

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Vergleichende Untersuchungen der Zelloberfläche der Pigmentzellen von Säugern mit Hilfe spezifischer Markierungstechniken

Romani, Nikolaus

1983

Material und Methoden

[urn:nbn:at:at-ubi:2-12519](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:at:at-ubi:2-12519)

MATERIAL UND METHODEN

I. Gewebekultur

1. Wahl des Untersuchungssystems:

Die Untersuchung von Zelloberflächeneigenschaften kann in verschiedenen Systemen durchgeführt werden. Biochemische Verfahren, wie die radioaktive Markierung von Zelloberflächenproteinen und die nachfolgende Analyse auf elektrophoretischem Weg (Gahmberg und Andersson 1977, Gahmberg und Hakomori 1973) fallen von vornherein weg, weil die dazu erforderlichen Quantitäten an Zellmaterial bei M nicht erreichbar sind. Außerdem können damit natürlich keine Verteilungs- und Umverteilungsphänomene auf der Zellmembran erkannt werden. Als weitere Untersuchungssysteme standen zur Auswahl:

A. Histochemische Untersuchungen an Gewebsschnitten:

Es werden Gefrier- oder Paraffinschnitte vom Gewebe angefertigt. Auf den Schnitten werden licht- oder fluoreszenzmikroskopische oder radioaktive Markierungssubstanzen lokalisiert, die im Anschluß an die Herstellung des Schnittes aufgebracht worden sind.

Dieses Untersuchungssystem hat für die Betrachtung von Geweben oder Organen große Vorteile. Beispielsweise können die in ihrem Differenzierungsgrad unterschiedlichen Schichten der Epidermis miteinander verglichen werden (Brabec et al 1980, Reano et al 1982). Es können mit relativ wenig Material relativ große Versuchsserien durchgeführt werden. Histologisches Material kann über längere Zeiträume hinweg gelagert werden.

Diesen Vorteilen stehen einige wesentliche Nachteile gegenüber. Histologische Schnitte stellen stets totes Material dar, welches in einer Reihe von Präparationsschnitten (Fixierung, Wässerung, Einbettung) stark verändert wurde. Bei Gefrierschnitten sind die Veränderungen kleiner, weshalb sie für Immunhistochemie fast ausschließlich verwendet werden.

Die Bewertung von histochemischen Nachweisreaktionen (Fluoreszenz, Enzymreaktionen wie Peroxidase oder alkalische Phosphatase) am Plasmalemma ist histo-

logisch nicht immer zweifelsfrei durchzuführen. Bei Geweben mit eng aneinander schließenden Zellen, wie z.B. Epidermis, ist die Unterscheidung zwischen Markierung des Interzellularspaltes und Markierung der Zelloberfläche unmöglich. Es können also einzelne negative Zellen (z.B. M), welche ganz von positiven Zellen (z.B. K) umgeben werden, nicht eindeutig als negativ erkannt werden. Aus diesen Gründen wurde das eben beschriebene System in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet.

B. Zytochemische Untersuchungen in vitro an Einzelzellen in Suspension:

Die Zellen des zu untersuchenden Gewebes werden enzymatisch (Trypsin, Kollagenase etc.) und/oder mechanisch dissoziiert und in Suspension gebracht. Die Einzelzellsuspension wird mit den Markierungssubstanzen inkubiert. Das System ist einfach und leicht quantifizierbar. Es wird daher in der Immunologie zum Nachweis von Antigenen auf Zelloberflächen häufig verwendet. Beim Arbeiten mit Epidermalzellsuspensionen ergeben sich dabei zwei Schwierigkeiten:

- Im Lichtmikroskop können M und K nicht voneinander unterschieden werden. Es gibt bis jetzt keine kommerziell erhältlichen, spezifisch gegen M gerichtete Antikörper, mit deren Hilfe man die Zellen identifizieren könnte, analog der selektiven Erkennung der Langerhanszellen in der Epidermalzellsuspension durch Färben mit Anti-Ia-Serum beim Meerschweinchen bzw. mit OKT6 beim Menschen (Stingl 1980).
- Bei der enzymatischen Dissoziation der Epidermalzellen (siehe II.2.) werden durch das Trypsin auch Bestandteile der Zellmembran, im besonderen Glykoproteine geschädigt oder entfernt.

Da die Markierungsexperimente unmittelbar nach Fertigstellung der Zellsuspension (d.h. nach Trypsinisierung) durchgeführt werden, könnte dies zu veränderten Ergebnissen führen. Aus den genannten Gründen wurde auch dieses System für diese Arbeit nicht verwendet.

C. Zytochemische Untersuchungen in vitro an kultivierten Zellen:

Das System der Gewebekultur bietet sich für die Fragestellung dieser Arbeit als geeignet an. In der Gewebekultur werden vom Organismus isolierte Zellen in einem künstlichen Medium, welches alle notwendigen Substanzen enthält (Nährsalze, Aminosäuren, Vitamine, Proteine) zum Weiterleben und, soweit möglich, zum Proliferieren gebracht (Paul 1980). Von den 2 Grundkonzepten

der Gewebekultur - Kultur von Zellen in Suspension und Kultur von Zellen auf festen Substraten - wurde zweiteres gewählt, da diese Kulturart dem Charakter der epidermalen Epithelzellen entspricht.

Am Substrat angewachsene M und K lassen sich aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie (Fritsch et al 1981) im Phasenkontrastmikroskop leicht auseinanderhalten (siehe Abb. 2). Die Zellen haben vom Zeitpunkt der Trypsinisierung bis zum Beginn des Experiments ca. 3-6 Tage Zeit, sich von den Trypsinschäden zu erholen. Diese Zeit genügt offensichtlich, um im Zuge der Membraneubildung das Plasmalemma samt seinen Kohlenhydratanteilen (Glykokalyx) vollständig zu reparieren (Davies und Trotter 1981, Gommans und Van den Hurk 1981, Fritsch et al 1975). Aufgrund der häufigen Frequenz freiliegender M in der Kultur und der Möglichkeit, reine M-Kulturen herzustellen, kann dieser Zelltyp im Gegensatz zur Situation bei Schnitten ganz eindeutig auf verschiedene Membranmarkierungen hin beurteilt werden.

Epidermalzellen scheinen sich in Kultur recht ähnlich zu verhalten wie in vivo. Dies wurde für M an Hand einiger typischer Parameter gezeigt (Fritsch et al 1981): M besitzen sowohl in vivo als auch in vitro die typische dendritische Gestalt, eine sehr geringe Beweglichkeit, sie proliferieren kaum und haften sehr stark an ihrem Substrat. K beginnen nach längerer Kulturdauer mehrschichtige Epidermis-ähnliche Gewebe zu bilden (Green et al 1979. Auch bei MZ wurde eine gute Korrelation zwischen der Morphologie in vivo und in vitro gefunden (Foa und Aubert 1977). Diese Übereinstimmungen von in vitro- und in vivo-Verhalten rechtfertigen den Gebrauch von Zellkulturen als Untersuchungssystem.

2. Kulturmethoden:

Prinzipiell werden 2 Arten von Gewebekultursystemen unterschieden: In Suspensionskulturen werden die Zellen im Nährmedium künstlich in Suspension gehalten. Mit Hilfe von Rührvorrichtungen werden die Zellen daran gehindert, sich festzusetzen und auszubreiten. Diese Art der Kultur wird für Epidermalzellen selten verwendet. Der Natur der Epidermalzellen als Epithelzellen entspricht eher der Typ der Monolayer-Kultur. Dabei können die Zellen am Substrat (Glas oder hydrophilisierte Kunststoffe) anhaften, sich dort ausbreiten und wachsen und proliferieren. Die Untersuchungen wurden ausschließlich an epidermalen Monolayer-Kulturen gemacht.

