

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Laborchemikalien werden von den Firmen Gibco (Detroit, USA), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Biochrom (Berlin), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) in analytischer Qualität bezogen.

Feinchemikalien und immunchemische Reagenzien anderer Hersteller werden bei den entsprechenden Methoden bzw. unter 2.5. erwähnt.

Abgewogen werden alle Reagenzien mit der Waage 1602MP der Firma Sartorius. Bei Mengen im Milligrammbereich wird die Präzisionswaage 1219MP derselben Firma verwendet.

Alle Puffer und Lösungen werden mit Wasser aus der Millipore-Filteranlage (Milli R/Q, Millipore Corp., Bedford, USA) angesetzt.

Der pH-Wert wird bei Raumtemperatur mit dem pH-Meter Knick digital Typ 645 der Firma Knick eingestellt.

#### 2.1.2. Zellkulturmaterialien

Die in der Zellkultur verwendeten Artikel sind entweder Einmalmaterialien oder werden im Labor in einem Autoklaven der Firma Webeco (Darmstadt) bei 120°C und 202,7 kPa für 30 min sterilisiert.

##### Sterile Einmalartikel:

Mikrotiterplatten mit Flachboden und 96 Vertiefungen, TPP, Renner, Darmstadt

Zellkulturschalen, TPP, Renner, Darmstadt

Zentrifugenröhrchen, TPP, Renner, Darmstadt

Sterilfilter, Schleicher und Schuell, Dassel

Spritzen, Becton Dickinson, Heidelberg

Kanülen, Braun

Pipettenspitzen, Sorensen und Roth

##### Medien und Chemikalien

Roswell-Park-Memorial-Institut-Medium (RPMI 1640), Biochrom KG, Berlin

Keratinocyte-Growth-Medium (KGM) mit Supplement, Gibco, Detroit, USA

Ham's F-12 Medium, Biochrom KG, Berlin

DMEM, Biochrom KG, Berlin

Hydrocortison HO888, Sigma, München

Fetal-Calf-Serum (FCS), Cell Concept GmbH, Deutschland

Streptomycin / Penicillin und L- Glutamin, BioWest, Nuaille, Frankreich

Trypsin, Biochrom, Berlin

DMSO, Merck KG AV, Darmstadt  
 PBS, PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria  
 Kollagen IV (human, C5533), Sigma, München  
 Fibronectin (human F 2006), Sigma, München  
 Laminin-1 (Maus, L 2020), Sigma, München  
 Poly-L-Lysin ( P8920), Sigma, München  
 Serumalbumin vom Rind (BSA), Sigma, München.

### 2.1.3. Versuchsmaterialien

Die verwendeten Laborchemikalien sind bei der Methodik erwähnt und stammen von herkömmlichen Feinchemikalienherstellern. Sie werden ohne vorherige Analytik oder Reinigung eingesetzt.

Der Proliferationsassay auf der Basis von 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) stammt von der Firma Roche (Cat. No. 1 647229), Pharma AG Deutschland.

Der Transwell-Migrationsassay 3422 wird von der Corning Costar Corp., NY, USA geliefert. Die Filter haben einen Durchmesser von 6,5mm sowie eine Porengröße von 8µm.

### 2.1.4. Puffer und Lösungen

#### Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

##### Gellösungen

##### Lösung A

30% Acrylamid (w/v)  
 0,8% N,N`Methylenbisacrylamid (w/v)

##### Lösung C

0,2% SDS (w/v)  
 0,5 M Tris/HCL, pH 6,8

##### Lösung B

0,2% SDS (w/v)  
 1,5% M Tris/HCL, pH 8,8

##### 7,5%-ige Trenngellösung

2,25ml Lösung A  
 2,25ml Lösung B  
 4,5ml aqua bidest.  
 45µl APS (10%)  
 4,5µl TEMED

##### 4%-ige Sammelgellösung

0,4ml Lösung A  
 0,75ml Lösung C  
 1,85ml aqua bidest.  
 12µl APS (10%)  
 3µl TEMED

