ l, 0,1 ng/ μ l und 1 ng/ μ l, so dass die Versuchstiere 100 μ l/kg KG TCDD-Lösung oder die Vehikelkontrolle (DMSO und Toluol 2:1) erhielten. Die Injektion erfolgte nach Rasur subkutan in der rechten Axillarlinie unterhalb des Rippenbogens.

2.1.3 Probengewinnung

Nach zwei bzw. vier Wochen (siehe Tabelle 3 und 4) wurden die Tiere mit einer einmaligen intraperitonealen Injektion von 100 mg Thiopental (TRAPANAL, Byk Gulden, Konstanz) getötet, sezirt und verschiedene Organe entnommen. Für die hier beschriebenen Versuche sind nur die Thymi von Relevanz, die übrigen Organe wurden für andere Versuche verwendet.

Die Thymi (anteilig) der 100 ng/kg Behandlungsgruppe und die zugehörigen Kontrollen wurden für die Immunhistochemie in flüssiges Tissue-Freezing-Medium (Leica, Nussloch) eingebettet, dann in flüssigen Stickstoff eingetaucht und später bei minus 80° Celsius eingefroren.

Die Thymi (anteilig) der 1 ng/kg bzw. 10 ng/kg Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe wurden nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend unbehandelt in Eppendorf-Reaktionsgefäße für den Immunoblot bei minus 80 ° Celsius eingefroren.

Gruppe	A	B	C
TCDD-Dosis	Vehikel	100 ng/kg	100 ng/kg
Beobachtung [Wo]	4	2	4
n	4	3	3
Altersverteilung [Wo]*	51, 54, 59, 81	51, 52, 68	54, 60, 67
mittleres Alter [Wo]*	59	57	60

* bei Versuchsbeginn

Tabelle 3:

Behandlungsschema der 1. Versuchsreihe

Gruppe	A2	B2	C2
TCDD-Dosis	Vehikel	1 ng/kg	10 ng/kg
Beobachtung [Wo]	4 Wochen	4 Wochen	4 Wochen
n	3	3	3
Altersverteilung [Wo]*	38, 38, 41	38, 40, 47	39, 39, 47
mittleres Alter [Wo]*	39	42	42

*bei Versuchsbeginn

Tabelle 4:

Behandlungsschema der 2. Versuchsreihe

2.2 Gefrierschnitte, Immunfluoreszenz, Fotos, Auswertung

2.2.1 Anfertigung von Kryostatschnitten

Die in Tissue-Freezing-Medium eingebetteten Stücke der Thymi, wurden in einem Kryostaten (Jung Frigocut 2800 N, Leica Nussloch, Bensheim, Deutschland) bei minus 25° Celcius mit einer Schnittdicke von 5 µm (Messer: C-Schliff, Reichert-Jung, Heidelberg) geschnitten und auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden anschließend in dafür vorgesehenen Plastikboxen bei minus 18° Celsius aufbewahrt.

2.2.2. Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die Immunmarkierung verwendet:

Antikörper gegen Proteine der extrazellulären Matrix:

- anti-Collagen I PAB¹, Ms anti Bov, Chemicon, Temecula, CA, USA
 - anit-Collagen IV PAB¹, Rbt anti Ms, Chemicon, Temecula, CA, USA
 - anti-Fibronectin PAB¹, Rbt anti Ms, Chemicon, Temecula, CA, USA
 - anti-Laminin B1 MAB², Rt anti Hum/Ms, Chemicon, Temecula, CA, USA
- (¹= polyklonaler Antkörper; ²=monoklonaler Antkörper)

sekundäre, FITC-markierte Antikörper:

- Rbt anti Rt IgG, Chemicon, Temecula, CA, USA
- Rbt anti Ms IgG, Chemicon, Temecula, CA, USA
- Gt anti Rbt IgG, Chemicon, Temecula, CA, USA

2.2.3 Immunfluoreszenz

2.2.3.1 Allgemeines

Zur Markierung der antigenen Strukturen wurde das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz angewendet. Dabei wurde ein primärer Antikörper verwendet, der ein Epitop (monoklonal) oder mehrere (polyklonal) des zu markierenden Proteins erkennt und dort bindet. Der sekundäre Antikörper bindet ein Epitop des primären und trägt ein fluoreszierendes Molekül (Fluorescein-Isothiocyanat, FITC), welches unter Anregung mit blauem Licht sichtbar gemacht werden kann.

