

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Materialien und Geräte

3.1.1. Chemikalien und Lösungsmittel

Das Zellkulturmedium RPMI 1640, das fetale Kälberserum (FCS), L-Glutamin, die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Penicillin und Streptomycin wurden von Seromed Biochrom (Berlin, Deutschland) geliefert. Alpha-Tocopherol, α -Tocopherol-Acetat, α -Tocopherol-Succinat, Trolox, NP-40, Dithiothreitol (DTT), Thiobarbitursäure (TBA), Butylhydroxytoluol (BHT), Dimethylsulfoxid (DMSO) und 1,1', 3,3'-Tetraethoxypropan (TEP) wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Kristallviolett und Glutaraldehyd (25 % wässrige Lösung) stammten von Serva (Heidelberg, Deutschland). Alle übrigen verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Bio-RAD (München, Deutschland), ICN (Eschwege, Deutschland), J.T. Baker (Deventer, Holland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), und Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

3.1.2. Geräte

Die sterilen Arbeiten wurden an einer Sterilbank (Lamin Air, TL 2472) von Heraeus (Hanau, Deutschland) vorgenommen, die mit Vakuumsaugpumpen (Sekreterauger P7010) von MEDAP Heraeus (Hanau, Deutschland) ausgestattet war. In einem CO₂-Inkubator BB 16 von Heraeus (Hanau, Deutschland) wurden die Zellen inkubiert. Reaktionsgefäße und Multipetten waren von Eppendorf (Hamburg, Deutschland), die elektrischen Pipettierhilfen von Drummond Scientific Company (Pennsylvania, USA) und die Neubauer Zählkammer von Brand (Berlin, Deutschland). Zum Homogenisieren der Zellen wurde ein Ultra-Turrax T25 (Dispergierstab S8N-8G, 9500 U/min⁻¹) von Janke und Kunkel (Staufen, Deutschland) benutzt. Es wurde ein inverses Forschungsmikroskop IMT-2 von Olympus (Dänemark) zur Beurteilung der Zelldichte verwendet. Als Bestrahlungsquelle diente ein UV/PUVA 180 Teilbestrahlungsgerät von Waldmann Lichttechnik (Villingen-Schwenningen, Deutschland).

Folgende Zentrifugen wurden verwendet: Megafuge 1.0 von Heraeus (Hanau, Deutschland), Zentrifuge von Hettich/Merck (Wien, Österreich), und ein Rotationsgerät von Heidolph (Kelheim, Deutschland). Als Waage diente eine Analysenwaage A 210 P von Sartorius (Göttingen, Deutschland). Die übrigen Materialien wurden von Falcon (Heidelberg, Deutschland), Greiner (Frickenhausen, Deutschland), Nalge Nunc International (Wiesbaden, Deutschland), Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) und Sarstedt (Berlin, Deutschland) geliefert.

3.1.3. Zellen

Die Versuche wurden mit der Keratinozytenzelllinie HaCaT durchgeführt. Diese Zellen sind spontan transformierte Keratinozyten von menschlicher Haut, welche die umfassende normale epidermale Differenzierungskapazität beibehalten haben. Die genetische Spezifität dieser Zellen ändert sich auch durch eine langandauernde Kultivierung mit bis zu über 140 Passagen nicht. Die Zelllinie wurde HaCaT genannt, um ihren Ursprung von menschlichen Keratinozyten zu bezeichnen, die unter niedrigen Kalzium-Konzentrationen und einer erhöhten Temperatur kultiviert wurden. (**H**uman **a**dult skin keratinocytes, low **C**alcium and elevated **T**emperature) (Boukamp et al. 1988). Die HaCaT-Keratinozyten wurden bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2. Zellkulturtechnik

Die HaCaT-Keratinozyten wurden in einer Konzentration von 10^6 Zellen pro Reaktionsgefäß in 1 ml FCS und 10 % DMSO eingefroren. Zum Kultivieren der Zellen wurde ein Reaktionsgefäß bei 37°C im Wasserbad schnell aufgetaut. Die Zellen wurden anschließend in 10 ml vorgewärmtes (37°C) Kulturmedium gegeben, einmal bei 192 x g abzentrifugiert; der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden mit frischem Kulturmedium in einer 75-cm²-Zellkulturflasche eingesät. Dieses Kulturmedium bestand aus RPMI-Medium 1640 mit 2,0 g/l NaHCO₃. Hinzugefügt wurden 10 % FCS, 600 µM L-Glutamin, 500 U/ml Penicillin und 500 µg/ml Streptomycin. Die Zellkultur wurde bei 37 °C und 5 % CO₂

inkubiert, bis die Zellen ca. 90 % konfluent waren. Die Kultivierung der Zellen wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.3. Passagieren der Zellen

War eine 90 %ige Konfluenz der HaCaT-Zellen erreicht, wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen, 2 ml Trypsin/EDTA dazugegeben und 15 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis sich alle Zellen vom Untergrund lösten. Anschließend wurden 8 ml Kulturmedium dazugegeben und in einem 50-ml-Röhrchen 5 min bei 192 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen, die Zellen in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Anschließend folgten eine weitere 5 min lange Zentrifugation bei 192 x g und eine erneute Zugabe von Kulturmedium.