In der Epidermis der Säuger stellen die K mit über 90% der Zellen die überwältigende Mehrheit dar. Die Kultur dieses Zelltyps ist relativ einfach. Es ist möglich, K in großer Menge zu züchten und zu subkultivieren (Rheinwald 1980). Es wurden auch schon Keratinozyten-Zelllinien etabliert.

Die Kultur von M ist wesentlich schwieriger. Es gelingt zwar, die im Ausgangsmaterial befindlichen M zum Anhaften am Substrat und zum Wachstum zu bringen; die Zellen teilen sich jedoch kaum. Mitosen bei M werden in Kultur nur sehr selten beobachtet. Deshalb ist es nicht möglich, große Mengen an M zu züchten (Fritsch et al 1981, Klaus 1980). Mit Hilfe des Tumorpromotors PMA (Phorbol-ester: Phorbol 12-myristat 13-acetat) gelingt es seit kurzem, proliferierende M-Kulturen zu etablieren (Eisinger und Marko 1982). Wegen der möglichen tiefgreifenden PMA-bedingten Zellveränderungen wurde die Methode nicht verwendet. Keratinozyten dagegen proliferieren sehr stark. Da vom Ausgangsmaterial der Kultur, der pigmentierten Epidermis, nur ca. 4-5% M sind, entsteht dadurch folgende Schwierigkeit: inokuliert man eine epidermale Zellsuspension in ein Kulturgefäß, so werden binnen wenigen Tagen die K einen geschlossenen Zellrasen bilden und alle M unter sich begraben. Man muß also die K entweder von vornherein entfernen oder sie daran hindern, alles zu überwuchern. Dies kann auf zweierlei Weise geschehen:

A. Epidermale Mischkultur:

K und M wachsen nebeneinander. Dabei muß die Flächendichte der ausgesäten Zellen optimiert werden. Eine Aussaatdichte von 150-200.000 Zellen/cm² stellte sich als optimal heraus: zwischen K-Monolayern befinden sich genügend einzelne, frei liegende M (Abb. 2). Werden mehr Zellen inokuliert, so überwuchern diese in kurzer Zeit die M; bei weniger Zellen ist die Ausbeute an M zu gering.

B. Melanozytenselektionskultur:

Schon seit den Anfängen der Epidermalzellkultur waren die vorwiegend an M interessierten Gruppen bestrebt, diese Zellen selektiv zu züchten. Dieses Ziel wurde auf verschiedene Weise mehr oder weniger zufriedenstellend erreicht:

- Cruickshank (unveröffentlichte Beobachtungen) nützte die Tatsache aus, daß M wesentlich schneller und besser am Substrat adhäreren als die K. Er drehte einige Stunden nach Aussäen der Zellsuspension einfach die Kulturf Flaschen um: die M blieben haften, die noch nicht attachierten K fielen herunter.

- Prunieras et al hemmten das Wachstum der K durch Zugabe von Natriumzitat zum Kulturmedium (1976).
- Riley (1975) fand, daß die Inkubation der Kulturen in einer angereicherten Sauerstoffatmosphäre (95% O₂) nahezu reine M-Kulturen liefert.
- Fritsch et al (1979a) identifizierten im fötalen Kälberserum einen Faktor, der für das Attachieren der K notwendig ist. M sind von diesem Faktor nicht abhängig. Die Verwendung von Meerschweinchenserum, das diesen Faktor nicht enthält, führte zu relativ reinen M-Kulturen.

Die einfachste und bis dato vor allem an Meerschweinchen-M erfolgreichste Methode wurde in unserem Labor entwickelt.

- Fritsch et al (1979b) fanden, daß die Anhaftung von K an das Substrat Magnesium-abhängig und Kalzium-unabhängig ist. Durch Inkubation der Zellen in Magnesium-freiem Nährmedium während der ersten 24 Stunden wird die Anhaftung der K an das Substrat verhindert. Die M überstehen diese Periode ohne Schaden. Nach sorgfältigem Ausspülen der nicht attachierten K werden die Kulturen in normalen Medien weitergeführt. Diese Kulturen sind in der Regel frei von K (Abb. 3). Deshalb kann auch die Flächendichte beim Aussäen gegenüber der Mischkultur erhöht werden: 250.000 Zellen/cm².

Beide unter A. und B. geschilderten Methoden wurden verwendet. Sie liefern M in ausreichender Quantität zur Durchführung zytochemischer Experimente. Subkultivieren bzw. das Anlegen von Zelllinien ist wegen der geringen Proliferation der M nicht möglich. Aus diesem Grund wurden für alle Experimente dieser Arbeit Primärkulturen verwendet.

3. Untersuchungsmaterial:

A. Tierisches Material:

Die Hautbiopsien stammten von schwarzen oder dunkelbraunen Ohren von Wildtyp Meerschweinchen. Die M-Dichte ist allgemein bei Nagern in den wenig behaarten, deutlich pigmentierten Körperarealen wie z.B. Ohren, Schwanz, Augenlidern, Scrotum am höchsten (vgl. Einleitung I.3.). In den vom Fell bedeckten Körperteilen konzentriert sich die Mehrzahl der M auf die Haarfollikel, welche für Kulturzwecke schwer zugänglich sind. Für einige Versuchsreihen wurden auch Kulturen aus den Ohren von Albinomeerschweinchen angelegt.

B. Humanes Material:

Präparat von menschlicher Haut und Melanomen wurden von der Plastischen Chirurgie erhalten.

- Die Präparate von Normalhaut entstammten verschiedenen Körperteilen: Extremitäten, Rumpfhaut, Mammae, Vorhaut. Auch das Alter der Spender war sehr unterschiedlich.
- Bei Melanompräparaten wurde versucht, wenn möglich, auch Kulturen von der paraläsionalen Normalhaut anzulegen, um den direkten Vergleich von normalen und malignen Zellen ein und desselben Organismus zu erhalten.

Die Melanome wurden ausgewählt, um möglichst das ganze klinische Spektrum dieses Tumors abzudecken, beginnend bei Lentigo maligna über noduläre Melanome bis zu Haut- und Lymphknotenmetastasen (Tab. 2).

4. Procedere zur Herstellung der Kultur:

A. Epidermalzellkulturen aus humaner (H) und Meerschweinchenhaut (MS):

- Die Präparate wurden gewaschen, rasiert (MS) oder sorgfältig vom subkutanen Fett befreit (H).
- Die Trennung der Epidermis von der Dermis erfolgte beim MS durch Abpräparieren von Epidermisstückchen mit dem Skalpell und darauf folgende Trypsinisierung (0,25% Trypsin in PBS ohne Kalzium und Magnesium/30 Min./37°C). Humane Haut wurde in kleine Stückchen geschnitten und ebenfalls trypsinisiert (0,5% Trypsin in PBS ohne Kalzium und Magnesium/über Nacht bei 4°C, anschließend 2-3 Stunden bei 37°C). Bei beiden konnte nun die Epidermis ganz leicht von der Dermis abgezogen werden.
- Die Epidermisstückchen, deren Zusammenhalt durch die Enzymwirkung schon gelockert war, wurden nun mit Hilfe zweier Pinzetten gegeneinander zerrieben. Dabei lösten sich die Zellen voneinander. Es entstand eine Einzelzellsuspension. Dieser Vorgang des "teasens" und die darauffolgenden Waschungen wurden in Nährmedium unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS) gemacht. Das FCS enthält nämlich einen Faktor, welcher die Wirkung des Trypsins hemmt.
- Die Viabilität der Zellsuspension wurde mittels Trypanblau überprüft. In der Regel schlossen mehr als 90% der Zellen den Farbstoff aus, waren also viabel.
- Die Zellsuspension wurde je nach Art der Kultur in normalem Nährmedium für Mischkulturen (Hepes gepuffertes Eagle's Minimal Essential Medium + 10%

Melanome	Anzahl für Lektin- Labeling verwendet	Anzahl für Labeling mit kationis. Ferritin verw.
Lentigo maligna	1	2
Lentigo maligna Melanom (lentiginöser Anteil)	-	1
(nodulärer Anteil)	1	-
Superficial spreading melanoma	3	4
Superficial spreading melanoma (nodulärer Anteil)	1	2
Noduläres Melanom	-	1
Summe der primären Melanome	6	10
Hautmetastasen	2	4
Lymphknotenmetastasen	3	3
Summe der Metastasen	5	7

Tab. 2:

Liste der für Lektin- und kationisiertes Ferritin-Labeling verwendeten Melanomzellkulturen.

