

3 Material und Methoden

3.1 HT-29/B6-Zellen

Intestinale Epithelzellen des Klons B6 der Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 wurden in unserem Labor entwickelt (Kreusel et al., 1991). HT-29/B6-Zellen wachsen zu einem hochdifferenzierten und polarisierten Monolayer heran und bilden einen apikalen Bürstensaum sowie interzelluläre Schlussleisten (Tight junction). Es wurden weitere typische Eigenschaften von Kolonepithel, wie die Bildung von Mukus und die Sekretion von Chlorid, nachgewiesen. Das Zellmodell HT-29/B6 entspricht somit in seinen Eigenschaften Kolon-Krypten-Zellen und ist für die Untersuchung von Zytokineffekten auf Kolonepithel geeignet (Bendfeldt, 2000; Gitter et al., 2000b, Schmitz, 2002 #738).

3.2 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden zunächst in Kulturflaschen (25 cm², Nunc, Karlsruhe, Deutschland) mit einem Zellkulturmedium (RPMI 1640 mit 2 % stabilisiertem N-acetyl-L-Alanin-L-Glutamin und 2,0 g/l NaHCO₃, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) mit 10 % fetalem Kälberserum, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom) bei 37°C und einer Atmosphäre von 95 % Luft und 5 % CO₂ kultiviert.

Das Kulturmedium wurde in regelmäßigen Abständen dreimal pro Woche erneuert, eine Trypsinierung mit anschließender Neuaussaat erfolgte alle 10 Tage.

Für meine Experimente wurden HT-29/B6-Zellen der Passagen 29 bis 38 mit einer Zelldichte von $7 \cdot 10^5$ Zellen/cm² auf Millicel-PCF-Zellkulturfiltern (Millipore, Eschborn, Deutschland), mit einer Fläche von 0,6 cm² und einem Porendurchmesser von 3 µm, ausgesät. Diese Zellfilter zeichneten sich durch ihre Permeabilität für das Kulturmedium und Zytokine, gute Adhäsion der Zellen, als auch durch genügende Transparenz (Experimente unter lichtmikroskopischer Kontrolle) aus.

Jeweils 3 Zellfilter wurden anschließend in herkömmliche Kunststoffkulturschalen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit einem Durchmesser von 6cm verbracht, in welchen sie 6 bzw. 7 Tage bis zur Ausbildung eines Monolayers kultiviert wurden. Sowohl das Kulturmedium der apikalen Seite (500 µl pro Zellkulturfilter) als auch das der basolateralen Seite (10 ml) wurde alle zwei Tage erneuert.

Um eine Aussage über die Barrierefunktion und die Vitalität der Monolayer zu erhalten, wurde am 7. bzw. 8. Tag nach Aussaat der transepitheliale Widerstand

(Abschnitt 3.6) der Zellen gemessen. Hiernach erfolgte die Zugabe spezieller Zytokine (Abschnitt 3.3) in das Kulturmedium der basolateralen Seite. Die Zellen wurden weitere 24 bzw. 48 Stunden im Brutschrank inkubiert, bevor sie den Untersuchungen zugeführt wurden.

3.3 Zytokine

In vorangegangenen wissenschaftlichen Arbeiten wurden spezielle Zytokine, die in vitro bei einer HIV-Infektion von mononukleären Zellen detektiert wurden, quantifiziert und ihre Wirkung auf die epitheliale Barriere untersucht (Schmitz et al., 2002). Dieses spezielle Zytokinmuster war Gegenstand meiner Experimente. Des Weiteren wurden einzelne Zytokine und Wachstumsfaktoren als Positivkontrolle genutzt. Im Folgenden werden die jeweiligen Zytokinkonzentrationen detailliert aufgeführt.

Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)

HT-29/B6-Zellen wurden mit humanem rekombinantem EGF (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) in einer Konzentration von $1,24 \cdot 10^3$ Units/ml auf der basolateralen Seite für 24 Stunden vorinkubiert.

Transformierender Wachstumsfaktor-beta1 (TGF- β 1)

Rekombinanter humaner transformierender Wachstumsfaktor-beta1 (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) wurde in einer Konzentration von $0,4 \cdot 10^2$ Units/ml dem basolateralen Kompartiment des Monolayers für 24 Stunden zugegeben.

Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)

Rekombinantes humanes TNF- α (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) wurde mit einer Konzentration von $3 \cdot 10^2$ Units/ml bzw. 10^4 Units/ml für 24 Stunden in das Kulturmedium der basolateralen Seite appliziert.

Interleukin-1beta (IL-1 β)

Die Endkonzentration des humanen IL-1 β (Biotrend, Köln, Deutschland) betrug im basolateralen Kompartiment $1,5 \cdot 10^2$ Units/ml. Die Inkubationsdauer der HT-29/B6-Zellen betrug auch hier 24 Stunden.

Interferon-alpha (IFN-a)

Rekombinantes humanes IFN- α (PeproTech EC Ltd, London, England) wurde in einer Konzentration von 75 Units/ml für 24 Stunden von basolateral verwendet.

