

Aus dem Department für Biologische Wissenschaften und Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Morphologie
(Leiter: Univ.Prof. Dr.med.vet. Michal Kyllar)

Nachweis von Typ II Hemidesmosomen im Jejunum von Schweinen

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Anna Katharina Schall

Wien, im Mai, 2024

Betreuerin: Dr.med.vet. Simone Gabner, PhD.

Institut für Morphologie

Department für Biologische Wissenschaften und Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachter: Dr.med.vet. Lukas Schwarz

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Schwechat, den 01.05.2024

Anna Katharina Schall

ZUSAMMENFASSUNG

Die innere Auskleidung des Darms besteht aus einer einschichtigen, iso- bis hochprismatischen Epithelzellschicht, welche über Hemidesmosomen (HDs) mit der Basallamina verbunden ist. In einschichtigen Epithelien sind Typ II HDs beschrieben, welche Plectin und Integrin $\alpha 6\beta 4$ als Bestandteile aufweisen.

In dieser Arbeit wurden Jejunumproben von vier 3 Monate alten Schweinen histologisch untersucht. An HE gefärbten Schnitten wurden morphologische Besonderheiten (Zerstörung des Epithels, Epithelablösung, Vakuolenbildung, zellarme Lamina propria) semiquantitativ untersucht sowie Zottenlängen gemessen. Mittels immunhistochemischer Färbung wurde das Vorhandensein und die Lokalisation der Typ II HDs Proteine Plectin und Integrin $\beta 4$ sowie der Proteine der Basallamina (Laminin und Kollagen-IV) untersucht. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ in vier Regionen (Krypten, Zottenbasis, Zottenmitte und Zottenspitze).

Die Epithelablösung und die Vakuolenbildung dominierten das morphologische Erscheinungsbild der Gewebeschnitte. Am seltensten konnte die Epithelzerstörung festgestellt werden. In der Kryptenregion konnte von den untersuchten Proteinen Laminin gut dargestellt werden, Plectin und Integrin $\beta 4$ zum Teil, Kollagen-IV hingegen nur in zwei Schnitten. Die Proteine Plectin, Integrin $\beta 4$, Laminin und Kollagen-IV konnten in allen drei ausgewerteten Regionen der Zotten nachgewiesen werden. Im Falle einer Epithelablösung war die Basallamina (Laminin, Kollagen-IV) der Lamina propria anliegend sichtbar, während die Typ II HDs Proteine Plectin und Integrin $\beta 4$ an der basalen Seite der Epithelzellen detektiert wurden.

Das Vorkommen und die Verteilung der Typ II HDs Proteine Plectin und Integrin $\beta 4$ sowie der Proteine der Basallamina (Laminin, Kollagen-IV) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um das Auftreten und die Funktionsmechanismen der Typ II HDs im Darm sowie die Verteilung der Proteine der Basallamina besser zu verstehen.

ABSTRACT

The inner lining of the intestine consists of a single-layered, iso-prismatic epithelial cell layer, which is connected to the basal lamina via hemidesmosomes (HDs). In monolayer epithelia, type II HDs have been described which contain plectin and integrin $\alpha 6\beta 4$ as components.

In this work, jejunum samples from four 3-month-old pigs were examined histologically. Morphological features (destruction of the epithelium, epithelial detachment, vacuole formation, cell-poor lamina propria) were examined semi-quantitatively in HE-stained sections and villus lengths were measured. The presence and localization of the type II HDs proteins plectin and integrin $\beta 4$ as well as the proteins of the basal lamina (laminin and collagen-IV) were examined by immunohistochemical staining. The analysis was performed semi-quantitatively in four regions (crypts, villus base, villus center and villus tip).

Epithelial detachment and vacuole formation dominated the morphological appearance of the tissue sections. Epithelial destruction was observed least frequently. In the crypt region, laminin could be visualized well, plectin and integrin $\beta 4$ partially, and collagen IV only in two sections. The proteins plectin, integrin $\beta 4$, laminin and collagen-IV could be detected in all three regions of the villi analyzed. In the case of epithelial detachment, the basal lamina (laminin, collagen-IV) was visible adjacent to the lamina propria, while the HDs II proteins plectin and integrin $\beta 4$ were detected on the basal side of the epithelial cells.

The occurrence and distribution of the type II HDs proteins plectin and integrin $\beta 4$ as well as the proteins of the basal lamina (laminin, collagen-IV) could be shown in this work. Further studies are necessary to better understand the occurrence and functional mechanisms of type II HDs in the intestine and the distribution of the basal lamina proteins.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Allgemeiner histologischer Aufbau des Dünndarms..... | 1 |
| 1.2. Allgemeiner Aufbau von Epithelien | 2 |
| 1.2.1 Apikobasale Polarität | 2 |
| 1.3. Aufbau des einschichtigen, hochprismatischen Epithels..... | 2 |
| 1.4. Allgemeiner Aufbau der Basalmembran | 3 |
| 1.4.1 Aufbau der Basallamina | 3 |
| 1.4.2. Aufbau der Lamina fibroreticularis..... | 4 |
| 1.5. Zellverbindungen und Zellkontakte | 5 |
| 1.6. Hemidesmosome | 5 |
| 1.6.1. Typ I Hemidesmosome | 5 |
| 1.6.2. Typ II Hemidesmosome | 5 |
| 2. Material und Methoden | 8 |
| 2.1. Probennahme und Vorbereitung..... | 8 |
| 2.2. Färbungen..... | 8 |
| 2.2.1. Hämatoxylin- und Eosinfärbung (HE)..... | 8 |
| 2.2.2. Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)..... | 9 |
| 2.2.3. Immunhistochemische Färbung | 9 |
| 2.3. Auswertung der Färbungen | 12 |
| 2.3.1. Morphologie | 12 |
| 2.3.2. Zottenlängen | 12 |
| 2.3.3. Immunhistochemie..... | 12 |
| 3. Ergebnisse | 14 |
| 3.1. Morphologie | 14 |
| 3.1.1. Epithelzerstörung | 14 |
| 3.1.2. Epithelablösung | 15 |

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 3.1.3. Vakuolen..... | 16 |
| 3.1.4. Zellarme Lamina propria | 16 |
| 3.2. PAS-Reaktion..... | 17 |
| 3.3. Zottenlänge | 18 |
| 3.4. Plectin | 19 |
| 3.5. Integrin β 4 | 21 |
| 3.6. Laminin..... | 23 |
| 3.7. Kollagen-IV..... | 25 |
| 4. Diskussion..... | 27 |
| 5. Literaturverzeichnis..... | 31 |
| 6. Tabellenverzeichnis..... | 33 |
| 7. Abbildungsverzeichnis..... | 34 |

1. Einleitung

1.1. Allgemeiner histologischer Aufbau des Dünndarms

Der Dünndarm wird in drei Abschnitte gegliedert: Duodenum, Jejunum und Ileum, die einen ähnlichen histologischen Wandaufbau aufweisen. Dieser wird weiterführend näher beschrieben (1).

Die Tunica mucosa als innerste Schicht beinhaltet die Lamina epithelialis, Lamina propria und Lamina muscularis mucosae. Die Tunica mucosa bildet im Dünndarm Zotten und Krypten aus, welche für eine starke Vergrößerung der resorbierenden Oberfläche verantwortlich sind (1).

Krypten stellen tubuläre Einsenkungen der Mucosa dar und sind mit einem einschichtigen, iso- bis hochprismatischen Epithel ausgekleidet. Sie sind im Gegensatz zu den Zotten tiefer in der Schleimhaut gelegen und sind als schlauchförmige, kurze, drüsenähnliche Strukturen erkennbar (1). Der Kryptenbereich lässt sich in einen unteren Abschnitt, mit sich nicht teilenden Epithelzellen und einen weiter oben gelegenen proliferativen Abschnitt einteilen. Der proliferative Bereich ist durch eine hohe Zellteilungsrate gekennzeichnet. Anschließend wandern die Enterozyten in den oben gelegenen Zottenbereich (2).

Zotten sind Ausstülpungen der Schleimhaut, ragen in das Darmlumen und sind mit einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel bedeckt. Das Oberflächenepithel besteht aus differenzierten, resorbierenden Enterozyten mit apikalen Mikrovilli, Becherzellen und endokrinen Zellen. Die bereits genannten Mikrovilli bilden apikal den Bürstensaum aus und sind durch ein Bündel von Aktinfilamenten in der Zellspitze verankert. Darüber ist die Glykokalyx, bestehend aus Glykoproteinen und Glykolipiden, angelagert. Sie dient als mechanischer Schutz des Bürstensaums, ist Teil der angeborenen Immunabwehr und muss bei allen Resorptionsvorgängen passiert werden (1).

Danach folgt die Lamina propria, welche Blut- und Lymphkapillaren enthält. Diese Schicht weist einen hohen Anteil an Abwehrzellen, wie beispielsweise Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen, auf. Die letzte Schicht der Schleimhaut, die Lamina muscularis mucosae, besteht aus glatten Muskelzellen (1).

Anschließend an die Tunica mucosa folgt die bindegewebige Tela submucosa. Die Kollagenfasern ermöglichen dem Darmrohr eine Verlängerung und Erweiterung. Wie in der Lamina propria sind zahlreiche Blut- und Lymphgefäße enthalten (1).

Die nachfolgende Tunica muscularis besteht aus glatter Muskulatur und ist aus einer inneren Ringmuskel- und einer äußeren Längsmuskelschicht aufgebaut. Der bindegewebige Anteil steht mit den Kollagenfasern der Tela submucosa und mit dem Bindegewebe der Tunica serosa in kontinuierlicher Verbindung (1).

Die Tunica serosa als letzte, äußere Schicht weist wieder Kollagenfasern als Anteil des Bindegewebes auf. Weiters sind zahlreiche elastische Fasern zu finden. Außen liegt das sogenannte Mesothel, ein einschichtiges Plattenepithel, an (1).

1.2. Allgemeiner Aufbau von Epithelien

Epithelien sind Zellverbände von dicht gelagerten Zellen, die jedoch durch einen schmalen Interzellularraum voneinander getrennt sind und einer Basallamina aufliegen. Die Basallamina stellt die Grenze zum nachfolgenden subepithelialen Bindegewebe dar. Epithelzellen stehen über verschiedene Zellkontakte miteinander in Verbindung (1).

1.2.1. Apikobasale Polarität

Bei einschichtigen Epithelien weisen die Epithelzellen zwei Pole auf: der apikale Pol, der an die Oberfläche und den basalen Pol, der an die Basalmembran und das darunterliegende Bindegewebe grenzt. Diese zwei Pole weisen unterschiedliche, strukturelle Merkmale und andere funktionelle Eigenschaften auf wie beispielsweise unterschiedliche Proteine in der Zellmembran. Der Begriff der „apikalen Domäne“ fasst alle Funktionen und Strukturen des apikalen Pols zusammen und steht der „basolateralen Domäne“ gegenüber. Die Funktionen der lateralen und basalen Zellmembran sind weitgehend übereinstimmend, sodass sie zu einem Begriff zusammengefasst werden können (1).

1.3. Aufbau des einschichtigen, hochprismatischen Epithels

Das einschichtige, hochprismatische Epithel kleidet als Oberflächenepithel den Darm aus. Es besteht aus einer Zellreihe und ist durch hohe und schlanke Zellen gekennzeichnet. Die Zellkerne weisen eine längsovale Form auf. Es kommen verschiedene Zelltypen in diesem Epithel vor. Durch Zellkontakte wie Zonula occludens, Zonula adhaerens, Nexus und Desmosomen sind hochprismatische Epithelzellen untereinander verknüpft. Apikale Differenzierungen wie beispielsweise die Mikrovilli der Enterozyten im Dünndarm sind für diese Epithelform kennzeichnend (1).

1.4. Allgemeiner Aufbau der Basalmembran

Die Basalmembran ist ein Begriff der Lichtmikroskopie; da in histologischen Präparaten Lamina basalis (Basallamina) und Lamina fibroreticularis nicht zu trennen sind und daher eine gemeinsame Linie bilden, wird dieser Begriff für beide Strukturen zusammen verwendet (1). In diesem Kapitel wird der Aufbau von Basallamina und Lamina fibroreticularis getrennt beschrieben.