FCS + 1,2% L-Glutamin + 0,1% Gentamicin) in einer Dichte von ca. 180.000 Zellen/cm² oder in sogenanntem Selektionsmedium (Hepes gepuffertes Eagl's Minimal Essential Medium für Suspensionskulturen ohne Magnesium + 20% FCS + 1,2% L-Glutamin + 0,1% Gentamicin) in einer Dichte von 250.000 Zellen/cm² ausgesät. Die Zellen wurden je nach Untersuchungsmethode in 8cm² Gewebekultur-Petrischalen oder auf speziellen gekammerten Gewebekulturobjektträgern für Elektronenmikroskopie und auf gewöhnlichen Deckgläschen (hydrolytische Klasse I) für die Fluoreszenzmikroskopie gezüchtet.

- Die Kulturen wurden bei 37°C in normaler Atmosphäre inkubiert. Alle 2 Tage wurde das Medium gewechselt.

B. Kultur von Melanomzellen (MZ):

Prinzipiell wurden MZ in der gleichen Weise kultiviert, dennoch ergaben sich bedingt durch die Beschaffenheit malignen Gewebes einige Unterschiede.

- Primäre noduläre Tumoren und Metastasen bilden in der Regel recht lockere Anhäufungen von Tumorzellen. Eine Trypsinbehandlung zur Gewebdissoziation war also nicht notwendig. Die Tumoren wurden in kleine Stückchen geschnitten und mit 2 Pinzetten fein zerrieben. So ergab sich eine sehr hohe Ausbeute an viablen Zellsuspensionen.
- Primäre, oberflächlich sich ausbreitende Melanome (Lentigo maligna, Lentigo maligna Melanom, superficial spreading melanoma), bei denen neben den MZ auch noch reichlich K vorkommen, mußten analog dem Procedere für Normalhaut trypsinisiert und weiter verarbeitet werden.

Die MZ-Kulturen wurden in Hepes gepuffertem Eagle's Minimal Essential Medium + 10% FCS + 1% L-Glutamin + 0,1% Gentamicin gehalten. Zur Förderung des Anwachsens der MZ am Substrat wurde während der ersten 1-2 Tage 20% FCS verwendet.

II. Lektine

1. Definition und Charakterisierung der Lektine:

Die Lektine wurden durch ihre Fähigkeit bekannt, Erythrozyten zu agglutinieren. Daher rührt ihr früherer Name: Phytohämagglutinine. Der Name Lektin kommt von lat. "legere", d.h. auslesen. Lektine sind Proteine, mit der Eigenschaft, spezifische Zuckergruppen "auszulesen", d.h. zu binden (Lis und Sharon 1981).

Sie besitzen 2 oder mehrere Bindungsarme, mit denen sie Brücken zwischen Membranglykokonjugaten verschiedener Erythrozyten schlagen. Dadurch agglutinieren die Zellen. Die Lektine stammen vorwiegend aus Pflanzensamen (z.B. Sojabohne, Erdnuß, verschiedene anderen Leguminosen, Kartoffel etc.), aber auch aus tierischen Geweben (z.B. Weinbergschnecke).

Die Eigenschaft der Hämagglutination wird zur Charakterisierung der Zuckerspezifität der Lektine herangezogen. Die Agglutination kann durch Zugabe von einfachen oder komplexen Zuckern verschieden stark gehemmt werden. Dementsprechend lassen sich die Lektine in 5 übergeordnete Spezifitätsgruppen (Goldstein und Hayes 1978) einteilen (siehe Tab. 3). Diese Gruppen korrelieren genau mit den an Zelloberflächen vorkommenden Zuckern (siehe Tab. 1).

In der Regel läßt sich die Agglutination besser mit Oligosacchariden oder mit an Proteine gebundenen "Neoglykoproteinen" (Lee et al 1976) hemmen, als mit einfachen Monosacchariden (Debray et al 1981). Das bedeutet, daß es innerhalb der großen Spezifitätsgruppen feine Spezifitätsunterschiede zwischen den einzelnen Lektinen gibt. Das hat seinen Grund in den sterischen Bedingungen, der Lektin-Zuckerbindung. Beispielsweise ist PNA ausschließlich spezifisch für terminale nicht reduzierende β -Galaktose (Gal). Die Bindung ist jedoch um vieles stärker, wenn subterminal auf diese Gal ein N-Azetyl-Galaktosamin (GalNAc) folgt (Lotan 1975). Lektine binden bevorzugt an die Endglieder von Zuckerketten. Es gibt aber auch hier Unterschiede: z.B. erkennen Con A und WGA sowohl terminale als auch intern gestellte Zuckermoleküle. Andere Lektine wie das erwähnte PNA, binden ausschließlich terminale Einheiten; wieder andere, wie STA bevorzugt interne. Manche Lektine können zwischen den α - und β -Anomeren unterscheiden. Ein weiteres Gegensatzpaar bilden das β -Gal-spezifische PNA und das strikt α -Gal spezifische GS I-B₄, ein Isolektin des GSA I (Murphy und Goldstein 1977). Die genauen Spezifitäten der in dieser Arbeit verwendeten Lektine sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

2. Prinzip der Methode:

A. Lektinmarkierung:¹⁾

Die Zellkulturen werden in situ mit den Lektinen inkubiert. Die Bindung an

¹⁾ In weiterer Folge werden die englischen Begriffe "label" bzw. "labeling" synonym für "Markierung" verwendet.

Verwendete Lektine	Abkürzung	Übergeordnete Zuckerspezifität (Abkürzung)	Feinspezifität	humane Blutgruppen-spezifität	verwendete Hemmzucker (O,1-O,2Molar)
Concanavalin A succinyliertes ConA Lens culinaris Ag ⁴ Pisum sativum Ag	ConA succ. ConA LCA PSA	D-Mannose (D-Man) D-Glukose (D-Glc)	α-D-Man > α-D-Glc > α-D-GlcNAc	unspezifisch	α-methyl-D-glucopyranosid
Wheatgerm Ag succinyliertes WGA Solanum tuberosum Ag Griffonia ¹⁾ simplicifolia Ag II GSA II	WGA succ. WGA STA GSA II	N-Azetyl-D-Glukosamin (GlcNAc)	β-D-GlcNAc; NANA ²⁾ β-D-GlcNAc β-D-GlcNAc β-D-GlcNAc = α-D-GlcNAc	unspezifisch	N'-diacetyl-chitobiose
Ulex europaeus Ag	UEA I	L-Fukose (L-Fuc)	α-L-Fuc	O	L-Fukose
Ricinus communis Ag I Ricinus communis Ag II (=Ricinus toxin, Ricin) Griffonia ¹⁾ simplicifolia Ag I GSA I Peanut Ag	RCA I RCA II GSA I PNA	D-Galaktose (D-Gal)	β-D-Gal > α-D-Gal β-D-Gal > D-GalNAc α-D-Gal > α-D-GalNAc β-D-Gal (1 3)-D-GalNAc	unspezifisch B >> A A, B, O ³⁾	Laktose Melibiose α-methyl-D-galactop.
Soybean Ag Helix pomatia Ag Dolichos biflorus Ag. Sophora japonica Ag	SBA HPA DBA SJA	N-Azetyl-D-Galaktosamin (GalNAc)	α-D-GalNAc > β-D-GalNAc α-D-GalNAc > α-D-GlcNAc α-D-GalNAc > α-D-Gal β-D-GalNAc > β-D-Gal	A A A ₁ >> A ₂ A	N-acetyl-D-galactopyranosid