##### Puffer

##### 5x reduzierender Probenpuffer

14,5% SDS (w/v)  
 0,3M Tris/HCL, pH 6,8  
 50% Glycerin (v/v)  
 25% 2- Mercaptopropandiol  
 0,015% Bromphenolblau (w/v)

##### 10x Laufpuffer

0,25 M Tris/HCL, pH 8,8  
 1,92 M Glycin  
 1% SDS (w/v)

##### 5x nicht reduzierender Probenpuffer

14,5% SDS (w/v)  
 0,3M Tris/HCL, pH 6,8  
 50% Glycerin (v/v)  
 -----  
 0,015% Bromphenolblau (w/v)

Lösungen für Gelfärbungen

Coomassie-Blau-Färbelösung: 40% Methanol (v/v)  
10% Essigsäure (v/v)  
1‰ Serva Blue G- 250 (w/v)

Coomassie-Blau-Entfärbelösung: wie Färbelösung, ohne Serva-Blue G-250

Lösungen für Silbernitratfärbung

Fixierlösung

50% Methanol  
12% Essigsäure  
in aqua bidest.

Silbernitratlösung

0,08 g AgNO<sub>3</sub>  
0,02% Formaldehyd ad 50 ml  
Aqua bidest

Thiosulfatlösung

0,02% Natriumthiosulfat  
In aqua bidest.

Entwicklungslösung

3% Natriumcarbonat  
0,05% Formaldehyd  
0,0005% Natriumthiosulfat in aqua b.

Lösungen für den Westernblot

Transfer-Puffer ( Towbin)

150mM Glycin  
20mM Tris/HCL, pH 8,3  
10% Ethanol (v/v)

Ponceau-Färbelösung

2% Ponceau- rot (w/v)  
30% TCA (v/v)  
30% Sulfosalicylsäure (w/v)  
1:4 mit aqua bidest. verdünnen

Waschpuffer

PBS-Puffer

150mM NaCl  
3mM KCl  
8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
PH 7,8

PBS-Tween

PBS-Puffer + 0,1% Tween 20 (v/v)

Lösungen für den ECL- Nachweis

Lösung A	6,8mM p-Cumarsäure in DMSO
Lösung B	1,25mM Luminol in 0,1M Tris/HCl, pH 8,5
Lösung C	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (v/v)

Entwicklerlösung: Kodak GBX Entwicklerkonz., 1:5 verdünnen mit aqua bidest

Fixierlösung: Kodak GBX, Fixierkonz., 1:5 verdünnen mit aqua bidest.

Elvanolherstellung

Es werden 3g Ploviol in 40ml PBS gelöst und 16h gerührt. Es werden 15ml Glycerin zugegeben und weitere 16h gerührt. Die Lösung wird 15min bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand zur Weiterverdünnung dekantiert. 1mg Phenylendiamin/ml Gesamtvolumen werden zugegeben und lichtgeschützt gelöst. Der pH-Wert wird auf 8,0 eingestellt. Nach Lösen von 259µl Mercaptoethanol wird der Ansatz portioniert und bei -20°C aufbewahrt.

### 2.1.5. Zelllinien

#### HaCaT-Zellen

Bei HaCaT-Zellen handelt es sich um eine nicht tumorigene, immortalisierte menschliche Keratinozytenzelllinie. Sie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Norbert E. Fusenig, DKFZ Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

HaCaT-Zellen wachsen adhärent (Monolayer) und exprimieren in vitro die meisten charakteristischen Marker normaler Keratinozyten der Epidermis so z.B. diverse Zytokeratine. In Bezug auf Wachstum und Differenzierung verhalten sie sich wie normale Keratinozyten. Auch im Lipidgehalt und der Lipidzusammensetzung unterscheiden sich HaCaT-Zellen nicht von normalen menschlichen Keratinocyten.

Die HaCaT-Zellen werden im RPMI-Medium unter Zusatz von 10% FCS, das zuvor auf 56°C erhitzt wurde, 5ml Penicillin/Streptomycin sowie 440mg Glutamin kultiviert. Die Aufbewahrung erfolgte in 10cm-Zellkulturschalen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank der Firma Heraeus Instruments, Hanau.

