

D. Untersuchungsergebnisse

Dieser Teil ist in drei Abschnitte gegliedert, die aufeinander Bezug nehmen. Im ersten Abschnitt werden die für die Anzucht der Zellen relevanten Methoden und Untersuchungen abgehandelt. Die Charakterisierung der angezuchteten Zellen erfolgt im zweiten und dritten Abschnitt. Zunächst wird im zweiten Abschnitt die licht- und elektronenmikroskopische Beschreibung der Zellen vorgenommen. Abschließend erfolgt im letzten Abschnitt, die histochemische und molekularbiologische Charakterisierung der angezuchteten Zellen mittels ELISA, SDS-PAGE und Western Blot.

1. Anzucht der Zellen

1.1 Isolierungen

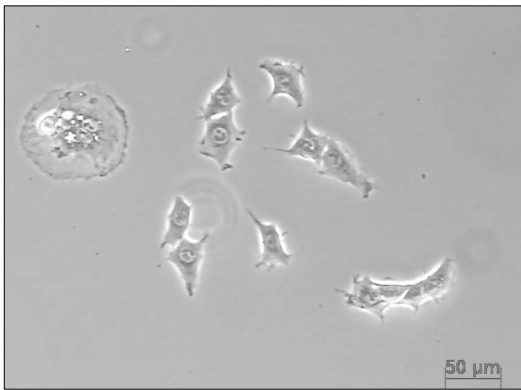
1.1.1 Isolierung und anschließende Anzucht der Zellen

Nachdem das während der Zellisolierung entstandene Zellpellet in Nährmedium resuspendiert und ausgesät worden war, erfolgte die erste mikroskopische Kontrolle. Es waren abgerundete, frei im Medium schwimmende Zellen sichtbar. Optimal in der Suspension waren möglichst viele, einzelne Zellen. Außerdem waren immer Verbände vorhanden, die aus einer variierenden Anzahl von Zellen bestanden. Für die weitere Anzucht waren diese Zellverbände jedoch meist ohne Bedeutung, da sie sich entweder nur sehr schwach oder gar nicht am Boden des Kultivierungsgefäßes anhefteten. Außerdem stammten die kleinen Zellverbände aus differenzierteren Schichten der Epidermis, die ihre Teilungsfähigkeit schon eingebüßt hatten. In der Zellkultur konnten nur die noch teilungsfähigen Zellen des Stratum basale angezucht werden, alle anderen differenzierteren Zellen gingen spätestens bei der ersten Passage verloren.

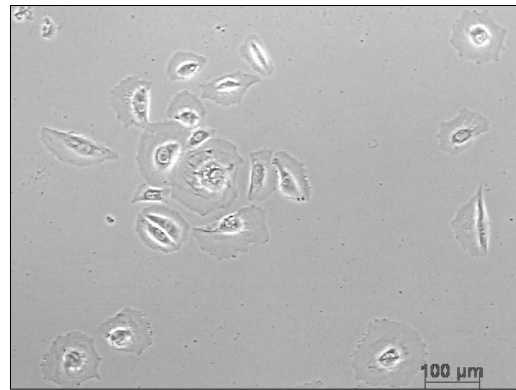
Im Gegensatz zu anderen Zellarten dauerte es recht lange, bis die neu isolierten Zellen am Boden des Kultivierungsgefäßes adhären waren. Nach ungefähr zwei Stunden hatten sich nur einzelne Zellen festgesetzt. Erst nach einem Zeitraum von 12 Stunden sah man deutlich die Adhäsion von einzelnen Zellen oder kleinen Zellgrüppchen. Aber auch hier waren es im Vergleich zu den in der Zellsuspension frei schwimmenden Zellen ein Viertel der Zellen, die sich festgesetzt hatten und damit weiter angezucht werden konnten. Der Hauptgrund hierfür war die relativ geringe Anzahl von Basalzellen in der Zellsuspension. Trotz der Bemühung ausschließlich Zellen des Stratum basale zu isolieren, war dies aus technischen Gründen nicht möglich. Das einschichtige Stratum basale ist im Verhältnis zu den anderen Schichten der Epidermis sehr dünn und durch die gut ausgebildete Verzahnung mit der Dermis stark „gewellt“. Es war auch mit Hilfe einer Lupe unmöglich, ausschließlich Basalzellen aus dem Übergang von Dermis zu Epidermis zu isolieren.

Daher befand sich in der Zellsuspension neben den Basalzellen auch immer ein großer Anteil von bereits differenzierteren Zellen des Stratum spinosum sowie eine gewisse Anzahl von dermalen Fibrozyten.

Zunächst behielten die festgesetzten Zellen ihre abgekugelte Form bei. Nach sechs bis zehn Stunden begannen sie, sich zu strecken (Abb. 1a). Als erstes bekamen die kugeligen Zellen kleine amöbenartige Ausläufer (Abb. 1b), von denen zunächst ein oder zwei sichtbar waren. Einige Stunden später waren es dann oft vier oder fünf. In den folgenden Stunden wurden diese Ausläufer recht schnell immer größer, dass heißt, sie gingen sternförmig auseinander, wobei immer mehr Zytoplasma in ihnen sichtbar wurde. Zu diesem Zeitpunkt war, abgesehen von den Ausläufern, ein deutlicher Zellkern mit einem dünnen Zytoplasmasaum sichtbar. In den folgenden Stunden verbanden sich die amöbenartigen Ausläufer zu einer einheitlichen Zellkontur. Im diesem Stadium gab es zwei unterschiedliche Formen der Keratinozyten. Zum einen kreisrunde Zellen mit einem großen, runden, zentral gelegenen Zellkern. Diese Zellen konnten einen maximalen



Textabbildung 5:
Primärkultur mit überwiegend kubischen und polygonalen Zellen

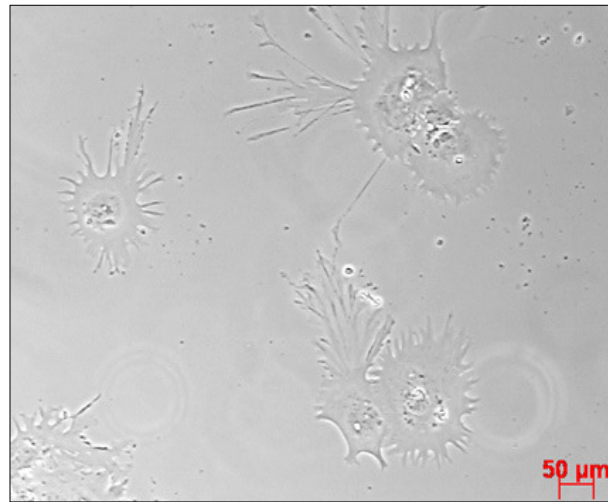


Textabbildung 6:
Primärkultur mit kreisrunden Zellen

Durchmesser von 100 µm (Textabbildung 6) erreichen. Zum anderen kubische bis polygonale Zellen, die ebenfalls einen zentralen Zellkern aufwiesen und in einigen Fällen über wenige, sehr kurze Ausläufer verfügten (Textabbildung 5). Der Durchmesser dieser Zellen betrug durchschnittlich 25 µm.

Neben den erwünschten Keratinozyten befanden sich in den Isolaten immer auch dermale Fibrozyten. Diese setzten sich schneller fest und streckten sich eher als die Keratinozyten. Sie wiesen das für diese Zellart typische morphologische Erscheinungsbild auf. Es konnten dünne, längliche, spindelförmige Zellen mit einem länglichovalen bis spindelförmigen Zellkern unter dem Invert-Mikroskop beobachtet werden (Abb. 2d + 2e). Neben den Fibrozyten waren auch Fibroblasten sichtbar, welche sich in ihrem morphologischen Erscheinungsbild stark von den Fibrozyten unterscheiden (Abb. 1c). Diese Zellen waren etwa zwei- bis dreimal so groß wie Fibrozyten, hatten einen ovalen bis

rundlichen Zellkern und eine ausgefranste, annähernd rechteckige Form. Das ausgefranste Aussehen hatte seinen Ursprung zum einen in den unterschiedlich langen Zellfortsätzen und zum anderen in meist deutlich sichtbaren intrazellulären Filamenten.



Textabbildung 7:

Zellen einer Primärkultur, die über unterschiedlich lange Zellfortsätze in Kontakt treten

Einen Tag nach dem Aussäen wurden die neu isolierten Zellen mit PBS einmal gespült und anschließend mit neuem Medium versorgt. Wenn sich viele, kleine, makroskopisch gut sichtbare Zellverbände im Medium befanden, wurde vorsichtig zweimal mit PBS gespült, um ihr vollständiges Entfernen zu gewährleisten. Bei diesem Vorgang wurden neben eventuell vorhandenen Zellverbänden auch alle Zellen, die sich nicht an dem Boden des Kultivierungsgefäßes festgesetzt hatten, weggespült. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich nur wenige Keratinozyten bereits vollständig gestreckt, aber die vitalen Zellen hatten mindestens einen kleinen Zellausläufer ausgebildet. In Gegensatz dazu hatten sich alle vorhandenen Fibrozyten bzw. Fibroblasten bereits vollständig gestreckt. Nach 48 und in wenigen Fällen auch erst nach 72 Stunden hatten sich dann auch fast alle Keratinozyten vollständig gestreckt. Die Keratinozyten lagen immer noch entweder einzeln oder in kleinen Grüppchen (Abb. 2a + 2b). Sie nahmen, wenn möglich mit anderen Keratinozyten Kontakt. Dies äußerte sich in der Ausbildung von langen, dünnen Zellfortsätzen, mit denen vor allem die einzeln liegenden Zellen auch über größere Distanzen versuchten, miteinander in Verbindung zu treten (Textabbildung 7). Im weiteren Verlauf war die Proliferation der Zellen, die in den Grüppchen lagen oder mit anderen Zellen Kontakt aufgenommen hatten, höher als die der einzeln liegenden Zellen (Abb. 2c). Aus den Grüppchen wurden innerhalb der nächsten zwei bis drei Tage größere Zellansammlungen, wobei das Wachstum bis zu einer Zelldichte, bei der Kontakte zwischen dem meisten Zellen hergestellt waren, langsam fortschritt. Nach dem Erreichen

dieser Zelldichte stieg die Proliferationsrate sprunghaft an. In den folgenden Tagen konnten immer größer werdende Zellhaufen, die oft im Zentrum konfluent waren, beobachtet werden. Von den Rändern dieser Zellmassen ging die Besiedelung der noch freien Flächen des Kultivierungsgefäßes aus. Bis ein vollständiger, konfluenter Zellrasen (Abb. 3a u. 3b) ausgebildet worden war, vergingen je nach Zelllinie bis zu drei Wochen. Die angezüchteten Zellen wurden in der Regel zum erstenmal passagiert, wenn sie einen subkonfluenten oder konfluenten Monolayer ausgebildet hatten.

Eine Ausnahme gab es bei Zelllinien mit einem hohen Anteil von Fibrozyten. Diese wuchsen sehr viel schneller als die fast reinen Keratinozytenprimärkulturen und bildeten schnell konfluente Regionen aus. Anhand ihrer typischen Struktur, das heißt fischschwarmartige Bereiche mit eng aneinandergelagerten dünnen spindelförmigen Zellen (Abb. 2e), waren sie gut erkennbar. Aufgrund der hohen Proliferationsrate bestand die Gefahr des Überwucherns der Keratinozyten. Mit der ersten Passage konnte nicht gewartet werden bis ein Monolayer ausgebildet war. Die verschiedenen Möglichkeiten für die weitere Vorgehensweise in diesem Fall sind unter Punkt 1.3 Eliminierung von Fibrozyten beschrieben.

Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden Fibrozyten gezielt isoliert. Die Anheftung dieser Zellen war schnell und unproblematisch. Bereits nach einigen Stunden hatten sich die Zellen vollständig gestreckt und innerhalb weniger Tage einen konfluenten Monolayer ausgebildet.

1.1.2 Isolierung der Zellen mittels Dispase-Inkubation

Neben der normalen Isolierung, bei der die Dermis unter Sichtkontrolle so gut wie möglich von der Epidermis getrennt wurde, sind Isolierungen nach Inkubation in Dispase durchgeführt worden. Hierbei wurde ein größerer Anteil der Dermis an der Epidermis belassen. Nach vorheriger Inkubation mit Penicillin-Streptomycin Lösung (Fa. Sigma, Taufkirchen) erfolgte eine Inkubation mit einer Dispaselösung (5 U/ml). Im Anschluss sollte man Epidermis und Dermis gut voneinander trennen können. Bei den durchgeführten Isolierungen war dies jedoch nicht möglich, da die Dermis eine sehr weiche Konsistenz annahm und zusätzlich auffaserte.

Mit dieser Methode ließ sich der Anteil der Fibrozyten gar nicht oder nur unerheblich verringern. Außerdem wurde wesentlich mehr Zeit benötigt, was für die Vitalität der Keratinozyten von Nachteil war.

1.2 Subkultivierung

Nach der Ausbildung eines subkonfluenten oder konfluenten Zellrasens erfolgte die Subkultivierung. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und in der Regel im Verhältnis 1:2 gesplittet. Eine bestehende Kultur wurde also auf zwei neue Kultivierungsgefäße aufgeteilt. Bei der Subkultivierung erfolgte eine wesentlich schnellere Adhärenz der Zellen. Innerhalb von drei bis vier Stunden hatten sich die Zellen am Boden des Kultivierungsgefäßes festgesetzt. Spätestens nach einem Tag hatten sich alle Zellen vollständig gestreckt. Die benötigte Zeit zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens war innerhalb der Zellen einer Isolierung hauptsächlich abhängig von der Zellzahl und der Größe der Kultivierungsgefäße. Grundsätzlich wurde bei einer hohen Zellzahl und der Verwendung von kleineren Kultivierungsgefäßen weniger Zeit zum Erreichen der Konfluenz benötigt. Große Unterschiede gab es zwischen den verschiedenen Zelllinien. Bei einem höheren Fibrozytenanteil wurde innerhalb von vier bis sieben Tagen nach der Subkultivierung ein konfluenter Zellrasen ausgebildet. Reine Keratinozytenkulturen benötigten zum Teil mehrere Wochen.