Je nach Versuchsanordnung wurden die Zellen dann in Zellkulturschalen (100 x 20 mm) und 10 ml Kulturmedium, oder in 24-well-Platten und 500 µl Kulturmedium pro Vertiefung bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur gewünschten Zelldichte kultiviert.

3.4. Vitaminsupplementation

Das jeweilige Vitamin wurde in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß abgewogen und mit Ethanol auf eine Konzentration von 10⁻¹ M gebracht. Diese Vitaminlösung wurde anschließend mit Kulturmedium auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt.

Anschließend wurden α-Tocopherol oder Trolox bzw. die α-Tocopherol-Derivate (α-Tocopherol-Acetat und α-Tocopherol-Succinat) in die Schalen gegeben. Es wurde mit folgenden Vitaminkonzentrationen in den Electrophoretic mobility shift assays (EMSA), den Versuchen mit thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBARS) und in den Western Blots gearbeitet:

α -Tocopherol:	10^{-4} M
Trolox:	10^{-4} M
α -Tocopherol-Acetat:	10^{-4} M
α -Tocopherol-Succinat:	10^{-5} M

3.5. UVA-Bestrahlung

Ein UV/PUVA 180 Teilbestrahlungsgerät (mit UVA-Strahlern mit einem Strahlungsspektrum von 315 nm bis 400 nm mit acht Strahlern zu je 15 Watt der Firma Waldmann, Villingen, Deutschland) wurde zur Bestrahlung der Zellen benutzt. Um eine Verdunstung des Mediums während der Bestrahlung zu verhindern, erfolgte die Bestrahlung von unten bei geschlossenem Deckel. Die Zellen wurden nach einer Vorlaufzeit der UVA-Strahler von drei Minuten mit 1 J/cm^2 , 5 J/cm^2 oder 10 J/cm^2 bestrahlt.

$$\text{Bestrahlungszeit in Sekunden} = \frac{\text{gewünschte Dosis in J/cm}^2 \times 1000}{\text{Strahlungsleistung in mW/cm}^2}$$

Die nicht zu bestrahlenden Schalen wurden für diese Zeit bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 \% CO_2 inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 \% CO_2 wurden die Zellen weiterbehandelt.

3.6. Proliferationsassay

Die Proliferationsassays wurden wie bei Gillies et al. beschrieben mittels Crystal-Violet-Assay durchgeführt (Gillies 1986). Die HaCaT-Zellen wurden wie unter 3.2 beschrieben kultiviert und nach folgender Versuchsanordnung in 24-well-Platten mit $500 \mu\text{l}$ Kulturmedium pro Vertiefung angesetzt.

K ₀	K ₀	K ₀	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁷ M
10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁸ M
10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁵ M	—	—	—
10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁶ M	—	—	—

Legende:

K₀ = Zellen und Medium

10⁻⁸ ... 10⁻⁴ M = Konz. der Vitamine in 500 µl Nährmedium

— = unbenutzte Vertiefung

Tabelle 3: Versuchsaufbau für den Proliferationsassay

Zwölf Platten dieser Anordnung wurden vorbereitet. Alle Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis ca. 50- bis 60-prozentige Konfluenz erreicht war. Anschließend wurde das Kulturmedium gewechselt und mit Vitaminen supplementiert.

Die Platten wurden für die Dauer von 3 h, 12 h bzw. 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Kulturen zweimal mit 250 µl PBS pro Vertiefung gewaschen und mit 500 µl 1 % Glutaraldehyd in PBS pro Vertiefung fixiert. Dazu mussten die Platten 30 min leicht geschüttelt werden. Der Überstand wurde entfernt, 500 µl 0,01 % Kristallviolett in PBS pro Vertiefung dazugegeben und die Platten erneut 30 min leicht geschüttelt.

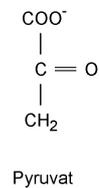
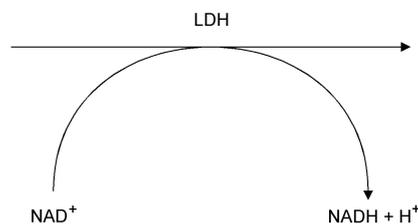
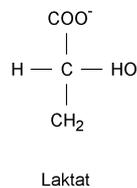
Nach Entfernung des Überstandes wurden die Platten in Aqua bidest. kurz gewaschen und in frischem Aqua bidest. 15 min lang geschüttelt. Danach trockneten die Platten an der Luft. In jede Vertiefung wurden anschließend 250 µl 0,2 % Triton® X-100 von Merck (Darmstadt, Deutschland) in PBS gegeben und eine Stunde geschüttelt, um das Kristallviolett aus den Zellen zu lösen. 100 µl des nun blauen Überstandes wurden in eine 96-well-Platte gegeben. Die Messung der Platten erfolgte bei 550 nm im ELISA-Reader MR 5000 von Dynatech (Chantilly, VA, USA).