Interferon-gamma (IFN-g)

Die Endkonzentration von rekombinantem humanem IFN- γ (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) betrug im basolateralen Kulturmedium 6 Units/ml für 24 Stunden.

Interleukin-13 (IL-13)

Zur 48-stündigen Vorinkubation wurde rekombinantes humanes IL -13 (R&D systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) in einer Konzentration von 10 ng/ml verwendet, welches in das Kulturmedium der basolateralen Seite der Monolayer appliziert wurde.

3.4 Elektrolytlösung

Alle Experimente im Versuchsstand wurden unter Verwendung einer Standardlösung (Schulzke et al., 1986), auch als Badlösung bezeichnet, durchgeführt.

Sie setzte sich aus folgenden Elektrolyten und Substraten zusammen:

Elektrolytkonzentrationen der Badlösung (in mmol/l):

Na⁺	140,0
Cl⁻	123,8
K⁺	5,4
Ca²⁺	1,2
Mg²⁺	1,2
HPO₄²⁻	2,4
H₂PO₄⁻	0,6
HCO₃⁻	21,0

Die Auswahl der Substrate erfolgte nach Windmüller & Späth (1978) (in mmol/l):

D(+)-Glucose	10
b-OH-Butyrat	0,5
Glutamin	2,5
D(+)-Mannose	10,0

Nach Begasung mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) betrug der pH-Wert 7,4 bei 37°C. Die Osmolarität lag bei 290 mosmol/kg.

Um eine Überwucherung mit Bakterien zu vermeiden, wurde der Badlösung 50 mg/l Piperacillin (Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland) und 4,43 mg/l Imipenem und 4,43 mg/l Cilastatin (Zienam 500, MSD GmbH, Haar, Deutschland) zugegeben.

3.5 Versuchsablauf

Die Versuche dieser Arbeit wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Schritt 1

Zunächst wurden HT-29/B6-Zellen bis zur Ausbildung eines Monolayers kultiviert. Am 7. bzw. 8. Tag nach Aussaat wurden dem Kulturmedium Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren zugegeben und damit für 24 bzw. 48 Stunden vorinkubiert.

Schritt 2

Nach Einspannen der Epithelfilter in den Versuchsstand wurde, mittels einer Mikroelektrode, ein Zellschaden definierter Größe gesetzt.

Schritt 3

Nach einer 2-stündigen Inkubation bzw. sofort nach Defektsetzung wurden die Monolayer fixiert und gegen Tight junction-Proteine angefärbt, um den Zelldefekt besser darstellen zu können.

Schritt 4

Die Epithelfilter wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie bzw. konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie fotografiert und der Zelldefekt wurde vermessen.

3.6 Vitalitätskontrolle

Zur Vitalitätskontrolle der Zellen wurde am Tage der Zytokinzugabe, und ein zweites Mal unmittelbar vor Versuchsbeginn, der transepitheliale Widerstand der konfluenten Monolayer bestimmt. Die Messung erfolgte in den Kulturschalen mit Hilfe von zwei fixierten Elektrodenpaaren (STX-2, World Precision Instruments, USA), die mit einem Widerstandsmessgerät (D. Sorgenfrei, Inst. für Klinische Physiologie, UKBF, Berlin) verbunden waren. Um weitgehend einheitliche Versuchsbedingungen herzustellen, gingen nur die Monolayer in die Experimente ein, die einen transepithelialen Widerstand von mehr als 300 Ω · cm² aufwiesen.

3.7 Versuchsaufbau

Um genau definierte Epitheldefekte zu erzeugen, wurde ein spezieller Versuchstand verwendet, der auf dem Prinzip eines Conductance scanning-Messstandes basiert (Gitter et al., 1997). Hierbei ist eine miniaturisierte, horizontale Ussingkammer unter einem Mikroskop angebracht. Das Epithel wird von der oben aufgeführten, auf 37°C temperierten Elektrolytlösung umspült. Der Messstand mit der Ussingkammer erlaubte die Präparation (Defektsetzung) am lebenden Monolayer unter lichtmikroskopischer Kontrolle.