Eine Subkultivierung war, wiederum abhängig von den angezüchteten Zelllinien, über mehrere Passagen möglich. Einige Keratinozytenreinkulturen konnten über einen Zeitraum von einem Jahr subkultiviert werden, das entsprach zwischen 30 und 35 Passagen. Diese Keratinozytenkulturen wurden teilweise subkultiviert, bevor sie einen konfluenten Monolayer ausgebildet hatten. Mit dem Ziel, ihre Proliferation anzuregen und degenerierte Zellen aus der Kultur zu entfernen. Keratinozyten und Fibrozyten in Kokulturen erreichten eine wesentlich höhere Anzahl von Passagen über einen längeren Zeitraum. Die Zelllinie KL-E, isoliert aus der Epidermis des Ballensegments einer Klaue, wurde über drei Jahre kontinuierlich subkultiviert und erreichte dabei über 100 Passagen. Diese Zelllinie wird jetzt nicht mehr kontinuierlich angezüchtet, sondern in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Aber auch nach über 100 Passagen können Zellen der KL-E Zelllinie nach dem Auftauen problemlos weiter angezüchtet werden.

1.3 Eliminierung von Fibrozyten

1.3.1 Isolierung von Keratinozyten mit Hilfe eines Zellschabers

Die einfachste, aber durchaus sehr erfolgreiche Methode der Eliminierung von Fibrozyten war die Verwendung eines Zellschabers. Diese Methode konnte auch gut mit der Isolierung von Zellen kombiniert werden. Grundvoraussetzung war eine deutliche morphologische Unterscheidbarkeit von Keratinozyten und Fibrozyten. Optimale Bedingungen waren gegeben, wenn die Keratinozyten nach einer Isolierung in Nestern ohne Fibrozyten zusammen lagen (Abb. 2a) oder in höheren Passagen die

Anfangsstadien der Koloniebildung deutlich erkennbar waren (Abb. 6a). Unter dem Invert-Mikroskop wurden geeignete Bereiche anhand der Zellmorphologie ausgewählt und mit einem Permanentmarker auf der Unterseite des Kultivierungsgefäßes angezeichnet. Entscheidend war, die Markierung so zu wählen, dass innerhalb der Markierung nur Keratinozyten lagen. Bei größeren Ansammlungen von Keratinozyten oder größeren Kolonien war es vorteilhaft, die Markierung so anzuzeichnen, dass die Keratinozyten an den Rändern außerhalb der Markierung lagen. So wurden diese Keratinozyten ebenfalls mit dem Zellschaber entfernt. Dadurch wurde die Gefahr, doch noch vereinzelte, im Randbereich liegende Fibrozyten weiterzuzüchten, erheblich minimiert. Nach dem Setzen der Markierung wurden alle außerhalb der Markierung liegenden Zellen mit dem Zellschaber entfernt. Nur die innerhalb der Markierung liegenden Zellen wurden weiter angezüchtet. Dieser Vorgang musste alle zwei Tage wiederholt werden, um gute Ergebnisse zu erzielen. Denn bereits wenige nicht abgeschabte Fibrozyten konnten aufgrund ihrer höheren Proliferationsrate zu Problemen führen. Bei längeren zeitlichen Abständen zwischen der Entfernung mit dem Zellschaber bestand die Gefahr des Überwucherns der Keratinozyten durch eventuell nicht entfernte, außerhalb der Markierung liegende Fibrozyten. Gerade an den Rändern der Kultivierungsgefäße war die Entfernung der Fibrozyten schwer durchführbar, wodurch gelegentlich Fibrozyten in diesem Bereich übersehen werden konnten.

Zusammenfassend lässt sich über diese Methode sagen, dass sie zu guten Ergebnissen führte, sofern die ausgewählten Zellen richtig markiert und über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen jeden zweiten Tag außerhalb der Markierung liegende Zellen gründlich entfernt wurden.

1.3.2 Single well cloning

Als weitere Methode zur Trennung von Fibrozyten und Keratinozyten wurde das single well cloning eingesetzt. Auch bei dieser Methode war die Identifizierung der beiden Zellarten der entscheidende Faktor. Drei Tage nach dem Aussäen und Verdünnen auf Lochplatten mit 96 Vertiefungen (96-Well) wurden die angezüchteten Zellen beurteilt. Als erstes wurde auf die Zellzahl pro Well geachtet. Nur hohe Verdünnungsstufen mit sehr wenigen Zellen, das heißt maximal zehn Zellen pro Well, wurden im weiteren Verlauf berücksichtigt. Nachdem die entsprechenden Wells ausgewählt worden waren, wurden die Zellen entsprechend ihrer Struktur den unterschiedlichen Zellarten zugeordnet. Es wurden nur Wells, in denen ausschließlich Keratinozyten angewachsen waren, weiter angezüchtet. Beim Auftreten von Fibrozyten wurde das entsprechende Well verworfen. Die Proliferationsrate der ausgewählten Keratinozyten war anfangs sehr gering, es dauerte in der Regel mindestens zwei bis drei Wochen, bis die Zellen einen annähernd

subkonfluenten Zellrasen ausgebildet hatten. Des Öfteren blieb die Bildung eines Zellrasens aus, stattdessen konnten degenerative Veränderungen der Zellen beobachtet werden. Teilweise waren Pyknosen oder Karyorhexis sichtbar, in einigen Fällen konnten auch stark vergrößerte, aufgehellte Zellkerne beobachtet werden. Neben diesen Veränderungen war die Zellgröße oft verdreifacht und eine sehr deutliche, streifenartige Zeichnung des Zytoskelettes sichtbar.

1.3.3 Magnetic-activated cell sorting (MACS)

Auch das magnetic-activated cell sorting (MACS) wurde zur Trennung von Fibrozyten und Keratinozyten angewendet (siehe Punkt 2.6.3). Erst nach dem Anwachsen der Zellen konnte der Erfolg der Trennung beurteilt werden. Die Beurteilung erfolgte normalerweise anhand der Zellstruktur. Es konnte aber auch, nach dem Aussäen der Zellen auf einer 96 Lochplatte, direkt ein ELISA angeschlossen werden. Nach einmaligem Durchlaufen der Trennsäule war die Trennung der unterschiedlichen Zellarten oft unbefriedigend. Es waren in den mit dieser Methode isolierten Keratinozytenkulturen wiederholt noch Fibrozyten anzutreffen. Mit einer Anzüchtung der in der Trennsäule verbliebenen Zellen konnte aber eine reine Fibrozytenkultur erzielt werden. Eine solche Kultur wurde unter anderem für die Herstellung von konditioniertem Medium benötigt. Allerdings konnte die Trennung von Keratinozyten und Fibrozyten durch ein zweimaliges Durchlaufen der Trennsäule optimiert werden. In der Praxis wurde nach dem ersten Durchlauf die Säule gespült. Anschließend wurde die beim ersten Durchlauf aufgefangene Zellsuspension ein zweites Mal in der Säule aufgetrennt. Nach diesem weiteren Durchlaufen der Trennsäule wurden nur noch vereinzelt Fibrozyten in den angezüchteten Keratinozyten angetroffen.

Unabhängig von den verwendeten Methoden, die zur Eliminierung der Fibrozyten aus den entsprechenden Kulturen angewandt wurden, trat beim weiteren Anzüchten von Keratinozytenreinkulturen immer die gleiche Problematik auf. Die Proliferationsraten dieser Kulturen waren im Vergleich zu den Mischkulturen stark verlangsamt. Meist benötigten die Kulturen mehrere Wochen, um einen konfluenten Zellrasen auszubilden. Wenige Keratinozytenreinkulturen bildeten keinen vollständig konfluenten Zellrasen aus. Unabhängig von der ihnen zum Wachstum gegebenen Zeit bildeten diese Kulturen maximal einen subkonfluenten Zellrasen aus. Die Differenzierung der Zellen war in der Regel unvollständig, in einigen Fällen wurden nicht einmal zwei übereinanderliegende Zelllagen ausgebildet. Oft waren sehr große Zellen sichtbar, in einigen Fällen war die Zellgröße vervierfacht. Diese Riesenzellen ließen sich nicht weiter anzüchten. Des Weiteren konnte oft eine deutliche Zeichnung des Zytoskelettes in diesen Zellen beobachtet werden. Die Anzahl der möglichen Passagen der Reinkulturen war begrenzt, meist waren ca. 30 Passagen möglich.

1.4 Differenzierung und Koloniebildung

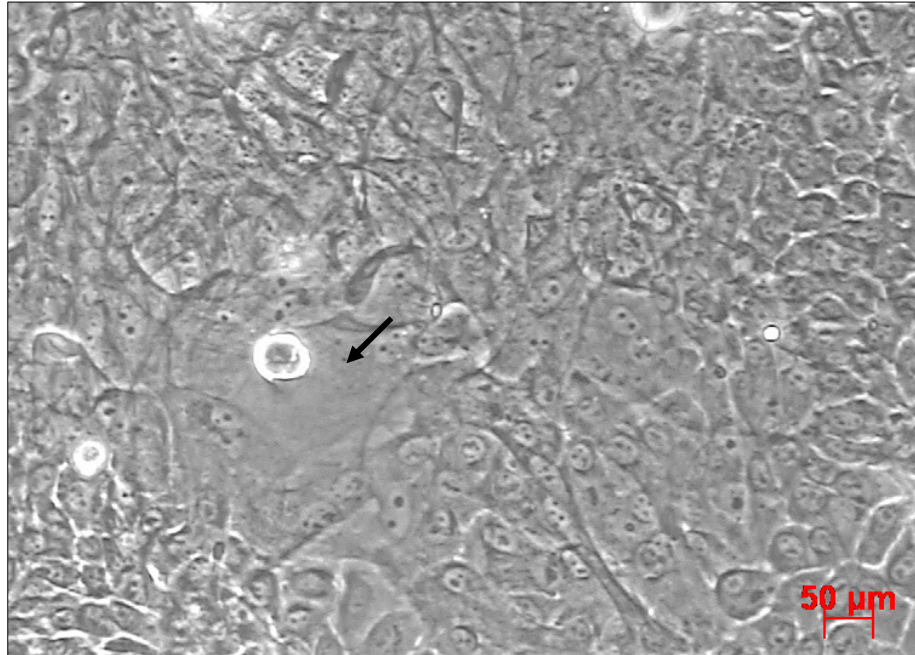
Der für die Differenzierung und/oder Koloniebildung benötigte Zeitraum war vor allem abhängig von der Zelllinie und der Anzahl der Passagen. Aber auch die Art des Kultivierungsgefäßes und das verwendete Nährmedium hatten einen bedeutenden Einfluss.

Durch die Verwendung mittelgroßer Kultivierungsgefäße (p60 und 6-well) wurde die Differenzierung der Zellen beschleunigt, da die Zellen schneller Kontakt zueinander aufnehmen konnten. Somit kam es zu einem schnellen Einsetzen der autokrinen Wachstumsstimulation. Noch kleinere Kultivierungsgefäße (p35 und 24-well) führten zu einer noch schnelleren Differenzierung, waren aber vom Handling wesentlich unpraktischer. So waren z.B. das Arbeiten mit einem Zellschaber sowie die Gewinnung von Proben für die Mikroskopie in diesen kleinen Gefäßen erschwert.

1.4.1 Differenzierung

Die Voraussetzung für den Beginn der Differenzierung war die Ausbildung eines subkonfluenten oder konfluenten Zellrasens, wobei sich dieser Zellrasen nicht über das ganze Kultivierungsgefäß erstrecken musste. Ausreichend waren auch begrenzte, konfluente Bereiche ab einem Durchmesser von 2 mm, die auch als Keratinozytennester beschrieben werden konnten. Die konfluenten Regionen zeichneten sich durch kleine rundliche bis polygonale Zellen mit einem Durchmesser von 15 bis 25 μm aus. Nur selten konnten in dieser Phase Zellen mit vielen 2 bis 4 μm langen Zellfortsätzen angetroffen werden. Meist waren keine Zellfortsätze mehr sichtbar. Typisch für dieses Stadium war ein kopfsteinpflasterähnliches Aussehen der konfluenten Regionen (Abb. 3a). Nach dem Erreichen der Konfluenz begannen die Zellen eine zweite Zelllage auszubilden. Der hierfür benötigte Zeitraum war abhängig von der Größe des konfluenten Bereiches. Kleine Keratinozytennester benötigten nur 2 bis 3 Tage. Komplett konfluente Kulturen brauchten hingegen 2 bis 3 Wochen zur Ausbildung einer vollständigen zweiten Zelllage. Allerdings wurde diese zweite Zelllage nicht homogen ausgebildet, sondern die Zellen begannen in unterschiedlichen Bereichen gleichzeitig mit dem Wachstum. So konnten unter dem Invert-Mikroskop unterschiedlich differenzierte Regionen beobachtet werden, z.B. nur einschichtige Bereiche neben mehrschichtigen (Abb. 4b + c). Im weiteren Verlauf wuchsen diese mehrschichtigen Abschnitte zusammen, wobei an manchen Stellen schon mehr als zwei Zelllagen ausgebildet worden waren. Eine genaue Beurteilung der Anzahl ausgebildeter Zelllagen war mit dem Invert-Mikroskop nicht möglich. Nur eine anschließende, licht- bzw. elektronenmikroskopische Untersuchung konnte Klarheit bringen. Auch der Grad der epidermalen Differenzierung konnte erst mit Hilfe dieser Untersuchungen beurteilt werden. Wenn diese mehrschichtigen Kulturen über einen

längeren Zeitraum von 4 bis 8 Wochen angezüchtet wurden, kam es zur Ausbildung weiterer Zelllagen (Textabbildung 8). Im Invert-Mikroskop ergab sich bei weiterer Anzüchtung ein diffuses Bild, einzelne Zellen waren nicht mehr auszumachen (Abb. 5a + 5b). Bei genauem Hinschauen konnten diese Strukturen makroskopisch als diffuser