Tab. 3:

Verwendete Lektine und Hemmzucker, sowie Zuckerspezifitäten der Lektine nach Goldstein und Hayes (1978). (1) früher: Bandieraea; (2) N-Azetyl-Neuraminsäure, Sialinsäure; (3) erst nach Behandlung der Erythrozyten mit Neuraminidase. (4) Ag = Agglutinin.

die Zelloberfläche wird evaluiert: Positive Resultate können auf 2 Weisen interpretiert werden:

- Der entsprechende Zucker befindet sich auf der Zelloberfläche.
- Das Lektin bindet unspezifisch, d.h. nicht über seine Zuckerbindungsstellen an das Plasmalemma. Diese Möglichkeit kann durch die Zuckerkontrolle ausgeschlossen werden: Das Lektin wird mit seinem spezifischen Hemmzucker im Überschuß vorinkubiert (oder gleichzeitig inkubiert). Der Zucker besetzt alle Zuckerbindungsstellen des Lektinmoleküls. Das so gehemmte Lektin kann also nicht mehr an die Zellen binden. Tut es das dennoch, so kann diese Bindung nur unspezifischer Natur sein (Lotan 1979).

Bei negativen Resultaten gibt es 3 Möglichkeiten:

- Der entsprechende Zucker ist nicht auf der Zelloberfläche.
- Der entsprechende Zucker ist durch andere Zuckermoleküle an der gleichen oder an benachbarten Ketten maskiert. Er ist für das Lektin nicht zugänglich. Diese Möglichkeit kann durch den Einsatz von spezifischen Exoglycosidasen (z.B. Neuraminidase), welche die terminalen Zuckergruppen abspalten, geprüft werden.
- Das Lektin ist nicht aktiv. Das kann durch unsachgemäßen Transport oder Lagerung geschehen. Lektine, welche aus einer großen Zahl von Untereinheiten bestehen (z.B. Limulus polyphemus Agglutinin) sind dafür besonders anfällig. Die Lektine müssen also vor Gebrauch an einem etablierten System getestet werden, d.h. an Erythrozyten der mit diesem Lektin agglutinierbaren Blutgruppe.

B. Markierungstechniken:

Die angewendeten zytochemischen Markierungsmethoden entsprachen im Wesentlichen denen der Immunfluoreszenz und Immunelektronenmikroskopie. Die Lektine müssen für die Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden (Fig. 4).

Bei den direkten Techniken wird das Lektin dazu mit einem geeigneten Marker gekoppelt (Fig. 4). Im vorliegenden Fall wurden folgende Marker verwendet:

- Fluorescein-isothiocyanat (FITC) und Tetramethylrhodamin-isothiocyanat (TRITC) für die Fluoreszenzmikroskopie, sowie
- Meerrettichperoxidase (HRP - von engl. horseradish-peroxidase) für die Elektronenmikroskopie (vgl. II.4.).

Alle Lektine wurden bereits als FITC, TRITC oder HRP-Konjugate gekauft.

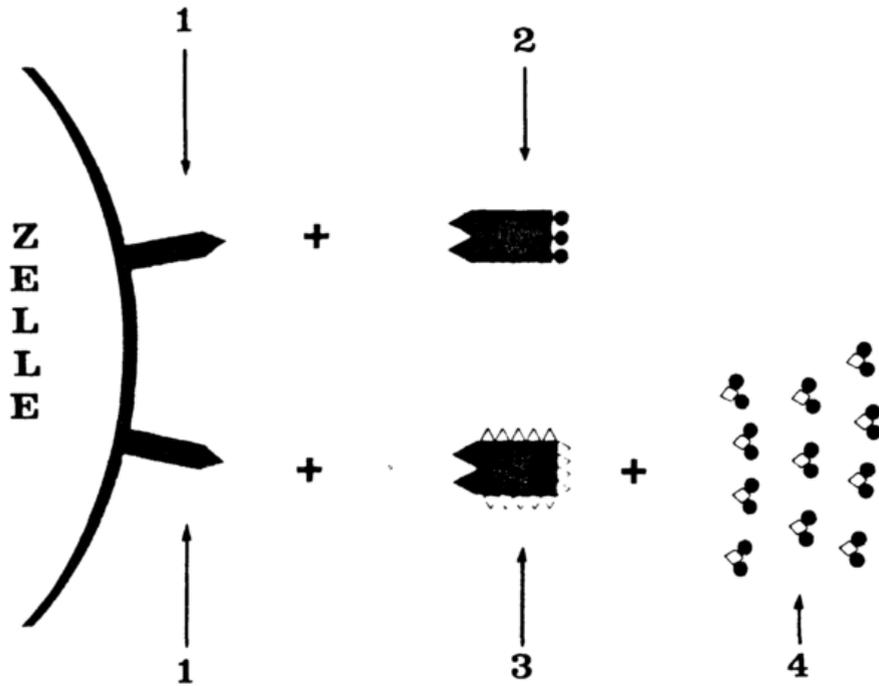


Fig. 4:

Lektin-Labeling: Direkte Technik (oben): An das Zelloberflächenkohlenhydrat (1) bindet das direkt HRP- oder FITC (●) gekoppelte Lektin (2). Indirekte Technik (unten): An das Zelloberflächenkohlenhydrat (1) bindet das biotinylierte (ΔΔ) Lektin (3), gefolgt von HRP- oder FITC (●) gekoppeltem Avidin (4). Man beachte, daß bei der indirekten Technik viel mehr HRP bzw. FITC Moleküle auf einen Lektinrezeptor (1) entfallen (Multiplikationseffekt).