1.4.1. Aufbau der Basallamina

Die Basallamina wird an der Basis des Epithels durch dasselbe ausgebildet und stellt eine dünne, flexible Grenze zum Bindegewebe dar. Sie besteht aus der Lamina rara und der Lamina densa (1).

Die Lamina rara besteht hauptsächlich aus Teilen des Lamininmoleküls und Integrinen. Integrine sind Heterodimere, welche aus einer α - und β -Untereinheit aufgebaut sind und an intra- und extrazelluläre Proteine binden können. Sie sind für den Kontakt und die Interaktion der Epithelzelle mit der extrazellulären Matrix entscheidend. Extrazellulär binden sie vor allem an Laminin und Fibronectin, die wiederum mit verschiedenen Kollagenen (beispielsweise Typ-IV-Kollagen) interagieren (1). Intrazellulär sind sie an fokalen Adhäsionen beteiligt (3).

Die Lamina densa enthält Typ-IV-Kollagen, Laminin, Nidogen und Perlecan. Die mechanische Komponente wird vor allem durch das Typ-IV-Kollagen gebildet, bei welchem es sich um ein nicht fibrilläres Kollagen handelt, das für die Bildung eines flachen, molekularen Netzwerks verantwortlich ist. Dieses Netzwerk ist durch das Glykoprotein Nidogen und das Proteoglykan Perlecan eng mit dem Laminin-Netzwerk verflochten (1).

Laminine sind eine Gruppe von heterotrimeren Proteinen, welche aus drei Polypeptidketten (α , β und γ) aufgebaut sind. Es gibt verschiedene Isoformen, die sich in ihrer Kettenzusammensetzung voneinander unterscheiden. Die Basallamina des Krypten- und Zottenkompartiments unterscheidet sich in ihrer Lamininkomposition. In der Basallamina der Kryptenzellen kommt hauptsächlich Laminin-2 vor, während in der Basallamina der Zotten Laminin-1 ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$) und Laminin-5 ($\alpha 3$, $\beta 3$, $\gamma 2$) zu finden sind. Es wird vermutet, dass Laminin-5 an der Migration und Differenzierung der intestinalen Epithelzellen beteiligt ist (2).

1.4.2. Aufbau der Lamina fibroreticularis

Die Lamina fibroreticularis ist das Bindegewebe unter der Basallamina und wird von Fibroblasten gebildet. Sie stellt die mechanische Verbindung zwischen den tieferen Bindegewebsschichten und dem Epithel mit dessen Basallamina dar. Die Bestandteile sind Kollagene, vor allem vom Typ III, Typ VII und zum Teil vom Typ I, Mikrofibrillen aus Fibrillin oder aus Kollagen Typ VI. Die sogenannten Ankerfibrillen, welche durch das Typ-VII-Kollagen gebildet werden, verbinden die Basallamina mit den Kollagenfibrillen der Lamina fibroreticularis. Sie kommen vor allem unter Hemidesmosomen vor (1).

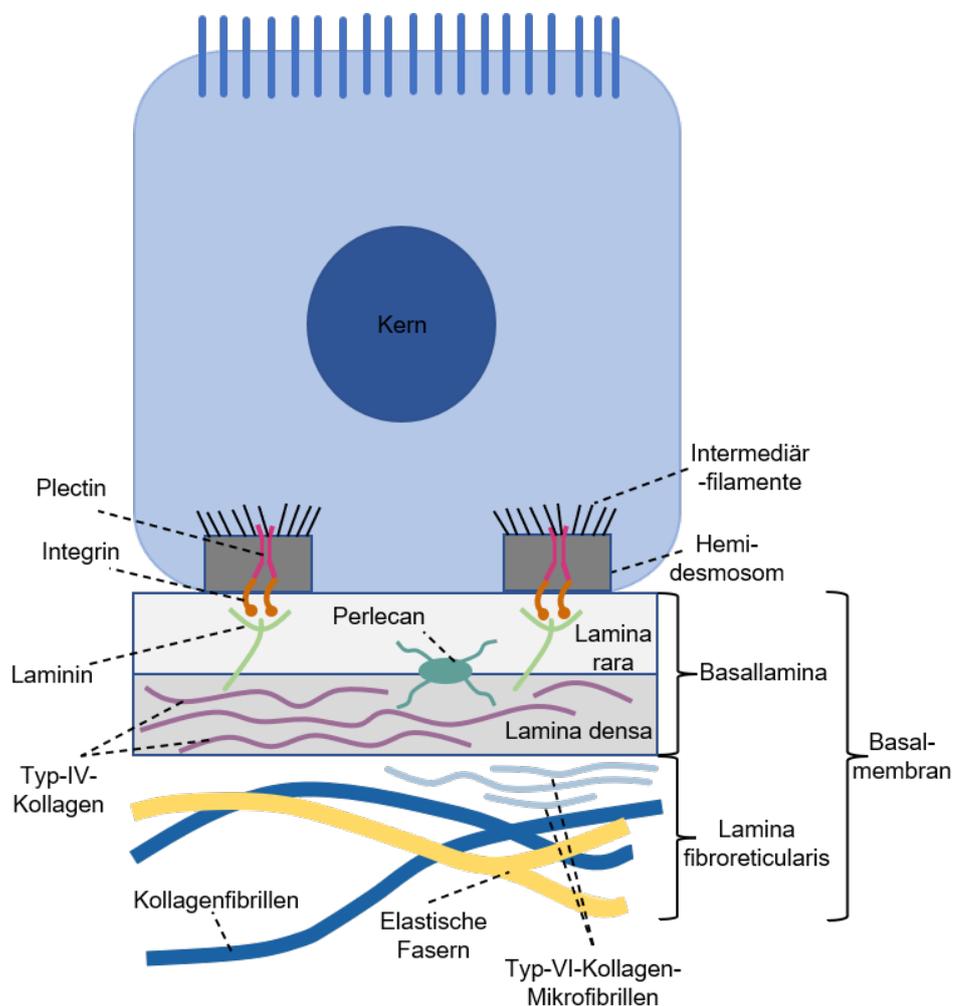


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Basalmembran und ihrer Komponenten.

1.5. Zellverbindungen und Zellkontakte

Zu den Zellverbindungen zählen Adhäsionskontakte, Kommunikationskontakte (zum Beispiel Gap Junctions), Verschlusskontakte (Tight Junctions) und Kontakte die Signale übermitteln (chemische Synapsen). Zelladhäsionskontakte sind für die mechanische Verbindung zwischen Zellen in Epithelien und für die Verankerung von Zellen mit der extrazellulären Matrix verantwortlich. Sie bestehen aus Adhäsionsmolekülen, Plaqueproteinen und einer Komponente des Zytoskeletts. Innerhalb dieser Zellverbindungen lassen sich zwei unterschiedliche Gruppen differenzieren. Einerseits Kontakte mit verankerten Aktinfilamenten in den Anheftungsplaques wie beispielsweise Zonula adhaerens, Punktdesmosomen und Fokalkontakte (1).

Andererseits Kontakte mit Intermediärfilamenten in den Anheftungsplaques zu denen Desmosomen und Hemidesmosomen zählen (1). In diesem Kapitel wird besonders der Aufbau der Hemidesmosome näher beschrieben.

1.6. Hemidesmosome

Hemidesmosomen (HDs) sind zelluläre Multiproteinverbindungen, welche Epithelzellen mit der extrazellulären Matrix (ECM) verankern. Ihre Lokalisation ist daher auf der Seite des Zell-ECM-Kontaktes (3). Es können zwei verschiedene Formen von Hemidesmosomen unterschieden werden: Typ I HDs und Typ II HDs.

1.6.1. Typ I Hemidesmosome

Typ I HDs kommen in mehrschichtigen Plattenepithelien der Haut vor und bestehen aus Integrin $\alpha 6\beta 4$, BP180, Tetraspanin CD151, Plectin und BP230. Sie weisen eine dreigliedrige Struktur mit inneren, transmembranen und äußeren, elektronendichten Plaques auf. Die innere Plaque weist eine Verbindung zu den Keratinfilamenten auf, während die äußere Plaque mit Ankerfilamenten verbunden ist, welche die Lamina lucida queren um die Typ I HDs mit der Lamina densa der epidermalen Basalmembran zu verankern (4).

1.6.2. Typ II Hemidesmosome

Typ II HDs wurden in einschichtigen Epithelien beschrieben und weisen Integrin $\alpha 6\beta 4$ und Plectin als molekulare Komponenten auf. Im Gegensatz zu den Typ I HDs fehlen ihnen BP230 und BP180 als Bestandteile. Dadurch ist die innere Plaque schwach ausgeprägt oder fehlt teilweise ganz (4).

Die Komponente Integrin $\alpha 6\beta 4$ der Typ II HDs gehört zu den Transmembranproteinen und besteht aus zwei Typ I Transmembranproteinuntereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 4$ sowie dem intrazellulären C-Terminus. Die zytoplasmatische Domäne der $\beta 4$ -Untereinheit besteht aus 5 kugelförmigen Domänen: dem proximalen Membranaustauscher Calx- β , zwei Paaren von Fibronectin Typ III (FnIII) Domänen, die durch das Verbindungssegment getrennt sind, und dem C-terminalen Schwanz, der sich abwärts des FnIII erstreckt. Die $\alpha 6$ -Untereinheit besteht aus einer langen N-terminalen extrazellulären Domäne, welche die Bindungsstelle des Laminin-5 darstellt. Sie wird gefolgt von einer Transmembrandomäne und einer kurzen intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Einheit des Integrin $\alpha 6\beta 4$ fungiert als Lamininrezeptor und kann an Laminin-5 binden (5).

Auf der zytoplasmatischen Seite sind Typ II HDs durch Plectin mit dem Zytokeratinskelett verbunden. Durch die Mehrfachdomänenstruktur des Plectins wird eine Interaktion mit einer Vielzahl von Proteinen ermöglicht. Es weist eine dreigliedrige Struktur mit einer zentralen coiled-coil Stabdomäne auf, welche von den kugelförmigen N- und C-Terminaldomänen flankiert wird. Die N-Terminaldomäne umfasst eine Aktin-bindende Domäne. Plectin bindet an vielen Stellen direkt an die zytoplasmatische Enddomäne der $\beta 4$ -Untereinheit. Der Primärkontakt findet aber zwischen der Aktin-bindenden Domäne des Plectins und dem ersten Paar der FnIII-Domäne der $\beta 4$ -Untereinheit statt (5).

Mittels Elektronenmikroskops konnte bewiesen werden, dass Typ II HDs Verdichtungen darstellen, die mit der Basalmembran assoziiert sind. Sie bestehen aus zahlreichen, individuellen Plaques, die sich zu einem Cluster verbinden. Für diesen Organisationsvorgang werden Aktinfilamente, aber keine Mikrotubuli benötigt. Die Anordnung von Typ II HDs ist sehr variabel und von der Lokalisation in der Zelle abhängig (3).

Weiters zeigen sie in Zellkulturen eine geringere Assoziation mit Keratinfilamenten und sind daher weniger stabil aber dafür dynamischer als Typ I HDs. Dennoch sind sie stark genug mit der Basalmembran verbunden um externe, mechanische Kräfte wie beispielsweise die Bewegung der intraluminalen Inhalte des Darms oder Wanderung entlang der Krypten-Zotten-Achse auszuhalten (6).

Die Bindung von Plectin an polymerisierte Zytokeratin-Intermediärfilamente der Zelle durch die Integrin- $\beta 4$ -Untereinheit, konnte *in vitro* gezeigt werden (3).

Die subzelluläre Verteilung von Plectin wird durch die zytoplasmatische Domäne der β 4-Untereinheit in den Hemidesmosomen reguliert (3). Man nimmt an, dass die Bindung von β 4 an Plectin der erste Schritt in der Formation von Hemidesmosomen ist (7).