3.7. Zytotoxizitätsassay

3.7.1. Chemisches Prinzip

Für die Zytotoxizitätsassays wurde das Cytotoxicity Detection Kit # 1 644 793 (Roche, Mannheim, Deutschland) benutzt, das die Quantifizierung von Zelltod und Zellyse möglich macht. Der Test basiert auf der Messung von Laktat-Dehydrogenase-(LDH-) Aktivität, welche bei Beschädigung der Plasmamembran der Zellen im Überstand von Zellkulturen zu finden ist. Die LDH-Aktivität wurde in einem enzymatischen Test bestimmt (LDH-Test):

1. Schritt:



2. Schritt:

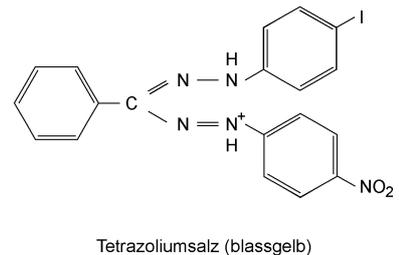
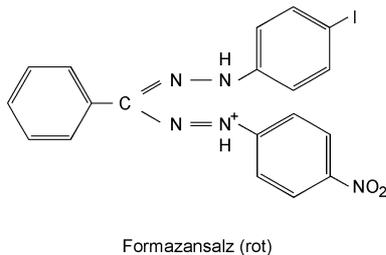


Abbildung 10: LDH-Test

Im ersten Schritt katalysiert LDH die Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ , was zur Umwandlung von Laktat zu Pyruvat führt. Im zweiten Schritt wird das Tetrazoliumsals (gelblich) mit H/H^+ vom entstandenen NADH/H^+ zu Formazansalz (rot) reduziert. Als Katalysator dient Diaphorase.

Je größer der Anteil von abgestorbenen oder membrangeschädigten Zellen ist, desto höher ist die LDH-Enzym-Aktivität im Überstand. Diese höhere Enzymaktivität korreliert direkt mit der Menge des gebildeten Formazansalzes. Daher ist die Intensität der roten Farbe direkt

proportional zur Anzahl der lysierten Zellen. Das Absorptionsmaximum des Formazansalzes liegt bei ca. 500 nm, wohingegen das Tetrazoliums Salz keine signifikante Absorption bei dieser Wellenlänge zeigt.

3.7.2. Kultivierung und Versuchsanordnung

Für den Zytotoxizitätsassay wurden die HaCaT-Keratinocyten wie in 3.2 beschrieben kultiviert. Anschließend wurden sie nach zwei unterschiedlichen Versuchsanordnungen in 24-well Platten kultiviert. In der *Versuchsanordnung 1* wurde die zytotoxische Wirkung der Vitamine auf die HaCaT-Keratinocyten bei einer Verweildauer von 24 Stunden untersucht, wohingegen in der *Versuchsanordnung 2* die Zytotoxizität unterschiedlicher UVA-Dosen auf die HaCaT-Keratinocyten gemessen wurde.

Versuchsanordnung 1:

K ₀	K ₀	K ₀	10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	10 ⁻³ M
neg. Kontrolle	neg. Kontrolle	neg. Kontrolle	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M
pos. Kontrolle	pos. Kontrolle	pos. Kontrolle	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁵ M
10 ⁻² M	10 ⁻² M	10 ⁻² M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁶ M

Legende:

- K₀ = nur Medium
- 10⁻⁶... 10⁻² M = Konz. der Vitamine in 500 µl Nährmedium
- neg. Kontrolle = Zellen und Medium
- pos. Kontrolle = mit Triton® X-100 lysierte Zellen

Tabelle 4: Zytotoxizitätsassay 1

Fünf Platten dieser Anordnung wurden vorbereitet. Die HaCaT-Zellen im Kulturmedium wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis ca. 50 %ige bis 60 %ige Konfluenz erreicht war. Die Kontrollen enthielten ausschließlich 500 µl Kulturmedium.

Versuchsanordnung 2:

K ₀	K ₀	K ₀	—	—	—
neg. Kontrolle	neg. Kontrolle	neg. Kontrolle	—	—	—
pos. Kontrolle	pos. Kontrolle	pos. Kontrolle	—	—	—
J/cm ²	J/cm ²	J/cm ²	—	—	—

Legende:

- K₀ = nur Medium
- neg. Kontrolle = Zellen und Medium
- pos. Kontrolle = mit Triton® X-100 lysierte Zellen
- J/cm² = Dosis der Bestrahlung
- = unbenutzte Vertiefung

Tabelle 5: Zytotoxizitätsassay 2

Zwölf Platten dieser Anordnung wurden vorbereitet, welche anschließend 24 Stunden lang bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden, bis ca. 90 %ige Konfluenz erreicht war.

