

**Teil V**

**Materialien und Methoden**

# 11 Material

## 11.1 Chemikalien

Laborchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Boehringer Mannheim (Mannheim), Biochrom (Berlin), Serotech (Berlin), Gibco (Detroit, USA) und Sigma-Aldrich (München) in höchster Qualitätsstufe bezogen. Chemikalien und Reagenzien weiterer Hersteller sind bei den entsprechenden Methoden ausgewiesen.

Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Falcon (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden), BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, USA), Corning (New York, USA), PAA (Cölbe) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Diese waren entweder sterile Einmal-Artikel oder sie wurden durch Wasserdampf-Sterilisation vor Gebrauch sterilisiert.

### 11.1.1 Phospholipide

Basierend auf Arbeiten von M.Mickeleit wurde das Inositol-C2-PAF (Ino-C2-PAF) von S.Laabs synthetisiert (s. Abb. 11.1). An das Glycerol-Grundgerüst sind über Etherbindungen eine Alkylgruppe (C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>) und Phosphocholin gebunden. An der *sn-2* Position ist über einen Abstandhalter (C<sub>2</sub>-Gruppe) der Zuckeralkohol Inositol über eine Etherbindung gebunden. Als Vergleichssubstanz dient Hexadecylphosphocholin (HePC), das unter dem Namen Miltefosine<sup>®</sup> schon in klinischen Studien zur Behandlung von Hautmetastasen bei Brustkrebs-Erkrankungen eingesetzt wird. Ausserdem wird es zur Behandlung der viszeralen Leishmaniose erprobt (s. Abb. 11.2).

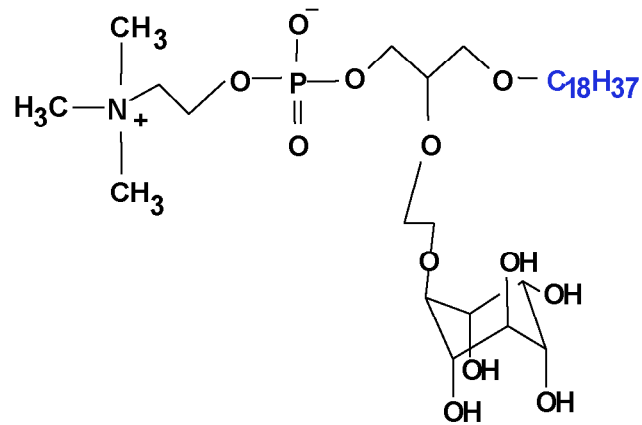


Abbildung 11.1: Strukturformel von Inositol-C2-PAF

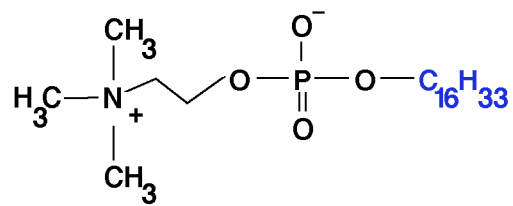


Abbildung 11.2: Strukturformel von HePC

## 11.1.2 Geräte

### Institut für Biochemie und Molekularbiologie

Amaya Nucleofector	amaya GmbH, Deutschland
Bruker Biflex MALDI-ToF MS	Bruker, Deutschland
Brutschrank (Zellkultur)	6000 Heraeus, Kendro
Cleanbench	Faster 1, Bio-Flow-Technik
Coulter (Partikel-Counter)	Z-Serie, Coulter Electronics
Digitales Imaging System	LAS-1000, Fujifim, X-Ray
ELISA-Reader	Spectra, SLT-Labinstruments
FACScan	BD, Immunocytometry Systems
Feinwaage	Adventurer, Ohaus
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Axiovert 200, Göttingen, Deutschland
Gel-, Blotsysteme	Mini-Protean 2, BioRad
Heizblock	Thermomixer 5336, Eppendorf
Kühlzentrifuge	Centrikon H-401, Kontron Instruments
Magnetrührer	IKAMAG, Roth
Mikroskop	TMS, Nikon
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf
Power Supply	Power Pac 1000, BioRad
Thermomixer	5436, Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge Pico, Heraeus
Ultraschallbad	Sonicator™, Heat systems Ultrasonic
Ultrazentrifuge	Centrikon T-2070, Kontron Instruments
Vortex	Vortex-Genie 2, Bender & Hobein
Waage	CP622, Sartorius
Wasserbad	GFL