Die Fragestellung dieser Arbeit umfasste das Vorkommen und die Verteilung von Proteinen der Typ II HDs (Plectin und Integrin β 4) und der Basallamina (Laminin und Kollagen-IV). Zusätzlich sollte deren Rolle bei der Ablösung des Darmepithels untersucht werden. Dazu wurden Jejunumproben von 4 Schweinen mittels Immunhistochemie gefärbt und 4 Regionen in der Darmschleimhaut (Krypten, Zottenbasis, Zottenmitte und Zottenspitze) semiquantitativ ausgewertet.

2. Material und Methoden

2.1. Probennahme und Vorbereitung

Die Proben für diese Arbeit stammen von vier 3 Monate alten Schweinen, die im Rahmen eines Forschungsprojektes (GZ 2022-0.291.141) von der Universitätsklinik für Schweine der Vetmeduni Vienna euthanasiert wurden. In diesem Projekt wurde der Darm *post mortem* entnommen und ein Abschnitt des Jejunums für 20 Minuten mit Baumpilzextrakten in 1x Krebs-Henseleit-Puffer inkubiert.

Von jedem der vier Schweine gab es die Behandlungsgruppe A (*Trametes versicolor* und *Fomitopsis betulina*) und B (*Trametes versicolor*, *Fomitopsis betulina*, *F. fomentarius* und *F. pinicola*). In der Kontrollgruppe wurden die Darmrohre in 1x Krebs-Henseleit-Puffer ohne Baumpilzextrakt für dieselbe Zeit inkubiert. Bei den Schweinen drei und vier wurde zusätzlich eine histologische Kontrolle (Histokontrolle) durchgeführt um die Darmgesundheit der Tiere und einen eventuellen Einfluss der 20-minütigen Inkubation auf das Darmepithel evaluieren zu können. Hierbei wurden die Jejunumproben unmittelbar nach der Euthanasie der Tiere entnommen und direkt in gepuffertes Formalin (4% Formaldehydlösung, SAV liquid production GmbH, Deutschland) gelegt. Die Proben der Behandlungs- und anderen Kontrollgruppe wurden nach dem Birkenporling-Versuch ebenfalls in Formalin fixiert.

Die fixierten Proben wurden anschließend in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom histologische Schnitte mit einer Dicke von 2,5–3 µm angefertigt und auf mit 3-Aminopropyltriethoxysilan-Glutardialdehyd beschichtete Objektträger aufgezogen. Danach folgte eine Trocknung im Wärmeschrank bei 45 °C über Nacht.

2.2. Färbungen

2.2.1. Hämatoxylin- und Eosinfärbung (HE)

Um die Morphologie zu beurteilen wurde die HE-Färbung herangezogen und mit Hilfe des Färbeautomaten Myreva (Myr, Spanien) durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden dafür 2 x 5 Minuten in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Ethanolreihe (100 % EtOH 2 x 2 Minuten, 96 % EtOH 1 x 2 Minuten und 70 % EtOH 1 x 2 Minuten) rehydriert und anschließend in *Aqua destillata* (*Aqua dest.*) gebracht. Anschließend wurden die Schnitte für 1 x 5 Minuten in die Hämatoxylin-Färbelösung getaucht um die Zellkerne anzufärben.

Nach der ersten Färbelösung wurde 2 x 20 Sekunden mit *Aqua dest.* und 1 x 10 Minuten mit *Aqua fontis* gespült.

Danach wurde die Färbung des Zytoplasmas mit 1 x 5 Minuten in der Eosin-Färbelösung durchgeführt, anschließend folgte das erneute Abspülen mit 1 x 10 Minuten *Aqua fontis* und 1 x 10 Minuten *Aqua dest.* Als letzten Schritt wurden die Gewebeschnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert und anschließend mit DPX (Fluka, Schweiz) im Eindeckautomaten Microm (CTM6, Eprexia, Vereinigte Staaten) eingedeckt.

2.2.2. Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)

Um Glykoproteine wie beispielsweise Laminin als Teil der Basallamina in den histologischen Schnitten darzustellen wurde dafür zusätzlich die PAS-Reaktion verwendet. Hierbei wird Perjodsäure als Oxidationsmittel verwendet um Aldehydgruppen zu bilden und dadurch Polysaccharide, neutrale Mukopolysaccharide, Glykoproteine- und Lipide nachzuweisen (8).

Für diese Färbung wurde ein PAS-Reaktion Färbekit von Morphisto (Morphisto GmbH, Deutschland) verwendet. Die Gewebeschnitte wurden dafür 2 x 5 Minuten in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Ethanolreihe (99,9 % EtOH 2 x 5 Minuten, 96 % EtOH 1 x 2 Minuten und 70 % EtOH 1 x 2 Minuten) rehydriert und anschließend in *Aqua dest.* gebracht. Danach wurden die Schnitte für 15 Minuten in 1%ige Perjodsäure gestellt und anschließend für fünf Minuten mit *Aqua fontis* und zwei Minuten mit *Aqua dest.* gespült. Darauf wurden sie für 20 Minuten in Schiff'sches-Reagenz gebracht, anschließend für fünf Minuten in *Aqua fontis* gespült und die Zellkerne für fünf Minuten mit saurem Hämatoxylin nach Mayer gefärbt. Nach einem erneuten Spülvorgang mit *Aqua dest.* und danach *Aqua fontis* wurden die Gewebeschnitte dehydriert und mit DPX (Fluka) eingedeckt.

2.2.3. Immunhistochemische Färbung

Um die ausgewählten Proteine der Hemidesmosomen sowie der Basalmembran nachzuweisen wurde die Immunhistochemie ausgewählt und mit den folgenden Antikörpern (Tab. 1) gearbeitet. Die Färbeprotokolle der jeweiligen Antikörper sind im Anhang der Arbeit beigelegt.

| Antikörper-Name | Antikörper-Typ | Firma | Katalog-Nr. | Verdünnung |
|---|----------------|---------------|-------------|------------------|
| Anti-Plectin (polyklonal, Kaninchen) | primär | Sigma Aldrich | HPA025967 | 1:50 |
| Anti-Integrin β 4 (polyklonal, Kaninchen) | primär | Sigma Aldrich | HPA036348 | 1:400 |
| Anti-Laminin (polyklonal, Kaninchen) | primär | Dako | Z0097 | 1:10000 |
| BrightVision Poly-HRP-anti-rabbit | sekundär | ImmunoLogic | DPVR110HRP | RTU ¹ |
| Anti-Kollagen-IV (monoklonal, Maus) | primär | Cellmarque | CIV22 | 1:100 |
| BrightVision Poly-HRP-anti-mouse | sekundär | ImmunoLogic | DPVM110HRP | RTU |

Tabelle 1. Liste der verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie. 1 RTU = ready to use.

Um das Paraffin von den histologischen Schnitten zu entfernen wurden diese 2 x für 8 Minuten in Xylol gestellt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 3 Minuten 100 % EtOH, 1 x 3 Minuten 96 % EtOH) rehydriert.

Ein Peroxidaseblock wurde zur Verhinderung der Mitreaktion von endogenen Peroxidasen mit dem Chromogen und einer damit entstehenden unspezifischen Hintergrundfärbung für 15 Minuten durchgeführt. Dieser wurde kurz vorher aus 40 ml Methanol, 1 ml 30 % Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und 9 ml *Aqua dest.* hergestellt.

Weiter folgte die Antigendemaskierung, welche in der Immunhistochemie einen essenziellen Schritt darstellt, der sowohl das Färbeergebnis als auch die Färbeintensität stark beeinflussen kann. Durch die Fixierung des Gewebes mit Formol entstehen Aldehydvernetzungen, welche die Bindung des Antikörpers an das Epitop verhindern kann. Ebenfalls ist die Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Antigens möglich, sodass es vom Antikörper nicht mehr erkannt wird (9). Da es notwendig ist, diese Proteinvernetzungen wieder aufzuheben, wurden zwei verschiedene Behandlungen angewendet. Bei Anti-Integrin β 4 und Anti-Plectin wurde eine hitzeinduzierte Demaskierung durchgeführt, indem die Gewebeschnitte in Küvetten mit einem Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6 für 30 Minuten in einen Dampfgarer (48780EE Intellisteam, Morphy Richards, England) gestellt wurden.

Bei Anti-Kollagen-IV und Anti-Laminin wurde eine enzymatische Antigendemaskierung vorgenommen. Dafür wurden 0,05 g Protease (P5147, Sigma Aldrich, Vereinigte Staaten) in 50 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gelöst, die Schnitte darin 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit *Aqua dest.* gespült um eine weitere Enzymreaktion zu verhindern.

Um eine unspezifische Färbung zu verhindern wurde vor Aufbringen des Primärantikörpers ein Proteinblock durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte mit einem 1,5%igen Normal Goat Serum (Dako, Vereinigte Staaten) für 30 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert.

So wurden durch die Bindung der Proteine des Normalserums die elektrostatischen Ladungen des Gewebes abgesättigt, damit der Primärantikörper an den spezifischen, zu untersuchenden Epitopen binden kann (9).

Im Rahmen der Immunhistochemie wurde ein indirektes Detektionssystem verwendet, wobei der jeweilige Primärantikörper an das Antigen im Gewebe bindet. Danach wurde ein Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet und mit dem Markerenzym Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) konjugiert ist, aufgebracht. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und bei Auftropfen des Chromogens entsteht eine Enzym-Substrat-Reaktion, die durch einen Farbniederschlag die spezifischen Bindungsstellen sichtbar macht. (9).

Nach dem Proteinblock wurden die Schnitte mit dem jeweiligen Antikörper (in entsprechender Verdünnung in PBS, Tab. 1) bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper (Tab. 1) aufgebracht und die Gewebeproben damit für 30 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Für Anti-Integrin β 4, Anti-Plectin und Anti-Laminin wurde als Sekundärantikörper BrightVision Poly-HRP-anti-rabbit (ImmunoLogic, Duiven, Die Niederlande) verwendet. Für Anti-Kollagen-IV (Cellmarque, Vereinigte Staaten) wurde BrightVision Poly-HRP-anti-mouse verwendet. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Schnitte 3 x 3 Minuten in PBS gewaschen.

Um die stattgefundene Antigen-Antikörperbindung sichtbar zu machen wurde das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin in Form von DAB-Solution (TA-125-QHDX, Quanto, Richard Allan Scientific, Vereinigte Staaten) verwendet. Diese Lösung wurde auf die Gewebeschnitte aufgetropft und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten in *Aqua dest.* gewaschen.

Die Schnitte wurden danach für drei Minuten mit Hämalaun nach Mayer (8) gefärbt um die Zellkerne sichtbar zu machen. Anschließend wurden sie für 10 Minuten mit *Aqua fontis* gespült. Nach der Kernfärbung wurden die Gewebeproben zur Dehydrierung in eine aufsteigende Alkoholreihe mit 1 x 3 Minuten 96 % EtOH und 2 x 3 Minuten 100 % EtOH gelegt. Abschließend wurden die Schnitte für 2 x 3 Minuten in Xylol gestellt und mit DPX (Fluka) im Eindeckautomaten Microm (CTM6) eingedeckt.

2.3. Auswertung der Färbungen

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden unter einem Lichtmikroskop Olympus BX53 (Olympus Scientific Solutions, Japan) betrachtet und ausgewertet. Aufnahmen von entsprechenden Abschnitten wurde mit dem Programm cellSens Entry (Olympus Lifescience, Japan) gemacht.

2.3.1. Morphologie

Bei jedem HE-gefärbten Schnitt wurde auf folgende morphologische Besonderheiten, welche jeweils mit negativ (-), geringgradig (+), mittelgradig (++) und hochgradig (+++) bewertet wurden, geachtet:

- Zerstörung des Epithels (Auflösung des Zellverbandes)
- Ablösung des Epithels *in toto* von der Lamina propria
- zellarmes Bindegewebe der Lamina propria
- Vakuolen

2.3.2 Zottenlängen

An den HE-gefärbten Schnitten wurde zusätzlich die Länge der Darmzotten mit Hilfe des Messtools von cellSens Entry (Olympus Lifescience) gemessen. Pro Schwein und Schnitt wurde an vier verschiedene Lokalisationen die Zottenlänge von der Zottenbasis bis zur Zottenspitze gemessen. Anschließend wurde der Mittelwert aus den vier gemessenen Längen ermittelt.