#### SCC-25-Zellen

SCC-25 Zellen (Tongue- Squamous- Carcinoma-Cells, Human) sind eine tumorigene, menschliche Zelllinie, die von einem Zungengrundkarzinom abstammt. Sie werden in Zellkulturschalen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Das Medium besteht aus einer Mischung aus Ham's F-12 Medium (45%), DMEM Medium (45%), 50ml KFS, 1ml Penicillin/Streptomycin und 400ng/ml Hydrocortison. Die Zellen wachsen adhärent und produzieren eine Matrix, die reich an Laminin-5 ist.

### 2.1.6. Antikörper

#### Antikörper gegen zytosolische Proteine

mAK anti-Phosphotyrosin PT 66, Sigma, München

#### Integrin-Antikörper

mAk anti- $\alpha$ 3, Chemicon (P1B5), Hofheim  
Dianova (M1Kd2), Hamburg

mAk anti- $\beta$ 1, K20 CD29 Beckman Coulter, Fullerton, USA

mAk anti- $\beta$ 4, Chemicon (CD 104), Hofheim

#### sekundäre Antikörper:

GAM-FITC, Sigma, München

GAR-FITC, Sigma, München

### 2.1.7. Aktivatoren und Inhibitoren

Bei den nachfolgenden Reagenzien handelt es sich um Inhibitoren, die Enzyme verschiedener Signaltransduktionskaskaden hemmen:

U73122, Biomol, Hamburg

U73122 inhibiert die Agonist-induzierte Aktivierung der Phospholipase C mit einer IC<sub>50</sub> von 1,0-2,1 $\mu$ M.

Wortmannin, Biomol, Hamburg

Wortmannin inhibiert das Enzym PI3 Kinase durch kovalente Bindung an dessen katalytische Untereinheit p110.

### **2.1.8. Geräte**

Mikroskop, Typ TMS, Nikon, Japan

Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 200, Zeiss, Göttingen

Laborzentrifuge, Sigma, München

Digifuge GL, Heraeus, Hanau

Biofuge pico, Heraeus Instruments, Hanau

Sterilbank BDK, Luft- und Raumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genhingen

Brutschrank, Heraeus Instruments, Hanau

Elisa Reader, Spectra, SLT- Labinstruments

Gelelektrophoresesystem, Mini-Protean 2, BioRad, München

FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg

### **2.1.9. Sonstiges**

3MM Filterpapier, Whatman, London, UK

Einweg-Zellschaber aus Teflon, Costar, Cambridge, UK

Multitest Objektträger, Dunn, Asbach

Nitrozellulose BA45, Schleicher und Schuell, Dassel

Zählkammer nach Neubauer

Röntgenfilm X-OMAT AR5, Kodak AG, Stuttgart

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Benötigte Lösungen

PBS-Puffer Dulbeccos Phosphate Buffered Saline, PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria

PBS/EDTA: 1000ml PBS

500mg Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Trypsin, PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Zellkulturmedium: RPMI 1640, Biochrom AG, Berlin

2g/l NaHCO<sub>3</sub>

10% Fetales Kälberserum (FCS), Cell Concept

440mg/l Glutamin, BioWest

100mg/l Streptomycin

100MU Penicillin

Keratinocytenmedium: Defined Keratinocyte-SFM, Gibco, Detroit, USA

a) KGM<sup>+</sup>

500ml serumfreies Keratinocytenmedium

1ml Growth- Supplement (Insulin, EGF,

FGF, frei von Rinderhypophysenextrakt.

b) KGM<sup>-</sup>

500ml serumfreies Keratinocytenmedium

Trypanblaulösung (0,5%): 0,9 g Natriumchlorid

0,5 g Trypanblaufarbstoff

auf 100 ml mit aqua bidest auffüllen und mit 0,45µm-  
Filter filtriert.