### Institut für Pharmazie und pharmazeutische Technologie

Bördelkappe, Gummistopfen	Iphas, Würselen
Fraktionssammler RF 3/SMTS 5000	Roth, Karlsruhe
Franz-Zelle, ø9mm, Durchfluss	Crown Scientific, Somerville, USA
Gefriermikrotom Frigocut® 2800 N	Leica, Bensheim
Glasbehälter für Nanoemulsionen	PACKSYS, Starnberg
Heisshomogenisator Micron Lab 40	APV Gaulin, Lübeck
Laserdiffraktometer Coulter LS 230	Coulter, Miami, USA
Liquid Scintillation Counter	Perkin Elmer, Boston, USA
Photonenkorrelationsspektroskop	
Pipetten Eppendorf Reference®	Eppendorf, Hamburg
Tensiometer K10T	Krüss, Hamburg
Ultra-Turrax IKA T25	Janke & Kunkel, Staufen
Zetasizer 4	Malvern Instruments, Malvern, UK

## Reagenzien/Verbrauchsmaterialien

Casein	Sigma-Aldrich, Deutschland
Miglyol 812	Caelo, Minden
Poloxamer 188	BASF, Ludwigshafen
Putrescin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Putrescine (60 Ci/mmol)	MP Biomedical, Irvine CA USA

### 11.1.3 Antikörper

#### Antikörper für die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Antikörper, -art	Konzentration	Herkunft
anti-human-Integrin-beta1 PE gekoppelt, mAb	1 $\mu$ L/10 <sup>5</sup> Zellen	Acris, Deutschland
anti-human-Integrin-beta1 FITC gekoppelt, mAb	40 $\mu$ g/mL	Immunotech, Frankreich
anti-human-Integrin-alpha3, mAb	1 $\mu$ g/mL	Cymbus Biotechnology, USA
anti-human-Integrin-alpha6, mAb	5 $\mu$ g/mL	Acris, Deutschland
anti-Vinkulin, mAb	2 $\mu$ g/mL	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-c-myc, mAb	2,4mg/mL	Sigma, USA
Choleratoxin B-subunit	1:100	Sigma, Deutschland
Hoechst Farbstoff	1:2000	
Phalloidin-TRITC oder CPITC	1:500	Sigma, Deutschland
goat-anti-mouse-IgG-Cy2	140 $\mu$ g/mL	dianova, Deutschland
goat-anti-mouse-IgG-FITC	1:32	Sigma, USA
anti-rabbit-IgG-TRITC	1:32	Sigma, USA
anti-rabbit-IgG-FITC	1:32	Sigma, USA