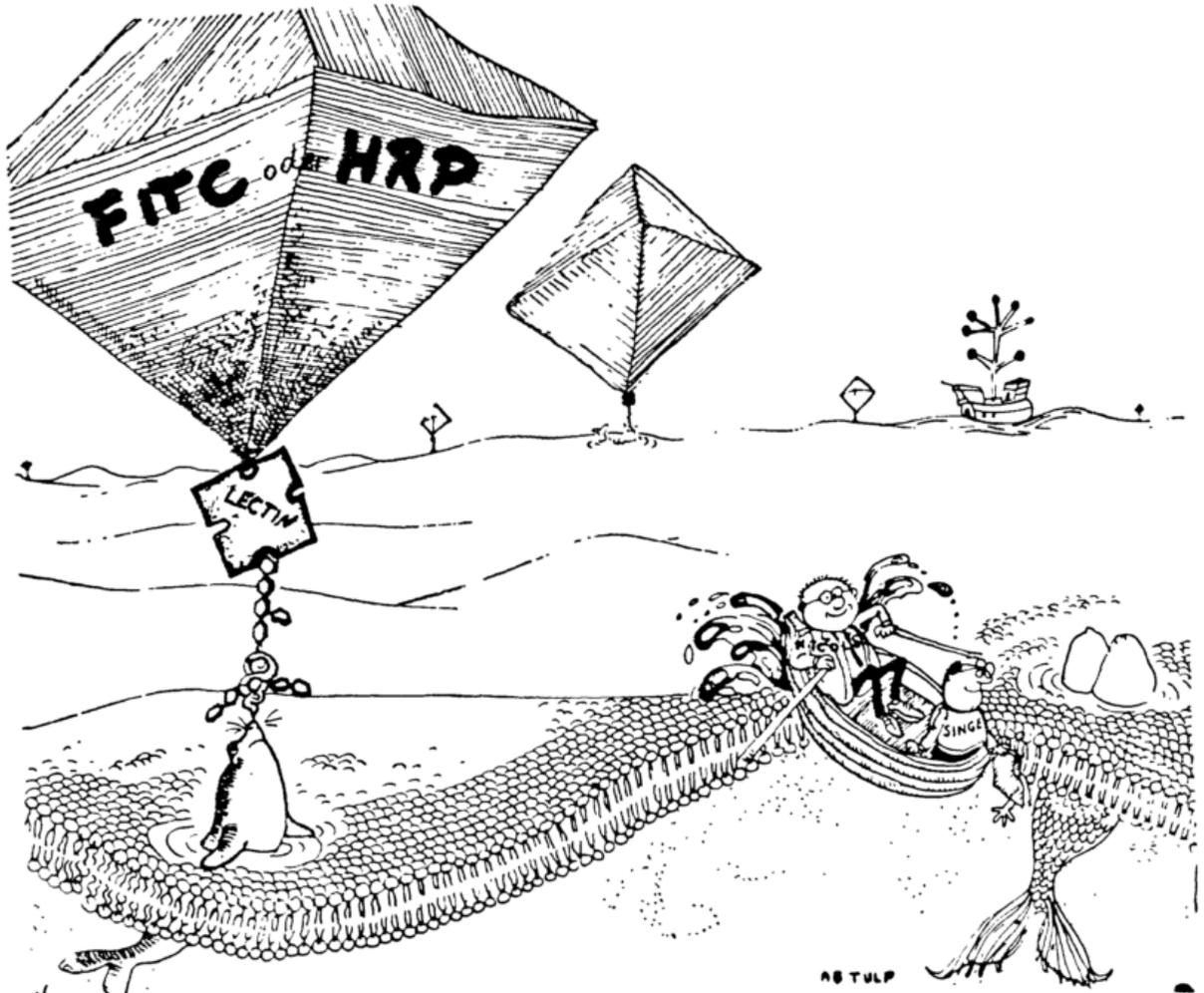


Fig. 4:

Direkte Technik zum Nachweis von Membranglykokonjugaten. Das tetravalente, direkt an FITC, TRITC oder HRP gekoppelte Lektin bindet an die Oligosaccharidkette (👁👁👁) eines integralen Membranglykoproteins (Seehund). Phospholipid-Doppelschichte (👁👁👁👁); weiters integrales Membranprotein (Nixe), peripheres Membranglykoprotein (Schiff; Mast = Oligosaccharid), im Ruderboot: Singer und Nicolson (1972). Zeichnung: Collard, aus: Monsigny und Schrével 1979.

Die direkte Technik hat den Vorteil der einfachen Versuchsanordnung. Eine einstufige Technik mit relativ wenigen Waschschrritten ist für viable Zellen schonender als eine Mehrstufentechnik. Sie wurde deshalb in erster Linie angewendet.

Indirekte Techniken sind durch den Multiplikationseffekt (siehe Fig. 4) sensitiver als die direkte Technik. Das ist zu bedenken, wenn die Dichte des Rezeptors, Antigens oder - im konkreten Fall - der Zuckerreste auf der Zelloberfläche gering ist. In der indirekten Immunfluoreszenz wird auf den unge-

koppelten ersten Antikörper ein FITC/TRITC/HRP gekoppelter zweiter Antikörper gegeben (Wick et al 1976). Bei den Lektinen wurde aus der Palette von indirekten Techniken die "Biotin-Avidin-Methode" ausgesucht (Fig. 4). Sie beruht auf der hohen Affinität von Biotin und Avidin zueinander (Skutelsky und Bayer 1979). Im ersten Schritt werden die Zellen mit den biotinylierten Lektinen inkubiert, im zweiten Schritt bindet sich das Avidin-FITC/TRITC/HRP-Konjugat an das Biotin.

C. Inkubationsbedingungen:

Es wurden viable, nicht vorfixierte Zellen für die Experimente verwendet, um mögliche, durch die Fixierung verursachte Veränderungen der Zelloberflächen-glykokonjugate (Temminck et al 1975) - insbesondere die Aufdeckung von maskierten Lektinrezeptoren, auszuschließen. Prinzipiell muß bei jeder Membranmarkierung die Aufnahme des Markers durch Endozytose und seine Umverteilung in der Ebene der Zellmembran verhindert werden. Aus diesem Grunde wurden alle Lektinlabeling-Experimente bei 4°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur ist die laterale Beweglichkeit von Membrankomponenten und das Endozytosevermögen vernachlässigbar klein. Zusätzlich dazu wurde allen verwendeten Inkubations- und Waschlösungen 0,02% Natriumazid zugesetzt (nicht bei HRP-Konjugaten). Das Natriumazid hemmt alle energieabhängigen Membranprozesse (Wick et al 1976).

3. Fluoreszenzmikroskopie:

Lektinkonzentrationen:

Die "optimalen Sättigungskonzentrationen" der Lektine wurden in Vorversuchen ermittelt. Dabei wurden Deckglaskulturen von Epidermalzellen (bei UEA I humane Erythrozyten der Blutgruppe O) mit steigenden Lektinkonzentrationen inkubiert. Die höchste, eindeutige Membranfluoreszenz ergebende Lektinkonzentration, bei der die Kontrolle mit dem spezifischen Hemmzucker noch vollständig negativ war, wurde als optimale Sättigungskonzentration bezeichnet. Diese Konzentrationen lagen für die verschiedenen Lektine zwischen 25 und 200µg/ml (Tab. 4). Alle Lektine wurden in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS pH 7,35) + 0,02% Natriumazid (= PBS-azid) verdünnt, ausgenommen LCA und PSA, welche in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS pH 7,35) + 0,02% Natriumazid + 1mM MnCl₂ + 5mM CaCl₂ (= TBS-azid) verdünnt wurden.

Verwendete Lektine	FITC ¹ gekoppelt	TRITC ¹ gekoppelt	biotinyliert ²	HRP ² gekoppelt
ConA	25	25	50	n.d.
succ.ConA	25	50	n.d.	n.d.
LCA	25 ³	100	50	n.d.
PSA	25 ³	100	50	n.d.
WGA	25	50	n.d.	n.d.
succ.WGA	50	200	n.d.	n.d.
STA	50	n.d.	n.d.	n.d.
GSA II	100	n.d.	n.d.	n.d.
UEA II	100	200	n.d.	200
RCA I	50	50	n.d.	n.d.
RCA II	25	n.d.	n.d.	n.d.
GSA I	25	100	n.d.	n.d.
PNA	50	200	50	200
SBA	50	200	50	200
HPA	50	200	50	200
DBA	100	200	50	200
SJA	100	200	50	200

Tab. 4:

Verwendete Lektinkonzentrationen: Lektine wurden verdünnt in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) unter Zusatz von 0,02% Natriumazid (1), in PBS ohne Natriumazid (2) und in Tris-HCl gepufferter Salzlösung unter Zusatz von 0,02% Natriumazid, 1mM MnCl₂ und 5mM CaCl₂ (3). Konzentrationen in µg/ml. Nicht durchgeführt (n.d.).