2.3.2. Immunhistochemie

Weiters wurden bei jedem Schnitt das Vorhandensein des Signals durch die spezifische Antikörperbindung in der Kryptenregion, an der Zottenbasis, der Zottenmitte und der Zottenspitze ausgewertet. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ, die Signalpräsenz wurde dabei mit negativ (-), geringgradig (+), mittelgradig (++) und hochgradig (+++) bewertet. Bei der Wertung negativ konnte nur ein schwaches Signal in weniger als fünf Krypten oder Zotten dargestellt werden. Als geringgradig wurde bewertet, wenn das Signal schwach ausgeprägt war oder in weniger als 15 Zotten beziehungsweise Krypten vorkam. Mittelgradig wurde verwendet, wenn mehr als die Hälfte der beurteilten Strukturen ein gut sichtbares Signal aufwiesen und hochgradig, wenn ein deutliches Signal in allen Zotten oder Krypten sichtbar war.

Bei jedem Durchgang der Immunhistochemie wurde jeweils ein histologischer Schnitt des Schweinejejunums als Negativkontrolle mitgenommen. Dieser wurde, statt mit PBS verdünnten Antikörper, nur mit PBS inkubiert um zu kontrollieren ob der Sekundärantikörper unspezifisch im Gewebe gebunden hat.

Für jeden Antikörper wurden interne Positivkontrollen, d.h. Strukturen in den untersuchten Schnitten mit bekannter Antigenkonzentration, verwendet. Bei Plectin und Integrin $\beta 4$ wurden als Positivkontrolle das Endothel der Blutgefäße in der Lamina propria und der Tela submucosa des Jejunums herangezogen. Bei Laminin und Kollagen-Typ-IV wurden die Basallamina der Blutgefäße und der glatten Muskelzellen in der Darmwand als Positivkontrolle verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Morphologie

Die Auswertung der beurteilten morphologischen Besonderheiten wurde in Tabelle 2 für alle Schweine (PIG) zusammengefasst und in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.

| Schwein | Epithel zerstört | Epithelablösung | Vakuolen | zellarmes Bindegewebe der Lamina propria |
|----------------------|------------------|-----------------|----------|--|
| PIG 1 Kontrolle | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 1 A | + | ++ | ++ | + |
| PIG 1 B | +++ | - | - | - |
| PIG 2 Kontrolle | - | ++ | ++ | + |
| PIG 2 A | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 B | - | ++ | + | - |
| PIG 3 Histokontrolle | - | + | + | + |
| PIG 3 Kontrolle | - | ++ | ++ | + |
| PIG 3 A | - | ++ | ++ | + |
| PIG 3 B | - | ++ | ++ | - |
| PIG 4 Histokontrolle | - | - | - | - |
| PIG 4 Kontrolle | - | - | ++ | ++ |
| PIG 4 A | ++ | + | ++ | + |
| PIG 4 B | ++ | + | ++ | ++ |

Tabelle 2. Morphologische Besonderheiten.

3.1.1. Epithelzerstörung

Bei diesem morphologischen Kriterium wurde auf eine eventuelle Auflösung des Zellverbandes, solitäre Enterozyten beziehungsweise Mucosafragmente im Bereich des Darmepithels geachtet (Abb. 2).

Bei einem Gewebeschnitt lag eine hochgradige, bei zwei weiteren eine ausgeprägte Epithelzerstörung vor. Bei den restlichen Schnitten war es nicht das dominierende Erscheinungsbild (Tab. 2).

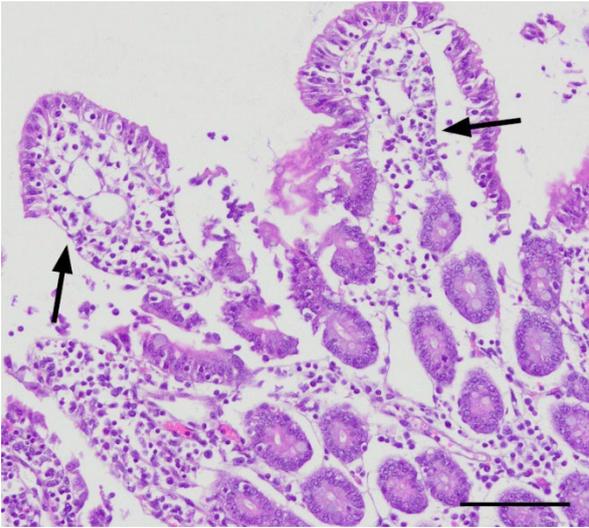


Abbildung 2. Beispielbild für zerstörtes Zottenepithel. Die Pfeile markieren Zottenabschnitte mit fehlendem Epithel und freiliegender Lamina propria. Färbung: Hämatoxylin- und Eosin, Maßstab: 100 µm.

3.1.2. Epithelablösung

Bei der Epithelablösung kam es zu einer Trennung der Enterozyten von der Lamina propria mit einem dazwischenliegenden Spalt. Die Ablösungen des Epithels präsentierten sich bei jeder Zotte unterschiedlich und wurden in allen Abschnitten einer Zotte (Zottenspitze, Zottenmitte, Zottenbasis) gefunden (Abb. 3). Bei acht Gewebeschnitten fand eine mehrheitliche Ablösung statt, bei drei konnte dieser Vorgang an einigen Zotten beobachtet werden und bei den restlichen drei war keine Ablösung zu beobachten (Tab. 2).



Abbildung 3. Beispielbild für Epithelablösung. Die Pfeile markieren die Ablösung des Epithels von der Lamina propria im Bereich der Zottenspitze. Färbung: Hämatoxylin- und Eosin, Maßstab: 100 µm.

3.1.3. Vakuolen

Bei diesem Kriterium wurde die Anwesenheit von Vakuolen bewertet. Hierbei handelte es sich um rundliche Strukturen, welche sich zwischen den Epithelzellen und der Lamina propria beziehungsweise in der Lamina propria befanden und bei ausgeprägtem Auftreten zu einem schaumigen Aussehen führten (Abb. 4).

Zehn Gewebeschnitte wiesen eine deutliche Vakuolenbildung auf (Tab. 2).

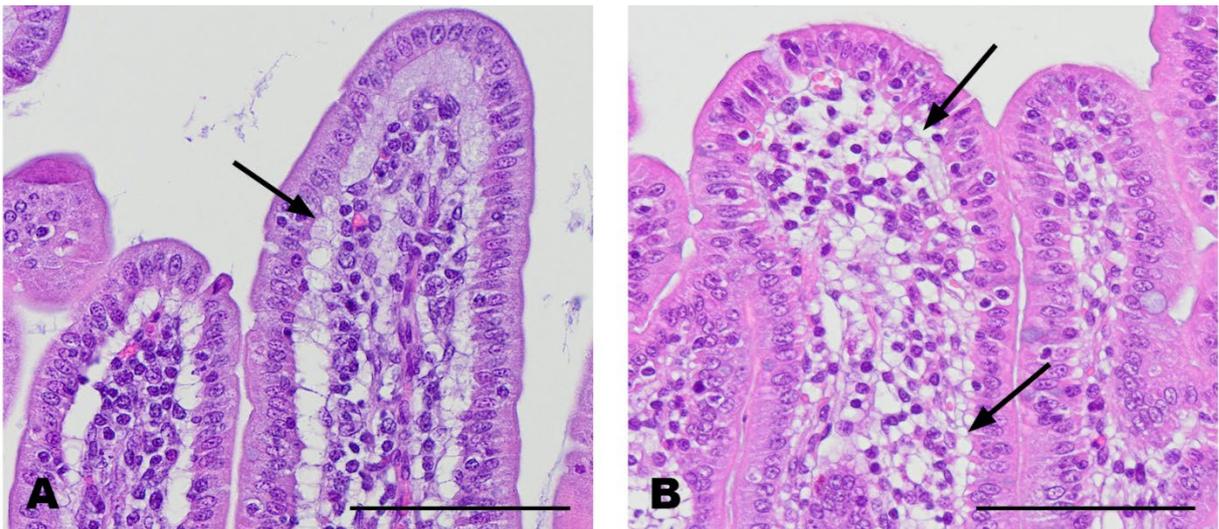


Abbildung 4. Beispielbild für Vakuolenbildung. (A) Die per Pfeil markierte Stelle zeigt eine beginnende, subepitheliale Vakuolisierung. (B) Eine fortgeschrittene Vakuolenbildung mit veränderter Lamina propria im Bereich der Zottenmitte- und Spitze ist durch Pfeile gekennzeichnet. Färbung: Hämatoxylin- und Eosin, Maßstab: 100 µm.

3.1.4. Zellarme Lamina propria

Bei vier Schnitten konnte man in vielen Zotten aber auch im Kryptenbereich eine zellarme, locker erscheinende, Lamina propria entdecken. Die Lamina propria wirkte leer und die einzelnen Strukturen des Bindegewebes auseinander geweitet (Abb. 5). Bei sechs weiteren Schnitten war diese morphologische Besonderheit geringgradig ausgeprägt und konnte bei den restlichen fünf Schnitten nicht beobachten werden (Tab. 2).

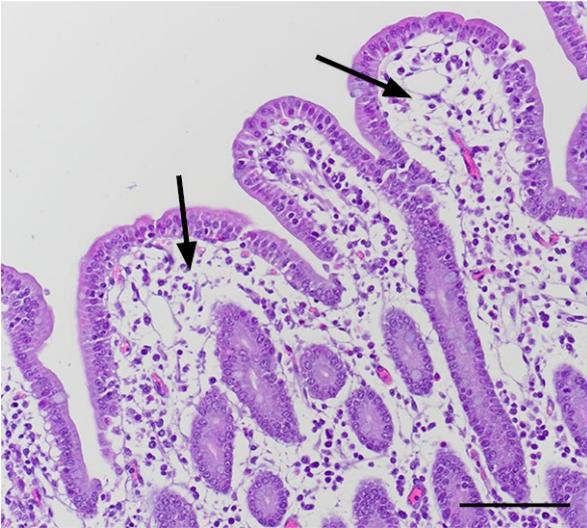


Abbildung 5. Beispielbild für zellarmes Bindegewebe. Die Pfeile kennzeichnen die zellarme, leer erscheinende Lamina propria. Färbung: Hämatoxylin- und Eosin, Maßstab: 100 µm.

3.2. PAS-Reaktion

Die Basallamina konnte mittels der PAS-Reaktion dargestellt werden (Abb. 6). Nachdem sich aber auch viele andere Strukturen im Epithel und der Lamina propria zum Teil deutlicher darstellen lassen, war die PAS-Reaktion der Lamininfärbung unterlegen und wurde nicht weiter ausgewertet.