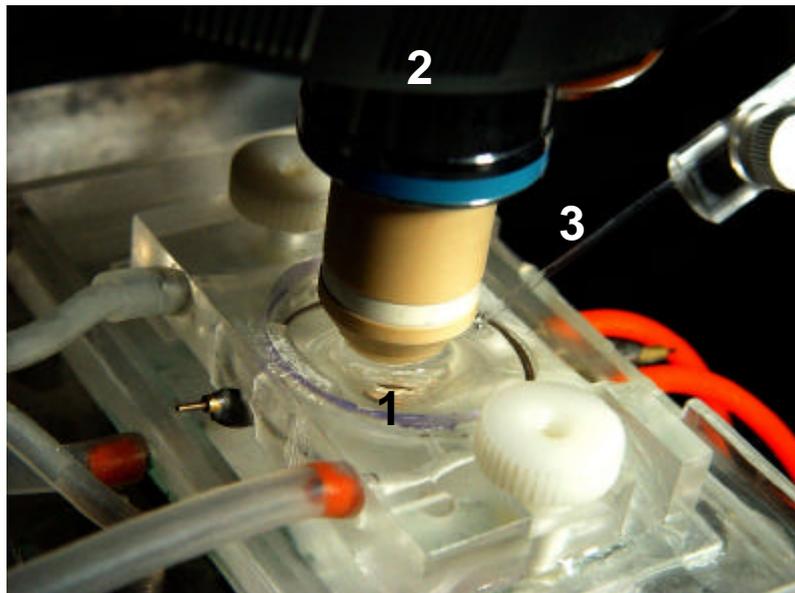


Abb. 8: Versuchstand

Die Abbildung zeigt die horizontal montierte miniaturisierte Ussing-Kammer (1). Mit Hilfe eines Wasserimmersionsobjektivs (2) war eine optische Kontrolle möglich. Die Mikroelektrode (3) zur Präparation des Defektes tauchte seitlich in die Kammer ein. Bewegt wurde die Kammer über einen (hier nicht dargestellten) Mikromanipulator, der in Abschnitt 3.7.4 beschrieben ist.

3.7.1 Perfusion

Im Versuchstand wurden die Monolayer mit der oben beschriebenen Elektrolytlösung perfundiert. Zunächst wurde die Lösung in zwei (für das apikale und basolaterale Kompartiment der Ussing-Kammer) doppelwandigen Glasbehältern mit Carbogen begast und durch einen Wärmetauscher auf 37°C vorgewärmt. Über ein Schlauchsystem mit doppelwandigen Tropfenzählern und einem weiteren Wärmetauscher unmittelbar vor dem Epithel wurde die Lösung zur Kammer geleitet. Die Einleitung der Lösung in die Kammer erfolgte über kleine Seitenbohrungen. In der Kammer teilte das eingespannte Epithel ein apikales von einem basolateralen Kompartiment (Abb. 12). Der Abfluss wurde über jeweilige Anschlüsse auf beiden

Seiten gewährleistet. Die Tropfenzähler wurden zur optischen Kontrolle der Durchflussmenge und zur Entfernung von Gasblasen genutzt. Es wurde eine Perfusionsrate von 2-4 ml/min eingestellt, die über Schlauchklemmen reguliert werden konnte. Der Kammerdurchfluss wurde durch den hydrostatischen Druck angetrieben. Höhenverstellbare Überlaufbehälter auf der Abflusseite dienten zur Regulation des Abflusses. Der Druck auf der mukosalen Epithelseite wurde gegenüber der serosalen Seite geringfügig durch eine Höhendifferenz von ca. 0,5 cm der Überlaufbehälter erhöht, um eine Zelablösung und eine Höhenschwankung der Filtermembran zu verhindern.

3.7.2 Präparation des Epithels

HT-29/B6-Zellen wurden auf Millicell-PCF-Filtern (Abschnitt 3.2) kultiviert. Die Filtermembran ließ sich mit einem Skalpell unbeschadet aus dem Kunststoff-Zellkulturträger heraus schneiden (Abb. 9) und gewährleistete auch nach dem Herauslösen genügend Eigenstabilität, so dass sie ohne Zellablösung in den Versuchsstand eingebaut werden konnte.



Abb. 9: Präparieren der Filtermembran

Mit Hilfe eines Skalpells wurde die Filtermembran entlang des sie aufspannenden Plastikrings des Zellkulturträgers herausgeschnitten und für die weitere Präparation in einen Container (3.7.3) verbracht.

3.7.3 Miniaturisierte Ussing-Kammer

Die herausgeschnittene Filtermembran mit Zell-Monolayer wurde in einen Plexiglas-container verbracht, der aus zwei ineinander passenden Kunststoffscheiben bestand (Abb. 10 und Abb. 11).

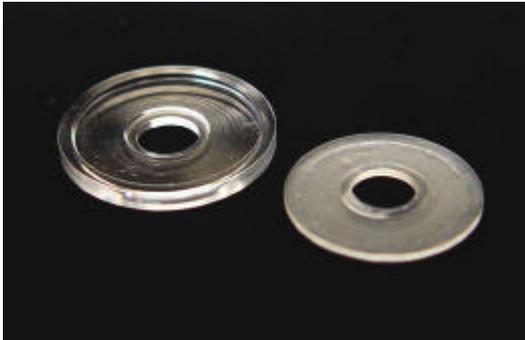


Abb. 10: Container

Dargestellt ist das Containerunterteil (links) mit einer Aussparung zur Aufnahme des Zell-Filters und das Oberteil mit einer abdichtenden Silikonscheibe (rechts).