Labeling-Prozedur:

3-6 Tage alte Primärkulturen auf Deckgläsern wurden sorgfältig mit PBS-azid gespült und anschließend mit Lektinkonjugaten 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS-azid wurden die Kulturen in 4%-igem Paraformaldehyd in PBS-azid (20 Minuten, 4°C) fixiert, wieder gespült und, mit der Kulturseite nach unten in PBS-azid auf Glasobjektträger aufgebracht. Die Experimente wurden mindestens dreimal mit verschiedenen Kulturen gemacht. Die einzelnen Versuchsansätze wurden im Duplikat (d.h. 2 Deckgläser pro Ansatz) geführt (Tab. 5).

Kontrollen:

Die folgenden Kontrollen wurden mitgeführt:

- Inkubation der Kulturen mit dem Lektin in Gegenwart seines spezifischen Hemmzuckers (0,1-0,2 Molar) (siehe Tab. 3).
 - Inkubation der Kulturen mit dem Lektin in Gegenwart eines nicht-Hemmzuckers (0,1 Molar). Damit sollen unspezifische Veränderungen der Zelloberfläche durch die veränderte Osmolarität ausgeschlossen werden.
 - Inkubation von vorfixierten Kulturen (4%-iges Paraformaldehyd in PBS, 15 Minuten, 4°C).
 - Ersatz der Lektininkubation durch PBS. Dadurch wird der Grad der Autofluoreszenz geprüft.
 - Ersatz der Lektininkubation durch FITC und TRITC gekoppelt an bovines Serumalbumin, um unspezifische Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes auszuschließen.
- Nur die 1. und 4. Kontrolle wurde routinemäßig mitgeführt, die anderen Kontrollen wurden stichprobenmäßig gemacht.

Biotin-Avidin-Methode:

Wurde analog ausgeführt, wie im nächsten Punkt für die Elektronenmikroskopie beschrieben.

Evaluation:

Die Präparate wurden in einem Leitz-Ortholux-Auflichtfluoreszenzmikroskop aufgewertet. Die Zellen wurden anhand der beschriebenen morphologischen Kriterien (Fritsch et al 1981) im Durchlicht bzw. im Phasenkontrast identifiziert. Membranfluoreszenz stellt sich bei Zellsuspensionen als distinkter leuchtender Zellrand dar. Dieses Phänomen entsteht durch die Superimposition

Lektine	Melanoz. + Keratinoz.	Melanoz. + Keratinoz.	Melanomzellen
	Meerschweinchen	Mensch	Mensch
	FM/EM	FM/EM	FM/EM
ConA	+/+	+/-	+/-
succ. ConA	+/-	+/-	-/-
LCA	+/+	+/-	-/-
PSA	+/+	+/-	-/-
WGA	+/-	+/-	+/-
succ.WGA	+/-	+/-	+/-
STA	+/-	+/-	-/-
GSA II	-/-	+/-	-/-
UEA I	+/+	+/+	+/+
RCA I	+/-	+/-	-/-
RCA II	+/-	+/-	-/-
GSA I	+/-	+/-	-/-
PNA	+/+	+/+	+/+
SBA	+/+	+/+	+/+
HPA	+/+	+/+	+/-
DBA	+/+	+/-	-/-
SJA	+/+	+/-	-/-

Tab. 5:

Schematisches Versuchsprotokoll: Experiment durchgeführt (+), nicht durchgeführt (-); Fluoreszenzmikroskopie (FM), Elektronenmikroskopie (EM).

vieler leuchtender Punkte an den - vom Betrachter aus gesehen - Rändern der Zelle. Dasselbe Kriterium gilt für kultivierte Zellen, wenn auch mit Einschränkungen. Am Substrat ausgebreitete Zellen sind oft sehr flach. Dadurch kann, besonders bei schwacher Fluoreszenz, der leuchtende Membranrand nur undeutlich zustande kommen. Ein zweites Kriterium ist dann die Abwesenheit von stark leuchtenden Aggregaten im Inneren der Zelle. In diesem Fall bedeutet unter den gewählten Versuchsbedingungen (4°C, Natriumazid) auch die homogene Fluoreszenz in Aufsicht auf die Zelle Membranfluoreszenz.

Die Fluoreszenzintensität wurde in einer subjektiven, semiquantitativen Skala von - zu +++ ausgedrückt. Als negativ wurde das völlige Fehlen von Fluoreszenz an ausgebreiteten Zellen bewertet.

4. Elektronenmikroskopie:

Lektinkonzentration:

- Für die Einstufen-Methode wurden die HRP-gekoppelten Lektine, gemäß den Empfehlungen der Hersteller, in einer Konzentration von 200µg/ml verwendet.
- Für die Zweistufen-Methode ("Biotin-Avidin-Methode") mußte die optimale Konzentration in Form einer Schachbrett-Titration von biotinyliertem Lektin gegen Avidin-HRP ermittelt werden. Anstelle des Avidin-HRP wurde dabei Avidin-FITC gestellt. Es ergaben sich optimale Konzentrationen von 50/100 (biotinyliertes Lektin in µg/ml/Avidin-HRP bzw. FITC in µg/ml). Alle Lektine und die Avidinkonjugate wurden in PBS ohne Azid verdünnt, da Natriumazid bekanntermaßen ein Hemmer der Peroxidaseaktivität ist.

Labelingprozeduren:

3-6 Tage alte Kulturen auf gekammerten Gewebekulturobjektträgern wurden sorgfältig mit PBS vom Medium freigespült und anschließend entweder 60 Minuten bei 4°C mit HRP-gekoppelten Lektinen (Einstufen-Methode) oder 25 Minuten bei 4°C mit biotinylierten Lektinen und, nach dreimaliger Spülung, 30 Minuten bei 4°C mit Avidin-HRP (Zweistufen-Methode) inkubiert. Die Kulturen wurden erneut mit PBS gespült und mit vorgekühltem Glutaraldehyd-Formaldehyd-Fixiergemisch nach Karnovsky (1965) eine Stunde lang bei 20°C fixiert und anschließend in 0,1 M Kakodylatpuffer (pH 7,4) ausgiebig gespült.

Enzymreaktion:

Anschließend an die Kakodylatwaschungen wurden die Präparate in 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) kurz gespült und dann 30 Minuten bei 20°C unter Lichtabschluß der 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Reaktion nach Graham und Karnovsky (1966) ausgesetzt. Die an die Lektine gekoppelte Peroxidase katalysiert die Reduktion des Wasserstoffperoxids, wobei das DAB als Elektronenspender dient. Das gebildete schwarz-braune Reaktionsprodukt (=oxidiertes DAB) ist unlöslich. In der nachfolgenden Reaktion mit Osmiumtetroxid wird es elektronendicht. Das DAB wurde 0,05%-ig in 0,05 M Tris-HCl (pH 7,6), das Wasserstoffperoxid in einer Endkonzentration von 0,01% verwendet. Nach Abschluß der Enzymreaktion wurde wieder mit Tris-HCl kurz gespült.

Präparation für das Transmissionselektronenmikroskop:

Die Präparate wurden in 3%-iger wässriger Osmiumtetroxidlösung (60 Minuten/0°C) postfixiert, ein bloc mit 0,5%-igem veronalgepuffertem Uranylazetat (60 Minuten/20°C) kontrastiert, schnell in einer steigenden Äthanolreihe (50%-70%-95%-100%) entwässert, in eine dünne Schichte Epon 812 eingebettet und 24 Stunden bei 60°C polymerisiert.