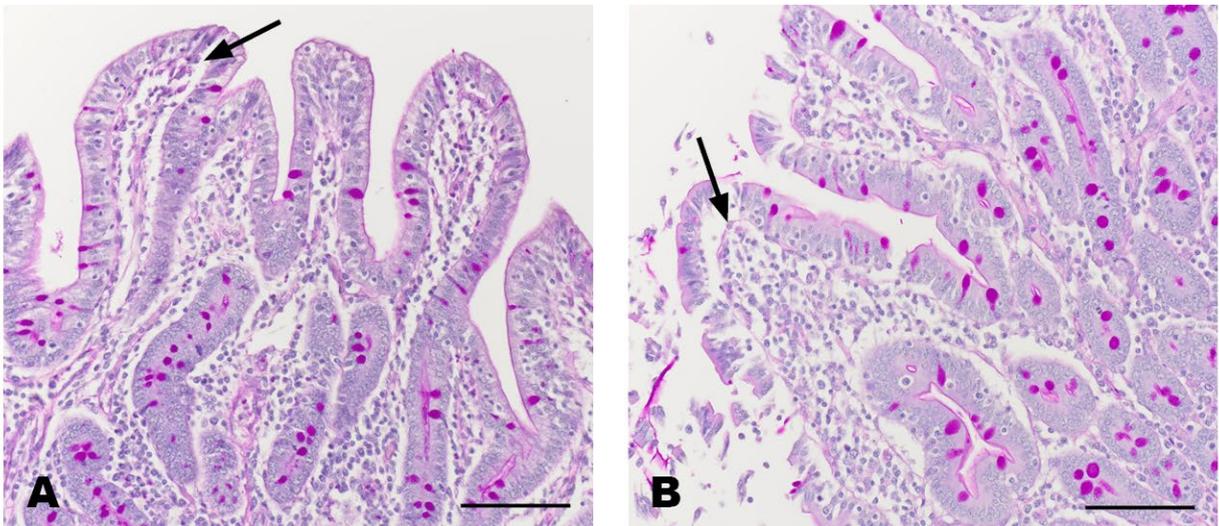


Abbildung 6. Darstellung der Darmzotten durch die PAS-Reaktion. (A) und (B) Die Basallamina (Pfeile) lässt sich bei Ablösung des Epithels erkennen. Maßstab: 100 µm.

3.3. Zottenlänge

Die gemessenen Darmzottenlängen bewegten sich in einem Bereich zwischen 210 und 710 μm und wiesen einen Gesamtmittelwert von 376 μm auf (Tab. 3). Die Zottenlänge war bei Schwein 1 Behandlungsgruppe B aufgrund hochgradiger Epithelzerstörung nicht messbar.

| Schwein | Zotte 1 (μm) | Zotte 2 (μm) | Zotte 3 (μm) | Zotte 4 (μm) | Mittelwert Zottenlänge (μm) |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--|
| PIG 1, Kontrolle | 336 | 273 | 349 | 398 | 339 |
| PIG 1 A | 422 | 389 | 286 | 225 | 331 |
| PIG 1 B | 240 | | | | |
| PIG 2, Kontrolle | 347 | 381 | 440 | 365 | 383 |
| PIG 2 A | 264 | 437 | 312 | 272 | 321 |
| PIG 2 B | 485 | 322 | 710 | 332 | 462 |
| PIG 3 Histokontrolle | 325 | 324 | 345 | 288 | 321 |
| PIG 3, Kontrolle | 633 | 505 | 701 | 655 | 623 |
| PIG 3 A | 518 | 467 | 345 | 329 | 415 |
| PIG 3 B | 420 | 358 | 407 | 388 | 393 |
| PIG 4, Histokontrolle | 339 | 422 | 413 | 292 | 367 |
| PIG 4, Kontrolle | 329 | 322 | 302 | 419 | 343 |
| PIG 4 A | 268 | 346 | 284 | 297 | 299 |
| PIG 4 B | 294 | 382 | 262 | 210 | 287 |

Tabelle 3. Gemessene Zottenlängen.

3.4. Plectin

In den Krypten konnte, bis auf drei Gewebeschnitte, Plectin nachgewiesen werden. Es war jedoch nur in den oberflächlich gelegenen Kryptenbereichen (am Übergang zu den Zotten) stärker gefärbt zu sehen. Hier stellte sich vor allem der apikale Teil der Enterozyten der Krypten, als auch der Zotten, im Querschnitt als positiv dar. Weiters fanden sich vereinzelt schmale, längliche Färbereaktionen an der basalen Seite der Kryptenzellen.

Bei der Auswertung der Zotten konnte der Schnitt von Schwein 1 Behandlungsgruppe B nicht berücksichtigt werden, da die Zerstörung des Epithels so massiv und eine Beurteilung dadurch nicht möglich war. Bei allen Gewebeschnitten wurde in den beurteilten Regionen der Darmzotten Plectin nachgewiesen (Tab. 4). Es konnte jedoch nicht in jeder einzelnen Zotte nachgewiesen werden und die Intensität des Signals variierte von Zotte zu Zotte.

| Schwein | Krypten | Zottenbasis | Zottenmitte | Zottenspitze |
|-------------------------------------|---------|-------------|-------------|--------------|
| PIG 1 Kontrolle | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 1 A | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 1 B | - | | | |
| PIG 2 Kontrolle | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 A | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 B | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 3 Histokontrolle | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 3 Kontrolle | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 3 A | + | + | ++ | ++ |
| PIG 3 B | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 Histokontrolle | - | - | + | + |
| PIG 4, Kontrolle | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 A | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 B | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 A Negativkontrolle | - | - | - | - |

Tabelle 4. Semiquantitative Auswertung von Plectin in den unterschiedlichen Regionen des Jejunums.

Bei Zotten mit Epithelablösung befand sich das Signal meist basal der Enterozyten, ihnen anliegend (Abb. 7A). Ebenso konnte man diese Lokalisation bei, vom Zellverband gelösten, Epithelzellen beobachten.

In manchen Zotten war Plectin als durchgehende Linie basal der Enterozyten sichtbar (Abb. 7A), vor allem bei morphologisch intakten Zotten ohne Epithelablösung. Ebenfalls ließ sich am apikalen Teil der Enterozyten eine Färbung im Bereich der Mikrovilli erkennen (Abb. 7A).

Bei unbeschädigten Zotten war das Färbesignal von Plectin im Vergleich zu Integrin $\beta 4$ leichter sichtbar.

Das Färbesignal der Zotten konnte, bei Schnitten mit Vakuolenbildung, punktförmig zwischen den Vakuolen beziehungsweise auf den Membranresten der rupturierten Vakuolen beobachtet werden. Weiters fanden sich bei drei Gewebeschnitten vereinzelt eine flächige Immunreaktion auf der der Oberfläche der Lamina propria.

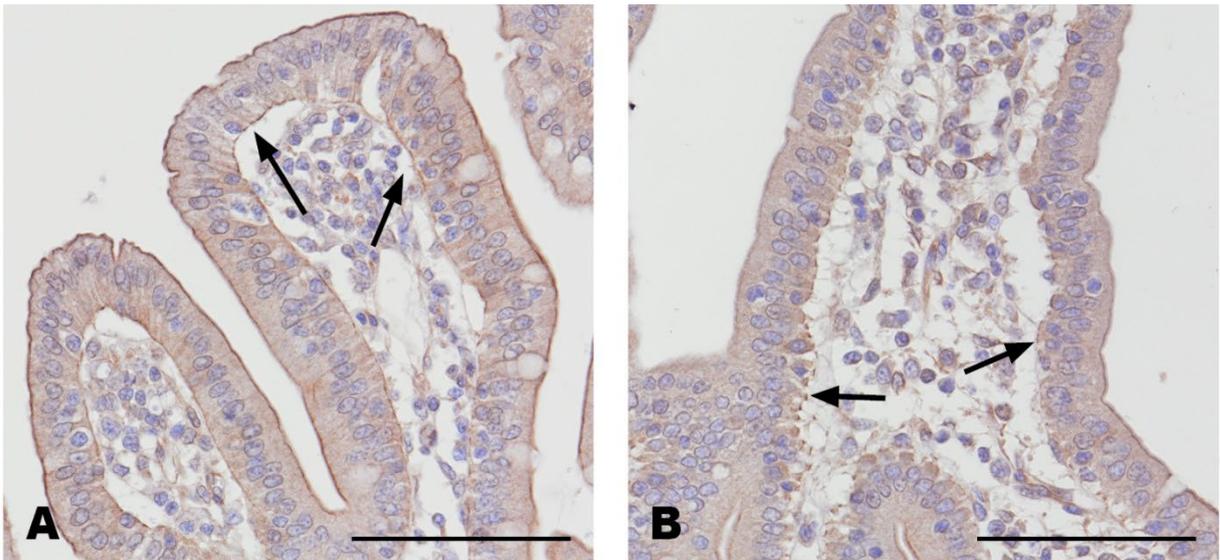


Abbildung 7. Immunhistochemische Färbung von Plectin. Die Antikörperbindung ist durch die braune Färbung dargestellt. **(A)** Darstellung der Anti-Plectinbindung im Zottenmitten- und Spitzenbereich als durchgehende Linie basal in den Epithelzellen. **(B)** Sichtbarkeit des punktförmigen Signals subepithelial. Die Pfeile kennzeichnen unter den einzelnen Epithelzellen kleine, längliche Strukturen. Maßstab: 100 μm .

3.5. Integrin β 4

Im Bereich der Krypten konnte bei fünf Gewebeschnitten ein schwaches Signal basal in den Kryptenepithelzellen gesehen werden (Tab. 5). Dieses betraf aber nur den oberflächlichen Kryptenbereich, welcher direkt unter den Zotten liegt (Abb. 7).

Bei allen Gewebeschnitten konnte in allen drei ausgewerteten Regionen der Zotten Integrin β 4 mehrheitlich dargestellt werden (Tab. 5).

| Schwein | Krypten | Zottenbasis | Zottenmitte | Zottenspitze |
|-----------------------------|---------|-------------|-------------|--------------|
| PIG 1 Kontrolle | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 1 A | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 1 B | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 Kontrolle | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 A | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 B | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 3 Histokontrolle | - | + | + | + |
| PIG 3 Kontrolle | - | + | + | + |
| PIG 3 A | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 3 B | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 Histokontrolle | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 Kontrolle | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 A | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 B | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 1 A Negativkontrolle | - | - | - | - |

Tabelle 5. Semiquantitative Auswertung von Integrin β 4 in den unterschiedlichen Regionen des Jejunums.

Am deutlichsten war die Integrin β 4-Färbung in den Zotten mit Epithelablösung, meist in Form von länglichen Strukturen basal der Enterozyten. Wenn die Epithelzellen von der Lamina propria abgelöst waren, konnte selten auch eine deutliche, durchgehende Linie basal an den Enterozyten beobachtet werden (Abb. 8B).

Die Lokalisation von Integrin β 4 in Zotten mit hochgradiger Vakuolenbildung zeigte sich unterschiedlich. In manchen Zotten wurden dünne Membranstrukturen zwischen dem Epithel und der Lamina propria beobachtet, auf denen kleine, längliche Färbesignale sichtbar waren.

In anderen Zotten waren die Färbesignale unter den Vakuolen oder direkt basal der Enterozyten lokalisiert.