Weiterbehandlung bei der Versuchsanordnung 1:

Nach der Inkubation wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, jede Vertiefung mit 500 µl PBS gespült und 500 µl Assaymedium dazugegeben, welches sich aus RPMI-Medium 1640 mit 1 % FCS und Penicillin und Streptomycin zusammensetzte. Dieses Assaymedium enthielt kein L-Glutamin. Die Vitamine wurden wie unter 3.4 beschrieben dazugegeben. Um eine positive Kontrolle zu erhalten, wurden die entsprechenden Zellen mit 1 % Triton® X-100 behandelt. Je nach Zeitwerten (30 min, 10 h und 30 h Vitaminpersistenz) wurden 20 µl des Überstandes nach 10-minütiger Zentrifugation der Platten bei 250 x g in eine 96-well-Platte gegeben.

Weiterbehandlung bei der Versuchsanordnung 2:

Nach der Inkubation wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, jede Vertiefung mit 500 µl PBS gespült und 500 µl Assaymedium dazugegeben. Um eine positive Kontrolle zu erhalten, wurden die entsprechenden Zellen mit 1 % Triton® X-100 behandelt. Die zu bestrahlenden Kulturplatten wurden wie in 3.5 beschrieben bestrahlt und anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Je nach Zeitwerten (sofort, 1 h und 3 h nach der Bestrahlung) wurden

20 µl des Überstandes nach Zentrifugation der Platten bei 250 x g in eine 96-well-Platte gegeben.

3.7.3. Messung und Kalkulation der Absorption

1 ml Aqua bidest. wurde zur Solution 1 (= Katalysator) des Cytotoxicity Detection Kits gegeben und 10 min stehen gelassen. Es wurde ein Reaktions-Mix hergestellt, der für 100 Tests aus 250 µl Solution 1 und 11,25 ml Solution 2 (= Farbstoff Reagenz) bestand. In die 96-well-Platten mit den 20 µl des Überstandes der Proben wurden jeweils 80 µl PBS und 100 µl Reaktions-Mix hinzugefügt. Diese Platte wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt und 30 min geschüttelt. Im ELISA-Reader wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen.

Nach folgender Formel wurden die Absorptionswerte der Proben und die negativen bzw. positiven Kontrollen in die Zytotoxizität umgerechnet:

$$\text{Zytotoxizität in \%} = \frac{\text{Probe - neg. Kontrolle}}{\text{pos. Kontrolle - neg. Kontrolle}} \times 100$$

Die errechneten Prozentwerte wurden mit dem Computerprogramm Microsoft Excel 2000 in Diagrammen dargestellt.

3.8. NF-κB - Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Mit dem Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) können die DNA-bindenden Kernproteine durch eine Bindung an die radioaktiv markierte DNA-Bindungsstelle untersucht werden. Dazu müssen diese mit Hilfe der Kernproteinextraktion aus dem Zellkern isoliert, quantifiziert, mit der markierten DNA inkubiert und gelelektrophoretisch getrennt werden. Der EMSA wurde nach dem Grundprinzip von Hirano et al. durchgeführt (Hirano et al. 1998).

3.8.1. Kernproteinextraktion

Für die Kernproteinextraktion wurden die HaCaT-Zellen nach folgendem Schema in zehn Zellkulturschalen (100 x 20mm) mit 10 ml Kulturmedium wie unter 3.2 beschrieben kultiviert.

Kontrolle	α -Tocopherol	Trolox	TOC-Acetat	TOC-Succinat
UVA	α -Tocopherol +UVA	Trolox + UVA	TOC-Acetat + UVA	TOC-Succinat + UVA

Tabelle 6: Versuchsaufbau für den NF κ B-EMSA

TOC = α -Tocopherol

Alle Kulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis 90 %ige Konfluenz erreicht war. Danach erfolgte ein Mediumwechsel mit Assaymedium (RPMI-Medium plus 1 % FCS, 600 μ M L-Glutamin, 500 U/ml Penicillin und 500 μ g/ml Streptomycin). Die Tocopherol-Derivate wurden wie unter 3.4 beschrieben dazugegeben. Nach 24 Stunden folgte die Bestrahlung wie unter 3.5 beschrieben. Der Überstand wurde eine Stunde nach der Bestrahlung abgesaugt und die Kulturen jeweils zweimal mit 6 ml PBS gespült. Danach wurden 2 ml Puffer 1 je Ansatz auf die Kulturen gegeben. Die Zellen wurden mit einem Schaber geerntet und jeweils in ein steriles 12-ml-Röhrchen auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen 2 x 10 sec auf Eis mit einem Ultra-Turrax T25 mit Dispergierstab S8N-8G bei 9500 U/min⁻¹ homogenisiert. Zwischen den zwei Zyklen wurden die Proben 20 sec auf Eis gekühlt.

Danach wurden die Röhrchen 15 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde jeweils 125 μ l 10 %iges NP-40 dazugegeben und jedes Röhrchen 15 sec geschüttelt. Jedem Röhrchen wurden 2 ml entnommen und jeweils in ein 2-ml-Reaktionsgefäß gegeben, um sie 30 sec bei 16.420 x g zu zentrifugieren. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Zellkernpellet wurde in 400 μ l Puffer 1 und 25 μ l 10 %igem NP-40 gewaschen, danach kurz geschüttelt und anschließend nochmals 30 sec bei 16.420 x g zentrifugiert. Schließlich wurden 50 μ l Puffer 2 auf das Zellkernpellet gegeben. Nachdem 20 min geschüttelt und 5 min bei 16.420 x g zentrifugiert worden war, wurde der Überstand, der die Kernproteine enthielt, in ein 0,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben. Daraufhin folgte die Proteinbestimmung.