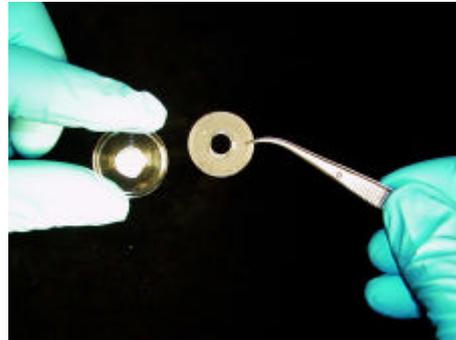


Abb. 11: Bestücken des Containers

Das Containeroberteil wurde mit der silikonbeschichteten Seite in Richtung Zellen auf das mit dem Zell-Filter bestückte Unterteil gelegt. Mit Blick auf die apikale Epithelseite wurde der Container in den Versuchsstand eingebaut.

Der Durchmesser dieses Containers betrug 2,08 cm. Die obere, im Durchmesser 1,8 cm große Scheibe, besaß mittig eine kreisrunde Aussparung von 0,6 cm, um mit der unteren, welche den gleichen Lochdurchmesser hatte, einen Zylinder zu bilden. Das Containerunterteil war im Durchmesser 2,08 cm und besaß eine 1,8 cm große innere Aussparung, um das Oberteil aufnehmen zu können. Um die Filtermembran zwischen beiden Containerhälften platzieren zu können, wurde mittig eine weitere Aussparung konstruiert, die einen Außendurchmesser von 0,8 cm aufwies. Auf die Kontaktseite des Oberteils wurde eine 0,2 cm dicke Silikonscheibe mit einem 0,25 cm dicken Innenrand gegossen, um auf der Membran so fest anliegen zu können, dass eine Dislokation zwischen den beiden Containerhälften ausgeschlossen war. So wurden beim Einlegen der Filtermembran nur die randständigen Epithelzellen zerstört. Zu Versuchszwecken wurden ausschließlich intakte Bereiche des Monolayers gewählt, die mikroskopisch kontrolliert wurden.

Der mit Epithel bestückte Container wurde horizontal in die miniaturisierte Ussing-Kammer eingebaut, die ihn durch zwei rechteckige Acrylglasshälften fixierte. Das Oberteil der Kammer hatte eine seitliche Aussparung, die das seitliche Einbringen einer Mikroelektrode (Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament, Firma Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland; innerer/äußerer Durchmesser: 0,5/1,0 mm, Art.Nr . 11 03210)

erlaubte. Das Kammeroberteil wurde mittels zweier (korrosionsbeständiger) Nylon-Schrauben auf das, am Objektisch fest installierte, Kammerunterteil geschraubt. Durch den freien inneren Kammerdurchmesser von 1,6 cm konnte das Wasserimmersionsobjektiv über dem Epithel positioniert werden.

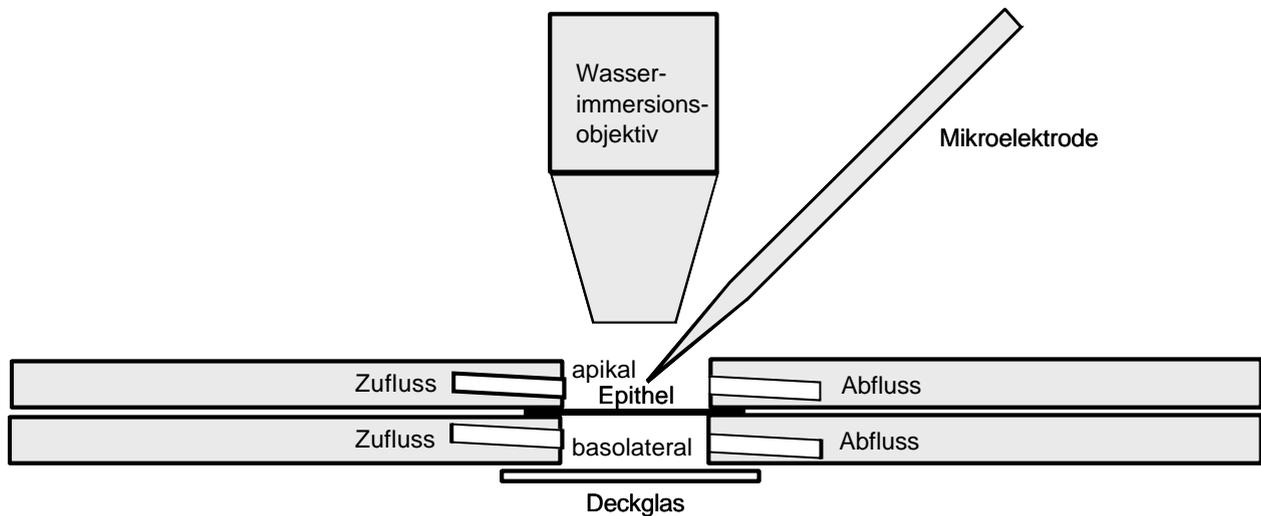


Abb. 12: Schematische Darstellung der Präparationskammer

In der horizontal montierten Ussing-Kammer trennt das Epithel ein apikales Kompartiment von einem basolateralen. Durch jeweilige Zufluss- und Abflussanschlüsse wurde das Epithel beidseits mit Badlösung umspült und so für die Zeit des Versuchs vital gehalten. Unter optischer Kontrolle (Wasserimmersionsobjektiv) konnte mit der Mikroelektrode der Defekt gesetzt werden.