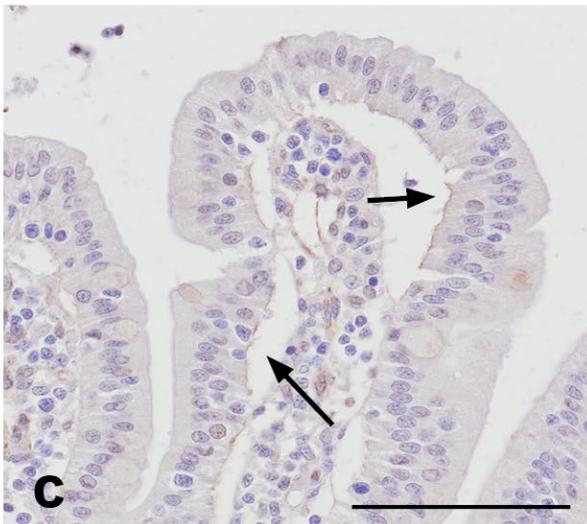
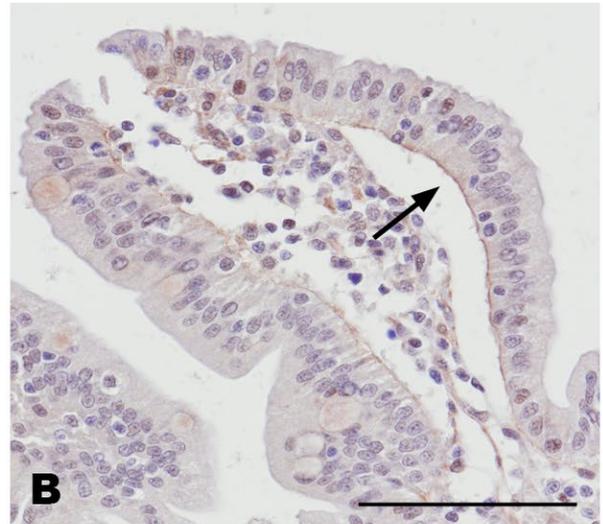
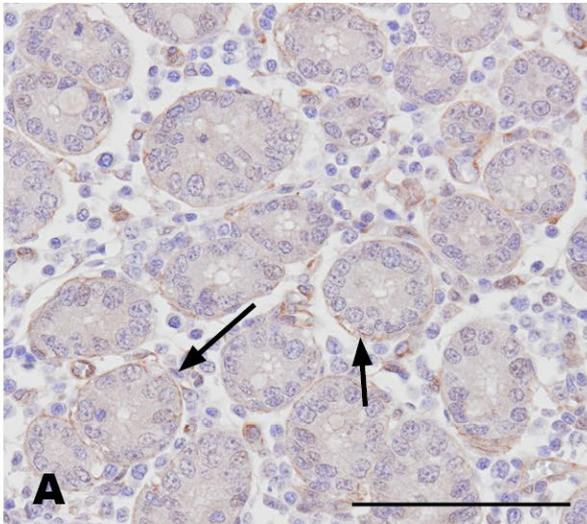


Abbildung 8. Immunohistochemische Färbung von Integrin $\beta 4$. Die Antikörperbindung ist durch die braune Färbung dargestellt. **(A)** Signal Darstellung von Integrin $\beta 4$ in den apikalen Kryptenreihen. **(B)** und **(C)** Antikörperbindung bei Zotten mit abgelöstem Epithel. Das Signal in Form einer dünnen, zum Teil durchgehenden Linie basal an den Epithelzellen wird durch die entsprechenden Pfeile markiert. Maßstab: 100 μm .

3.6. Laminin

Bei allen 14 Gewebeschnitten konnte mit dem Antikörper Anti-Laminin die Basallamina der Darmzotten und der Krypten sichtbar gemacht werden. In zwei Proben war die Signalintensität der Basallamina in der Kryptenregion weniger ausgeprägt als in den restlichen Schnitten (Tab. 6).

| Schwein | Krypten | Zottenbasis | Zottenmitte | Zottenspitze |
|-----------------------------|---------|-------------|-------------|--------------|
| PIG 1 Kontrolle | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PIG 1 A | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 1 B | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 Kontrolle | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 A | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 B | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PIG 3 Histokontrolle | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PIG 3 Kontrolle | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PIG 3 A | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PIG 3 B | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 Histokontrolle | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 Kontrolle | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 A | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 B | ++ | ++ | ++ | ++ |
| PIG 1 A Negativkontrolle | - | - | - | - |

Tabelle 6. Semiquantitative Auswertung von Laminin in den unterschiedlichen Regionen des Jejunums.

Besonders bei Betrachtung der Darmzotten konnte man die Basallamina als durchgehende Linie von der Zottenbasis bis zur Zottenspitze darstellen (Abb. 9B). Die klare Abgrenzung der Basallamina zu anderen Strukturen im Gewebe wurde durch eine sehr geringe, unspezifische Hintergrundfärbung ermöglicht.

In Zotten, bei denen eine Epithelablösung von der Lamina propria stattgefunden hat, wurde die Basallamina stets an der Oberfläche der Lamina propria gefunden (Abb. 9B). In manchen Zotten waren auch nur einseitige Epithelablösungen sichtbar.

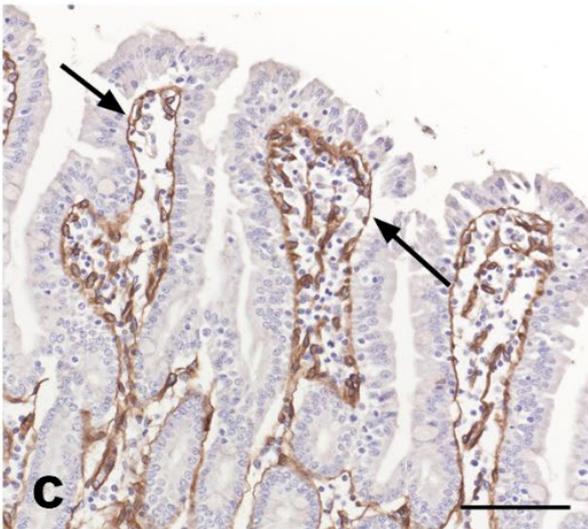
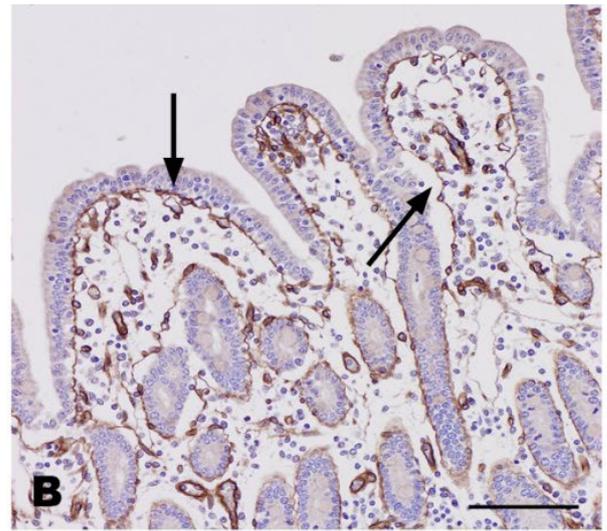
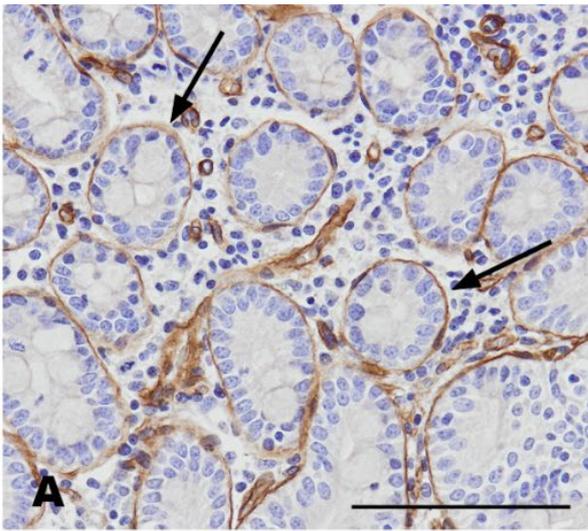


Abbildung 9. Immunhistochemische Färbung von Laminin. Die Antikörperbindung ist durch die braune Färbung dargestellt. **(A)** Darstellung von Laminin im Kryptenbereich. Die Pfeile kennzeichnen das braune Signal der Basallamina. **(B)** Lamininfärbung in den Darmzotten. Der rechte Pfeil markiert die Lokalisation von Laminin an der Oberfläche der Lamina propria bei partieller Epithelablösung, der linke die Basallamina unter dem anliegenden Epithel. **(C)** Lamindarstellung in Zotten mit abschnittsweiser Epithelzerstörung. Maßstab: 100 μm .

Im Gegensatz zu den immunhistochemischen Färbungen von Plectin und Integrin $\beta 4$, waren die Vakuolen in den Laminin-gefärbten Schnitten nicht mehr sichtbar. Um zu überprüfen, ob die enzymatische Antigendemaskierung dafür verantwortlich war, wurde ein Färbedurchgang mit reduzierten Inkubationszeiten (20, 15 und 10 Minuten) der Schnitte in der Proteaselösung durchgeführt. Die Vakuolen waren danach erhalten, aber die Antigendemaskierung war nicht ausreichend für ein gut sichtbares Färbesignal.

3.7. Kollagen-IV

Die Färbung von Kollagen-IV wies eine geringere Färbeintensität im Vergleich zu Laminin auf, dadurch wurde die Verfolgbarkeit der Basallamina in den verschiedenen Zottenregionen erschwert.

In den Krypten konnte, bis auf zwei Gewebeschnitte, keine Kollagen-IV-Färbung nachgewiesen werden. Bei den zwei Proben, in denen eine Färbung im Kryptenbereich sichtbar war, fand man sie in den Plicae circulares direkt unter den Zotten (Abb. 9A). In den tiefer liegenden Kryptenbereichen konnte kein oder nur vereinzelt Kollagen-IV basal des Kryptenepithels festgestellt werden (Tab. 7).

| Schwein | Krypten | Zottenbasis | Zottenmitte | Zottenspitze |
|------------------------|---------|-------------|-------------|--------------|
| PIG 1 Kontrolle | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 1 A | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 1 B | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 Kontrolle | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 A | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 B | - | + | ++ | ++ |
| PIG 3 Histokontrolle | - | + | ++ | ++ |
| PIG 3 Kontrolle | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 3 A | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 3 B | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 Histokontrolle | - | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 Kontrolle | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 4 A | - | + | + | + |
| PIG 4 B | + | ++ | ++ | ++ |
| PIG 2 Negativkontrolle | - | - | - | - |

Tabelle 7. Semiquantitative Auswertung von Kollagen-IV in den unterschiedlichen Regionen des Jejunums.

In der Zottenregion konnte an der Zottenbasis Kollagen-IV bei drei Schnitten schwach und bei manchen Zotten gar nicht nachgewiesen werden. In der Zottenmitte und Zottenspitze war das Färbesignal mehrheitlich in Form von einer durchgehenden Linie sichtbar (Tab. 7). Bei Zotten mit beginnender beziehungsweise fortschreitender Epithelablösung war die Basallamina am besten darstellbar und von anderen Strukturen unterscheidbar. Wie bei Laminin konnte bei Epithelablösung die Basallamina an der Oberfläche der Lamina propria gesehen werden und nicht subepithelial (Abb. 9B).

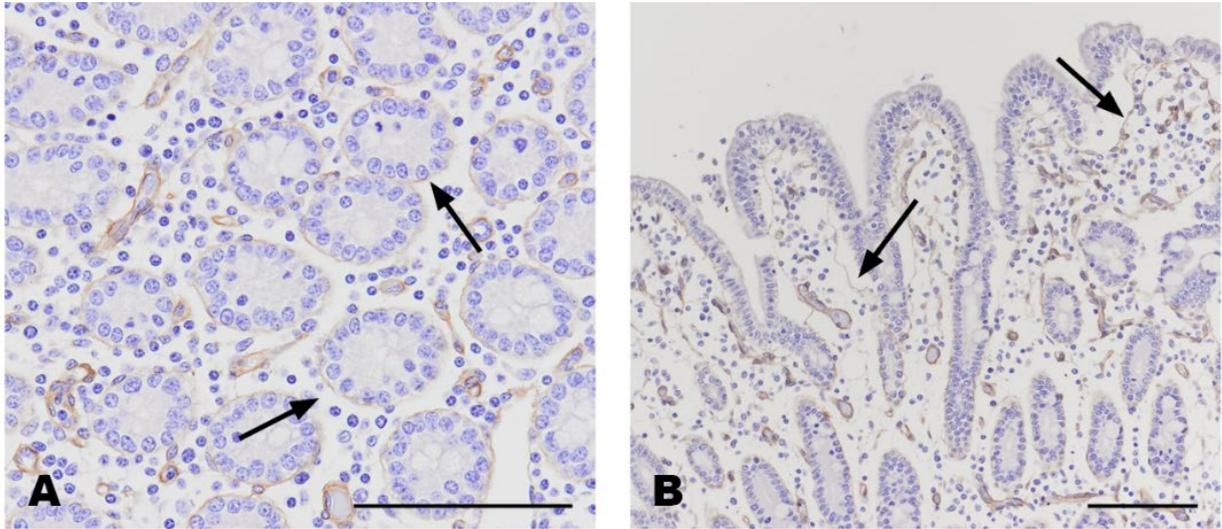


Abbildung 10. Immunhistochemische Färbung von Kollagen-IV. Die Antikörperbindung ist durch die braune Färbung dargestellt. **(A)** Darstellung von Kollagen-IV bei den Plicae circulares in der Basallamina der apikal gelegenen Krypten. **(B)** Kollagen-IV in der Zottenmitte- und Zottenspitze bei sich ablösendem Epithel. Die Krypten weisen in diesem Bild keine Immunfärbung auf. Maßstab: 100 μm .