Puffer 1, pH 7,8: Hepes (10 mM), KCl (10 mM), MgCl₂ (2 mM), DTT (1 mM), EDTA (0,1 mM), PMSF (0,1 mM)

Puffer 2, pH 7,8: Hepes (50 mM), KCl (50 mM), NaCl (300 mM), DTT (1 mM), EDTA (0,1 mM), PMSF (0,1 mM), Glycerol (10 %)

3.8.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Bicinchoninic-acid-(BCA)-Assay von Pierce (Rockford, Illinois, USA) durchgeführt. Es wurde eine Standardreihe mit BSA hergestellt. Zur Verdünnung und als Leerwert diente PBS.

Die Proteinproben wurden 1:10 mit PBS verdünnt. Jeweils 10 µl der Probe bzw. 10 µl der Standardreihe wurden in eine 96-well-Platte gegeben. Es wurden jeweils Dreifachwerte angesetzt. Dazu wurden jeweils 200 µl Proteinassaylösung gegeben, welche aus 4 µl Lösung A (# 23221) und 196 µl Lösung B (# 23224) bestand und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 550 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Proteinwerte wurden anhand der Standardkurve abgelesen und in µg/µl umgerechnet.

3.8.3. Markierung der DNA

Es wurden Oligonukleotide (Sense und Antisense), bestehend aus jeweils 26 Basen der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) verwendet, welche durch spezifische Anlagerung eine Bindungsstelle für das DNA-bindende NF-κB Protein darstellten.



Um diese komplementären Stränge spezifisch aneinander zu lagern, wurden die Oligonukleotide in jeweils gleichen Konzentrationen Sense und Antisense 10 min bei 90 °C im Heizblock erhitzt und anschließend über Nacht stehen gelassen, um langsam abzukühlen.

Die Überhänge des doppelsträngigen Oligonukleotids an den 5'-Enden wurden mittels DNA Polymerase I (Klenow Fragment von Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland) mit komplementären Basen aufgefüllt, wobei sich die radioaktive Markierung des Oligonukleotids mit α^{32} P-Desoxycytidintriphosphat (dCTP) ergab, welches von NENTM Life Science Products (Boston, USA) bezogen wurde. Dazu wurde ein Markierungsmix (siehe Tab. 7) in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß auf Eis hergestellt, geschüttelt, kurz zentrifugiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 75 μ l T/E-Puffer dazugegeben. Um sicheres Arbeiten zu gewährleisten, wurden alle Arbeitsschritte mit radioaktivem Phosphor hinter einer Plexiglasscheibe durchgeführt.

Der Markierungsmix wurde über eine NAP-5-Säule (Pharmacia # 17-0853-02) gereinigt, um nicht gebundene Nukleotide zu entfernen. Dazu spülte man die Säule einmal mit 1000 μ l T/E-Puffer, ließ 100 μ l Markierungsmix in die Säule einlaufen und gab anschließend 400 μ l T/E-Puffer in die Säule. Die herauslaufenden 500 μ l wurden verworfen. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die Probe in der Säule. Anschließend wurden 1000 μ l T/E-Puffer in die Säule gegeben. Es konnten ca. 1000 μ l gereinigte Probe aufgefangen werden. Die Höhe der Radiaktivität der Probe wurde mittels Cerenkow-Counting überprüft, wobei 1 μ l der gereinigten Probe ca. 100.000 cpm hatten.

Substanz	Mengenangabe	Stock-Lösung
Aqua bidest.	17,7 μ l	-
10 x Klenow-Puffer	2,5 μ l	-
ds Oligo	0,5 μ l	(= 100 μ M)
dNTPs	1,8 μ l	0,5 mM
α^{32} P-dCTP	1,5 μ l	20 μ Ci/ μ l
Klenow-Fragment	1,0 μ l	3 U/ μ l

Tabelle 7: NF- κ B-EMSA: Markierungsmix für die radioaktive Markierung der DNA
Die dNTPs wurden von Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

10x-Klenow-Puffer, pH 7,6: Tris-HCl (0,5 M), MgCl₂ (0,1 M)

T/E-Puffer, pH 7,5: Tris-HCl (10 mM), EDTA (1 mM)

3.8.4. Bindung der Kernproteine an die DNA

Die radioaktive DNA-Sequenz wurde zu den zu untersuchenden Kernproteinproben gegeben, um das NF- κ B Protein zu detektieren. Dazu wurde ein Bindungsmix (siehe Tab. 8) hergestellt, welcher mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 20 μ l gebracht, kurz geschüttelt, zentrifugiert und 30 min bei 30 °C inkubiert wurde. Zur Kontrolle wurde ein Antikörper-Supershift durchgeführt. Dazu wurden nach 15 min Bindungszeit 2 μ l des NF- κ B-p50-AK (sc-1191 Santa Cruz, USA) zum Bindungsmix gegeben. Bei der Auswertung konnte dadurch die spezifische NF- κ B-Bande erkannt werden.