Textabbildung 8:

Mehrere übereinanderliegende, unterschiedlich stark differenzierte Zellen, einzelne Zellen sind stellenweise nicht mehr zu erkennen, einzelne sehr große, scheinbar kernlose Zellen (Pfeil)

Grauschleier wahrgenommen werden. Wenn in umgrenzten Bereichen die durchschnittliche Anzahl der Zelllagen überschritten wurde, sah man in dieser Region einen dunkelgrauen Punkt. Bei der Subkultivierung einer solchen mehrschichtigen Kultur ergab sich folgende Problematik: Mit der Trypsin EDTA Lösung konnte zwar die Kultur vom Kultivierungsgefäß abgelöst werden, aber sie blieb in einem zusammenhängenden Stück erhalten. Auch durch mechanischen Druck, ausgeübt durch wiederholtes Trituieren mit einer sterilen Pipette, konnten nur große Bruchstücke gelöst werden. Diese Bruchstücke hefteten sich in der Regel an den Untergrund eines neuen Kultivierungsgefäßes (Abb. 3c) und Zellen begannen vom Randbereich ausgehend das Kultivierungsgefäß zu besiedeln (Abb. 3d u. 3e). Aber eine gleichmäßige Besiedlung erfolgte nie. Die Bruchstücke konnten sich nach einigen Tagen ablösen, oder sie schienen zu degenerieren. Ein etwas anderes Bild ergab sich, wenn in einer Kultur viele Keratinozytennester vorhanden waren, zwischen denen nur wenig einzelne Zellen lagen. In diesem Fall begann die Differenzierung in Nestern unabhängig von den umliegenden Zellen. So konnten auf einem Kultivierungsgefäß unterschiedlichste Stadien angetroffen

werden (Abb. 4e). Einige Nester waren bereits mehrschichtig, während zwischen ihnen nur wenige Zellen lagen, die versuchten mit Zellfortsätzen miteinander Kontakt aufzunehmen. Eine weitere Besiedlung des Kultivierungsgefäßes ging hauptsächlich von den Rändern der Keratinozytennester aus. Ein einheitlicher Zellrasen wurde von diesen Kulturen nicht ausgebildet und in Folge dessen auch nie eine reproduzierbare Anzahl von Zelllagen.

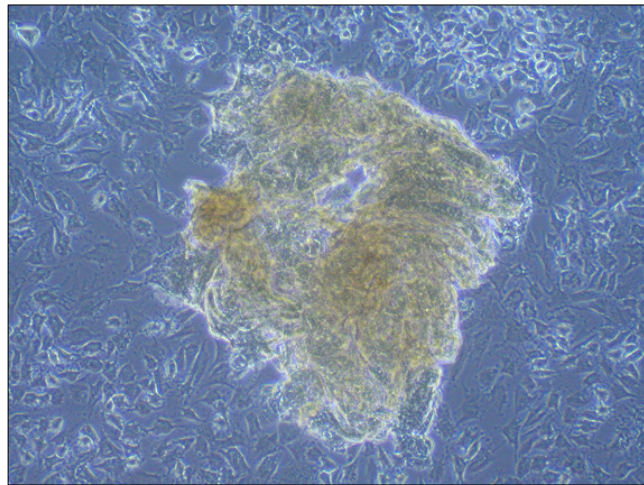
Differenzierte Zellen lösten sich zum Teil von der Kultur ab und schwammen dann frei im Medium. Teilweise konnten differenzierte Zellverbände, bestehend aus bis zu 20 Zellen, unter dem Invert-Mikroskop beobachtet werden. Diese Zellen hatten eine kubische oder dreieckige Form und waren bis zu 100 µm groß. Nur selten waren noch Zellkernfragmente sichtbar. Den meisten Zellen waren kernlos (Abb. 4d).

1.4.2 Koloniebildung

Die Bildung von deutlich sichtbaren, das heißt auch morphologisch eindeutig von den umliegenden Zellen abgrenzbaren Keratinozytenkolonien, konnte häufig beobachtet werden. Vor allem in Mischkulturen mit einem hohen Fibrozytenanteil von etwa einem Drittel kam es während der ersten 20 Passagen regelmäßig zur Bildung von Kolonien. Eine Voraussetzung für die Koloniebildung war die Ausbildung eines subkonfluenten Zellrasens oder das Vorhandensein von größeren konfluenten Bereichen, wobei 0,5 cm² ausreichend waren. Oft begannen die Keratinozyten an mehreren Lokalisationen gleichzeitig mit dem Aufbau von Kolonien, so dass bis zu zehn Kolonien in einem Kultivierungsgefäß sichtbar wurden. Die Kolonien bestanden im Anfangsstadium nur aus drei bis sechs großen runden Zellen mit einem zentralen Zellkern (Abb. 6a). Der Durchmesser dieser Zellen betrug 40 bis 60 µm. Es wurden keine Zellfortsätze ausgebildet. Ein Teil dieser Kolonien wurde nicht bedeutend größer bzw. von den in der Kokultur enthaltenen Fibrozyten überwuchert und war somit nicht mehr sichtbar. Andere vergrößerten innerhalb einer Woche ihren Umfang beachtlich, sie enthielten nun bis zu 40 große runde Zellen. Um die Gefahr des Überwucherns dieser Kolonien mit Fibrozyten zu verringern, wurde die Lage dieser Kolonie auf der Unterseite des Kultivierungsgefäßes markiert. Im Anschluss wurden die außerhalb der Markierung liegenden Zellen mit einem Zellschaber entfernt. Durch eine wiederholte Entfernung der außerhalb der Markierung liegenden Zellen in Abständen von drei bis vier Tagen konnte dieses Risiko dauerhaft eingeschränkt werden. Wobei die Markierung jedes Mal erneuert wurde, um sie an die neue Größe der Kolonie anzupassen. In den folgenden ein bis zwei Wochen nahm nicht nur der Umfang der Kolonien zu, die Keratinozyten begannen nun auch mit der Ausbildung von zwei bis drei Zelllagen (Abb. 6b). In diesem Stadium konnten mit dem Invert-Mikroskop noch einige Zellen der oberen Zellschicht gut beobachtet werden. Die Zellen waren nun polygonal bis

kubisch, wobei die Zellgröße etwas zunahm. Zu diesem Zeitpunkt waren die Kolonien bereits makroskopisch auf dem Kultivierungsgefäß als kleine hellgraue Punkte mit einem Durchmesser von 1 bis 2 mm erkennbar. Innerhalb der nächsten vier bis sechs Wochen bildeten die Kolonien noch mehr Zelllagen aus, die Anzahl der Zelllagen konnte nicht mehr mit dem Invert-Mikroskop ermittelt werden (Abb. 6d, 7a + 7b). Erst die licht- und elektronmikroskopische Untersuchung gab Aufschluss über die Anzahl, es konnten bis zu 22 Zelllagen beobachtet werden (Abb. 9a). Auch der Umfang der Kolonien nahm in diesen Wochen zu. Die größte Kolonie war 1 cm lang und an den breitesten Stellen erreichte sie 0,7 cm (Abb. 7c). Makroskopisch konnte bei dieser Kolonie eine Oberfläche mit kleinen Hügeln und einigen Vertiefungen unterschieden werden.

In Keratinozytenreinkulturen entstanden nur selten kleine Kolonien, die aus bis zu zehn runden Zellen mit einem Durchmesser von ca. 50 µm bestanden. Diese Kolonien wurden nur sehr langsam etwas größer, das heißt, aus fünf Zellen wurden nach zwei Wochen zehn oder zwölf. Selten wurden mehrere Zelllagen ausgebildet und nur in sehr wenigen Fällen wurden gelbliche, verhornte Zellen beobachtet (Textabbildung 9). Jedoch wurden niemals die



Textabbildung 9:

Von einer Keratinozytenreinkultur gebildete gut differenzierte Kolonie mit gelblichen verhornten Zellen
Vergr. 100x

Größe und der Differenzierungsgrad der in Gegenwart von Fibrozyten gebildeten Kolonien erreicht. In der Regel waren die von den Keratinozytenreinkulturen gebildeten Kolonien aber nur für ein oder zwei Wochen sichtbar, bevor sie mit den umliegenden Zellen zu einem einheitlichen Bild verschmolzen.

Die größten und am besten differenzierten Kolonien wurden mit einem Mediengemisch, bestehend aus DMEM (D 5796, Fa. Sigma, Taufkirchen) supplementiert mit 10 % FBS (Fa. Sigma, Taufkirchen) und Keratinocyte Medium Kit (Fa. Sigma, Taufkirchen) im Verhältnis 1:2 angezüchtet.

1.5 Zellwachstum in Abhängigkeit von den verwendeten Kultivierungsgefäßen und unterschiedlichen Beschichtungen

1.5.1 Verschiedene Kultivierungsgefäße

Die Wachstumsrate und auch die zur Differenzierung benötigte Zeit waren abhängig von der Anzahl der Zellen auf den Kultivierungsgefäßen. Allgemein kann gesagt werden, dass eine höhere Zelldichte zu einem schnelleren Wachstum und einer frühzeitig einsetzenden Differenzierung führte. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden für die routinemäßige Anzucht der Zellen mittelgroße Kultivierungsgefäße verwendet.

Für die Anzucht und Subkultivierung der Zellen erwiesen sich p60 und 6-wells als besonders geeignet. Hauptsächlich wurden p60 verwendet. Diese Kultivierungsgefäße hatten zusätzlich den Vorteil eines einfachen Handlings, z.B. konnte problemlos mit einem Zellschaber gearbeitet werden. Ein weiterer Vorteil war, dass die im Randbereich des Gefäßes wachsenden Zellen gut unter dem Mikroskop sichtbar waren.

Die Anzucht von Keratinozyten auf größeren Kultivierungsgefäßen gestaltete sich etwas schwieriger, besonders bei einer geringen Zellzahl. Wurden p100 zur Anzucht verwendet, so waren zuerst meist einzeln oder in kleinen Gruppen liegende Zellen sichtbar, wobei große Anteile des Gefäßbodens vollkommen zellfrei blieben. Auch hier versuchten die einzeln liegenden Zellen über Zellfortsätze Kontakt zu den in der Umgebung liegenden Zellen aufzunehmen. Von den Zellen wurden unterschiedliche Anzahlen von Zellausläufern ausgebildet, auch unterschiedlich die Struktur der Zellausläufer. Einige Zellen bildeten nur einen einzigen, sehr langen und dünnen Fortsatz aus, der bis zu 1,5 cm lang werden konnte. Andere Zellen bildeten zwei bis fünf Fortsätze verschiedener Länge und Dicke aus. Selten wurden sehr viele, meist kürzere Fortsätze ausgebildet, so dass die Zellen ein sternförmiges Aussehen erhielten. Nachdem die Zellen miteinander in Verbindung getreten waren, bildeten sie Zellnester. Zu diesem Zeitpunkt konnten auf dem Kultivierungsgefäß viele getrennt liegende Zellnester beobachtet werden. In den folgenden Tagen wurden die Zellnester immer größer. Einige Nester waren zentral innerhalb von vier bis sechs Tagen konfluent und wiesen ein paar Tage später erste Anzeichen einer beginnenden Differenzierung auf. In der Peripherie dieser Nester waren immer noch einzelne Zellen sichtbar. Von hier ging die Besiedlung der freien Flächen des Kultivierungsgefäßes aus. Bis ein solches p100 vollständig mit einem Monolayer bedeckt war, vergingen vier bis sechs Wochen. Nachteilig waren die unterschiedlichen Differenzierungsgrade der angezuchteten Zellen. Bei einer anschließenden Subkultivierung traten mitunter folgende Probleme auf. Die differenzierteren Zellen ließen sich nicht mehr durch das Trypsin von einander trennen, so dass in der Zellsuspension immer unterschiedlich große, zusammenhängende

Zellverbände enthalten waren. Einige dieser Zellverbände setzten sich nach der Subkultivierung fest und waren dann als gelbliche Zellklumpen sichtbar (Abb. 3d). So wurden auch nach der Subkultivierung unterschiedlich differenzierte Zellen, mit einer sehr unregelmäßigen Verteilung in dem Kultivierungsgefäß gezüchtet.

Große Kultivierungsgefäße (p100) wurden vor allem für die Anzüchtung von Fibrozyten verwendet, da diese Zellart sehr schnell wächst. Die Verwendung von p100 war für die Gewinnung von konditioniertem Medium vorteilhaft, da bei diesem Kultivierungsgefäß 10 bis 15 ml Medium zur Zellanzüchtung benötigt wurden. Im Gegensatz dazu wurden bei der Verwendung von p60 nur 5 ml pro Kultivierungsgefäß benötigt. Die Anzüchtung von Fibrozyten in p100 ermöglichte somit die Gewinnung einer größeren Menge konditionierten Mediums.

1.5.2 Zelladhärenz und Proliferation in Abhängigkeit von der Art der Beschichtung

Es konnte kein deutlicher Unterschied des Zellwachstums bei Anzüchtung auf mit Kollagen Typ I beschichteten Kultivierungsgefäßen gegenüber den standardmäßig verwendeten, unbeschichteten festgestellt werden. Auch die Differenzierung der Zellen wurde nicht beeinflusst.