2.2.3.2 Verfahren

Die Objektträger mit den Gefrierschnitten wurden zuerst in 0,5%iger BSA-Lösung (bovines Serumalbumin, PAA Laboratories, Linz, Österreich) für 10 Minuten in einer Färbekammer unter langsamem Rühren auf dem Magnetrührer inkubiert. Danach wurden die Objektträger kurz in PBS-Lösung (phosphate buffered saline, Biochrom, Berlin) getaucht und anschließend 2-mal 10 Minuten in PBS-Lösung unter Rühren gespült. Zum Trocknen wurden die Schnitte für ca. 5 Minuten auf Zellulose gelegt und die verbliebenen Wassertropfen vorsichtig mit Filterpapier entfernt. Nun wurden pro Schnitt jeweils 20 µl des primären Antikörpers aufgetragen. Auf jedem Objektträger blieb ein Schnitt als spätere "Negativkontrolle" ohne primären Antikörper um unspezifisch fluoreszierende Bestandteile des Präparats zu erfassen. Die Antikörper wurden eine Stunde lang in einer dunklen feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte wieder ein kurzes Abspülen mit PBS, gefolgt von zweimaligem Spülen in PBS wie oben beschrieben. Die Objektträger wurden wieder kurz getrocknet und im Anschluss daran auf jeden Schnitt 20 µl des entsprechenden sekundären Antikörpers pipettiert (Verdünnung 1:20 in PBS). Nun wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Dann folgte wieder ein wie oben beschriebener Spülschritt. Die Schnitte wurden anschließend nicht getrocknet, um ein Auskristallisieren des sekundären Antikörpers zu verhindern. Auf jeden Schnitt wurde nun mit einer 1 ml Spritze ein Tropfen 0,1%ige p-Phenylendiamin-Lösung (Sigma, St. Louis, MO, USA), gelöst in Glycerin (Merck, Darmstadt) und PBS, 9:1, verbracht und danach die Objekte mit einem Deckgläschen auf dem Objektträger versiegelt. Das p-Phenylendiamin in der Lösung stabilisiert den fluoreszierenden Farbstoff FITC und verhindert so ein rasches Verblässen der Fluoreszenz. Die Objektträger wurden bis zum Fotografieren der

Schnitte lichtgeschützt gehalten und im Kühlschrank verwahrt. So war die Fluoreszenz für bis zu 2 Tage konservierbar.

2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie und -fotografie

Die Fluoreszenz der gefärbten Präparate wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiophot (Zeiss, Oberkochen) unter Auflicht-Anregung mit blauem Licht (Anregungsfilter 450-490 nm, Zeiss, Oberkochen) sichtbar gemacht und befundet. Zum Fotografieren wurde ein 10fach Objektiv (Plan-Neofluar, Zeiss, Oberkochen) und ein 20fach Objektiv (Fluar, Zeiss, Oberkochen) verwendet. Jedes Objekt wurde durchschnittlich 3-mal an repräsentativen Stellen fotografiert. Die Aufnahmen wurden mit der im Mikroskop integrierten Kamera (Axio Film-Kassette 35 mm, Eigenvergrößerung 2,5fach, Film: Ektachrome 64T, Kodak, Stuttgart) angefertigt.

2.2.5 Bildbearbeitung und densitometrische Auswertung

Die Fotos wurden als Diapositive entwickelt und anschließend von Hand gerahmt. Danach wurden die Dias gescannt (Epson Perfection 1640 SU, Seiko Epson Corp., Hirooka, Japan) und zur späteren digitalen Auswertung gespeichert (als Bitmap). Die densitometrische Auswertung der Bilder im Sinne einer orientierenden, semiquantitativen Analyse erfolgte mit ScionImage Beta 4.0.2 (Scion Coporation, Frederick, MD, USA). Die Farbbilder wurden in binäre Bilder umgewandelt und so die angefärbte Fläche in Relation zur Gesamtfläche ermittelt. Aus diesen Daten wurde anschließend für jedes Objekt der Mittelwert berechnet und in ein Diagramm eingetragen. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit GraphPadPrism 3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2.3 Probenaufbereitung, Gel-Elektrophorese, Western-Blot