### 2.2.2. Kultivieren der Zellen

HaCaT-Zellen werden in Zellkulturschalen (10cm Durchmesser) im Brutschrank bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5% CO<sub>2</sub> enthält, kultiviert. Die Zellen werden alle 2-3 Tage mit neuem Medium versehen. Dabei werden die Zellen 1 Woche vor den geplanten Versuchen aus -80°C aufgetaut und in RPMI-Medium gehalten. Um konfluent gewachsene Zellen zu passagieren, werden die Zellen zunächst mit PBS/EDTA gespült und dann kurze Zeit mit einer 0,25% Trypsinlösung behandelt. Nach der unter dem Mikroskop sichtbaren Abrundung der Zellen werden diese von der Kulturschale abgespült und in ein mit Medium gefülltes 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen werden in der Digifuge 3 min bei 900U/min pelletiert und in Medium resuspendiert. Zur Versuchsvorbereitung werden die Zellen 2 Tage vor dem Versuch erneut von den Kulturschalen abgelöst und die Zellzahl mit Hilfe des Zellzählgerätes (Coulter Counter) auf 2,5x10<sup>6</sup>/Kulturschale eingestellt. Das Medium wird dabei auf das Keratinocytenmedium mit Supplement (KGM<sup>+</sup>) umgestellt. Damit wird sichergestellt, dass die Zellen zu den Versuchen immer in der gleichen Ausgangssituation sind.

### 2.2.3. Zellen einfrieren

Die Zellen werden trypsiniert und in der Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet wird in 1ml fetalem Kälberserum mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in ein Nunc-Gefäß (2ml) mit Schraubverschluß überführt. Das Gefäß wird mit Zellstoff umwickelt und die Zellen zunächst langsam innerhalb von 1 Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für kurze Zeit können die Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Zellen, die über längere Zeit gelagert werden, werden bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in einem Stickstofftank gelagert.

### 2.2.4. Zellen auftauen

Die tiefgefrorenen Zellen können jederzeit durch Zugabe von 1ml vorgewärmtem RPMI 1640-Medium aufgetaut werden. Während das Einfrieren von Zellen langsam erfolgt, sollte das Auftauen schnell erfolgen. Nach zweimaligem Waschen mit Zellkulturmedium werden die Zellen auf drei Kulturschalen (10cm Durchmesser) verteilt.

### 2.2.5. Zytotoxizitätsbestimmung mit Trypanblau

Die Bestimmung der Zytotoxizität der beiden untersuchten Substanzen Glc-PC und Glc-PAF erfolgt durch Färbung mit Trypanblau und nachfolgender Zählung der lebenden und toten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer. Lebende Zellen dürfen nicht angefärbt sein, während tote Zellen durchgängig blau angefärbt sind. Sollte eine Zellzählung wiederholt werden, muß der Testansatz stets neu gemischt werden, da Trypanblau zytotoxisch für die Zellen ist. Mit zunehmender Inkubationsdauer nimmt die Anzahl der toten Zellen zu. Den Prozentsatz an lebenden Zellen wird nach folgendem Schema errechnet.

lebende Zellen (in %) =  $\frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100$

### 2.2.6. Zytotoxizitätsbestimmung mit LDH-Messung

Zur sensitiven und präzisen Quantifizierung der Zytotoxizität wird der „Cytotoxicity Detection Kit“ (Cat. No. 1 644793) von Roche verwendet. Er basiert auf der Messung des zytoplasmatischen Enzyms LDH. Dieses Enzym kommt in allen Zellen vor und wird bei deren Absterben in das Zellmedium abgegeben. Mit dem Kit kann die LDH-Aktivität im Zellüberstand gemessen und damit Rückschlüsse auf prozentuale Zytotoxizität gezogen werden.

Nach der üblichen Versuchsvorbereitung, wird die Zellzahl auf  $10^5/100\mu\text{l}$  eingestellt, und die Zellen in eine 96-well Mikrotiterplatte verteilt. Bei  $37^{\circ}\text{C}$  lässt man die Zellen über Nacht adhären. Nach Wechseln des Mediums werden die auf Zytotoxizität zu untersuchenden Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen dazugegeben und für unterschiedliche Zeiten (2h, 24h, 48h) bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Das Gesamtvolumen beträgt dabei  $200\mu\text{l/well}$ . Nach der Inkubationszeit werden  $100\mu\text{l}$  des Zellüberstandes mit einer Pipette abgenommen und in eine neue 96 well Platte überführt. Anschliessend werden  $100\mu\text{l/well}$  einer von Roche

mitgelieferten Reaktionssubstanz dazugegeben und 30min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 492 nm im ELISA- Reader.