Mit der BD MatrigelTM-Matrix wurden überwiegend Millicell[®] Zellkulturplatten-Einsätze beschichtet, da diese als Boden eine schneidbare Membran besaßen, wodurch die nachfolgende Einbettung erleichtert wurde. Ein weiterer Grund war, dass die Zellen auf unbeschichteten Millicell[®] Zellkulturplatten-Einsätzen nur schlecht anhafteten und somit eine Anzüchtung ohne Beschichtung schwierig war. Bei der Verwendung von mit BD MatrigelTM-Matrix beschichteten Einsätzen zeigten die Zellen jedoch eine gute Adhärenz. Innerhalb eines Tages setzten sich die Zellen fest und begannen sich zu strecken. Oft bildeten die Zellen keinen gleichmäßigen Zellrasen aus, sondern begannen sofort mit der Koloniebildung. Häufig waren innerhalb einer Woche bis zu 8 mehrschichtige, steckkopfnadelgroße Kolonien makroskopisch sichtbar. Dazu kamen kleinere, nur mikroskopisch sichtbare Zellnester. Im weiteren Verlauf nahm die Größe der bestehenden Kolonien zu. Einige wuchsen zu einer größeren, mehrschichtigen Fläche zusammen. Auch hier konnte die genaue Anzahl der Zelllagen nicht mit dem Invert-Mikroskop festgestellt werden, detaillierten Aufschluss gaben erst die nachfolgenden lichtmikroskopischen Untersuchungen. Selten kam es zu einer gleichmäßigen Besiedlung und einer daraus folgenden einheitlichen Differenzierung.

1.6 Wachstum mit verschiedenen Medien

Die Proliferationsrate und auch der Differenzierungsgrad der angezüchteten Zellen waren abhängig von der Art der verwendeten Nährmedien. Am auffälligsten waren die Unterschiede zwischen den Gruppen der serumhaltigen und serumfreien Medien. Innerhalb dieser beiden Gruppen wurden reproduzierbare Ergebnisse erzielt. Im Folgenden wird auf jedes zur Anzüchtung benutzte Medium separat eingegangen.

1.6.1 DMEM+

Dieses Medium wurde sowohl für die Anzüchtung nach einer Zellisolierung als auch für die normale Kultivierung verwendet. Auch Fibrozytenreinkulturen wurden in DMEM+ kultiviert. Mit diesem Medium wurde ein gutes und zügiges Zellwachstum erreicht. Nur mit Quantum 286 wurden noch bessere Ergebnisse in Bezug auf die benötigte Zeit zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens erzielt. Da Quantum 286 aber noch nicht so lange auf dem Markt ist, wurde während dieser Studien DMEM+ als Standardmedium für die Anzüchtung von bovinen Zellen aus der Klaue verwendet. In den meisten Fällen benötigten die Zellen nach einer Subkultivierung ein bis maximal zwei Wochen zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens. Keratinozyten waren dann als rundliche bis polygonale Zellen mit einem Durchmesser von 20 bis 30 μm sichtbar. Teilweise konnten kleine, dunkle Granula, die bevorzugt in der Umgebung des Zellkerns gelagert waren, beobachtet werden. Fibrozyten stellten sich als spindelförmige Zellen mit einer durchschnittlichen Länge von 30 μm und Breite von 5 μm dar. In Bereichen mit vielen Fibrozyten konnte ein fischschwarmähnliches Muster beobachtet werden. Die Ausbildung von deutlich erkennbaren Keratinozytenkolonien erfolgte vornehmlich in Mischkulturen, und zwar verstärkt ab der nullten bis zur zehnten Passage, sonst erfolgte eine Ausbildung von mehreren Zelllagen ohne eine eindeutige visuelle Abgrenzung.

1.6.2 RPMI+

Dieses Medium wurde häufig zur Anzüchtung von Keratinozytenreinkulturen verwendet. Die Keratinozyten stellten sich als runde Zellen mit einem zentralen Zellkern dar. Ihr Durchmesser lag zwischen 50 und 100 μm . Um den Zellkern gelagert waren wenige, kleine, dunkle Granula sichtbar. Zellfortsätze wurden in der Regel nicht ausgebildet, gelegentlich konnten nur 5 bis 10 μm lange Fortsätze beobachtet werden. Ab der fünfzehnten Passage konnten zunehmend riesige Zellen, die zum Teil einen Durchmesser von 250 μm erreichten, beobachtet werden. Manche dieser Zellen bildeten bis zu 100 μm lange Zellfortsätze aus und oft waren kleine Vakuolen sichtbar. Die Zahl solcher Zellen nahm mit dem weiteren Subkultivieren zu, wahrscheinlich handelte es sich hierbei um einen Alterungsprozess.

Um das Wachstum von Keratinozytenreinkulturen zu steigern, wurde RPMI 1640 (R 8758, Fa. Sigma, Taufkirchen) 20 % FBS zugesetzt. Eine sichtbare Steigerung des Zellwachstums konnte jedoch nicht beobachtet werden. Aber die Anzahl extrem vergrößerter Zellen konnte verringert werden.

Auch Mischkulturen wurden mit RPMI+ kultiviert. Es konnte, vor allem in Bezug auf die Zellmorphologie und Differenzierung, kein Unterschied zu DMEM+ festgestellt werden.

1.6.3 Quantum 286

Mit diesem Spezialmedium für Epithelzellen konnten gute Ergebnisse erzielt werden. Besonders die Geschwindigkeit des Zellwachstums wurde verstärkt (siehe Punkt 1.6.7). Innerhalb von 4 bis 7 Tagen nach einer Subkultivierung wurde von Mischkulturen ein konfluenter Monolayer ausgebildet. Dieser Monolayer bestand aus rundlichen bis polygonalen Zellen mit einem zentralen Zellkern. In der Regel wiesen die Zellen einen Durchmesser um 40 µm auf. Es wurde nur selten die Bildung von kleinen Granula beobachtet. Obwohl Quantum 286 ein Spezialmedium für Epithelzellen ist, wuchsen auch Fibrozyten ausgesprochen gut, was durch die Anzüchtung einer reinen Fibrozytenkultur mit diesem Medium belegt werden konnte. In Mischkulturen konnte immer ein variierender Anteil von Fibrozyten angetroffen werden. Diese Zellen waren spindelförmig, 30 bis 40 µm lang und ca. 5 µm breit.

Eindeutig erkennbare Keratinozytenkolonien wurden selten ausgebildet. Nach dem Erreichen der Konfluenz wurden innerhalb von einer Woche mindestens zwei Zelllagen entwickelt.

Im Gegensatz zu den anderen verwendeten, serumhaltigen Medien hat Quantum 286 den Vorteil, dass es nur ausgewählte Serumbestandteile enthält, somit auch besser standardisiert ist.

1.6.4 Konditioniertes Medium

Für die Herstellung von konditioniertem Medium wurden sowohl RPMI+ als auch DMEM+ als Ausgangsmedium verwendet. Es konnte kein sichtbarer Unterschied in Bezug auf die Wachstumsrate oder die Zelldifferenzierung zu den Ausgangsmitteln festgestellt werden. Dies galt sowohl für Mischkulturen als auch für reine Keratinozytenkulturen.

1.6.5 Gemisch aus serumhaltigen und serumfreien Medien

Dieses Mediengemisch wurde aus zwei unterschiedlichen Gründen verwendet. Einerseits zur Standardanzüchtung, andererseits um eine problemlose Umstellung auf serumfreie Medien zu ermöglichen. Ein abrupter Wechsel von mit FBS supplementiertem Medium zu serumfreiem führte zum Abstreben des mehrheitlichen Anteiles der angezüchteten Zellen.

Die abgestorbenen Zellen lösten sich vom Untergrund, kugelten sich ab und waren dann freischwimmend in Medium sichtbar. Um das zu verhindern, wurden die Zellen langsam an das neue, serumfreie Medium gewöhnt. Als erstes wurde ein Gemisch im Verhältnis 1:1 benutzt, nach 4 bis 6 Tagen wurde der Anteil des serumhaltigen Mediums immer weiter reduziert, bis meist eine Woche später eine vollständige Umstellung vollzogen war.

Wenn ein solches Mediengemisch zur Zellzüchtung genommen wurde, war die Proliferationsrate verlangsamt. Die Zelldifferenzierung wurde aber stimuliert, besonders gut differenzierte und große Kolonien wurden mit diesen Gemischen angezüchtet.

1.6.6 Serumfreie Medien

Die serumfreien Medien werden hier als Gruppe abgehandelt, da mit ihnen vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden. Alle verwendeten serumfreien Medien waren Spezialmedien für Keratinozyten und wurden als Komplettdien erworben.

Nach einer Subkultivierung und einer anschließenden Anzüchtung mit diesen Medien wurden nur wenige, festgesetzte und gestreckte Zellen beobachtet. Es ergab sich aber ein sehr einheitliches Zellbild. Es wurden große, runde Zellen mit einem zentralen, prominenten Zellkern angetroffen. Die Zellgröße variierte jedoch beträchtlich, der Zelldurchmesser erreichte Werte zwischen 40 µm und 100 µm. Zellfortsätze konnten zumeist nicht beobachtet werden. Im Verlauf der weiteren Kultivierung änderte sich das morphologische Erscheinungsbild dieser Zellen. Neben den runden Zellen wurden nun vermehrt polygonale angetroffen. Zusätzlich fingen die Zellen an in alle Richtungen viele, kurze Zellfortsätze auszubilden, wodurch ihre Form einem vielzackigen Stern glich. Auch in konfluenten Bereichen waren die Zellen oft durch viele, sehr kurze Zellfortsätze verbunden, zwischen ihnen war dann ein sehr schmaler Spalt sichtbar. Regelmäßig wurden Zellen mit vielen, kleinen Vakuolen beobachtet, in einigen Fällen füllten diese Vakuolen das gesamte Zytoplasma aus. Der Zeitraum, der nach einer Subkultivierung zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens benötigt wurde, war sehr lang und betrug oft bis zu 6 Wochen. Nach 10 bis 15 Passagen mit diesen Medien wurden von den meisten Zelllinien nur noch ein subkonfluenter Zellrasen ausgebildet.

Versuche, Fibrozytenreinkulturen mit diesen Medien anzuzüchten, misslangen weitestgehend. Es setzten sich nur wenige Zellen fest, nach dem Strecken glichen sie Fibroblasten. Die Teilungsfähigkeit dieser Zellen war beeinträchtigt. Bei einer weiteren Anzüchtung wurden nur wenig Fibrozyten beobachtet.

1.6.7 Quantitative Auswertung des Zellwachstums bei der Verwendung verschiedener Medien

Um die in den vorherigen Abschnitten beschriebenen, von den verwendeten Nährmedien abhängigen Differenzen des Zellwachstums genauer erfassen zu können, wurde die Zellzahl eines p60 einer Zelllinie ermittelt. Auf zehn 6-wells wurden jeweils 10 000 Zellen pro Well ausgesät. Jeweils zwei 6-wells wurden mit dem gleichen Medium beschickt. Aus der Gruppe der serumhaltigen Medien wurden DMEM+, RPMI+ und Quantum ausgewählt. Stellvertretend für die serumfreien Medien wurde MCDB Komplettmedium ausgewählt. Auch ein Gemisch aus serumhaltigen und serumfreien Medien wurde berücksichtigt, hier kam DMEM+/MCDB Komplettmedium in einem Mischverhältnis von 1:1 zum Einsatz. Für jedes Medium wurden parallel zwei Versuchsansätze durchgeführt. Die erste Zählung wurde drei Tage nach dem Aussäen der Zellen durchgeführt. Es folgten 5 weitere Zählungen in einem Abstand von drei Tagen. Der optimale zeitliche Abstand der Zähltermine für die verwendete Zelllinie wurde in einem Vorversuch ermittelt. Größere zeitliche Intervalle führten zu einer fortschreitenden Differenzierung der Zellen. In Folge dieser Differenzierung konnte aufgrund der entstandenen Zellkontakte keine homogene Zellsuspension durch Trypsination gewonnen werden. Es waren viele Zellverbände variierender Größe anzutreffen, die eine genaue Bestimmung der Zellzahl unmöglich machten. Bei jeder Zählung wurde die Zellzahl eines Wells pro Ansatz bestimmt. Um einen exakten Wert zu erzielen, wurde die Zellzahl jedes Wells viermal ausgezählt. Die Auswertung der ermittelten Zellzahlen erfolgte durch einen Vergleich der mittleren Verläufe der logarithmierten Zellzahlen mit SPSS.

Diagramm 1 gibt einen Überblick über den Einfluss der verschiedenen Medien auf die logarithmierte Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit. Bei allen untersuchten serumhaltigen Medien (Medium 1-3) wurde ein konstanter Anstieg der logarithmierten Zellzahl vom Aussäen bis zum dritten Zähltermin ermittelt. Zwischen dem dritten und vierten Termin konnte bei der Anzucht mit DMEM+ (Medium 1) und Quantum 286 (Medium 3) eine weitere Zunahme der logarithmierten Zellzahl beobachtet werden. Bei diesen Medien blieb die logarithmierte Zellzahl von Termin 4 und 5 annähernd unverändert, um beim fünften Zeitpunkt wieder leicht anzusteigen. Die logarithmierte Zellzahl von Termin 3 und 4 war bei einer Anzucht mit RPMI+ (Medium 2) konstant. Am fünften Termin kam es zu einem leichten Absinken der logarithmierten Zellzahl und beim Sechsten zu einem erneuten Anstieg.

Eine Kultivierung mit einem Gemisch aus DMEM+ und MCDB Komplettmedium im Verhältnis 1:1 führte zu einem mit RPMI+ vergleichbaren Verlauf des Anstiegs bzw. Absinkens der logarithmierten Zellzahl. Die ermittelte logarithmierte Zellzahl war hier aber wesentlich niedriger.