4. Diskussion

Die Fragestellung dieser Arbeit umfasste das Vorkommen und die Verteilung der Typ II hemidesmosomalen Proteine Plectin und Integrin $\beta 4$ und sowie die Proteine der Basallamina Laminin und Kollagen-IV. Zusätzlich sollte deren Rolle bei der Ablösung des Darmepithels untersucht werden.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Morphologie der einzelnen Gewebeschnitte mittels HE-Färbung betrachtet. Die dominierenden Erscheinungsbilder waren einerseits Ablösungen des Epithels und andererseits eine Bildung von Vakuolen. Die Vakuolenbildung trat sowohl in beiden Behandlungsgruppen als auch in den Kontrollen auf. Die vorhandenen Vakuolen in der Lamina propria werden in der Literatur hinsichtlich Funktionsweise und Zeitpunkt des Auftretens kontrovers diskutiert. Einerseits wird die Anwesenheit von Vakuolen in morphologischen Studien bei Saugferkeln in den ersten Lebenswochen beschrieben (10, 11). Diese werden mit der Resorption von Makromolekülen und Immunglobulinen in dieser Zeit in Verbindung gebracht. Die beschriebenen Vakuolen befinden sich intraepithelial und wurden im Jejunum von Schweinen bis zum 11. Lebenstag beobachtet (11). Die Schweine in dieser Arbeit waren ca. 3 Monate alt und auch die Lokalisation der Vakuolen in der Lamina propria deckten sich nicht mit Ergebnissen der oben genannten Studien.

Eine andere Studie beschäftigte sich mit den morphologischen Veränderungen der Mucosa des Jejunums während einer Fastenperiode. Hier wurde das Auftreten von Vakuolen in der Lamina propria bei männlichen Wistar-Ratten, welchen fünf Tage lang die Nahrung entzogen wurde, beschrieben (12). Diese Vakuolen decken sich morphologisch mit jenen der Schweine in dieser Arbeit. Weiters konnte durch die experimentell induzierte Nahrungskarenz ein Rückzug beziehungsweise eine Schrumpfung der Lamina propria an der Zottenspitze nachgewiesen werden, welche ebenfalls zum Teil in dieser Arbeit beobachtet werden konnte. Diese Prozesse waren jedoch nach Fütterung der Ratten reversibel (12). Es bedarf in Zukunft noch weitere Forschung um die Gründe des Auftretens von Vakuolen in der Lamina propria des Jejunums sowie deren Funktion besser zu verstehen.

Plectin als intrazellulär gelegenes Protein und Bestandteil von Typ II HDs konnte in den oberflächlich gelegenen Kryptenreihen basal in den Kryptenepithelzellen nachgewiesen werden. In den drei untersuchten Zottenregionen konnte Plectin sowohl basal als auch apikal in den Epithelzellen beobachtet werden.

Diese Ergebnisse decken sich mehrheitlich mit den Beobachtungen der Studie über die Verteilungsmuster von Plectin in Dünndarm-Schnitten von Ratten. Jedoch wurde hier nur der Nachweis von Plectin in den Krypten bestätigt und nicht ob es Unterschiede in der Färbung in einzelnen Kryptenreihen gab (13). Die Ursachen der Färbung von Plectin nur in den oberflächlich gelegenen Kryptenreihen in dieser Arbeit könnten auf ein Fehlen von Typ II Hemidesmosomen in den unteren Kryptenreihen hindeuten. Die Expression von Plectin wurde nur in differenzierten Zottenepithelzellen nachgewiesen, mit einem steigenden Plectingradient von der Zottenbasis bis zur Zottenspitze (14). Es wird diskutiert, dass die fehlende Expression in den Krypten einen Kontrollmechanismus darstellt, um die Formation von Typ II HDs in undifferenzierten Kryptenzellen zu verhindern (15). Die in den Zottenregionen beobachtete apikale Färbung im Bereich der Mikrovilli der Epithelzellen deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie über das Plectinvorkommen in unterschiedlichen Gewebetypen. In dieser wurde ebenfalls eine apikale Antigenkonzentration in den Dünndarmepithelzellen von Ratten festgestellt (13). Es kann diskutiert werden, dass Plectin die Aktinfilamente der Mikrovilli mit den Intermediärfilamenten der Epithelzelle verbindet. Die Funktion von Plectin als Bindeglied zwischen Mikrotubuli (Aktinfilamenten) und Intermediärfilamenten in Zellen, ist in der Literatur beschrieben (16, 17).

Die Integrin β 4-Untereinheit konnte, ähnlich zu Plectin, nur in den oberflächlich gelegenen Kryptenbereichen in Form einer diskontinuierlichen Umrandung dargestellt werden. In der Literatur wird die Verteilung von Integrin β 4 entlang der Krypten-Zotten-Achse als gleichmäßig beschrieben (18), allerdings wird in den Kryptenzellen eine Variante von Integrin β 4A exprimiert, welcher das COOH-terminale Fragment der zytoplasmatischen Domäne fehlt (15). Eine Erklärung für das abweichende Ergebnis in dieser Arbeit wäre, dass der verwendete Antikörper diese Variante von Integrin β 4 nicht erkennt und daher keine Antikörperbindung entstehen kann. Die Färbeintensität sowie das Verteilungsmuster der Integrin β 4-Bindung in den drei Zottenregionen konnte als mittelgradig bewertet werden und präsentierten sich morphologisch ident zu Plectin. Dieses ähnliche Verteilungsmuster beziehungsweise die Kolokalisation von Plectin und Integrin β 4 wurde auch mittels Doppelimmunfärbung dieser zwei Proteine in einer HT29-Fu-Zelllinie beschrieben (3).

Der immunhistochemische Nachweis von Laminin als wesentliche Komponente der Basallamina konnte in allen untersuchten Regionen bewiesen werden. Der verwendete Antikörper richtet sich gegen die α 1-Kette von Laminin-1. In der Literatur wird die Verteilung von Laminin-1 im Dünndarm kontrovers diskutiert.

Eine Studie, die unter anderem die Verteilung der $\alpha 1$ -Kette in den drei Dünndarmabschnitten Duodenum, Jejunum und Ileum beim Menschen untersuchte, konnte eine Färbung des Krypten- und Zottenbereichs im Jejunum feststellen (2). Auf der anderen Seite wird im humanen Dünndarm das Vorhandensein von Laminin-1 nur während der Entwicklungsperiode zwischen der 8. und 14. Woche diskutiert. Anschließend wird es dann durch Laminin-2 in den adulten Krypten und durch Laminin-5 und Laminin-10 im Zottenbereich ersetzt (19). Bei Mäusen soll Laminin-1 ebenfalls nur während der fetalen Entwicklung vorhanden sein und ist abwesend im ausgereiften Darm (19). Da die für diese Arbeit verwendeten Jejunumproben von Schweinen in einem Alter von drei Monaten stammen und diese Tiere somit noch nicht ausgewachsen waren, wäre dies ein möglicher Erklärungsansatz weshalb Laminin-1 noch in den untersuchten Schnitten gefunden wurde. Es gilt in Zukunft noch zu erforschen, ob bei adulten Schweinen die Laminin-1-Expression des Jejunums von der Expression bei juvenilen Tieren abweicht beziehungsweise ob es gegen andere Laminine ausgetauscht wird.

Die Verteilung von Kollagen-Typ-IV als Hauptbestandteil der Lamina densa der Basallamina wurde in dieser Arbeit als mittelgradig in den drei Zottenregionen und negativ für die Kryptenregion ausgewertet. Der verwendete monoklonale Maus-Antikörper ist gegen die $\alpha 1$ -Kette von Kollagen-IV gerichtet. Diese $\alpha 1$ -Kette bildet im Gewebe mit einer weiteren $\alpha 1$ - und einer $\alpha 2$ -Kette eine Variante des Kollagen-IV-Moleküls (20). Die beobachtete Verteilung dieser Kollagenkette im Jejunum des Schweines weicht von den Ergebnissen anderer Studien ab. Durch indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonalen Ratten-Antikörpern gegen die $\alpha 1$ -Kette war diese im humanen Dünndarm auf der gesamten subepithelialen Basallamina sichtbar (21). Eine weitere Studie konnte die $\alpha 1$ -Kette ebenfalls auf der gesamten Basallamina im Dünndarm von menschlichen Feten und Erwachsenen nachweisen (22). Das Färbemuster in der vorliegenden Arbeit ähnelt den $\alpha 5$ - und $\alpha 6$ -Ketten von Kollagen IV im humanen Dünndarm, welche auf die Basallamina der Darmzotten beschränkt sind und nicht in den Krypten nachgewiesen werden konnten (21).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Gewebeschnitte wurden bei Zotten mit ablösender Epithelschicht die Proteine der Basallamina (Laminin sowie Kollagen-IV) stets der Lamina propria anliegend gefunden. Die Typ II HDs Proteine Plectin und Integrin $\beta 4$ hingegen befanden sich in den Zottenregionen mit Epithelablösung stets am basalen Pol der Epithelzellen. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die abgelösten Epithelzellen inklusive ihrer Typ II HD-Komponenten Plectin und Integrin $\beta 4$ ohne Adhäsion an die Basallamina im Gewebe liegen.

Das Vorkommen und die Verteilung der Typ II HD Proteine Plectin und Integrin $\beta 4$ sowie die Proteine der Basallamina (Laminin, Kollagen-IV) konnte in dieser Arbeit anhand der histologischen Untersuchung an Jejunumschnitten von Schweinen gezeigt werden. Die Frage nach der Lokalisation der untersuchten Proteine bei Darmzotten mit Epithelablösung konnte beantwortet werden. Das Vorhandensein von Vakuolen wurde beschrieben sowie die möglichen Gründe bezüglich ihres Auftretens sowie ihrer Funktion diskutiert. Es wären in Zukunft weitere Studien sinnvoll, um das Auftreten und die Funktionsmechanismen von Typ II HDs im Darm sowie die Verteilung der Proteine der Basallamina besser zu verstehen.

5. Literaturverzeichnis

1. Welsch U, Kummer W, Hrsg. Lehrbuch Histologie. 5. Auflage. München: Elsevier GmbH; 2018: 32–40, 94–97, 101, 394–401.
2. Leivo I, Tani T, Laitinen L, Bruns R, Kivilaakso E, Lehto V, Burgeson R, Virtanen I. Anchoring Complex Components Laminin-5 and Type VII Collagen in Intestine: Association with Migrating and Differentiating Enterocyte. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1996. 44(11): 1267–1277.
3. Fontao L, Stutzmann J, Gendry P, Launay JF. Regulation of the Type II Hemidesmosomal Plaque Assembly in Intestinal Epithelial Cells. *Experimental Cell Research*. 1999. 250(2): 298–312.
4. Molder LT, de Pereda JMD, Sonnenberg A. Regulation of hemidesmosome dynamics and cell signaling by integrin $\alpha 6 \beta 4$. *Journal of Cell Science*. 2021. 134(18), jcs25900.
5. Walko G, Castañón MJ, Wiche G. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell and Tissue Research*. 2015. 360(3): 529–544.
6. Geuijen CA, Sonnenberg A. Dynamics of the $\alpha 6 \beta 4$ integrin in keratinocytes. *Molecular Biology of the Cell*. 2002. 13(11):3845–3858.
7. Litjens S H.M., de Pereda JM, Sonnenberg A. Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends in Cell Biology*. 2006. 16(7): 376–383.
8. Romeis B. *Mikroskopische Technik*. München: Urban und Schwarzenberg; 1989: 393–395.
9. Noll S, Müller KM, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. 1. Auflage. München: Urban und Fischer; 2000: 40–53, 66–72.
10. Clarke RM, Hardy RN. Histological changes in the small intestine of the young pig and their relation to macromolecular uptake. *Journal of Anatomy*. 1971. 108(1): 63–77.
11. Moon HW. Vacuolated villous epithelium of the small intestine of young pigs. *Veterinary Pathology*. 1972. 9(1): 3–21.
12. Dunel-Erb S, Chevalier C, Laurent P, Bach A, Decrock F, Le Maho Y. Restoration of the jejunal mucosa in rats refed after prolonged fasting. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. 2001. 129(4): 933–947.