3.7.4 Mikromanipulator

Um das eingespannte Epithel relativ zur Mikroelektrode und dem Wasserimmersionsobjektiv bewegen zu können, wurde die Kammer auf einem dreidimensional elektrisch beweglichen Objektisch angebracht, der sich mit Hilfe eines computer-gesteuerten Mikromanipulators (Model 5171, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) steuern ließ. Die Steuerung erfolgte bei Manipulationen im Mikrometerbereich, d. h. bei der Umschneidung des Epithelstückes (Abschnitt 3.7.5), über die Tastatur des angeschlossenen Computers (Software: Dipl.-Ing. D. Sorgenfrei). Um den vorpräparierten Zellstreifen herauszulösen, wurde der Mikromanipulator mittels eines digitalen Joysticks bewegt.

3.7.5 Mikroskop

Die Defektsetzung fand unter lichtmikroskopischer Kontrolle (Universalmikroskop Axioplan, Zeiss, Deutschland) mit Hilfe eines Wasserimmersionsobjektivs (Achromplan 40x, numerische Apertur 0,75, Arbeitsabstand 1,98 mm, Zeiss) statt. Mittels einer Videokamera (Hamamatsu Mikroscope Video Camera, Photonic Microscope System C2400, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH) wurde das Bild auf dem Monitor (Hitachi, Japan) des Computers angezeigt.

Die durch den Mikroelektrodenpuller (DMZ-Universal-Puller, Zeitz Instrumente, Augsburg, Deutschland) ausgezogene Glasmikroelektrode wies einen Spitzendurchmesser von 2 μm auf. Sie konnte, nachdem sie fest in die vorgesehene Haltevorrichtung installiert wurde, seitlich in die Kammer vorgeschoben und unter lichtmikroskopischer Kontrolle über dem Epithel positioniert werden (Abb. 12). Für jeden Versuch wurde eine neue Glaselektrode angefertigt.

Die Mikroelektrode brachte man mit Hilfe des steuerbaren Objektisches so tief in das Epithel ein, dass die Spitze die Filtermembran berührte. So war eine vollständige Durchschneidung der Epithelschicht gewährleistet. Diese Stelle konnte als Startkoordinate ($x = 0$, $y = 0$, $z = 0$) für die folgende Defektsetzung festgelegt werden (Abb. 13).

Der Objektisch wurde erst 2000 μm in der x-Ebene, dann 200 μm in der y-Ebene gesteuert, um dann erneut auf den Startkoordinaten platziert zu werden. Der Filter wurde dann erneut 200 μm in der y-Ebene und 2000 μm in der x-Ebene so gesteuert, so dass ein 2000 μm langes und 200 μm breites Rechteck umschnitten wurde.

Dieses rechteckige Epithelstück ließ sich mit der Mikroelektrode von der Filtermembran lösen.

Der Monolayer wurde aus der Kammer und dem Container ausgebaut und sofort bzw. nach einer weiteren 2-stündigen Inkubation fixiert und gefärbt.

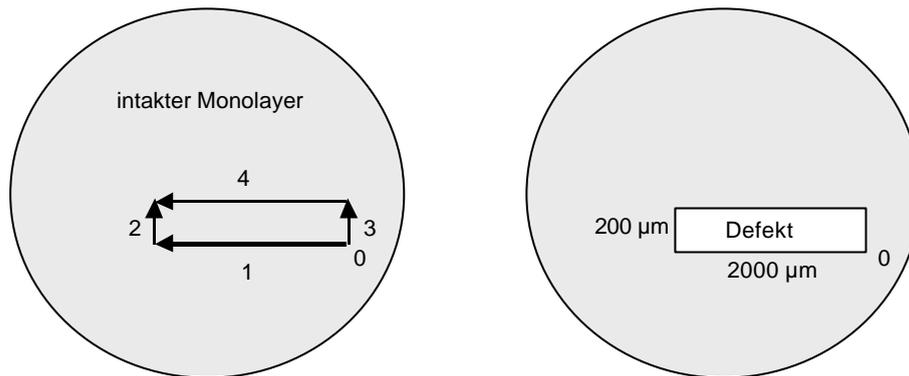


Abb. 13: Epitheldefekt (schematisch)

Um einen Defekt mit definierter Größe zu erzeugen, wurde ein Epithelabschnitt rechteckig, vom Startpunkt (0) ausgehend, umschnitten (links). Die Schnittführung erfolgte im Epithel 2000 µm nach links (1) und 200 µm nach oben (2). Danach wurde die Mikroelektrode wieder auf den Nullpunkt gebracht, um dann erneut 200 µm nach oben (3) und 2000 µm nach links (4) geführt zu werden. Anschließend wurden die Zellen dieses Bereichs entfernt. Man erhielt einen rechteckigen Zelldefekt (rechts).