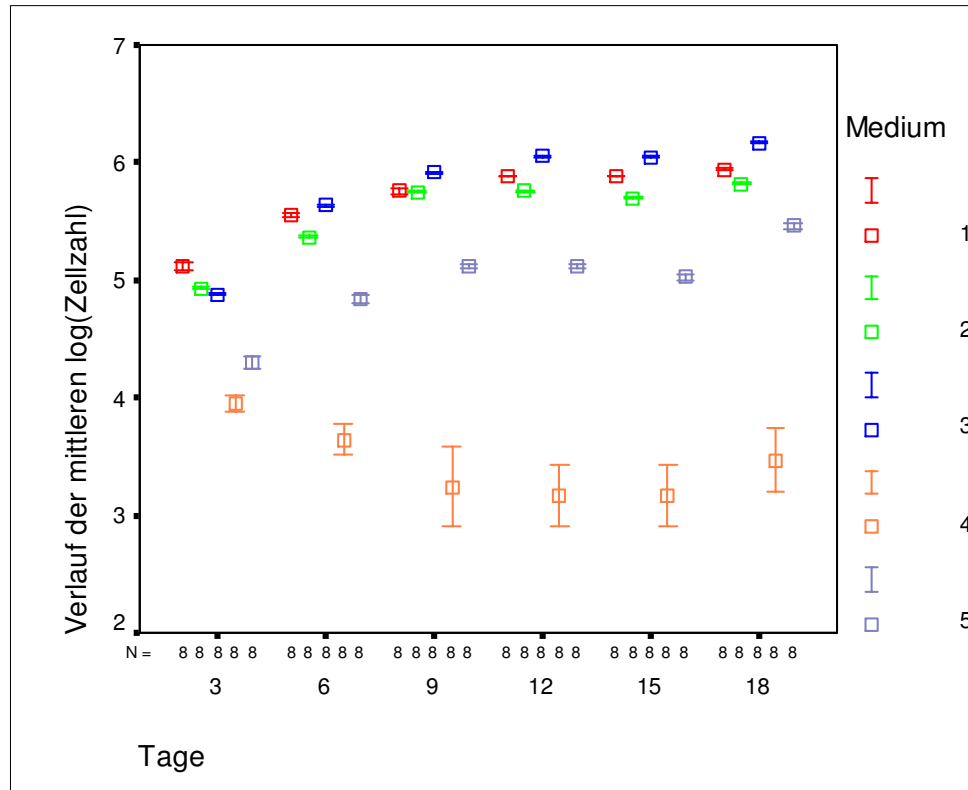


Diagramm 1:

Einfluss der verschiedenen Medien auf die Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit.
 Untersuchte Medien: DMEM+ (Medium 1), RPMI+ (Medium 2), Quantum 286 (Medium 3),
 MCDB Komplettmedium (Medium 4), DMEM+/MCDB Komplettmedium 1:1 (Medium 5)

Eine Anzuchtung mit MCDB Komplettmedium, als Vertreter der Gruppe serumfreier Medien, führte zu einer von allen anderen Medien stark abweichenden Entwicklung der logarithmierten Zellzahl über den Messzeitraum. Auffällig war schon die niedrige logarithmierte Zellzahl bei dem ersten Termin. Sie lag unter der Ausgangskonzentration der ausgesäten Zellen. Sowohl beim zweiten als auch beim dritten Termin wurde ein weiterer deutlicher Abfall der logarithmierten Zellzahl registriert. Bei der vierten Zellzählung war nur noch ein leichtes Absinken festzustellen. Die Messwerte von Termin 4 und 5 waren konstant, bei der letzten Zählung konnte zum ersten Mal ein Ansteigen der logarithmierten Zellzahl beobachtet werden.

Für alle verwendeten Medien werden in den Diagrammen 2 bis 6 die Wechselwirkungen zwischen den Versuchsansätzen und den Zeitpunkten der Zellzählung für die einzelnen Medien dargestellt. Die Diagramme 2 bis 6 sind noch ein Mal in einem größeren Format im Anhang abgebildet. Die am stärksten ausgeprägten Abweichungen der bei den verschiedenen Zeitpunkten in Ansatz 1 bzw. Ansatz 2 ermittelten Zellzahlen waren bei der Verwendung von MCDB Komplettmedium anzutreffen.

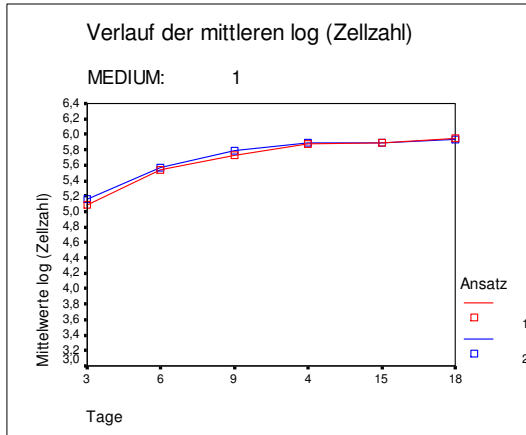


Diagramm 2:
Einfluss von Ansatz und Zeit auf die Zellzahl bei Anzucht mit DMEM+

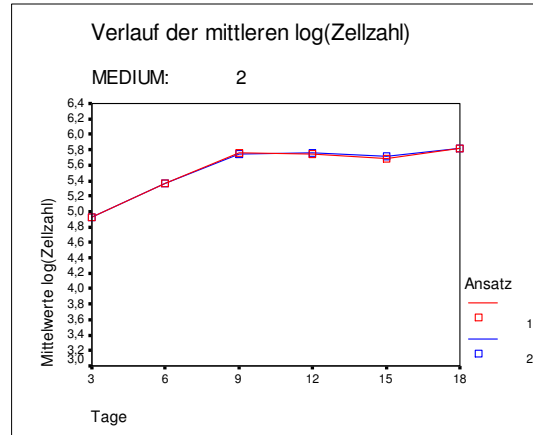


Diagramm 3:
Einfluss von Ansatz und Zeit auf die Zellzahl bei Anzucht mit RPMI+

Zusätzlich verdeutlichen die Diagramme 2-6 noch einmal die Unterschiede der logarithmierten Zellzahl am Zeitpunkt der Zellzählung. Aus der Höhe der ermittelten Zellzahlen konnten Rückschlüsse auf das Zellwachstum gezogen werden. Je größer die Zellzahl war, desto höher waren die

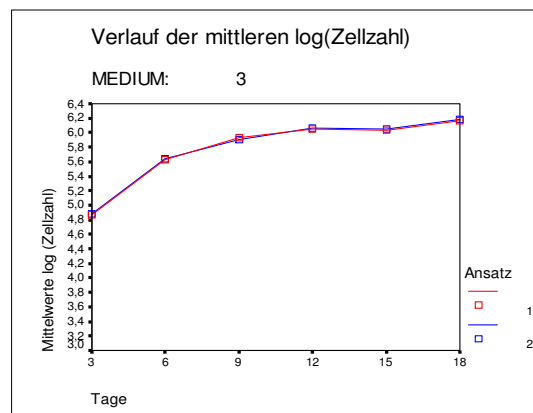


Diagramm 4:
Einfluss von Ansatz und Zeit auf die Zellzahl bei Anzucht mit Quantum 286

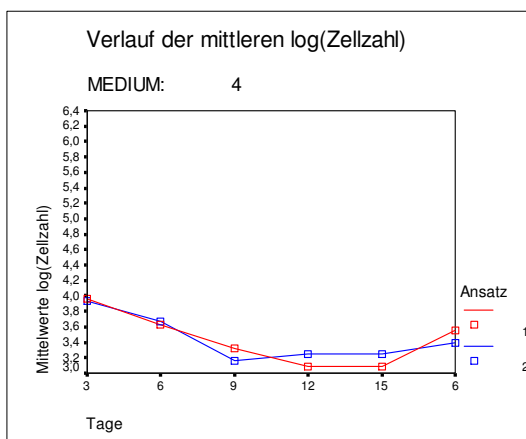


Diagramm 5:
Einfluss von Ansatz und Zeit auf die Zellzahl bei Anzucht mit MCDB Kompletmedium

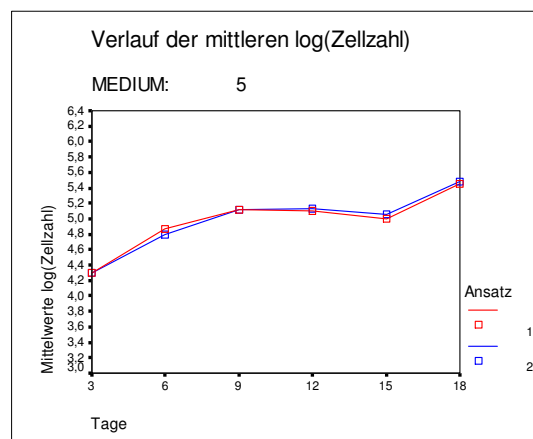


Diagramm 6:
Einfluss von Ansatz und Zeit auf die Zellzahl bei Anzucht der Zellen mit DMEM+/MCDB 1:1

Mitoserate und somit auch die Proliferationsrate der angezüchteten Zellen. Vergleicht man die Mittelwerte der logarithmierten Zellzahl sind die Werte und der Kurvenverlauf der drei serumhaltigen Medien ähnlich. Mit Quantum 286 wurden die höchsten Mittelwerte vom zweiten bis zum dritten Termin erzielt. Betrachtet man das Diagramm 4, so fällt auf, dass bei einer Anzüchtung mit einem Gemisch aus DMEM+/MCDB in Verhältnis 1:1 ein ähnlicher Kurvenverlauf darstellen ließ, nur mit wesentlich geringeren logarithmierten Zellzahlen. Die mit MCDB Kompletmedium ermittelten Werte weichen von denen aller anderen Medien stark ab. Neben den sehr niedrigen Werten für der Mittelwerte und somit auch der logarithmierten Zellzahlen, kam es zu dem abweichenden Kurvenverlauf. Hier konnte erst ein Absinken der Werte, gefolgt von einer Stagnation beobachtet werden. Beim letzten Zähltermin war erstmals ein Ansteigen der Werte sichtbar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei Rückschlüssen von logarithmierten Zellzahlen auf das Zellwachstum mit serumhaltigen Medien, insbesondere mit Quantum 286, die besten Ergebnisse erzielt wurden. Eine Anzüchtung mit DMEM+/MCDB führte zu einem vergleichbaren Verlauf der Zellwachstumsrate aber mit deutlich geringeren Zellzahlen. Dies lässt den Rückschluss zu, dass mit diesem Gemisch, im Vergleich zu den serumhaltigen Medien, eine längere Zeitspanne zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens benötigt wird. Bei der Verwendung von MCDB Kompletmedium kam es sogar zu einer Abnahme der Ausgangszellzahlen und somit zu einer Wachstumsregression. Erst ab dem vorletzten Zähltermin konnte ein Wachstumsanstieg gesehen werden, die Zellzahl war aber immer noch geringer als die Anzahl der ursprünglich ausgesäten Zellen. Diese Befunde korrelieren mit den in den oberen Abschnitten beschriebenen Beobachtungen der Abhängigkeit des Zellwachstums von den unterschiedlichen Medien. Ein Einfluss der verschiedenen Medien auf die Zelldifferenzierung konnte mit diesem Versuchsmodell nicht untersucht werden.

1.7 Wachstum bei verschiedenen Temperaturen

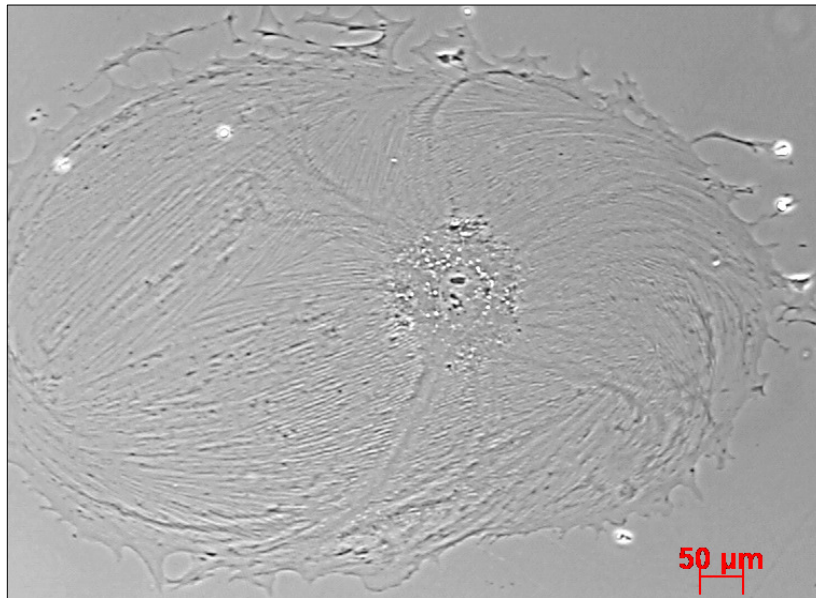
Vier Monate lang wurden Zellen parallel bei 34°C und 37°C angezüchtet, wobei die anderen Parameter unverändert blieben. In der Literatur ist beschrieben, dass eine Anzüchtung bei 34°C den Anteil von Fibrozyten in Kokulturen verringert, da 34°C unterhalb des Temperaturoptimums zur Anzüchtung von Fibrozyten liegen (*Wunn et al., 1999*).

Es wurden unterschiedliche Kulturen, meist Kokulturen aus epidermalen Keratinozyten und Fibrozyten, aber auch Fibrozytenreinkulturen, parallel bei beiden Temperaturen angezüchtet. Die Fibrozytenreinkulturen wuchsen bei jeder gewählten Temperatur. Es konnte nur ein minimaler Unterschied festgestellt werden. Für die Ausbildung eines konfluenten Zellrasens benötigten die bei 34°C angezüchteten Fibrozyten einen etwas

längeren Zeitraum. Fast immer waren es aber nur ein oder zwei Tage. Auch ein Vergleich der Proliferationsrate und des morphologischen Erscheinungsbildes der Kokulturen ergab keine offensichtlichen Unterschiede. Anhand ihrer typischen Morphologie konnten Fibrozyten in den bei unterschiedlichen Temperaturen angezüchteten Kulturen identifiziert werden. Eine Kultivierung bei 34°C führte zu keiner eindeutigen Reduzierung der Fibrozyten in Kokulturen. Auch das Wachstum von reinen Fibrozytenkulturen wurde bei einer Inkubationstemperatur von 34°C nur geringgradig negativ beeinflusst.