Von ihrer Glasunterlage wurden die eingebetteten Kulturen nach der Polymerisation entweder durch oftmaliges Eintauchen in flüssigen Stickstoff oder durch Abheben mit einer Rasierklinge abgelöst. Horizontale Ultradünnschnitte wurden auf einem Reichert Ultramikrotom geschnitten, auf Kupferträgernetzchen (300-mesh, unbefilmt) aufgefischt und mit Bleizitrat nach Reynolds (1963) kontrastiert.

Die Schnitte wurden am Elektronenmikroskop EM 400 (Philips) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV betrachtet und photographiert.

Kontrollen:

- Zuckerkontrolle (wie bei Fluoreszenz).
- Ersatz der Lektininkubation (Einstufen-Methode) bzw. der Lektin- und der Avidin-Inkubation (Zweistufen-Methode) durch PBS. Dadurch wird eine mögliche endogene Peroxidaseaktivität entdeckt (Farr und Nakane 1981).
- Inkubation mit ungekoppelter HRP. Es wird eine mögliche Bindung des v.a. mannosehaltigen Glykoproteins Meerrettichperoxidase (HRP) an die Zellmembran geprüft (Lotan 1979).

- Zusätzlich wird bei der Zweistufen-Methode eine etwaige unspezifische Bindung des Avidin-Konjugates dadurch geprüft, daß nur die Lektininkubation durch PBS ersetzt wird, die Avidin-HRP-Inkubation jedoch normal durchgeführt wird.

Evaluation:

K werden anhand der typischen Tonofilamentbündel und der Anordnung der Melanosomen in Komplexen sowohl beim Meerschweinchen als auch beim Menschen erkannt. M und MZ werden durch einzelnliegende Melanosomen, oft in verschiedenen Reifungsstadien, identifiziert (Breathnach 1971, Fritsch et al 1981).

Die Ablagerung einer Schicht von Reaktionsprodukt auf der Plasmamembran bei intakten Innenstrukturen der Zelle wird als positiv bewertet. Negativ ist die völlige Abwesenheit von Reaktionsprodukt auf den Membranen. Es wurden keine Quantifizierungen der Menge des Reaktionsproduktes vorgenommen.

5. Neuraminidase-Vorbehandlung:

Unfixierte, viable Zellen wurden in vitro mit Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* inkubiert. Das Enzym wurde in Konzentrationen von 0,25U/ml (Meerschweinchen) und 0,05U/ml (Mensch) verdünnt in serumfreien Medium verwendet. Die Proteaseaktivität, laut Hersteller nach der Methode von Erlanger et al (1961) bestimmt, lag unter 0,1 mU/ml.

Nach der Enzymbehandlung (60 Minuten/37°C) wurden die Kulturen dreimal mit PBS gespült und unmittelbar mit den Lektinen für Fluoreszenz- und/oder Elektronenmikroskopie inkubiert.

III. Kationisiertes Ferritin (CF)

1. Prinzip der Methode:

Untersuchungen zur Verteilung von Ladungsträgern auf Zelloberflächen werden elektronenmikroskopisch gemacht, da die Fluoreszenzmikroskopie Unterschiede in der Feinverteilung von fluoreszierenden Markern nicht auflösen kann. Anionische, also negative Bindungsstellen werden durch die elektrostatische Bindung von kationischen, also positiv geladenen Markermolekülen dargestellt.

Dafür wurde kolloidales Eisen (Gasic et al 1968) verwendet, welches in der Elektronenmikroskopie direkt sichtbar ist. Die Methode hat jedoch den Nachteil, daß sie nur bei sehr niedrigem, unphysiologischem pH (2-3) arbeitet. Von Danon et al (1972) wurde deshalb eine einfache Methode entwickelt, welche bei physiologischem pH funktioniert. Ferritin, ein gebräuchliches Markermolekül in der Elektronenmikroskopie (Williams 1977) wird kationisiert und kann direkt zur Inkubation von Zellen verwendet werden. Die Methode ist für solche Fragestellungen die Methode der Wahl.

Zwei Überlegungen bestimmten die Konzeption der Versuchsanordnung.

- In erster Linie sollte die Ladungsverteilung an viablen Zellen demonstriert werden. Es wurde nämlich bereits mehrfach beschrieben, daß die Fixierung von Zellen mit Aldehyden das Verteilungsmuster der anionischen Bindungsstellen drastisch verändern kann (Grinnell et al 1976, Marikovsky et al 1974).
- Im Gegensatz zu der Untersuchung mit Lektinen (vergleiche Punkt II.1.) wurde nicht nur eine rein statische Anordnung der negativen Ladungen beschrieben, sondern auch eine dynamische, zeit- und temperaturabhängige Umverteilung, was in den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen zum Ausdruck kommt.

2. Inkubationsbedingungen und Kontrollen:

Das CF wurde in allen Versuchen in einer Konzentration von 0,32mg/ml verwendet. Diese Konzentration gewährleistet eine vollständige Markierung aller anionischen Stellen. Geringere CF-Konzentrationen vermögen nur noch Bindungsstellen mit besonders hoher Affinität zu entdecken (Borysenko und Woods 1979). Dies war jedoch im konkreten Fall nicht von Interesse.

Die Kulturen wurden in situ mit CF bei variabler Zeit und Temperatur inkubiert.

- Die "inhärente", noch nicht vom Liganden, dem CF, mitbeeinflusste Verteilung, kann unter 2 Bedingungen erwartet werden (Borysenko und Woods 1979): 1. Bei tiefer Temperatur (4°C) wird die Ligandeninduzierte Umverteilung durch die stark reduzierte Membranbeweglichkeit fast unmöglich. 2. Bei sehr kurzer Inkubationszeit (10 Sekunden mit sofort anschließender Fixation) bleibt für diese Umverteilung keine Zeit.
- Umverteilungsphänomene wurden in zeitlich gestaffelten Inkubationen von 1-20 Minuten studiert.
- Zum Vergleich wurden auch vorfixierte Kulturen mit CF inkubiert.

Ein Schema des Versuchsaufbaues ist in Fig. 5 dargestellt.