2.3.1 Allgemeines

Um semiquantitative Aussagen von bestimmten Proteinmengen machen zu können wurde das Verfahren der Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Blot angewendet. Dabei wurde eine definierte Proteinmenge aus homogenisiertem Gewebe auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Proteine der Lösung wurden vorher komplett negativ geladen (mittels SDS), so dass sie im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandern. Im Gel wird nun eine Spannung angelegt und die Proteine trennen sich im Gel nach ihrem Molekulargewicht auf (grosse Proteine "wandern" im Gel langsamer als kleinere). Anschließend werden die aufgetrennten Proteine mittels eines gerichteten Stromflusses aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Western-Blot). Im nächsten Schritt werden mittels indirekter Immunmarkierung die zu untersuchenden Proteine markiert. Dabei ist der sekundäre Antikörper mit einem Enzym gekoppelt (alkalische Phosphatase), welches mit einer zugesetzten Entwicklerlösung reagiert und so das Protein als eine Bande auf dem Gel sichtbar macht.

2.3.2 Verwendete Chemikalien

- 1M tris-Puffer pH 6,8*
 - 1 l H₂O-bidest
 - 157,6 g trizma-HCl (Sigma, St. Louis, MO, USA)

- 1M tris-Puffer pH 8,8*
 - 1 l H₂O-bidest
 - 121,1 g trizma-base (Sigma, St. Louis, MO, USA)

- tris-Puffer pH 9,5* (10fach konzentriert)
 - 1 l H₂O-bidest
 - 121,1 g trizma-base (s.o.)
 - 101,7 g MgCl₂ (Sigma, St. Louis, MO, USA)
 - 58,5 g NaCl (Merck, Darmstadt)

*falls nötig wurde der pH-Wert mittels HCl/ NaOH (Riedel-de Haen, Seelze) korrigiert

- Transfer-Puffer
 - 950 ml H₂O-dest
 - 2,5 g trizma-base (s.o.)
 - 12,25 g Glyzin (Merck, Darmstadt)
 - 50 ml Methanol (Riedel-de Haen, Seelze)

- Elektrophorese-Puffer (10fach konzentriert)
 - 1 l H₂O-dest
 - 30 g trizma-base (s.o.)
 - 144,2 g Glyzin (s.o.)
 - 10 g SDS (BioRad, Hercules, CA, USA)

- Proben-Puffer
 - 35 ml Glycerin (Merck, Darmstadt)
 - 10 g SDS (s.o.)
 - 25 ml Ethanol (Merck, Darmstadt)
 - 25 mg Bromphenol-Blau (Sigma, St. Louis, MO, USA)
 - 16,7 ml tris-Puffer pH 6,8 (s.o.)

- Blockierungs-Puffer
 - 1 l PBS (Biochrom, Berlin)
 - 1 ml Tween 20 (BioRad, Hercules, CA, USA)
 - 50 g Magermilchpulver (Fluka, Buchs, Schweiz)

- Lyse-Puffer
 - 1 ml Triton X (BioRad, Hercules, CA, USA)
 - 1 g Na-deoxycholat (Merck, Darmstadt)
 - 0,5 ml SDS (20%) (s.o.)
 - 875 mg NaCl (s.o.)
 - 5 ml 1 M trizma-HCl-Lösung (s.o.)

- SDS (Natriumdodecylsulfat) 20%
 - 25 ml H₂O-bidest
 - 5 g SDS (s.o.)