1.8 Zellalterung *in vitro*

Mit zunehmender Anzahl der Passagen konnten einige Veränderungen der Zellen beobachtet werden, die auf Alterungsprozesse zurückzuführen waren. In Mischkulturen konnten derartige Veränderungen ab Passage 70 beobachtet werden. Auffällig war eine verstärkte Bildung von Granula. Daneben traten wiederholt folgende Merkmale auf: Vakuolenbildung, Größenzunahme und ein deutliches Sichtbarwerden des Zytoplasmaskelletes.



Textabbildung 10:
Riesige gealterte Zelle mit deutlich sichtbarer Streifung und Zellkernfragmenten.

Bei reinen Keratinozytenkulturen traten schon ab der 25sten Passage Veränderungen auf. Immer weniger Zellen setzten sich nach dem Passagieren fest, auch hier war eine deutliche Größenzunahme bis hin zu riesigen Zellen mit atypischer Morphologie zu beobachten (Textabbildung 10). Diese Zellen konnten einen Durchmesser von einem Millimeter erreichen und wiesen eine streifenartige Zeichnung des Zytoplasmas auf. Des Weiteren konnten sehr häufig Veränderungen des Zellkerns festgestellt werden.

1.9 Lagerung in flüssigem Stickstoff / Wiederauftauen

Die angezüchteten Zellen konnten nach der im Material und Methodenteil beschriebenen Methode problemlos eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Auch nach einem Zeitraum von drei Jahren waren die Zellen nach dem Auftauen vital. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn man den Inhalt eines Kryovials nach dem Auftauen auf ein p60 oder ein Well eines 6-wells aussäte. Für die Adhärenz der Zellen war die Größe der Kultivierungsgefäße zwar ohne Bedeutung, aber die Proliferationsrate war wesentlich höher als bei größeren Gefäßen.

2. Morphologische Charakterisierung der angezüchteten Zellen

2.1 Lichtmikroskopische Untersuchung

Die lichtmikroskopische Untersuchung von eingebetteten und angefärbten Kolonien zeigte, dass die gebildeten Kolonien Unterschiede in ihrer Zellzusammensetzung aufwiesen. Neben reinen Keratinozytenkolonien wurden wiederholt kolonieähnliche Zellansammlungen mit dermalen Anteilen, die meist im Zentrum dieser Gebilde lagen, beobachtet. Des Weiteren wurde eine große Variationsbreite der Kolonien, bezogen auf die Anzahl der gebildeten Zelllagen und die Stadien der Zelldifferenzierung beobachtet. Gut differenzierte Kolonien bildeten bis zu 22 Zelllagen mit spezifischen morphologischen Merkmalen der Klauenepidermis aus. Daneben waren Kolonien, die nur aus 5 bis 10 Zelllagen bestanden und unterschiedliche Differenzierungsgrade aufwiesen, sichtbar.

In einem Versuch konnte eine Kolonie mit bis zu 30 Zelllagen erfasst werden. Sie wies aber eine vorher noch nie gesehene Besonderheit auf, denn sie bestand nur aus undifferenzierten Zellen. Sie waren rund bis polygonal und hatten einen zentralen runden Zellkern. Der Durchmesser aller Zellen lag zwischen 20 und 30 µm.

2.1.1 Kolonieähnliche Zellansammlungen mit Fibrozyten

Bereits während der Anzucht konnten teilweise kolonieähnliche Gebilde von den Kolonien, die ausschließlich von Keratinozyten aufgebaut wurden, visuell unterschieden werden. Es wurden zwar mehrere Zelllagen ausgebildet, aber die für reine Keratinozytenkolonien typischen großen, runden Zellen waren im Anfangsstadium nicht erfassbar. Bei der Bildung einer zweiten und dritten Zelllage kam es zu keiner weiteren Größenzunahme der Zellen. Im weiteren Verlauf waren diese kolonieähnlichen Gebilde als gräuliche oder hellgelbe, mehrschichtige Bereiche in dem Kultivierungsgefäß sichtbar. Die Morphologie der Zellen konnte jetzt nicht mehr beurteilt werden, da einzelne Zellen aufgrund der Ausbildung vieler Zelllagen nicht mehr erkennbar waren. Erst die folgende lichtmikroskopische Untersuchung gab Aufschluss über die Zellzusammensetzung und

die räumliche Anordnung der unterschiedlichen Zellarten innerhalb dieser Gebilde. Normalerweise befand sich im Zentrum eine Region, die aus 3 bis 5 Lagen Fibrozyten bestand. Die Fibrozyten hatten in diesem Bereich Fasern gebildet (Abb. 8a). In der HE Färbung war das Zytoplasma dieser Zellen hellrosa angefärbt. Oft besaßen sie einen schmalen, länglichovalen oder annähernd dreieckigen Zellkern. Um diesen zentralen Bereich waren runde bis polygonale Zellen mit runden zentralen Zellkernen sichtbar. Ein Teil der in der Nähe des Zentrums gelegenen Zellen wies in der HE Färbung ebenfalls ein hellrosa Zytoplasma auf, in den äußeren Zelllagen war es dann jedoch dunkelrosa angefärbt. In manchen Regionen waren die äußersten Zelllagen stark abgeflacht, an anderen waren sie unverändert polygonal.

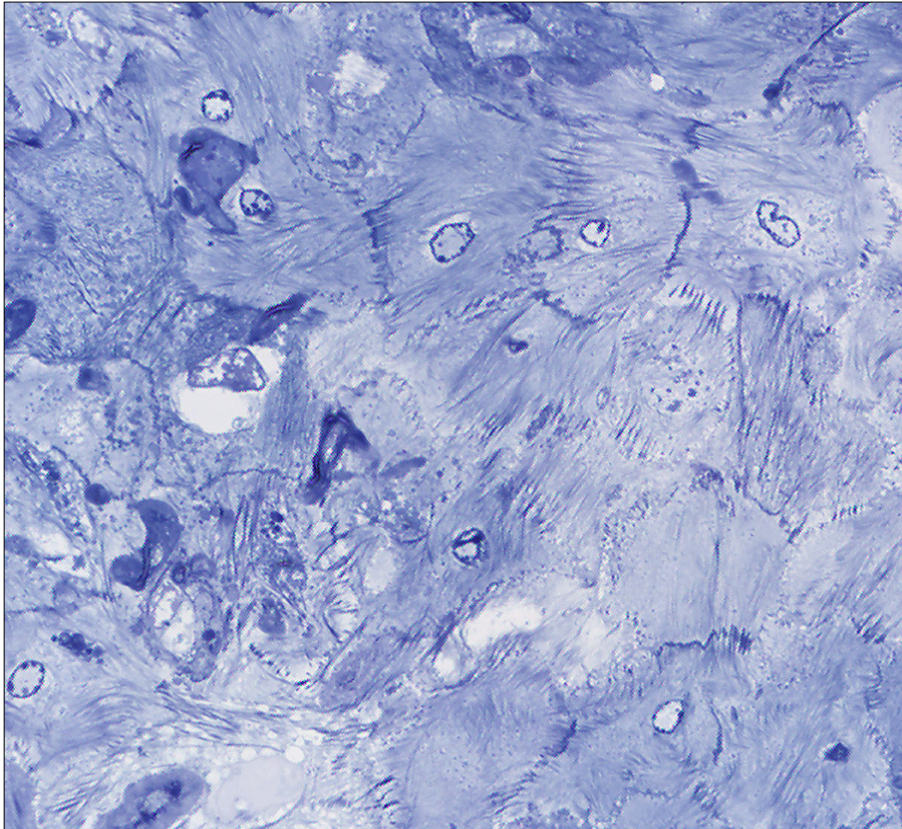
2.1.2 Unvollständig differenzierte Kolonien

Diese Kolonien wiesen zwischen 5 und 9 übereinander geschichtete Zelllagen auf (Abb. 8c), wobei die Anzahl der Zelllagen in Abhängigkeit von der Lokalisation innerhalb eines Präparates leicht variieren konnte. In den unteren zwei bis drei Zelllagen wurden kubische oder polygonale Zellen mit rundlichem, zentral gelegenen Zellkern beobachtet. Danach kam es zu einer von Zelllage zu Zelllage immer stärker werdenden Abflachung der Zellen, wobei die Zellkerne eine länglichovale Form annahmen. In den beiden superfiziellen Zelllagen waren oft sehr stark abgeflachte Zellen mit dunkel angefärbten, strichförmigen Zellkernen sichtbar.

Bei einer Anzucht auf Millicell[®] Zellkulturplatten-Einsätzen wurde häufig die Ausbildung von bis zu 10 Zelllagen umfassenden, unvollständig differenzierten Kolonien, die sich von den oben Beschriebenen unterschieden, beobachtet (Abb. 8b). Das Fehlen der superfiziellen, stark abgeflachten Zelllagen war das auffälligste Merkmal. Direkt auf der Membran des Millicell[®] Zellkulturplatten-Einsatzes waren ein oder zwei Lagen mit polygonalen oder kubischen Zellen anzutreffen. Diese Zellen hatten einen großen zentralgelegenen Zellkern, wobei seine Form variierte. Etwa die Hälfte der Zellen hatte einen runden Zellkern, bei den restlichen war er länglichoval. Darauf folgten mehrere Lagen mit leicht abgeflachten Zellen und länglichovalen Zellkernen. Manchmal waren in den oberen Lagen auch wieder rundliche Zellen mit großen, runden, zentralgelegenen Zellkern sichtbar.

2.1.3 Keratinozytenkolonien mit gewebespezifischer Differenzierung

Die größte angezüchtete und gut differenzierte Kolonie erreichte folgende Maße: 1 cm in der Länge und 0,7 cm in der Breite (Abb. 7c). Kolonien, die eine gewebespezifische Differenzierung aufwiesen, bestanden aus bis zu 22 Zellschichten. Die morphologischen Merkmale dieser Kolonien entsprechen denen der Rinderklauenepidermis *in vivo*. Innerhalb der Kolonien konnten drei unterschiedlich differenzierte Zellschichten erfasst



Textabbildung 11:

Intermediäre Zellschichten, polygonale Zellen mit charakteristischen, stachelartigen Zellfortsätzen
Vergr. 400x

werden. Die undifferenzierte basale Schicht befand sich direkt auf der Oberfläche des Kultivierungsgefäßes und ist vergleichbar mit dem Stratum basale der Klauenepidermis *in vivo*. Hier waren annähernd kubische Zellen mit einem im Zentrum gelegenen Zellkern sichtbar. Darauf folgte eine intermediäre Schicht, die sich aus 10 bis 18 Zellschichten zusammensetzte. Hier waren polygonale Zellen mit vielen stachelartigen Fortsätzen sichtbar (Textabbildung. 11 + Abb. 9a), vergleichbar mit den Zellen des Stratum spinosum der Klauenepidermis *in vivo*. Sowohl das Zytoplasma als auch der Zellkern dieser medialen Zellen konnten mit einer 1%igen Methylenblau-Azur-II-Lösung nur schwach angefärbt werden. Es folgte eine superfizielle Zellschicht bestehend aus 3 bis 5 Zellschichten mit unterschiedlich stark verhornten Zellen (Abb. 9a). Hier waren ungleichmäßig

abgeflachte Zellen sichtbar, die sich mit einer 1%igen Methylenblau-Azur-II-Lösung dunkelblau anfärben ließen. Diese Zellschicht konnte mit den unteren Zellschichten des Stratum corneum der Klauenepidermis *in vivo* verglichen werden.

In den Randbereichen dieser Kolonien war oft keine deutliche Abgrenzung der unterschiedlich weit differenzierten Zellen sichtbar (Abb. 9b). Auch die Anzahl der gebildeten Zellschichten war in diesem Bereich geringer.

2.2 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung

Bei dieser Untersuchung wurden primär Keratinozytenkolonien mit gewebespezifischer Differenzierung und einige unvollständig differenzierte Kolonien berücksichtigt.

Die räumliche Anordnung der Zellen innerhalb der Kolonien wich in manchen Arealen von der Architektur der Klauenepidermis *in vivo* ab. Oft war keine klare räumliche Trennung der unterschiedlich stark differenzierten Bereiche erkennbar. So konnten noch undifferenzierte Zellen, deren Zytoplasma nur eine geringe Anzahl von locker angeordneten Keratinfilamenten enthielt, neben differenzierteren Zellen, deren Zelleiber mit dicken Keratinfilamentbündeln zum Teil fast vollständig ausgefüllt waren, beobachtet werden. Die Anordnung der Keratinfilamente innerhalb der Kolonien folgte keinem Muster, meist variierte sie von Zelle zu Zelle. Alle Zellen waren miteinander über zahlreiche Desmosomen eng verbunden. Die Desmosomen waren über Keratinfilamente am Zytoskelett verankert.