Um die prozentuale Zytotoxizität kalkulieren zu können, müssen bei jedem Versuchsansatz folgende Kontrollen mitgeführt werden:

Hintergrund: 200 µl/well Medium

Low control: 100µl Medium + 100µl Zellsuspension

High control: 100µl Triton X 100 + 100µl Zellsuspension

Substanzkontrolle: 100µl der Testsubstanz (höchste Konzentration) + 100µl Medium

Die prozentuale Zytotoxizität errechnet sich wie folgt:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{gemessene Extinktion} - \text{Low control}}{\text{High control} - \text{low control}} \times 100$$

### 2.2.7. Adhäsionsassay zur Untersuchung von Zell-Matrix-Wechselwirkungen

Die Fähigkeit von Zellen auf Matrixproteinen zu adhären, kann im Adhäsionsassay getestet werden. Die dabei involvierten Oberflächenrezeptoren der Zellen können durch Hemmung der Adhäsion mittels spezifischer Antikörper identifiziert werden. Die Zahl der adhären Zellen wird nach der Färbung der fixierten Zellen photometrisch im ELISA-Reader bestimmt. 96-well-Mikrotiterplatten werden über Nacht bei 4°C mit jeweils 100µl/well Kollagen IV (je 20µg/ml in PBS), Fibronektin (je 20µg/ml in PBS), Laminin (je 20µg/ml in PBS) beschichtet. Nach Absaugen der überschüssigen Proteinlösung wird die Platte 1x mit PBS gewaschen und mit 1% BSA in PBS für 4h bei 4°C abgesättigt. Nach nochmaligem Waschen mit PBS werden 100 µl/well Zellsuspension ( $5,5 \times 10^4$ /ml) dazugegeben. Die Zellen werden wie üblich zur Versuchsvorbereitung eine Woche zuvor aus -80°C aufgetaut und im RPMI 1640-Medium in Kultur gehalten. Zwei Tage vor dem Versuch werden je  $2,5 \times 10^6$  Zellen auf neue Kulturschalen verteilt und für 48h im KGM<sup>+</sup> kultiviert. Das Medium wird dann erneuert und die zu untersuchenden Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen dazugegeben, wobei das Lösungsmittel DMSO immer eine Endkonzentration von 0,1% erreicht. Nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten wird das Medium abgesaugt, und die Zellen 1x mit PBS gewaschen. Die Zellen werden dann für 2h in KGM<sup>+</sup> gehalten. Nach dem Trypsinieren werden sie wiederum in KGM- aufgenommen und bei 900U/min für 3min pelletiert. Nachdem sie mit einer Kanüle gut vereinzelt wurden, wird die Zellzahl mit Hilfe eines Zellzählgerätes eingestellt. Um sicherzustellen, dass alle Zellen nach dem Verteilen in die Mikrotiterplatte wieder in der gleichen Ausgangssituation sind, wird der Versuchsansatz für 20 min bei 4°C gehalten. In der Zeit sinken alle Zellen auf den Boden und verlangsamen ihren Stoffwechsel. Die Adhäsion erfolgt dann für 90min bei 37°C. Anschließend wird die Platte ausgeschlagen und 3x mit PBS gewaschen, um nichtadhärente Zellen zu entfernen. Die adhären Zellen werden für 10min mit 1% Glutardialdehyd in PBS fixiert (100µl/well) und gewaschen. Zur Quantifizierung der Zellen werden diese mit 0,1% Kristallviolett (Hexamethylparafuchsin in aqua bidest), welches an negativ geladenen Moleküle bindet, für 25min gefärbt (100µl/well). Anschließend 2x mit aqua bidest gewaschen und nach dem Trocknen mit 0,5% Triton in aqua bidest, welches den Farbstoff in Lösung bringt, mehrere Stunden inkubiert. Die Färbung wird bei 570nm im ELISA-Reader photometrisch bestimmt. Alle Waschschritte erfolgen mit 150µl/well. Mittelwerte wurden von mindestens vier wells pro Ansatz bestimmt. Die Anzahl der ausgewerteten Assays wurde jeweils angegeben. Der Fehler stellt die Standardabweichung dar. Die Inhibitoren U73122 und Wortmannin werden 10min vor Ausplattieren der Zellen in das Medium dazugegeben

### 2.2.8. Proliferationsassays

Zur Messung des Einflusses von Glc-PAF und Glc-PC auf die Proliferation der Zellen wird der „ Cell Proliferation ELISA BrdU colorimetric Kit „ (Cat. No. 1 647229) von Roche eingesetzt.