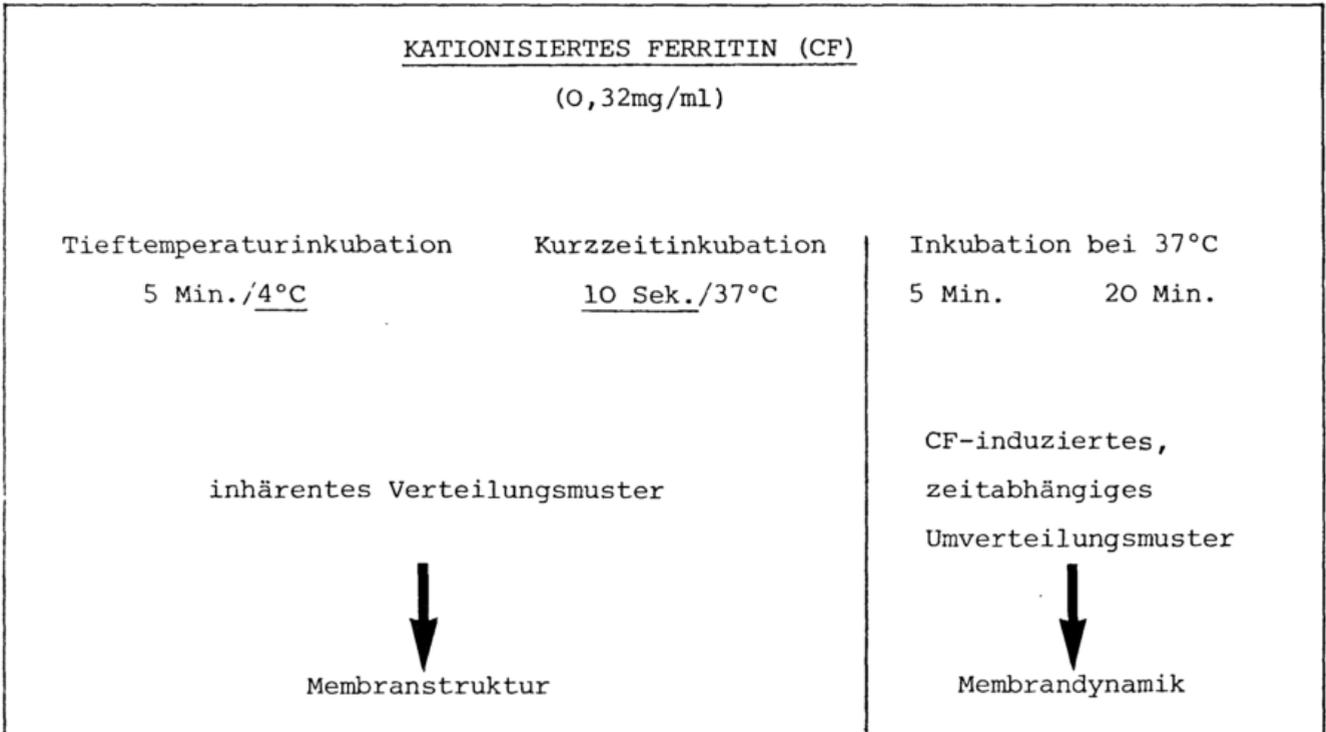


Fig. 5:

Schematischer Versuchsplan für kationisiertes Ferritin.

Kontrollen:

Die Kontrollen zur Feststellung der Spezifität der CF-Bindung wurden für das Meerschweinchensystem bereits von Schuler et al (1981) detailliert beschrieben. Sie werden hier wiedergegeben.

- Anstelle des kationisierten Ferritins wird mit nativem Ferritin gelabelt. Dadurch kann unspezifische Bindung des CF an nicht-negativ geladene Stellen ausgeschlossen werden.
- Das CF wird in einem Puffer von hoher Ionenstärke inkubiert (0,6 M NaCl in PBS). Die spezifische elektrostatische Bindung zwischen der Zelloberfläche und dem CF wird dadurch verhindert. Unspezifische Bindungen bleiben bestehen (Kanwar und Farquhar 1979, Bittiger und Heid 1977).
- Die 2. Kontrolle muß jedoch ihrerseits kontrolliert werden. Vorinkubation der Kulturen in PBS von hoher Ionenstärke (0,6 M NaCl) kann ausschließen, daß anionische Stellen durch die Einwirkung der hohen Ionenstärke zerstört oder entfernt werden.

- Vorinkubation mit dem Polykation Poly-L-Lysin (10µg/ml PBS, 10 Minuten, 20°C) sättigt die negativen Ladungen ab; das CF kann nicht mehr spezifisch binden (Skutelsky und Danon 1976).

3. Experimentelle Prozeduren:

Zellkulturen in Gewebekulturpetrischalen wurden sorgfältig mit Calcium- und Magnesium-freiem PBS vom Medium freigespült und anschließend mit CF in situ bei 37°C inkubiert.

Für die Kälteinkubation wurden die Kulturen nach dem Spülen ca. 15 Minuten lang in PBS bei 4°C vorgekühlt und dann erst mit CF bei 4°C inkubiert.

Vergleichskulturen wurden in 1%-igem Glutaraldehyd (10 Minuten, 20°C) fixiert. Nach dreimaligem Spülen wurden noch reaktive Aldehydgruppen durch Behandlung mit 0,01 M Ammoniumchlorid (5 Minuten, 20°C) abgebunden. Nach abermaligem Spülen wurden die Kulturen in CF bei 20°C inkubiert.

Anschließend an die CF-Behandlung wurden die Kulturen gut gespült und sofort in vorgekühltem Glutaraldehyd-Formaldehyd-Fixiergemisch nach Karnovsky (1965) 1 Stunde bei 20°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen in 0,1 M Natrium-Kakodylatpuffer wurde in 3%-iger wässriger Osmiumtetroxidlösung postfixiert. Die weitere EM-Präparation wurde in Punkt II.4. bereits beschrieben.

4. Ergänzende Experimente:

Zusätzlich zu dieser allgemeinen Erhebung der Verteilung und Umverteilung wurden noch Experimente zur Beantwortung einiger spezieller Fragen gemacht.

A. Zytoskelettbeeinflussende Substanzen:

Um eine denkbare Abhängigkeit der Zellmembranstruktur und der Verteilung des CF von Elementen des Zytoskeletts zu überprüfen wurden die einzelnen Komponenten des Zytoskeletts gezielt gestört bzw. zerstört (Thyberg 1980). Erst anschließend wurde mit CF inkubiert (5 Minuten/37°C).

- Colchizin verhindert die Polymerisation des Tubulins zur Mikrotubuli. Die Kulturen wurden mit Colchizin 10^{-4} M in serumfreiem Medium 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert.

- Schnelles Abkühlen der Zellen auf 4°C und anschließendes Wiedererwärmen auf 37°C zerstört ebenfalls die Mikrotubuli.
- Cytochalasin B greift in den Aufbau des F-Actins ein. Es unterbindet also die Bildung der Mikrofilamente. Es wurde 10^{-6} M in serumfreiem Medium ebenfalls 2 Stunden bei 37°C den Kulturen zugegeben. Da Cytochalasin B in Dimethoxysulfoxid (DMSO) gelöst ist, wurde eine Kontrollinkubation in DMSO ohne Cytochalasin B durchgeführt.
- Colcemid bewirkt eine perinukleäre Konzentration der 10nm dicken intermediären Filamente. Es wurde dem normalen Kulturmedium in einer Konzentration von 10^{-6} M zugesetzt und 24 Stunden lang mit den Kulturen inkubiert.

B. Neuraminidasebehandlung:

Da die Sialinsäuren den größten Teil der negativen Oberflächenladung ausmachen (Sherbet 1978), wurden auch die Ladungsverhältnisse nach Abspaltung dieses Moleküls durch Neuraminidase untersucht. Die Kulturen wurden 1 Stunde bei 37°C mit Neuraminidase (0,5U/ml) in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit CF (5 Minuten/4°C).

C. "Pulse and Chase"-Versuch:

In diesem Experiment wird das weitere Schicksal des CF im Zellinnern verfolgt. Die Kulturen werden kurz (5 Minuten, 37°C) mit CF inkubiert ("Pulse"). Dann werden die Kulturen 10, 20, 40, 60 und 120 Minuten lang in serumfreiem Medium bei 37°C ("Chase") stehen gelassen, anschließend gespült und fixiert. Als Kontrolle wird auch unmittelbar nach der CF-Inkubation fixiert.

IV. Bezugsquellen

- Alle Medien und sonstigen Reagenzien für Gewebekulturen: Flow, Irvine, Schottland.
- Kulturflaschen, Petrischalen für Gewebekultur: Nunc, Dänemark.
- Gewebekulturobjektträger: "Lab-Tek": Miles, England.
- Lektine (FITC-, TRITC-, HRP-gekoppelt, biotinyliert): Vector Laboratories, Burlingame, California, USA; E-Y Laboratories, San Mateo, California, USA; Miles-Yeda, Rehovot, Israel.
- Hemmzucker: Sigma, München, BRD.
- Kationisiertes Ferritin: Miles-Yeda, Rehovot, Israel.
- Neuraminidase: Behringwerke, Marburg/Lahn, BRD.
- Colchizin, Cytochalasin B, Colcemid: Sigma, München, BRD.