Substanz	Mengenangabe	Stock-Lösung
Kernproteinprobe	4 μ g	je nach Konz.
2 x c Bindungspuffer	10 μ l	-
DTT	0,4 μ l	100 mM
BSA	0,2 μ l	10 μ g/ μ l
poly [d(I-C)]	1,0 μ l	2 μ g/ μ l
³² P-ds Oligo	1 μ l	-

Tabelle 8: NF- κ B-EMSA: Bindungsmix für die Bindung der Kernproteine an die DNA poly [d(I-C)] wurde von Boehringer (Mannheim, Deutschland) bezogen.

2 x c Bindungspuffer, pH 7,9: Hepes (40 mM), KCl (120 mM), Ficoll (8 %)

3.8.5. Gelelektrophorese

Es wurden zwei 18 x 18 cm große 5 %ige Acrylamidgele (siehe Tab. 9) vorbereitet. Die benutzten Abstandhalter zwischen den Gelen waren 1,5 mm dick, ein Kamm für 15 Spuren wurde eingesetzt, und nach der Polymerisation des Gels lief dieses ohne Proben 30 min bei 140 V und 50 mA in der Gelkammer vor. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE.

Jeweils 20 µl der Proben pro Spur wurden mittels Hamilton-Pipette in das Gel geladen. Als Laufkontrolle dienten 2 µl eines blauen Farbstoffes (siehe Tab. 10) in der letzten unbesetzten Spur, der eine intensiv blaue Farbe hat. Der Lauf für zwei Gele in einer Elektrophorese-Kammer (Protean II, BioRAD, München, Deutschland) dauerte 1,5 Stunden bei 140 V und 50 mA. Anschließend wurde das Gel eine Stunde bei 80 °C auf Whatman-Papier im Geltrockner unter Vakuum getrocknet, in eine Filmkammer von Du Pont (Vertrieb Berlin, Deutschland) gelegt und auf einer Phosphor Imager Platte (BAS-MS 2040) von Fuji Film (Kanagawa, Japan) über Nacht exponiert.

Substanz	Mengenangabe	Stock-Lösung
H ₂ O	46,04 ml	-
4 x TBE	20,00 ml	-
AA / - AA	13,30 ml	30 %ig
APS	600 µl	10 %ig
TEMED	60 µl	

Tabelle 9: NF-κB-EMSA: Mengenangaben für zwei 5 %ige Acrylamidgele

4 x TBE, pH 7,4: Tris-base (0,356 M), boric acid (0,356 M), EDTA (0,01 M)

Substanz	Mengenangabe
Tris-HCl	250 mM
bromphenol blue	0,2 %
xylene cyanol	0,2 %
Glycerol	40 %

Tabelle 10: NF-κB-EMSA: Farbstoff zur Laufkontrolle der Elektrophorese

3.8.6. Auswertung im Phosphor Imaging System BAS 1500

Die Phosphor Imager Platte wurde am Phosphor Imaging System BAS 1500 von Fuji-Film (Kanagawa, Japan) computergestützt mit dem Programm BAS-Reader eingelesen und anschließend mit dem Computerprogramm TINA 2.0 ausgewertet.

Die Signale der NF- κ B-Bande, welche durch den Antikörper-Supershift identifiziert werden konnte, wurden dann mit dem Computerprogramm Microsoft Excel 2000 in einem Säulendiagramm als relative NF- κ B-Bindungsaktivität in Prozent zur Kontrolle dargestellt.

3.9. I κ B α -Western-Blot

Zur Detektion von I κ B α in den Zellen wurde ein Western Blot angewandt, der nach dem Grundprinzip von Grützkau et al. durchgeführt wurde (Grützkau et al. 1998). Durch zwei Antigen-Antikörper-Reaktionen und Bindung eines Antikörper-gekoppelten Enzyms an das Enhanced chemi-luminescence (= ECL) Western Blotting Reagent emittierte der so entstandene Komplex Licht, welches durch Auflegen und Entwickeln eines Hyperfilms von Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) sichtbar gemacht werden konnte.

Die Zellen wurden wie unter 3.2 beschrieben in 100-mm- \emptyset -Schalen kultiviert und die Vitamine im Assaymedium anschließend nach folgendem Versuchsaufbau wie unter 3.4 dargestellt dazugegeben:

Kontrolle	α -Tocopherol	Trolox	TOC-Acetat	TOC-Succinat
Kontrolle + UVA	α -Tocopherol + UVA	Trolox + UVA	TOC-Acetat + UVA	TOC-Succinat + UVA

Tabelle 11: Versuchsaufbau für den I κ B α -Western-Blot

TOC = Tocopherol

Die UVA-Bestrahlung erfolgte wie unter 3.5 beschrieben.

Eine Stunde nach der Bestrahlung wurden die Gesamtproteine aus den Zellen extrahiert.