### Antikörper und Farbstoffe für FACS-Anwendungen

Antikörper, -art	Konzentration	Herkunft
Annexin V-FITC		
anti-human-Integrin-alpha3, mAb	1µg/mL	Chemicon, Kanada
anti-human-Integrin-alpha5, pAb	1,25µg/mL	Chemicon, Kanada
anti-human-Integrin-alpha6, pAb	1,25µg/mL	BD, Belgien
anti-human-Integrin-beta1 PE gekoppelt, mAb	1µL/10 <sup>5</sup> Zellen	Acris, Deutschland
anti-human-Integrin-beta1 FITC gekoppelt, mAb	40µg/mL	Immunotech, Frankreich
anti-human-Integrin beta4, mAb	1µg/mL	Chemicon, Kanada
anti-human-CD3-PerCP, mAb	10µL/5x10 <sup>5</sup> Zellen	BD, Belgien
anti-human-CD4-PerCP, mAb	10µL/5x10 <sup>5</sup> Zellen	BD, Belgien
anti-human-CD14-PC5, mAb	4µL/5x10 <sup>5</sup> Zellen	Beckman Coulter Frankreich
anti-human-CD16-FITC, mAb	10µL/5x10 <sup>5</sup> Zellen	Immunotech, Frankreich
anti-human-CD25-FITC, mAb	10µL/5x10 <sup>5</sup> Zellen	BD, Belgien
anti-human-CD69-FITC, mAb	10µL/5x10 <sup>5</sup> Zellen	BD, Belgien
anti-human-CD86-PE, mAb	6µL/5x10 <sup>5</sup> Zellen	BD, Belgien
anti-human-CD95-FITC, mAb	20µL/5x10 <sup>5</sup> Zellen	BD, Belgien
anti-human-CD163-PE, mAb	20µL/5x10 <sup>5</sup> Zellen	BD, Belgien
anti-human-IL1A-DR-PE, mAb	6µL/5x10 <sup>5</sup> Zellen	BD, Belgien
goat-anti-mouse-IgG-PE	3µL/5x10 <sup>5</sup> Zellen	BD, Belgien
goat-anti-mouse-IgG-PerCP	3µL/5x10 <sup>5</sup> Zellen	BD, Belgien
goat-anti-mouse-IgG-FITC	3µL/5x10 <sup>5</sup> Zellen	BD, Belgien
Propidiumiodid	0,2µg/mL	

### Antikörper für den Nachweis auf Blotmembranen

Antikörper, -art	Verdünnung	Herkunft
anti-pMAPK, mAb	1:5000	Promega, USA
anti-human-beta-Actin, mAb	1:5000	Sigma, USA
anti-human-Involucrin, mAb	1:100	Sigma, USA
anti-human-Transglutaminase, pAb	1:250	abcam, England
anti-human-rac1, mAb	1:1000	BD, Belgien
anti-c-myc, mAb	1:1000	Sigma, USA
rat-anti-mouse-IgG-POD	1:5000	dianova, Deutschland
goat-anti-rabbit-IgG-POD	1:5000	dianova, Deutschland

## Plasmid-DNA für Transfektionen

AAH04247: Rac1-Protein (Homo sapiens) Für die Generierung der dominant-negativen Mutante des Rac1 (T17N Rac) wurde das Threonin an Position 17 durch Asparagin ausgetauscht, für die Generierung der konstitutiv-aktiven Mutante des Rac1 (Q61L Rac) wurde Glutamin von Position 61 durch ein Leucin ersetzt. Die modifizierten Aminosäuren sind unterstrichen in der nachfolgenden Übersicht dargestellt.

```
1  mqaikcvvvg  dgavgktcll  isyttnafpg  eyiptvfdny  sanvmvdgkp  vnlglwdtag
61  qedydrlrpl  sypqtdvfli  cfslvspasf  envrakwype  vrhhcpntpi  ilvgtkldlr
121 ddkdtiekkl  ekklipityp  qglamakeig  avkylecsal  tqrglktvfd  eairavlcpp
181 pvkkrkrkcl  ll
```

pCMV-Myc-Vektoren:

pCMV-Myc / N17Rac, pCMV-Myc / L61Rac, pCMV-Myc / wt-Rac, pCMV-Myc / Leervektor

Der Expressionsvektor pCMV-Myc J3 ist eine Modifikation des Vektors pCMV-Myc (Clontech) (Liu und Burrige, 2000). Der pCMV-Myc mammalia Expressionsvektor exprimiert ein Protein, das N-terminal ein c-Myc-Tag Epitop enthält, was sehr immunreaktiv ist. Zusätzlich besitzt der Vektor eine Multiple-Cloning-Site (MCS), das Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 und eine Ampicillin-Resistenz für die Genexpression in *E. coli* (Abb. 11.3).

Kontroll-Vektor: Der Kontroll-Vektor pmaxGFP ist im Amaxa Nucleofektionskit enthalten und kodiert für das grün fluoreszierende Protein aus der Quallenspezies *Aequorea victoria*.