3.8 Immunhistologie

Um den Defekt ausmessen zu können, wurden die Monolayer fixiert und mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen dargestellt. Im ersten Versuchsansatz wurden 8 Tage alte, nicht vorinkubierte Kontrollmonolayer und mit Zytokinen inkubierte Testmonolayer angefärbt. Der zweite Versuchsansatz wurde unter gleichen Bedingungen mit 9 Tage alten Monolayer durchgeführt.

3.8.1 ZO-1 Färbung

Zur besseren Darstellung des intakten Epithels wurde mit Antikörpern gegen das Tight junction-assoziierte Protein ZO-1 (Zonula occludens-1) eine spezifische Immunfluoreszenz-Färbung der Schlussleisten durchgeführt.

Die Bindung des monoklonalen Anti-ZO-1-Antikörpers wurde mit einem Anti-Maus-Sekundärantikörper (Alexa FluorTM 488) bei einer Wellenlänge von 488 nm (Grün-Fluoreszenz) nachgewiesen.

Materialien und Geräte

- 1. Antikörper: Maus-Anti-ZO-1 (Transduction Laboratories, San Francisco, CA, USA) in Blockierungslösung 1:50
- 2. Antikörper: Alexa-Fluor™ 488 Anti-Maus (Molecular Probes, Inc., Oregon, USA) in Blockierungslösung 1:500
- Permeabilisierungslösung: 0,5% Triton X-100 in PBS
- Ziegenserum (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- Blockierungslösung: 0,5% Ziegenserum in PBS
- PBS-Puffer: Tabletten (Life technologies, Schottland) in Aqua bidest., pH 7,2
- 100% Methanol (Mallinckrodt Baker B.V., Holland) bei –20°C
- Aqua dest.
- Ethanol absolut
- Eindeckmittel: ProTaq MountFluor (Biocyc GmbH & Co. KG, Luckenwalde, Deutschland)
- Objektträger, Deckgläser
- Fluoreszenzmikroskop Olympus BX 60 bei 488 nm Wellenlänge

Durchführung

Die Filtermembran mit dem Monolayer wurde wie nun beschrieben gefärbt:

- zweimal kurz in PBS-Puffer waschen
- 10 min in Methanol bei –20°C fixieren
- zweimal kurz in PBS-Puffer waschen
- 5 min in Permeabilisierungslösung
- zweimal kurz in PBS waschen
- 10 min in Blockierungslösung
- 30 min in 1. Antikörper Maus-Anti-ZO-1, Markieren des ZO-1
- zweimal kurz in Blockierungslösung waschen
- 30 min in 2. Antikörper 488 Anti-Maus, im Dunkeln, Fluoreszenzmarkierung
- zweimal kurz in Blockierungslösung waschen
- einmal kurz in Aqua dest. spülen
- einmal kurz in Ethanol abs. spülen
- eindecken mit ProTaq MountFluor und aushärten lassen

3.8.2 ZO-1 / Occludin-Doppelfärbung

Neben den routinemäßig durchgeführten Färbungen gegen ZO-1 zur Darstellung des Defektes, wurden zusätzlich einzelne Färbungen gegen das integrale Tight junction-Protein Occludin durchgeführt.

Occludin

Im Rahmen meiner Untersuchung sollte mit Hilfe des Anfärbens von ZO-1 und Occludin sowohl das Vorhandensein eines Tight junction-assoziierten Proteins (ZO-1) als auch eines integralen Tight junction-Proteins (Occludin) im Bereich des Defektrandes geprüft werden. Als primärer Antikörper für die Bindung an Occludin wurde ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen verwendet, um mittels eines rot markierten Anti-Kaninchen-Sekundärantikörpers das Signal bei einer Wellenlänge von 600 nm von dem grün markierten Anti-ZO-1-Sekundärantikörper zu unterscheiden.

Materialien und Geräte

- 1. Antikörper: Maus-Anti-ZO-1 (Transduction Laboratories, San Francisco, CA, USA) in Blockierungslösung 1:50
- 2. Antikörper: Alexa Flour™ 488 Anti-Maus (Molecular Probes, Inc., Oregon, USA) in Blockierungslösung 1:500
- 1. Antikörper: Kaninchen-Anti-Occludin (ZYMED Lab., San Francisco, CA, USA) in Blockierungslösung 1:50
- 2. Antikörper: Alexa Fluor™ 594 Anti-Kaninchen (Molecular Probes, Inc., Oregon, USA) in Blockierungslösung 1:500
- Permeabilisierungslösung: 0,5% Triton X-100 in PBS
- Ziegenserum (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- Blockierungslösung: 0,5% Ziegenserum in PBS
- PBS-Puffer: Tabletten (Life technologies, Schottland) in Aqua bidest., pH 7,2
- 100% Methanol (Mallinckrodt Baker B.V., Holland) bei –20°C
- Aqua dest., Ethanol absolut
- Eindeckmittel: ProTaq MountFlour (Biocyc GmbH & Co. KG, Luckenwalde, Deutschland)
- Objektträger, Deckgläser
- Konfokales Laserscanning-Mikroskop Zeiss LSM 510 META bei 488 nm und 564 nm, Wellenlänge