- APS (Amoniumpersulfat) 5%
 - 1 ml H₂O-bidest
 - 50 mg APS (BioRad, Hercules, CA, USA)
- Proteaseinhibitoren
 - PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) 1 mg/ml Methanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)
 - Pepstatin 1 mg/ml Methanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- TEMED (BioRad, Hercules, CA, USA)
- 2-Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Acrylamid (30%) (BioRad, Hercules, CA, USA)
- Entwickler (Pierce, Rockford, Irland)

Bestandteil	Laufgelgröße		
	5%	7,5%	4%*
Acrylamid (30%) [ml]	1,65	2,5	0,67
tris-Puffer (pH 8,8) [ml]	2,5	2,5	1,25 (pH 6,8)
SDS (20%) [μ l]	50	50	25
H ₂ O-bidest [ml]	5,7	4,85	3
APS (5%) [μ l]	100	100	50
TEMED [μ l]	10	10	10

* Sammelgel

Tabelle 5:
Herstellungsschema für die Polyacrylamid-Gele

2.3.3 Probenaufbereitung

Um aus den Organen die lösliche Proteinfraction zu extrahieren, wurden die Teile der Organe (ca. 20 mg) in Eppendorff-Reaktionsgefäße verbracht und mit 1 ml Lyse-Puffer, 10 µl PMSF und 5 µl Pepstatin versetzt. Die Proben wurden eine Stunde bei 8° Celsius unter mehrmaligem Schütteln inkubiert und danach unmittelbar bei 8° Celsius homogenisiert (ca. 5 min) bis nur noch maximal einige Flocken (besser gar keine) zu sehen waren. Dann wurden die Proben bei 4° Celsius für 30 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert, um die nicht gelösten Anteile zu entfernen. Der Überstand im Eppendorffgefäß wurde nach Zentrifugation abgenommen, das Pellet verworfen. 30 µl des Überstandes wurden für die Gesamtproteinbestimmung (s.u.) verwendet, der Rest wurde für je 100 µl Probe mit 25 µl Proben-Puffer und 6,25 µl 2-Mercaptoethanol versetzt (der Proben-Puffer enthielt einen blauen Farbstoff, damit die Proben während des Pipettierens und beim "Laufen" im Gel gut sichtbar waren). Jetzt wurden die Proben für 10 Minuten unter dem Abzug bei 95° Celsius in einem Heizblock unter Rütteln gekocht. Um den Dampf aus den Reaktionsgefäßen entweichen lassen zu können, wurden in die Deckel mit einer Kanüle Löcher gestochen. Nach dem Kochen wurden die Proben in neue Gefäße pipettiert und bei minus 20° Celsius bis zur weiteren Verwertung eingefroren.

2.3.4 Gesamtproteinbestimmung, Konzentrationsangleichung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der BCA-Methode. Verwendet wurde ein BCA-Assay-Kit (Pierce, Rockford, Irland). Dazu wurden je 10 µl Probe, 1 ml Reagenz A und 20 µl Reagenz B in ein Eppendorffgefäß pipettiert. Der Vorgang sollte zügig ablaufen, um möglichst geringe Unterschiede der Reaktionszeiten zu erzielen. Deshalb wurden erst alle zu bestimmenden Proben auf die Eppendorffgefäße verteilt, dann die komplett benötigte Menge der Reagenzen A und B in einem Becherglas gemischt, um anschließend jeweils 1 ml der Lösung zu den Proben zu pipettieren. Als Standard wurden 10 µl BSA (2 mg/ml, Pierce, Rockford, Irland) verwendet, der Leerwert entsprach dem Gemisch als Reagenz A und B. Nun wurden die Proben (mit Standard und Leerwert) auf dem Rüttler für 30 Minuten bei 56° Celsius inkubiert. Die Reaktion wurde dann über 10 Minuten bei 8° Celsius gestoppt. Die Proben wurden jetzt, nachdem das Photometer mit dem Leerwert geeicht worden war, bei 562 nm gemessen. Danach wurden die Proteinkonzentrationen der Proben nach folgender Formel errechnet:

$$2 \cdot \text{Extinktion(Probe)} / \text{Extinktion(Standard)} = \text{Gesamtprotein [mg/ml]}.$$

Da die Proben alle etwas unterschiedliche Proteinkonzentrationen aufwiesen, wurden alle nach der unten aufgeführten Formel auf eine gemeinsame Konzentration eingestellt, um bei der Elektrophorese gleiche Probenvolumina auftragen zu können. Im Anschluss daran wurden die Proben wieder bei minus 20 ° Celsius eingefroren.