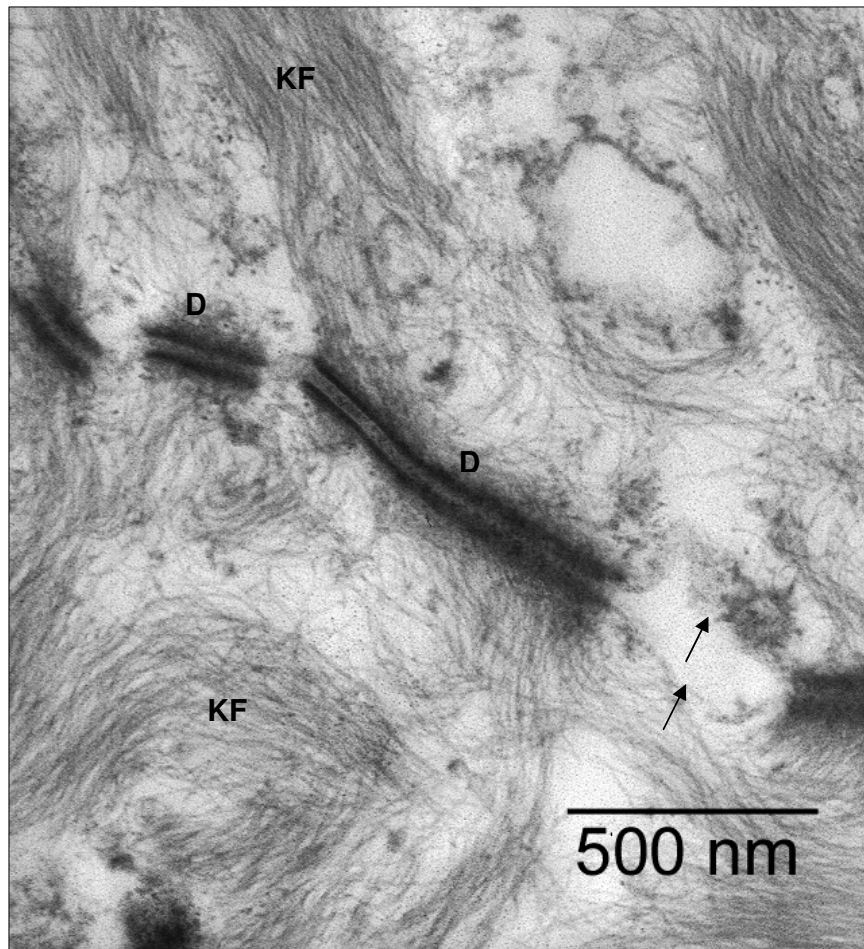
Unvollständig differenzierte Kolonien wiesen keine komplett verhornten Zellen auf. Ebenso fehlten einige Differenzierungsmerkmale. Membrane coating granules (MCG) waren in diesen Kolonien nie sichtbar, folglich fehlte auch der Interzellularkitt. Selten konnte in den oberen Zellschichten eine cornified envelope gesehen werden.

2.2.1 Ultrastruktur der Kolonien mit gewebespezifischer Differenzierung

2.2.1.1 Basale Zellschicht

Diese Zellschicht wurde von rundlichen Zellen (Abb. 10a), deren Durchmesser 7 bis 10 µm betrug, gebildet. Sie hatten einen runden oder leicht ovalen Zellkern, der einen Durchmesser von 4 bis 5 µm aufwies. Oft war ein deutlich ausgebildeter Nukleolus vorhanden. Das Zytoplasma der basalen Zellen wurde von einzelnen Keratinfilamenten oder locker verbundenen, dünnen Filamentbündeln durchzogen. Ein Teil der Filamentbündel zog zu den in großer Zahl ausgebildeten Desmosomen (Textabbildung 12). Zwischen den teilweise scherengitterartig verlaufenden Filamenten oder Filamentbündeln lagen nur wenige Zellorganellen. Sie waren gleichmäßig über das ganze Zytoplasma verteilt. Mitochondrien vom Crista-Typ gehörten zu den am häufigsten

angetroffenen Zellorganellen. Perinukleär war ein schmaler Raum filamentfrei. Es konnte jedoch wiederholt beobachtet werden, dass einige Filamentbündel direkt an die Kernmembran stießen. Manchmal hatte man sogar den Eindruck einige Filamentbündel



Textabbildung 12:

Desmosomen (D) zwischen zwei basalen Zellen
 KF = Keratinfilamente, Pfeil = Plasmalemm

entsprängen an den Kernporen (Abb. 10b). Eine weitere Auffälligkeit war, dass die Zellmembranen oft nur schemenhaft erkennbar waren. Hemidesmosomen wurden niemals ausgebildet, was zu erwarten war, da die Kolonien normalerweise in Kultivierungsgefäßen aus Plastik angezchtet wurden. Somit fehlte direkt auf dem Boden des Kultivierungsgefäßes eine dermale Komponente.

An den Kolonierändern wichen die Befunde etwas ab. An diesen Lokalisationen wurden elektronendurchlässige Zellen mit sehr elektronendichter Zellmembran angetroffen. Im Zytoplasma dieser randständigen Zellen lagen nur wenige dünne, lockergepackte Filamentbündel, Zellorganellen fehlten fast vollständig. Dank zahlreicher Ausstülpungen

des Plasmalemmas und häufiger Anschnitte von Zellfortsätzen stellte sich die Oberfläche der Zellen ausgefranst dar (Abb. 10c).

2.2.1.2 Intermediäre Zellschichten

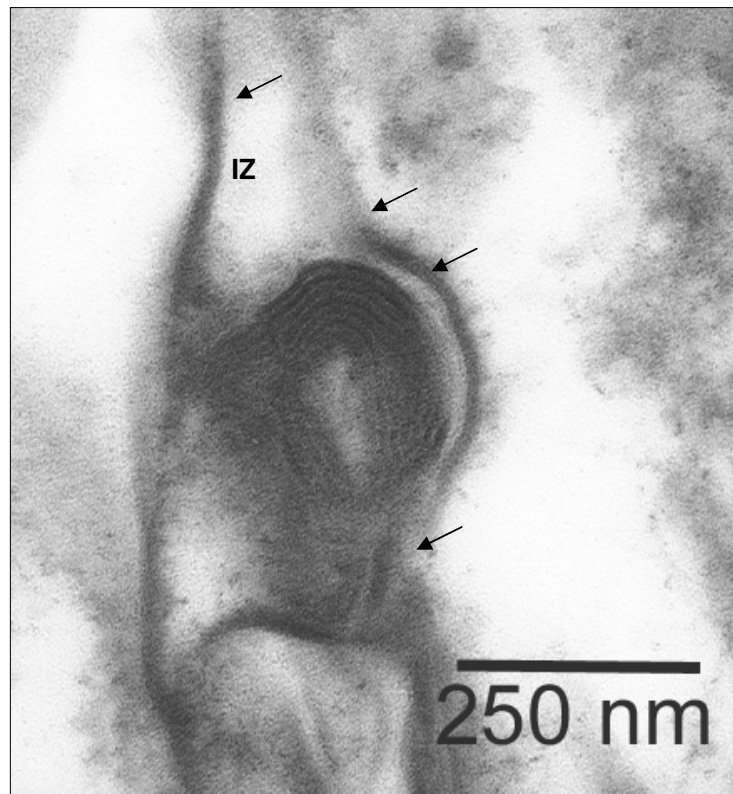
Diesem Bereich gehörten die meisten Zellen an. Die Zellgröße nahm stetig zu, während die Zellkerne zunehmend flacher wurden. Oft hatten die Zellkerne eine länglichovale Form. Der perinukleäre, filamentfreie Raum wurde immer schmaler. In den intermediären Zellschichten konnten im Gegensatz zu den basalen Zellen keine Filamentbündel in der Nähe von Kernwandporen beobachtet werden. In den oberen Zelllagen kam es zu einer immer stärker ausgeprägten Kondensierung des Chromatins. Es war dann überwiegend an die Kernmembran angelagert (Abb. 11a + 11b). Außerdem fiel auf, dass die Kernmembranen mit fortschreitender Differenzierung immer undeutlicher erkennbar waren.

Zahlreiche Desmosomen (Abb. 13b) verbanden die Zellen miteinander. In die intrazellulären Haftplatten der Desmosomen strahlten Keratinfilamente ein. Zwischen den Haftplatten war desmosomaler Haftkitt sichtbar (Abb. 13a). Neben den vollständig etablierten Desmosomen konnte in den unteren Zellschichten auch die Entstehung neuer Desmosomen beobachtet werden (Abb. 12b). Hierbei kam es zur Annäherung der Zellmembranen benachbarter Zellen bis auf 40 nm. Der Interzellularspalt neben diesen Arealen wies eine Breite von 150 bis 320 nm auf. Zusätzlich kam es in den angenäherten Membranbereichen zu einer elektronendichten Verdickung der Membranen und zum Einstrahlen einzelner Keratinfilamente in diese Regionen (Abb. 13c). Abgesehen von den Desmosomen wurden in Zellen mit wenig, locker gepackten Filamenten sehr selten gap junctions gesehen (Abb. 13b). Oft lagen sie in unmittelbarer Umgebung der Desmosomen.

Mit zunehmendem Grad der Zelldifferenzierung kam es durch zahlreiche Zellfortsätze zu einer stärkeren mechanischen Verbindung benachbarter Zellen. Auch die Anzahl der Keratinfilamente nahm stetig zu. Zusätzlich konnte eine Vergrößerung der Keratinfilamentbündel beobachtet werden. Die Verlaufsrichtung der Keratinfilamente bzw. der Keratinfilamentbündel änderte sich von Zelle zu Zelle (Abb. 12a), ein einheitliches Bild ergab sich nicht. Teilweise lagen Zellen mit eher wenig, locker gepackten Keratinfilamenten in direkter Nachbarschaft zu Zellen, deren Zytoplasma fast vollständig mit dicken, dicht gepackten Filamentbündeln ausgefüllt war.

In Zellen mit einer Vielzahl von Keratinfilamenten und einer unterschiedlichen Anzahl von Keratinfilamentbündeln waren MCGs sichtbar. Zum einen wurden runde MCGs, deren Durchmesser mit Werten von 290 bis 400 nm variierte, beobachtet. Die Mehrheit der MCGs hatte einen Durchmesser von 300 bis 320 nm. Zum anderen waren ovale MCGs

mit noch stärker ausgeprägten Größenunterschieden sichtbar. Das kleinste ovale MCG hatte eine Breite von 175 nm und eine Länge von 200 nm, das größte eine Breite von 360 nm und eine Länge von 440 nm. Meist wiesen die MCGs im Inneren eine feinkörnige bis homogene, elektronendichte Struktur auf (Abb. 14a + 14b). Sehr selten wurden MCGs gesehen, deren Inhalt aus übereinandergeschichteten Membranstapeln mit charakteristischer Periodizität bestand (Textabbildung 13). Innerhalb der Zellen lagen die MCGs zunächst zentral. Mit zunehmendem Differenzierungsgrad wanderten sie zur Peripherie, um dann ihren Inhalt, das membrane coating material, in den Interzellularraum mittels Exozytose auszuschleusen (Textabbildung 13).



Textabbildung 13:
Exozytose eines MCGs mit Membranstapeln als Inhalt
IZ = Interzellularspalt, Pfeil = Plasmalemm

In den oberen Zelllagen war Interzellularkitt in blasigen Erweiterungen des Interzellularspaltes sichtbar. Zwischen den Desmosomen kam es zu meist unregelmäßigen, ovalen Erweiterungen des Interzellularspaltes. Diese Erweiterungen hatten eine maximale Breite von bis zu 560 nm und erstreckten sich über eine Länge von bis zu 500 nm. Sie enthielten vorwiegend feinkörnige Kittsubstanz (Abb. 15a), selten wurde eine grobkörnige, mittelgradig elektronendichte Kittsubstanz beobachtet (Abb.

15b). Sowohl MCGs als auch Interzellularkitt konnten nicht in allen untersuchten Kolonien nachgewiesen werden.

In den obersten unverhornten Zellschichten war die cornified envelope, als homogene, elektronendichte, an die innere Oberfläche der Zellmembran angelagerte Linie sichtbar (Abb. 14c). Die Bildung einer cornified envelope wurde in allen gewebespezifisch differenzierten Kolonien beobachtet.

2.2.1.3 Superfizielle Zellschichten

Die superfiziellen Zellschichten bestanden aus maximal 4 bis 5 Schichten unterschiedlich stark verhornter Zellen. Die Desmosomen zeigten fortschreitende Auflösungserscheinungen, wobei der Interzellularspalt in ihrem Bereich eine Breite von 30 nm behielt (Abb. 16a). Zwischen den Desmosomenresten wurden Erweiterungen des Interzellularspaltes von 80 bis 100 nm erfasst. Diese Erweiterungen waren überwiegend elektronendurchlässig, nur selten konnte eine feinkörnige Kittsubstanz beobachtet werden (Abb. 16a). Oft ist eine ausgeprägte Verzahnung der Zellen sichtbar (Abb. 16b).

Häufig waren vollständig mit dicken, dicht gepackten Filamentbündeln gefüllte Zellen anzutreffen (Abb. 16c). Nur in Ausnahmefällen waren vollständig verhornte, kernlose Zellen sichtbar. Auch mit soliden Keratinmassen ausgefüllte Zellen wiesen meist noch einen Zellkern auf. Dieser war entweder stark abgeplattet, oder zeigte eine stark ausgeprägte Kernwandhyperchromasie. Auch pyknotische Zellkerne konnten häufiger beobachtet werden.