3.9.1. Gesamtproteinextraktion

Das Medium wurde aus den Schalen abgesaugt, zweimal mit je 6 ml PBS gewaschen und 1 ml Puffer nach Bäuerle in jede Zellkulturschale gegeben. Mit einem Schaber wurden die Zellen geerntet, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben, kurz geschüttelt und 10 min bei 4 °C mit einem Rotationsgerät gedreht. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße 15 min bei 16.420 x g zentrifugiert. Der Überstand, der nun die Gesamtproteine enthielt, wurde vorsichtig abpipettiert.

Puffer nach Bäuerle, pH 7,9: Hepes (20 mM), NaCl (350 mM), MgCl₂ (1 mM), EDTA (0,6 mM), NP-40 (1 %), Glycerol (20 %)

3.9.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte wie unter 3.8.2 beschrieben.

3.9.3. Elektrophorese

Es wurde ein 10 %iges Trenngel (siehe Tab. 12) und darüber ein 3 %iges Sammelgel (Tab. 13) gegossen. Das Trenngel musste mit Aqua bidest. überschichtet werden und eine Stunde polymerisieren, bis das Aqua bidest. entfernt und das Sammelgel darüber gegossen werden konnte. Die Kämme mit jeweils zehn Spuren wurden vorsichtig in das Sammelgel eingesteckt, und nachdem das Gel polymerisiert war, wurden die Kämme entfernt, die Taschen mit 1 x Elektrophoresepuffer (Verdünnung des 5 x Elektrophoresepuffers (0,25 M Tris, 1 M Glycin und 0,5 % SDS) mit Aqua bidest.) gespült. Das Gel lief ohne Proben 15 min bei 50 V vor.

Es wurden 30 µg Protein der Proben mit 4 x Probenpuffer (0,25 M Tris, pH 6,8, 2 % SDS, 40 % Glycerol, 20 % β-MCE, 0,04 % Bromphenolblau und 0,2 M DTT) 1:4 verdünnt mit Aqua bidest. pro Spur angesetzt, für 5 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert.

Es wurden ebenfalls pro Spur 5 µl des Membran-Molekulargewichtsmarkers (MW-Standard, # sc-2035) von Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, USA) für 5 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Pro Spur wurden 5 µl des Gel-Molekulargewichtsmarkers (Prestained Marker, broad range, # 161-0318) von Bio-RAD (München, Deutschland) 5 min lang im 37 °C warmen Wasserbad erwärmt. Nach einer 5-minütigen Abkühlphase der Reaktionsgefäße auf Eis wurden Proben und Marker mit einer Hamilton-Pipette in die Taschen geladen. Das Gel lief erst 15 min bei 50 V, danach ca. eine Stunde bei 75 V.

Substanz	Mengenangabe	Stock-Lösung
Aqua bidest.	4,0 ml	-
Trenngelpuffer	2,5 ml	-
Acrylamid / bis -AA	3,4 ml	30 %ig
SDS	100 µl	10 %ig
APS	50 µl	10 %ig
TEMED	5 µl	-

Tabelle 12: IκBα-Western-Blot: Mengenangaben für zwei 10 %ige Trenngele

Substanz	Mengenangabe	Stock-Lösung
Aqua bidest.	3,0 ml	-
Sammelgelpuffer	520 µl	-
Acrylamid	400 µl	30 %ig
SDS	40 µl	10 %ig
APS	30 µl	10 %ig
TEMED	3 µl	-

Tabelle 13: IκBα-Western-Blot: Mengenangaben für zwei 3 %ige Sammelgele

Trenngelpuffer pH 8,8: Tris (0,64 M), Tris-HCl (0,12 M), SDS (0,2 %)

Sammelgelpuffer pH 6,8: Tris (0,33 M), SDS (0,2 %)

3.9.4. Transfer

Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde eine Cellulosenitrat-Membran (0,2 µm, Protran BA 83, # 10401395) von Schleicher und Schüll (Dassel, Deutschland) im Transferpuffer (48 mM Tris, 30 mM Glycin, 0,037 % SDS und 20 % Methanol) 30 min lang bei Raumtemperatur equilibriert. Das Gel wurde aus der Gelkammer genommen, die Markierung des Gelmarkers abgeschnitten und auf ein Filterpapier übertragen. Nach folgendem Schema wurden das Gel und die Membran in die Transferträger gelegt, wobei die Schwämme und das Whatman-Papier vorher mit Transferpuffer befeuchtet wurden.

Kathodenseite (oben)
Schwamm
Whatman-Papier
Membran
Gel
Whatman-Papier
Schwamm
Anodenseite (unten)

Eventuell vorhandene Luftblasen wurden entfernt. Die Transferträger und der bei -70°C vorgekühlte Kühlkern wurden in die Transfer-Kammer eingesetzt und der Transferpuffer in die Kammer eingefüllt. Die gesamte Transfer-Kammer wurde mit Eis von außen gekühlt. Mit einem Rührfisch wurde der Transferpuffer während des Transfers sehr langsam bewegt. Durch ein transversal zur Geloberfläche angelegtes elektrisches Feld wurden die Proteine auf die Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Transfer dauerte bei konstant 100 V zwei Stunden. Danach wurden die Transferträger herausgenommen, das Gel verworfen und die Membran weiterverwendet.