Bei diesem Assay beruht die Quantifizierung der Zellproliferation auf der Messung des Basenanalogs 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), das während der Zellteilung anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird.

Die Zellen werden wie üblich vor Versuchsbeginn für 48h zu je  $2,5 \times 10^6$  auf 10cm Kulturschalen verteilt und mit Keratinozytenmedium bei 37°C kultiviert. Nach Absaugen des Mediums werden sie mit 1x mit PBS/EDTA gewaschen und mit Hilfe von 0,25% Trypsin von der Schale abgelöst. Die Zellen werden dann in KGM<sup>+</sup> aufgenommen und 3min bei 900U/min pelletiert. Nachdem sie mit einer Kanüle gut vereinzelt werden, wird die Zellzahl mit einem Zellzählgerät bestimmt und auf  $1 \times 10^4$ /ml eingestellt. Die jeweils zu untersuchende Substanz wird in unterschiedlichen Konzentrationen mit in die Zellsuspension gegeben, wobei DMSO, in dem Glc-PC und Glc-PAF gelöst ist, immer eine Endkonzentration von 0,1% erreicht. Unmittelbar nach Zugabe der Substanzen wird die Zellsuspension (100µl/well) in die wells einer 96 Mikrotiterplatte verteilt und anschließend für 24h bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit adhären und proliferieren die Zellen unter Einfluss von Glc-PC und Glc-PAF. Nach 24 h wird BrdU dazugegeben und für weitere 12h bei 37°C inkubiert. Um den Assay nach insgesamt 36h zu beenden, wird das Medium durch Ausschlagen der Platte entfernt und für 30min eine von der Firma mitgelieferte Fixierlösung dazugegeben (200µl/well). Damit werden die Zellen fixiert und gleichzeitig denaturiert, wodurch das in die DNA eingebaute BrdU für die Markierung durch einen mit Peroxidase gekoppelten Antikörper frei vorliegt. Der Antikörper (100µl/well) inkubiert für 90min bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Platte 3x mit einem Waschpuffer (200µl/well) gewaschen. Durch Zugabe eines Substrates (Tetramethylbenzidin, 100µl/well) kommt es innerhalb von 10min zu einer Blaufärbung, deren Intensität von der Zahl der in den 36h proliferierten Zellen abhängig ist. Die Quantifizierung der Blaufärbung erfolgt dann im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405nm. Der gesamte Assay wird im KGM<sup>+</sup> durchgeführt.

### 2.2.9. Haptotaktischer Transwell-Migrationsassay

Im Transwell-Migrationsassay (Costar # 3422, Corning, NY, USA) wandern Zellen entlang eines Matrixgradientens durch einen porösen Filter (Porengröße: 8,0 µm). Migrierte Zellen werden gefärbt und gezählt.

Für diesen Assay werden die Zellen wie üblich zur Vorbereitung 48h vorher zu je  $2,5 \times 10^6$  auf 10cm Kulturschalen verteilt und im KGM<sup>+</sup> kultiviert. Glc-PC oder Glc-PAF wird je nach Inkubationszeit für 2h oder 24h in unterschiedlichen Konzentrationen mit in das Medium der Kulturschale gegeben. Unmittelbar vor dem Versuch wird das Medium abgesaugt und die Kulturschale 1 x mit PBS gewaschen. Für 2h werden die Zellen in KGM<sup>-</sup> inkubiert und nach dem Ablösen wiederum in diesem Medium aufgenommen.