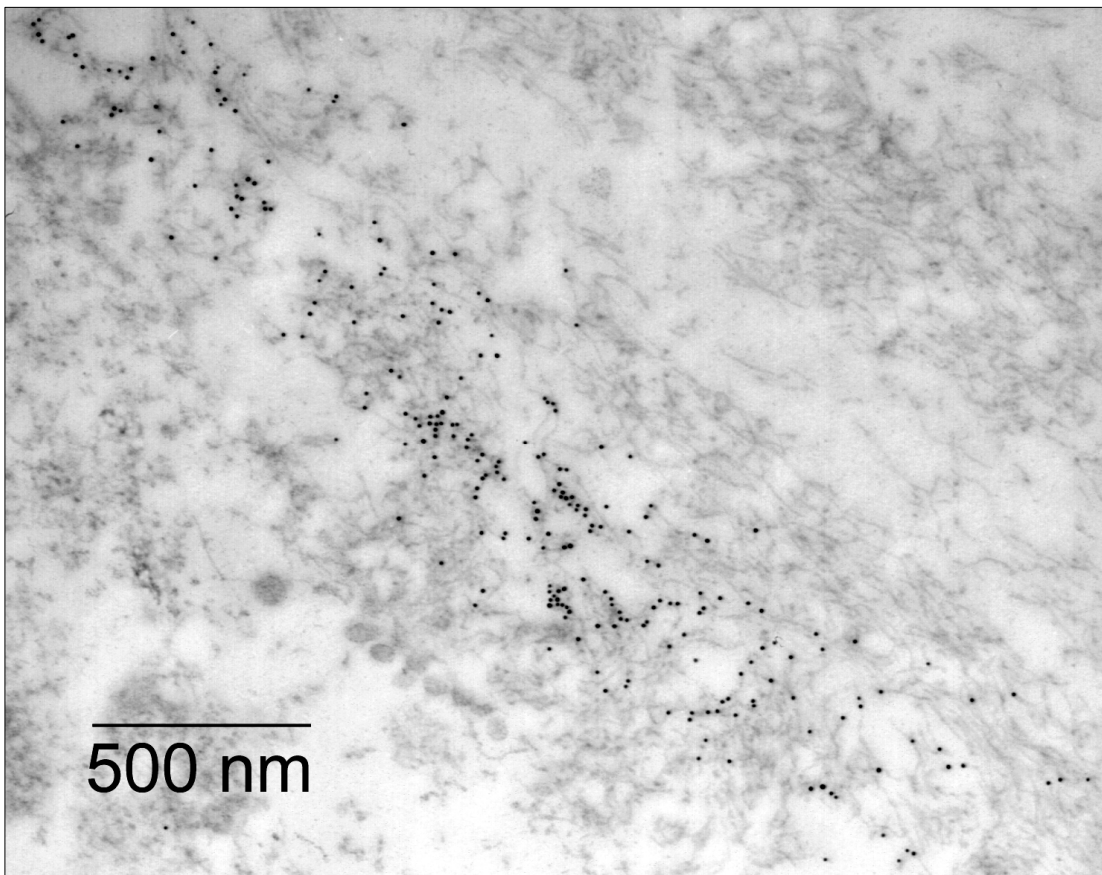
2.2.1.4 Segmentspezifische Differenzierung

In den organotypischen Kulturen konnte unabhängig von dem Ursprungssegment der Keratinozyten keine segmentspezifische Differenzierung beobachtet werden. Ein Stratum Granulosum wurde nie ausgebildet, auch wenn die Keratinozyten aus dem proximalen Abschnitt des Ballensegmentes isoliert worden waren.

3. Immunhistochemische und molekularbiologische Charakterisierung der angezüchteten Zellen

3.1 Immunogold labelling

Zur ultrastrukturellen Charakterisierung der angezüchteten Zellen wurde das immunogold labelling, eine immunhistochemische Methode, angewandt. Es konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den im Transmissionselektronenmikroskop sichtbaren Intermediärfilamenten um Keratinfilamente handelte. Sowohl mit dem monoklonalen Antikörpern AE 1 und AE 3 (Abb. 17a + 17b), als auch mit Antizytokeratin 16 gelang eine Markierung der Intermediärfilamente in den Proben. An den Längs- und Querschnitten der



Textabbildung 14:

Markierung von Keratinfilamenten mit an Protein-A gebundenen 10 nm großen Goldpartikeln, für diesen Nachweis wurde der monoklonale Antikörper AE 1 verwendet

Keratinfilamente waren die an Protein-A gebundenen Goldpartikel als schwarze runde Körnchen mit einem Durchmesser von 10 nm sichtbar (Textabbildung 14). Als Negativkontrolle wurde eine reine Fibrozytenkultur mitgeführt, hier wurden die Intermediärfilamente nicht durch die an Protein-A gebundenen Goldpartikel markiert.

Mit dieser Methode konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den angezüchteten Zellen eindeutig um Keratinozyten handelte, da Keratinproteine spezifisch für Epithelzellen sind. Fibrozyten exprimieren keine Keratinproteine und somit war in der Negativkontrolle auch keine Goldmarkierung sichtbar. Das gleiche gilt für eventuell in kleiner Anzahl mit angezüchtete Melanozyten, die zusätzlich aber schon im Invert-Mikroskop durch das Vorhandensein von Melanin gut von den anderen Zellen abgrenzbar waren.

3.2 ELISA

Für die Durchführung eines ELISA-Tests wurden die Zellen auf Lochplatten mit 96 Vertiefungen angezüchtet. Nachdem in etwa drei Vierteln der Vertiefungen ein subkonfluenter Zellrasen ausgebildet worden war, wurde das Wachstum mit 4%igem Formalin gestoppt. Überwiegend konnten sehr große, teilweise bis zu 200 µm lange Zellen beobachtet werden, wobei viele Zellen eine annähernd rechteckige Form aufwiesen. Mit Hilfe der Farbreaktion



Textabbildung 15:
Nachweis von Keratinen mit AE 3

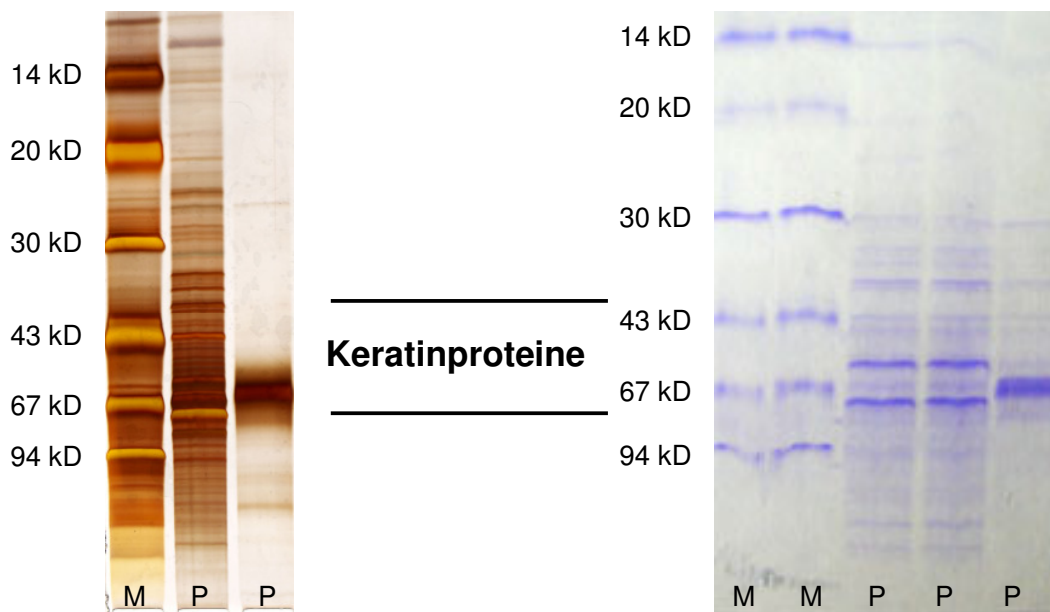
konnten in diesen Zellen sowohl mit den monoklonalen Antikörpern AE 1 (saure) und AE3 (basische) Keratine nachgewiesen werden (Textabbildung 15 + Abb. 17c). In allen durchgeführten Versuchen wurden Keratine im perinukleären Zytoplasma nachgewiesen. Häufig konnten Keratine im gesamten Zytoplasma der Zellen dokumentiert werden. Da Keratine spezifisch für Epithelien sind, konnte somit nachgewiesen werden, dass es sich bei den angezüchteten Zellen um Keratinozyten handelte. Als Negativkontrolle wurden bei der Durchführung eines ELISA-Tests Fibrozyten mitgeführt, die unangefärbt blieben. Zellen, in denen mit dem ELISA-Test Keratine nachgewiesen wurden, konnten nicht weiter angezüchtet werden. Deshalb wurde an Zellen der unterschiedlichen Zelllinien, auch in verschiedenen Passagen stellvertretend, ein ELISA-Test durchgeführt. Das Ergebnis gab Aufschluss über das Verhältnis von Keratinonzyten zu den anderen nicht erwünschten Zellen und war daher entscheidend für eine weitere Kultivierung der dementsprechenden Zelllinien.

Zusätzlich konnte in einigen Zellen Desmoglein mit einem ELISA-Test nachgewiesen werden. Hier ergab sich ein ähnliches Bild (Abb. 17d). Auch bei diesem Nachweis war perinukleär die stärkste Anfärbung sichtbar. Sehr selten konnte Desmoglein im gesamten Zytoplasma nachgewiesen werden.

3.3 SDS-PAGE

Mit der Elektrophorese wurden insgesamt 23 unterschiedliche Proben aufgetrennt. Dabei handelte es sich um unterschiedliche Zelllinien, wobei einige Zelllinien auch in variierenden Passagen untersucht wurden. Zwei Proben (Proben 22 und 23 in Tab. 9) bestanden aus in das Nährmedium abgeschwommen Zellen und kleinen Zellverbänden. Diese wurden solange gesammelt, bis genügend Material für eine Proteinextraktion zur Verfügung stand. In der Literatur wird beschrieben, dass es sich hierbei um differenzierte Zellen handelt, die in Folge ihrer Differenzierung in das Medium desquamieren.

Alle Proben wurden mindestens zweimal elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss an die Auftrennung wurden die Proteinbanden entweder mit einer Coomassie-Blue Lösung



Textabbildung 16:

Darstellung der aufgetrennten Proteinbanden mit einem Silver Staining Kit
M = Marker, P = Probe

Textabbildung 17:

Darstellung der aufgetrennten Proteinbanden mit einer Coomassie-Blue Lösung
M = Marker, P = Probe

(Textabbildung 17) oder einem Silver Staining Kit (Textabbildung 16) sichtbar gemacht. Die Auswertung des entstandenen Bandenmusters erfolgte rein qualitativ, es wurde die Anzahl der Banden und das dazugehörige Molekulargewicht bestimmt. Wobei die Versilberung einer hoch empfindlichen Methode entspricht und auch für den Nachweis geringer Proteinkonzentrationen von bis zu 0,01 mg/ml geeignet ist. Mit dieser Methode konnten in einem Molekulargewichtsbereich von 70 bis über 94 kD maximal 14 meist nur schwach ausgeprägte Banden dargestellt werden. Im Molekulargewichtsbereich von 40 bis 70 kD, der auch die Zytokeratine umfasst, konnten 4 Banden deutlich und 5 sehr

schwach angefärbt werden. Des Weiteren konnten gut 20 unterschiedlich stark ausgeprägte Banden mit einem geringeren Molekulargewicht als 40 kD nachgewiesen werden. Eine Anfärbung mit Coomassie-Blue war dagegen weniger empfindlich, ein Nachweis war bis zu einer Proteinkonzentration von 0,2 mg/ml möglich. Im Molekulargewichtsbereich von 70 kD und schwerer konnten bis zu 6 in der Regel schwach ausgebildete Proteinbanden wahrgenommen werden. Maximal 4 Banden waren im Bereich von 40 bis 70 kD nachweisbar, ebenfalls bis zu 4 Banden konnten im Molekulargewichtsbereich von weniger als 40 kD angefärbt werden.

Die Tabelle 9 gibt eine Übersicht über das Molekulargewicht aller nachgewiesenen Proteinbanden im Bereich zwischen 40 und 70 kD, dies entspricht dem Bereich der Zytokeratine.

Tabelle 9: Molekulargewichte der in den Proben nachgewiesenen Proteinbanden

| Proben Nr. | 41 kD | 43 kD | 45 kD | 46 kD | 50 kD | 54 kD | 55 kD | 57 kD | 58 kD | 62-65 kD | 67 kD |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|
| 1 | | | X | | | X | | | | X | X |
| 2 | | | | | | X | | | | X | |
| 3 | X | | | | | | | | | X | |
| 4 | X | | | | | | | | | X | X |
| 5 | | X | | | X | | | | | | |
| 6 | | X | | X | | X | | | | | X |
| 7 | | | X | | | X | | | | | |
| 8 | | | | | | | X | | | | X |
| 9 | | | | | | | | | | | X |
| 10 | | X | | X | | | X | | | | X |
| 11 | | X | | | X | | | | X | | X |
| 12 | | | | | | | | | | | X |
| 13 | | | | | | | | | | | X |
| 14 | | | | | | | | | | X | X |
| 15 | | | | | | | | | | X | X |
| 16 | | | | | | | | | | | X |
| 17 | | | | | | | | | X | X | X |
| 18 | | | | | | X | | | | | |
| 19 | | | | | | | | | | | X |
| 20 | | | | | | X | | | | | |
| 21 | | | | | | | | X | | | |
| 22 | | | | | | X | | | | | X |
| 23 | | | | | | | | X | | | |

Die am häufigsten nachgewiesene Bande hatte ein Molekulargewicht von 67 kD. Auch Proteine mit einem Molekulargewicht von 62 - 65 kD und 54 kD wurden häufig gesehen.

3.4 Western Blot

Um zu verifizieren, dass es sich bei den mit der SDS-Page dargestellten Proteinbanden tatsächlich um Keratinproteine handelte, konnte im Anschluss ein Western Blot durchgeführt werden. Mit Hilfe einer Antigen-Antikörper Reaktion ließen sich die einzelnen Proteinbanden eindeutig als Keratinproteine identifizieren. Ein Western Blot mit den polyvalenten Antizytokeratinen AE 1 und AE 3 wurde an fast alle Elektrophoresen angeschlossen. Mit dem Antikörper AE 1 reagierten die Proteinbanden mit den Molekulargewichten von 50 kD und 54 kD. Die Banden mit einem Molekulargewicht von 58 kD, 62-65 kD und 67 kD reagierten mit dem Antikörper AE 3.