Formel:

$$[V_{\text{Ausgang}} * (K_{\text{Start}}/K_{\text{End}})] - V_{\text{Ausgang}} = V_{\text{zur Angleichung}}$$

(die Angleichung erfolgte mit Lyse-Puffer!)

2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Elektrophorese wurde das MiniProtean III System (BioRad, Hercules, CA, USA) verwendet. Der Aufbau und die Verwendung der Apparatur erfolgte nach der Bedienungsanleitung von BioRad. Die Herstellung der Gel-Lösung erfolgte wie in Tabelle 5 beschrieben, beim Sammelgel wurden TEMED und APS-Lösung zuerst nicht hinzupipettiert, die Lösung aber zur späteren Verwendung verwahrt. (Der Vorgang, nachdem TEMED und APS-Lösung zum Laufgel pipettiert worden sind, musste zügig ablaufen, da die beiden Stoffe als Polymerisationsbeschleuniger wirken und das Gel zunehmend fester wurde!) Die Lösung für das Laufgel wurde nach gutem Durchmischen mit einer Pasteur-Pipette bis ca. 1,5 cm unter den Rand der vorbereiteten Kammer (Stärke: 0,75 mm) eingefüllt. Die letzten 1,5 cm wurden mit aqua dest. aufgefüllt. Für 20 Minuten polymerisierte das Gel, danach wurde das aqua dest. abgegossen und die Reste mit Filterpapier vorsichtig abgesaugt. Jetzt wurde die Sammelgel-Lösung mit TEMED und APS-Lösung gut vermischt und bis unter den Rand der Kammer pipettiert. Anschließend wurde ein 10 Taschen (5*10 mm) umfassender Gelkamm eingesetzt. Das Gel polymerisierte dann für 40 Minuten, danach wurde der Kamm entfernt und das Gel nach Arbeitsanweisung in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit ca. 900 ml Elektrophorese-Puffer (9:1 mit aqua dest. verdünnt) gefüllt. In den ersten Slot wurden mit Hilfe einer Gelloader-Pipette 10 µl eines Markers (BioRad, Hercules, CA, USA) pipettiert. Der Marker bestand aus unterschiedlichen Proteinen (Myosin, Karboanhydrase, Lysozym, etc.) die zur Unterscheidung mit unterschiedlichen Farbstoffen gekoppelt waren, um später die Größe der immunmarkierten Proteine ungefähr einzuschätzen. In die übrigen Slots konnten die Proben pipettiert werden. Im allgemeinen betrug das

Probenvolumen 20 µl, die Proteinkonzentrationen lagen zwischen 0,5 und 1 mg/ml. Nach Auftragen der Proben wurde eine Spannung von 80 Volt für 15 Minuten angelegt um die Proben in ihren Slots zu "sammeln", danach wurde die Spannung auf 100 Volt für 75 Minuten erhöht. Nach abgelaufener Zeit wurde kontrolliert, ob die Proben bis zum Ende des Gels "gelaufen" waren. War dies der Fall, konnte mit dem Western-Blot begonnen werden, andernfalls musste unter Kontrolle wiederum eine Spannung von 100 Volt angelegt werden bis die Proben das Ende des Gels erreicht hatten.

2.3.6 Western-Blot

Für den Western-Blot in "wet-blot"-Technik wurde das Mini Trans-Blot System (BioRad, Hercules, CA, USA) verwendet. Das Gel wurde dafür zuerst in eine Wanne mit Transfer-Puffer eingelegt. Im Transfer-Puffer wurde dann eine Nitrocellulose-Membran (BioRad, Hercules, CA, USA) auf das Gel gelegt und dann zusammen mit 2 Filterpapieren und 2 Support-Pads in die Gelhalter-Kassette eingespannt. Die Kassette wurde dann in das Trans-Blot-Modul eingesetzt und in den mit Transfer-Puffer gefüllten Tank umgesetzt. Da das System sich aufgrund der hohen Stromstärke mit der Zeit stark erwärmte und der sich im Tank befindende Kühl-Akku nicht ausreichend war, wurde das gesamte System zusätzlich in eine mit Eis gefüllte Styropor-Box eingestellt. Die Transferzeit betrug je nach Größe des zu untersuchenden Proteins von 50 bis 60 Minuten bei 120 Volt. Abschließend wurde die Nitrocellulose-Membran aus der Gelhalter-Kassette entfernt und über Nacht in eine Wanne mit Blockierungs-Puffer eingelegt.