Die Filter des Assays werden für 30min bei Raumtemperatur mit 50µl Kollagen IV (20µg/ml) beschichtet. Die überschüssige Flüssigkeit wird abpipettiert und der Filter 1x mit PBS gespült und mit 1% BSA in PBS für 30min abgesättigt. Nach einmaligen Waschen mit PBS werden die Filter in die wells der Platte eingesetzt und 500µl KGM<sup>-</sup> in die Außenkammer gegeben. Innen auf die Filter werden jeweils 100µl der Zellsuspension pipettiert ( $10^5$  Zellen/ml). Die Zellmigration erfolgt für 5-6 h bei 37°C im Brutschrank. Anschließend werden die Zellen von der Oberseite des Filters vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt. Die Filter werden in

PBS gespült und in 3% Paraformaldehyd in PBS mit 0,025% Saponin für 30min fixiert. Nach Waschen mit aqua bidest werden die Zellen für 25min in 0,1% filtriertem Kristallviolett gefärbt. Die überschüssige Farbe wird mit aqua bidest abgespült und migrierte Zellen mit einem 20 x Objektiv unter dem Mikroskop gezählt.

### 2.2.10. Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated-Cell-Scanning)

In der Durchflusszytometrie werden Zellen einzeln hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom an einen Analysepunkt vorbeigeleitet (hydrodynamische Fokussierung), wo sie auf ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften von einem Laser untersucht werden. Am Analysepunkt kann anhand des Vorwärtsstreulichtes des Laserstrahls die Zellgröße und anhand des Rechtwinkelstreulichtes die Zelldichte und Granularität bestimmt werden. Die Zellen können des weiteren durch Markierung mit Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper gegen bestimmte Proteine charakterisiert werden. Es können mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig gemessen werden, wenn sich ihre Absorptionsspekten überlappen, ihre Emissionsspektren aber unterschiedlich sind.

Für die FACS-Analysen werden die Zellen wie üblich vorbereitet. Nach Inkubation mit Glc-PC bzw. Glc-PAF werden pro Ansatz  $10^5$  Zellen in FACS-Puffer suspensiert und gut vereinzelt. Die Zellen werden bei 900 rpm pelletiert und in 500 $\mu$ l des mit FACS-Puffer (PBS, 0,1% BSA, 0,02%  $\text{NaN}_3$ ) verdünnten primären Antikörper aufgenommen.

Die Zellen werden 60min auf Eis inkubiert und 2x mit 4ml FACS-Puffer gewaschen. Es folgt eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper (GAM-FITC) 1: 32 verdünnt für 60 min auf Eis im Dunkeln. Für den Nullwert werden Zellen nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen werden die Zellen in 1ml FACS-Flow aufgenommen und im Lysis II-Programm des FACScan (Becton Dickinson, Heideberg) analysiert.

### 2.2.11. Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Zelluläre Proteine und ihre Lokalisation können durch Fluoreszenz-Markierung und indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

Objektträger werden über Nacht bei 4°C mit Matrixproteinen (20 $\mu$ g/ml) beschichtet, für 4h bei 4°C mit 1% BSA abgesättigt und mit PBS gewaschen. Die Zellen werden nach der üblichen Vorbereitung und Inkubation mit Glc-PC bzw. Glc-PAF für 30min in KGM inkubiert und für 3h auf den vorbereiteten Objektträgern ausgesät. Sie werden anschliessend 3x mit PBS gewaschen und die adhärenen Zellen mit 3% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Zur Färbung intrazellulärer Proteine werden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 in PBS für 2min permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen werden die Objektträger für 20min mit 1% BSA in PBS abgesättigt. Das F-Aktinskelett wird mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin detektiert. Hierzu wird für 30min 7,5 $\mu$ l/ml Phalloidin in PBS auf die adhärenen Zellen gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation erfolgt im Dunkeln. Nach gründlichen Waschen werden die Objektträger getrocknet und die Zellen mit Ehanol unter Objektgläschen eingedeckt. Die Ergebnisse werden am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Zeiss) ausgewertet und als Photoshop-Dateien dokumentiert.