13. Wiche G, Krepler R, Artlieb U, Pytela R, Denk H. Occurrence and immunolocalization of plectin in tissues. *Journal of Cell Biology*. 1983. 97(3): 887–908.
14. Orian-Rousseau V, Aberdam D, Fontao L, Chevalier L, Meneguzzi G, Kedinger M, Simon-Assmann P. Developmental expression of laminin-5 and HD1 in the intestine: Epithelial to mesenchymal shift for the laminin $\gamma 2$ chain subunit deposition. *Developmental Dynamics*. 1996. 206(1): 12–23.
15. Basora N, Herring-Gillam E F., Boudreau F, Perreault N, Pageot LP, Simoneau M, Bouatrouss Y, Beaulieu JF. Expression of functionally distinct variants of the $\beta 4A$ integrin subunit in relation to the differentiation state in human intestinal cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1999. 274(42): 29819–29825.
16. Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *Journal of Cell Science*. 1998. 111(9): 2477–2486.
17. Leung C L., Green K J., Liem, R K.H. Plakins: A family of versatile cytolinker proteins. *Trends In Cell Biology*. 2002. 12(1): 37–45.
18. Stutzmann J, Bellissent-Waydelich A, Fontao L, Launay JF, Simon-Assmann P. Adhesion complexes implicated in intestinal epithelial cell-matrix interactions. *Microscopy Research and Technique*. 2000. 51(2): 179–190.
19. Teller I C., Beaulieu JF. Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2001. 3(24): 1–18.
20. Timpl R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *European Journal of Biochemistry*. 1989. 180(3): 487–502.
21. Sato H, Naito I, Momota R, Naomoto Y, Yamatsuji T, Sado Y, Ninomiya Y, Ohtsuka A. The differential distribution of type IV collagen α chains in the subepithelial basement membrane of the human alimentary canal. *Archives of Histology and Cytology*. 2007. 70 (5): 313–323.
22. Simoneau A, Herring-Gillam F., Vachon P.H, Perreault N, Basora N, Bouatrouss Y, Pageot LP, Zhou J, Beaulieu JF. Identification, distribution, and tissular origin of the $\alpha 5(IV)$ and $\alpha 6(IV)$ collagen chains in the developing human intestine. *Developmental Dynamics*. 1998. 212(3): 437–447.

6. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1. Liste der verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie. | 10 |
| Tabelle 2. Morphologische Besonderheiten. | 14 |
| Tabelle 3. Gemessene Zottenlängen. | 18 |
| Tabelle 4. Semiquantitative Auswertung von Plectin in den unterschiedlichen Regionen des Jejunums..... | 19 |
| Tabelle 5. Semiquantitative Auswertung von Integrin β 4 in den unterschiedlichen Regionen des Jejunums. | 21 |
| Tabelle 6. Semiquantitative Auswertung von Laminin in den unterschiedlichen Regionen des Jejunums..... | 23 |
| Tabelle 7. Semiquantitative Auswertung von Kollagen-IV in den unterschiedlichen Regionen des Jejunums. | 25 |

7. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1. Schematische Darstellung der Basalmembran und ihrer Komponenten..... | 4 |
| Abbildung 2. Beispielbild für zerstörtes Zottenepithel..... | 15 |
| Abbildung 3. Beispielbild für Epithelablösung..... | 15 |
| Abbildung 4. (A-B) Beispielbild für Vakuolenbildung..... | 16 |
| Abbildung 5. Beispielbild für zellarmes Bindegewebe..... | 17 |
| Abbildung 6. (A-B) Darstellung der Darmzotten durch die PAS-Reaktion..... | 17 |
| Abbildung 7. (A-B) Immunhistochemische Färbung von Plectin..... | 20 |
| Abbildung 8. (A-C) Immunhistochemische Färbung von Integrin $\beta 4$ | 22 |
| Abbildung 9. (A-C) Immunhistochemische Färbung von Laminin..... | 24 |
| Abbildung 10. (A-B) Immunhistochemische Färbung von Kollagen-IV..... | 26 |

Anhang

Anti-PLEC antibody produced in rabbit, Sigma Prestige, Kat. Nr.: HPA025967

- 2x8min Xylol
- 2x3min 100% EtOH
- 1x3min 96% EtOH
- Block der endogenen Peroxidasen: 40ml Methanol + 1ml 30% H₂O₂ + 9ml Aqua dest. für 15min
- 10x mit Aqua fontis spülen
- **Antigen Retrieval (Steamer):**
 - 30 Minuten Citrat Puffer pH 6,0 (selfmade)
 - Mindestens 20 Minuten auskühlen lassen
- 3x3min PBS
- Protein Block: 1,5% Normal Goat Serum (Dako) in PBS für 30min (150µl Goat Serum in 10ml PBS)
- **1. Antikörper (100µl pro Slide)**
 - **Negative Probe** wird nur mit PBS pipettiert
 - **Anti-PLEC 1:50 in PBS (4 µL AK +196 µL PBS)**
 - **Anti-PLEC 1:100 in PBS (2 µL AK +198 µL PBS)**
 - Inkubation über Nacht auf 4°C
- 3x3min PBS
- **2. Antikörper (100µl pro Slide) ready to use:**
 - **BrightVision Poly-HRP-anti-rabbit** (ImmunoLogic-Duiven-The-Netherlands) für 30min
- 2x5min PBS
- **Inkubation mit DAB-Solution (Quanto, Richard Allan Scientific, TA-125-QHDX)**
 - Nach Datenblatt arbeiten: 1ml Puffer + 1 Tropfen DAB Chromogen → vortex (working solution ist 7 Tage auf 4°C haltbar)
 - 100µl pro Slide auftropfen
 - 5 Minuten inkubieren
- 1x10min in Aqua dest. waschen
- 1x3min Nuclei staining mit Hämalaun (self-made)
- 1x10min Aqua fontis
- 1x3min 96% Ethanol
- 2x3min 100% Ethanol
- 2x3min Xylol
- Slides mit DPX (Fluka, Buchs, Schweiz) und Deckglas eindecken

Anti-ITGB4 antibody produced in rabbit Enhanced validation, Sigma Prestige, Kat. Nr.: HPA036348

- 2x8min Xylol
- 2x3min 100% EtOH
- 1x3min 96% EtOH
- Block der endogenen Peroxidasen: 40ml Methanol + 1ml 30% H₂O₂ + 9ml Aqua dest. für 15min
- 10x mit Aqua fontis spülen
- **Antigen Retrieval (Steamer):**
 - 30 Minuten Citrat Puffer pH 6,0 (selfmade)
 - Mindestens 20 Minuten auskühlen lassen
- 3x3min PBS
- Protein Block: 1,5% Normal Goat Serum (Dako) in PBS für 30min (150µl Goat Serum in 10ml PBS)
- **1. Antikörper (100µl pro Slide)**
 - **Anti-ITGB4 1:500 in PBS**
 - Inkubation über Nacht auf 4°C
- 3x3min PBS
- **2. Antikörper (100µl pro Slide) ready to use:**
 - **BrightVision Poly-HRP-anti-rabbit** (ImmunoLogic-Duiven-The-Netherlands) für 30min
- 2x5min PBS
- **Inkubation mit DAB-Solution (Quanto, Richard Allan Scientific, TA-125-QHDX)**
 - Nach Datenblatt arbeiten: 1ml Puffer + 1 Tropfen DAB Chromogen → vortex (working solution ist 7 Tage auf 4°C haltbar)
 - 100µl pro Slide auftropfen
 - 5 Minuten inkubieren
- 1x10min in Aqua dest. waschen
- 1x3min Nuclei staining mit Hämalaun (self-made)
- 1x10min Aqua fontis
- 1x3min 96% Ethanol
- 2x3min 100% Ethanol
- 2x3min Xylol
- Slides mit DPX (Fluka, Buchs, Schweiz) und Deckglas eindecken

Polyclonal Rabbit-anti-Laminin [Z0097], Dako

- 2x8min Xylol
- 2x3min 100% EtOH
- 1x3min 96% EtOH
- Block der endogenen Peroxidasen: 40ml Methanol + 1ml 30% H₂O₂ + 9ml Aqua dest. für 15min
- 10x mit Aqua fontis spülen
- **Antigen Retrieval (enzymatisch) :**
 - 1mg/ml Protease (Sigma Aldrich, P5147)
 - 0,05g/50ml PBS für 20 Minuten auf RT inkubieren
 - 2-3mal in Aqua dest. spülen
- 2x5min PBS
- Protein Block: 1,5% Normal Goat Serum (Sigma Aldrich) in PBS für 30min (150µl Goat Serum in 10ml PBS)
- **1. Antikörper (100µl pro Slide)**
 - **Rabbit-anti-Laminin 1:10.000 in PBS (aus 1:100 Vorverdünnung)**
 - Inkubation über Nacht bei 4°C
- 2x5min PBS
- **2. Antikörper (100µl pro Slide):**
 - **BrightVision Poly-HRP-anti-rabbit** (ImmunoLogic-Duiven-The-Netherlands) für 30min
- 2x5min PBS
- **Inkubation mit DAB-Solution (Quanto, Richard Allan Scientific, TA-125-QHDX)**
 - Nach Datenblatt arbeiten: 1ml Puffer + 1 Tropfen DAB Chromogen → vortex (working solution ist 7 Tage auf 4°C haltbar)
 - 100µl pro Slide auftropfen
 - 5 Minuten inkubieren
- 1x10min in Aqua dest. waschen
- 1x3min Nuclei staining mit Hämalaun (self-made)
- 1x10min Aqua fontis
- 1x3min 96% Ethanol
- 2x3min 100% Ethanol
- 2x3min Xylol
- Slides mit DPX (Fluka, Buchs, Schweiz) und Deckglas eindecken

Polyclonal Mouse-anti-Collagen IV, Quardett

- 2x8min Xylol
- 2x3min 100% EtOH
- 1x3min 96% EtOH
- Block der endogenen Peroxidasen: 40ml Methanol + 1ml 30% H₂O₂ + 9ml Aqua dest. für 15min
- 10x mit Aqua fontis spülen
- **Antigen Retrieval (enzymatisch) :**
 - 1mg/ml Protease (Sigma Aldrich, P5147)
 - 0,05g/50ml PBS für 20 Minuten auf RT inkubieren
 - 2-3mal in Aqua dest. spülen
- 2x5min PBS
- Protein Block: 1,5% Normal Goat Serum (Sigma Aldrich) in PBS für 30min (150µl Goat Serum in 10ml PBS)
- **1. Antikörper (100µl pro Slide)**
 - **Mouse-anti-Collagen IV 1:100 in PBS**
 - Inkubation über Nacht bei 4°C
- 2x5min PBS
- **2. Antikörper (100µl pro Slide):**
 - **BrightVision Poly-HRP-anti-mouse** (ImmunoLogic-Duiven-The-Netherlands) für 30min
- 2x5min PBS
- **Inkubation mit DAB-Solution (Quanto, Richard Allan Scientific, TA-125-QHDX)**
 - Nach Datenblatt arbeiten: 1ml Puffer + 1 Tropfen DAB Chromogen → vortex (working solution ist 7 Tage auf 4°C haltbar)
 - 100µl pro Slide auftropfen
 - 5 Minuten inkubieren
- 1x10min in Aqua dest. waschen
- 1x3min Nuclei staining mit Hämalaun (self-made)
- 1x10min Aqua fontis
- 1x3min 96% Ethanol
- 2x3min 100% Ethanol
- 2x3min Xylol
- Slides mit DPX (Fluka, Buchs, Schweiz) und Deckglas eindecken