2.3.7 Immunmarkierung

2.3.7.1 Verwendete Antikörper

Antikörper gegen Proteine der extrazellulären Matrix:

- anti-Collagen I PAB¹, Ms anti Bov, Chemicon, Temecula, CA, USA
- anti-Collagen IV PAB¹, Rbt anti Ms, Chemicon, Temecula, CA, USA
- anti-Fibronectin PAB¹, Rbt anti Ms, Chemicon, Temecula, CA, USA
- anti-Laminin B1 MAB², Rt anti Hum/Ms, Chemicon, Temecula, CA, USA

Antikörper gegen Integrine:

- anti-alpha1-Integrin MAB², Ms anti Hu, Pharmingen, San Diego, USA
- anti-alpha5-Integrin MAB², Rbt anti Hum/Ms, Biomol, Hamburg
- anti-alpha6-Integrin MAB², Rbt anti Rt, Pharmingen, San Diego, USA
- anti-beta1-Integrin MAB², Ms anti Hu, Pharmingen, San Diego, USA

sonstige:

- anti-TGF-beta1 MAB², Ms anti Hu, Biomol, Hamburg
- anti-TGF-beta-Rezeptor TypII PAB¹, Rbt anti Hu, Biomol, Hamburg
- anti-beta-Actin MAB², Ms anti Hu, Sigma, Saint Louis, USA

(¹= polyklonaler Antikörper; ²=monoklonaler Antikörper)

2.3.7.2 Verfahren

Die Nitrocellulosemembran wurde nun in eine passende Petrischale überführt und mit dem primären Antikörper, der 1:1000 (10 µl Antikörper plus 10 ml Blockierungs-Puffer) verdünnt worden war, übergossen, so dass die Membran gerade bedeckt war. Zum Inkubieren des primären Antikörpers wurde die Petrischale abgedeckt und zum gleichmäßigen Verteilen des Antikörpers bei 300 U/min auf einem Schüttler geschwenkt. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde der primäre Antikörper mit einer Pipette abgezogen und anschließend bei 8° Celsius verwahrt. So war der Antikörper für ca. 7 Tage haltbar und konnte mehrmals verwendet werden. Nun wurde die Membran 3-mal für 10 Minuten mit jeweils 15 ml Blockierungs-Puffer gespült. Danach wurde der sekundäre Antikörper 1:4000 (5 µl Antikörper plus 20 ml Blockierungs-Puffer) verdünnt, auf die Membran gegeben und wie oben beschrieben für 45 Minuten inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde dann abgezogen und verworfen. Im Anschluss wurde 1-mal für 5 Minuten mit Blockierungs-Puffer gespült und darauf folgend 3-mal für 10 Minuten mit Tris-Puffer pH 9,5. Jetzt wurde die Entwicklerlösung 1:2,5 (10 ml Entwickler plus 15 ml Tris-Puffer pH 9,5) verdünnt und auf die Membran appliziert. Da der Entwickler lichtempfindlich reagiert, wurden die Petrischalen lichtundurchlässig abgedeckt und so auf den Rüttler gestellt. Nun wurden die Membranen beobachtet bis die sich entwickelnden Banden die gewünschte Intensität erreicht hatten. Abschließend wurde der Entwickler verworfen und die Membranen zum Trocknen auf ein Stück Filterpapier gelegt und lichtgeschützt verwahrt.

2.3.8 Densitometrische Auswertung

Die fertigen Blots wurden zunächst gescannt (Epson Perfection 1640 SU, Seiko Epson Corp., Hirooka, Japan) und falls nötig unter zur Hilfenahme des zum Scanner gehörenden Bildbearbeitungsprogramms aufbereitet. Die gescannten Blots wurden dann densitometrisch ausgewertet (Software: LabImage, Kapelan, Halle (Saale)) und mit dem Programm GraphPadPrism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) grafisch dargestellt.