### 2.2.12. Solubilisation von Zellen

$5 \times 10^6$  Zellen werden gewaschen und mit 1ml Triton X-100-Puffer mit 1mM PMSF, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 5 $\mu\text{M}$  Phenylarsenoxid und je 10  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin für 2h bei 4°C unter Rütteln solubilisiert. Unlösliche Bestandteile werden durch 18000rpm für 15min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wird in anschließenden Versuchen verwendet.

### 2.2.13. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt nach der BCA-Methode (Bicinchoninsäure-Methode), welche auf der Protein-abhängigen Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu Cu beruht, und wird wie von der Firma (Pierce, Rockford, IL, USA) angegeben durchgeführt. Die Probe wird zuvor 1:1 mit Solubilisierungspuffer verdünnt. Für die Quantifizierung wird eine Proteinbezugskurve verwendet, die mit Hilfe von BSA erstellt wird.

### 2.2.14. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Porengröße der Gele kann über den Acrylamidanteilen je nach Größe der aufzutrennenden Moleküle variiert werden. Es werden 7,5% -Minigele verwendet.

Das Trenngel wird bis ca. 3cm unterhalb der oberen Glasplattenkante gegossen und mit aqua bidest überschichtet. Nach etwa 1h wurde das Wasser entfernt und das Sammgel gegossen. Vor dem Auftragen werden die Proben mit einem Fünftel Volumenanteil 5x SDS-Probenpuffer versetzt und 5min gekocht. Die Elektrophorese wird im Laufpuffer bei 120V durchgeführt (System von Bio-Rad, München).

### 2.2.15. Western-Blotting

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine werden mittels der Western-Blott-Analyse aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schüll, 0,45  $\mu\text{m}$  Porengröße) transferiert. Die überführten Proteine können dann immunologisch mit spezifischen primären Antikörpern bzw. mit an diese bindenden sekundären Antikörper und einer gekoppelten Enzymreaktion detektiert werden.

Der Blot wird nach dem Tank-Blot-Verfahren durchgeführt. Die Nitrocellulosemembranen und das Whatmanpapier werden kurz in Transferpuffer äquilibriert und der Blot-Sandwich so zusammengebaut, dass das SDS-Gel der Kathode zugewandt ist. Der Transfer erfolgt in einer Bio-Rad-Kammer für 1h bei 250mA auf Eis mit Transferpuffer. Die Nitrocellulosemembran wird durch reversible Färbung mit Ponceau für 5min und anschließendem Entfärben (1% Essigsäure in PBS) überprüft. Dadurch werden die Proteinbanden rot angefärbt. Für den Nachweis von Tyrosin-Phosphat wird die Blotmembran mit 2% BSA Fraktion V., pH7 (Serva, Heidelberg) in TBS-Earp abgesättigt. Inkubation mit PT66 (1:2000 in Blockierungspuffer) erfolgt für 1h. Alle Waschschrirte und Verdünnungen werden mit TBS/Earp durchgeführt. Nach dem Entfernen des Antikörpers folgt ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (TBS) für je 15min. Die Inkubation mit dem Detektionsantikörper (1:5000 in TBS) erfolgt für 2h bei Raumtemperatur. Die Blots werden dann 1h gewaschen.

### **2.2.16. Proteinnachweis mittels ECL-Methode (Enhanced-Chemiluminescence)**

Proteine, die auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden, können durch die ECL (enhanced chemiluminescence)- Methode nachgewiesen werden. Eine Antikörper-gekoppelte Peroxidase katalysiert hierbei einen Substratumsatz, der von einer Chemilumineszenz begleitet wird. Diese kann auf einem Röntgenfilm erfasst werden. Die Blotmembranen werden kurz zwischen Whatmanpapier abgetrocknet und auf eine Folie gelegt. Es werden 1ml Lösung A mit 10µl Lösung B und 3µl Lösung C gemischt und unter Rotlicht auf die Membran pipettiert. Die ECL-Lösung wird nach ca. 1min mit Filterpapier abgesaugt, die Membran wird mit einer Folie abgedeckt und Röntgenfilme aufgelegt. Nach verschiedenen langen Expositionszeiten werden diese entwickelt, eingescannt und als Photoshop-Dokument abgespeichert.