Durchführung

- zweimal kurz in PBS-Puffer waschen
- 10 min in Methanol bei -20°C fixieren
- zweimal kurz in PBS-Puffer waschen
- 5 min in Permeabilisierungslösung
- zweimal kurz in PBS waschen
- 10 min in Blockierungslösung
- 30 min in 1. Antikörper Maus-Anti-ZO-1, Markieren des ZO-1
- zweimal kurz in Blockierungslösung waschen
- 30 min in 1. Antikörper Kaninchen-Anti-Occludin, Markieren des Occludin
- zweimal kurz in Blockierungslösung waschen
- 30 min in 2. Antikörper 488 Anti-Maus, im Dunkeln, Fluoreszenzmarkierung
- zweimal kurz in Blockierungslösung waschen
- 30 min in 2. Antikörper 564 Anti-Kaninchen, im Dunkeln, Fluoreszenzmarkierung
- zweimal kurz in Blockierungslösung waschen
- einmal kurz in Aqua dest. spülen
- einmal kurz in Ethanol abs. spülen
- eindecken mit ProTaq MountFluor und aushärten lassen

3.9 Fluoreszenzmikroskopie

Nach 24-stündiger Aushärtung konnten die mit Anti-ZO-1 angefärbten Objekte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX60, Japan) fotografiert werden. Als Objektiv wurde ein 20x/0.50 der Firma UPlanFI (Japan) genutzt. Unter Verwendung des Computerprogramms Analysis (Vers. 3.0, Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland) war eine Vermessung des Defektspaltes möglich. Hierbei wurde der Rand des Zelldefektes aufgesucht. Der epithelfreie Spalt wurde senkrecht zur Schnittlinie ausgemessen und dokumentiert (Abb. 14). Es wurden pro Epitheldefekt im Mittel vier Fluoreszenzbilder angefertigt. Pro Bild wurden anschließend vier bis fünf Einzelmessungen durchgeführt und statistisch ausgewertet.

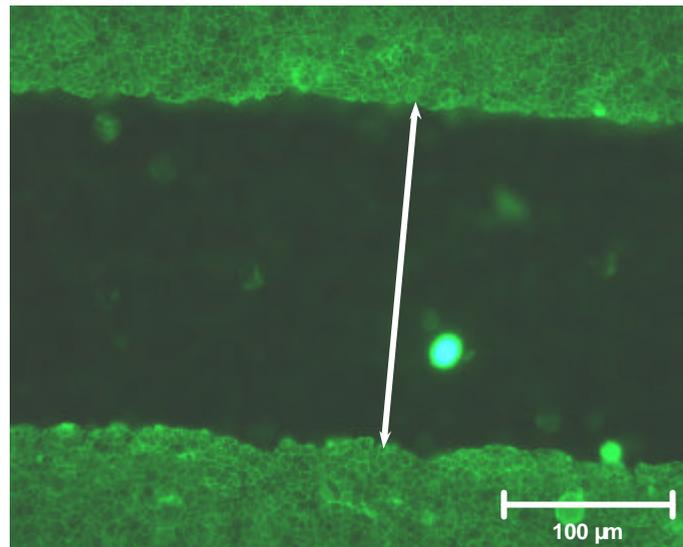


Abb. 14: Ausmessung des Epitheldefektes

Zur besseren Darstellung der Zellgrenzen wurde eine Fluoreszenzfärbung gegen das Tight junction-Protein ZO-1 (hier grün) verwendet.

Es ist ein Ausschnitt aus dem 2000 μm langen Gesamtdefekt abgebildet. Im intakten Bereich des Monolayers führen die grün angefärbten Zellgrenzen der Einzelzellen zu einem netzartigen Erscheinungsbild. Der Pfeil zeigt exemplarisch eine Messung der Breite des Defekts.

3.9.1 Konfokale Lasermikroskopie

Ein konfokales Laserscanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510 META) mit einem 63 x Objektiv wurde bei den zweifach gefärbten (Anti-ZO-1, Anti-Occludin) Objekten genutzt. Dies wurde als Detektionsverfahren für Mehrfachfluoreszenzen angewandt, um die fluoreszenzmarkierten Strukturen der Zellen mit hoher räumlicher Genauigkeit zu lokalisieren. Der große Vorteil der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie ist die Möglichkeit, das von einer Probe emittierte Licht aus einer einzigen Ebene zu sammeln. Eine Lochblende die zur Fokusebene konjugiert (konfokal) angeordnet ist sorgt dafür, dass sämtliches Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, auch nicht vom Detektor erfasst werden kann. Beim Laserscanning-Mikroskop wird ein Bild aus einer Menge von Daten zusammengesetzt, wobei die Probe Punkt für Punkt sequentiell abgetastet wird. Der so erzeugte optische Schnitt ist ein in x , y -, und z -Ebene hochaufgelöstes Abbild der Probe.