3.9.5. Immunodetektion

Die Membran wurde auf Gelgröße ausgeschnitten, gekennzeichnet und über Nacht in PBS und 2 % Magermilch und 0,1 % Tween 20 bei 4 °C auf einem Schüttler blockiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Am nächsten Tag wurde die Membran 2 Stunden lang unter Schütteln mit einem IκB-α-Antikörper (Santa Cruz, sc-371 vom Kaninchen, 0,2 mg/ml) in einer Konzentration von 1 μg/ml in 10 ml PBS und 2 % Magermilch und 0,1 % Tween 20 inkubiert, um eine Bindung der IκB-α-Proteine zu ermöglichen. Anschließend wurde einmal kurz mit 10 ml PBS und 0,1 % Tween 20 gewaschen und dann 30 min in PBS und 0,1 % Tween 20 geschüttelt.

Ein Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Horseradish peroxidase-labelled (HRP)-conjugate, Santa Cruz, sc-2030, von der Ziege) wurde anschließend in einer Konzentration von 0,133 μg/ml 2 Stunden lang in einem Mix aus 9 ml PBS, 2 % Magermilch und 0,1 % Tween 20 auf die Membran gegeben und geschüttelt.

Es folgten drei Waschschriffe von 15 min mit PBS und 0,1 % Tween 20 und ein letzter Waschvorgang fünf Minuten lang mit PBS.

Jeweils 1 ml Western Blotting Reagent von Amersham & Pharmacia Biotech (Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) wurde auf jede Membran gegeben und 2 min inkubiert, wobei das Reagent das an den zweiten Antikörper gebundene Enzym Peroxidase oxidierte, welches dann Licht emittierte. Die Membran wurde in Folie eingelegt, die Feuchtigkeit entfernt und auf Hyperfilm ECL (# RPN 2103K) von Amersham & Pharmacia Biotech exponiert. Abschließend wurde der Film entwickelt.

Die Größe des IκBα-Proteins wurde anhand des Molekulargewichtsstandards ermittelt.

3.10. Bestimmung von thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBARS)

Um eine Lipidperoxidation in Keratinozyten nachzuweisen, wurden thiobarbitursäurereaktive Substanzen (TBARS) im Fotometer bestimmt.

Die Keratinozytenkultivierung erfolgte in 100-mm-Ø-Gewebekulturschalen wie in 3.2 beschrieben, bis 50-60 %ige Konfluenz der Zellen erreicht war. Anschließend wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen mit 10 ml Assaymedium versorgt, welches mit den Tocopherol-Derivaten, wie unter 3.4 beschrieben, supplementiert war.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen zweimal mit 6 ml PBS gewaschen und für die Bestrahlung 4 ml PBS auf die Kulturen gegeben. Anschließend wurden die Kulturen wie unter 3.5 beschrieben bestrahlt.

Nach der Bestrahlung wurden die Kulturen eine Stunde bei 37 °C inkubiert. 500 µl Überstand pro Schale wurden für die extrazelluläre TBARS-Bestimmung in ein 12-ml-Röhrchen pipettiert und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden 30 sec homogenisiert, mit einem Schaber gesammelt und in ein 12-ml-Röhrchen gegeben und geschüttelt, und 100 µl davon wurden für die Proteinbestimmung (siehe 3.8.2) verwandt.

Das verbliebene Zellhomogenisat wurde gemischt und die Zellen mit 4 ml 1-Butanol gesprengt, indem sie gründlich gemischt wurden. Nach zwei Stunden hatten sich die Zellen in der wässrigen Phase am Boden der Röhrchen abgesetzt. 500 µl der wässrigen Phase wurden für die intrazelluläre TBARS-Bestimmung in neuen 12-ml-Röhrchen auf Eis gestellt.

Für die Messung wurde eine Standardreihe mit TEP (MW 220,3) angesetzt. Die erste Verdünnung erfolgte mit 40 %igem Ethanol, alle weiteren mit PBS (9,36 mM, 46,79 µM, 11,25 µM, 5,6 µM). Als Leerwert diente ebenfalls PBS.

Auf die vorbereiteten Proben und die Standardreihe wurden je 1,5 ml Puffer 1 (200 µM EDTA, 1 % Phosphorsäure und 20 µM BHT), 0,5 ml von der 0,5 %igen Thiobarbitursäure und 50 µl 10%iges BHT in Ethanol gegeben, die Reaktionsgefäße gemischt und 30 min bei 100 °C im Wasserbad inkubiert.

Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und die organische Phase mit 1,25 ml 1-Butanol extrahiert, indem geschüttelt und mindestens eine Stunde gewartet wurde, damit sich die wässrige Phase absetzen konnte.

750 µl der oberen (organischen) Phase wurden in Messküvetten pipettiert und im Ultrospec Fotometer im Absorbance-mode bei 535 nm gegen 1-Butanol kalibriert gemessen. Die Werte der TEP-Konzentrationen wurden am Computer mit Hilfe des Swift-Programms kalkuliert.

3.11. Statistische Methode

Zur Auswertung der Messergebnisse wurde der Student t-Test angewandt.