Mit einem angeschlossenen Bildverarbeitungsprogramm war es möglich, die Anordnung der Proteine an der Tight junction dreidimensional darzustellen (Abb. 15 und Abb. 16).

3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel und Statistiksoftwareprogramm SPSS (Version 11.5). Die Grafiken wurden mit Excel bzw. Word angefertigt. Die Auswertung erfolgte nach Absprache mit dem Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Alle Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte, zusammen mit der Standardabweichung (Mittelwert \pm SD) und der Stichprobengröße (n), angegeben. Zur Ermittlung der Signifikanzen wurde für den Vergleich zweier Mittelwerte unabhängiger normalverteilter Stichproben der zweiseitige t-Test nach Student angewandt (homo-, oder heteroskedastisch; die Varianzen wurden mit dem F-Test ermittelt). Als signifikant galt $p < 0,05$. In den Abbildungen sind die mit dem t-Test ermittelten Signifikanzen folgendermaßen dargestellt: n.s.: nicht signifikant verschieden, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. Die Signifikanzen in den dargestellten Grafiken wurden anhand der Einzelwerte berechnet. Der t-Test konnte für die überwiegende Zahl der Datensätze dieser Arbeit angewandt werden, andernfalls wird es im Text oder in den Abbildungsbeschriftungen ausdrücklich erwähnt. Die Restitutionsgeschwindigkeit (v) wurde in $\mu\text{m} / \text{h}$ angegeben und wie folgt berechnet:

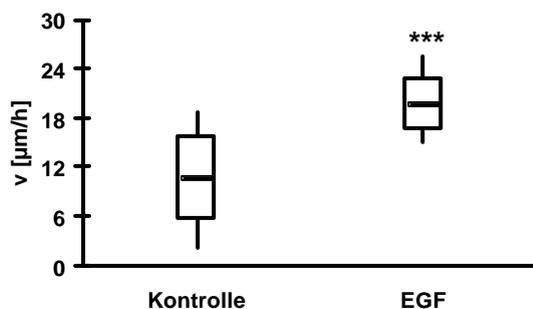
$$v \text{ (mm / h)} = \frac{D_{0h} - D_{2h}}{4}$$

v : Restitutionsgeschwindigkeit in $\mu\text{m} / \text{h}$

D_{0h} : Breite des Epitheldefektes in μm zum Zeitpunkt 0 h

D_{2h} : Breite des Epitheldefektes in μm zum Zeitpunkt 2 h

Die im Tabellenkalkulationsprogramm Excel erstellten Grafiken zeigen die mittlere Restitutionsgeschwindigkeit (v) als mittlere breite horizontale Linie, die Standardabweichung (SD) als schmale horizontale Linien und die Maximal- und Minimalwerte als vertikale Linien, wie am folgenden Beispiel gezeigt:



Da bei Verwendung verschiedener Zellpassagen unterschiedliche Restitutionsgeschwindigkeiten der Epithelzellen beobachtet wurden, wurde zu jedem Versuchs-

aufbau eine entsprechende Anzahl an Kontrollversuchen parallel durchgeführt. So konnten die Ergebnisse der einzelnen Testsubstanzen mit den Ergebnissen der Kontrollversuche derselben Passage verglichen werden.

Die Experimente mit HIV-typischen Zytokinen in Kombination wurden mit einer Varianzanalyse (SPSS, Version 11.5) ausgewertet, da zwei unzusammenhängende Stichproben unterschiedlicher Zellpassagen untersucht wurden (HIV-typische Zytokine in Kombination 1 und HIV-typische Zytokine in Kombination 2). In der Modellvorstellung wurden hierbei als Faktoren Passage, Filter und Passage * Filter angenommen (Tab. 4 im Anhang).

Zur Untersuchung der Effekte bestimmter Wachstumsfaktoren und Zytokine auf die epitheliale Restitution wurde folgendes Kollektiv herangezogen:

Zytokin bzw. Wachstumsfaktor	Anzahl (n) der Kontroll-Filter	Anzahl (n) der Proben-Filter
EGF	10	8
TGF- β 1	11	17
TNF- α	14	16
IL-13	12	11

HIV-typische Zytokine:

TNF- α + IFN- γ	10	15
IFN- γ	19	25
IFN- α	14	19
IL-1 β	32	31
HIV-typische Zytokine in Kombination (29.Pas.)	15	23
HIV-typische Zytokine in Kombination (30. Pas.)	16	19

Tab. 2: Anzahl (n) der Kontroll- und Probenfilter

In der Tabelle sind die Anzahl (n) der Kontroll- und Probenfilter aufgeführt, die die einzelnen Restitutionsexperimente durchliefen. Im Versuchsansatz „HIV-typische Zytokine in Kombination“ wurden aus labortechnischen Gründen zwei unterschiedliche Zellpassagen (29. bzw. 30.) verwendet. Die Auswertung der Experimente wird in Ergebnisse des 1. Versuchs und Ergebnisse des 2. Versuchs unterteilt.