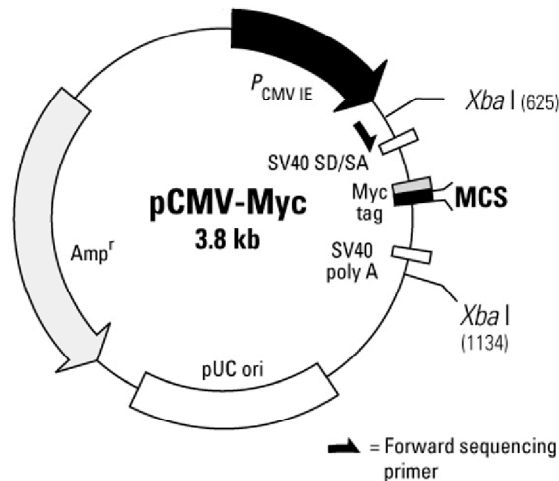


Abbildung 11.3: Schematischer Aufbau des pCMV-Myc1 Vektors

## 11.1.4 Zelllinien und Zellkulturmaterialien

### HaCaT-Zellen

N.E. Fusenig, Heidelberg

Die verwendete Zelllinie HaCaT wurde spontan aus einer adulten, humanen, histologisch unauffälligen Primärkeratinozyten-Kultur gewonnen (Boukamp et al., 1988). Von der Arbeitsgruppe von N. E. Fusenig wurde die Zelllinie etabliert. Der Name HaCaT ist eine Kurzschreibweise für „**h**uman **a**dult **k**eratinocytes kept under low **c**alcium and elevated **t**emperature“. Die Zellen weisen einen epithelialen Phänotyp auf und sind durch Zell-Zell-Kontaktinhibition in ihrer Proliferation auf den zur Verfügung stehenden Raum angewiesen. Ab der 10. Passage ist die Proliferation von den Kulturbedingungen, wie der Temperatur oder der Calciumkonzentration, unabhängig. Trotz des transformierten Phänotyps sind HaCaT-Zellen nicht tumorigen. HaCaT-Zellen sind durch eine geordnete Wachstumsstruktur und ihre Fähigkeit zur Differenzierung gekennzeichnet.

### SCC-25-Zellen

ATCC, Rockville, USA

Diese Zellen sind squamöse Karzinomzellen epithelialen Ursprungs. Im Gegensatz zu der HaCaT-Zelllinie können SCC-25-Zellen nach Erreichen der Konfluenz rosettenartig übereinander wachsen. Der Name SCC ist eine Kurzschreibweise für „squamous cell carcinoma“.



## Primärkeratinozyten

AG B. Kleuser, Institut für Pharmazie, Berlin

Die Primärkeratinozyten (Passagen 2-4) wurden von der AG B. Kleuser zur Verfügung gestellt.

## Blutzellen

Die Blutzellen wurden aus Vollblutspenden gesunder Probanden gewonnen. Die Aufreinigung der PBMCs ist im Abschnitt „zellbiologische Methoden“ detailliert dargelegt.

## 11.1.5 Enzyme/Proteine, Marker und Kits

### Enzyme/Proteine

Enzym/Protein	Herkunft
humaner epithelialer Wachstumsfaktor	Sigma, Deutschland
RNase, DNase frei	Quiagen, Hilden
Trypsin	PAA, Deutschland

### Marker

Marker	Herkunft
Prestained Molecular Weight Marker	Sigma, München

### Kits

Kit	Herkunft
AnnexinV-FITC/PI	Bender Med, San Bruno, USA
BCA-Protein-Assay	Gibco-BRL, Detroit, USA
Cell line Nucleofactor™ Kit V	Amaxa Biosystems, Köln
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche, Mannheim
CellTiter 96, AQueos One Solution Proliferation Assay	Promega, USA
Cytotoxicity detection Kit, LDH	Roche, Mannheim

## Sonstiges

Reagenz	Herkunft
Accutase	PAA, Deutschland
Collagen IV	Sigma, München
Fibronectin	Sigma, München
Ficoll-Paque Plus	Amersham Biosciences, USA
Immersol	Zeiss, Deutschland
Interferon $\gamma$ , rekombinant, human	ImmunoTools, USA
Laminin-1	Roche, Mannheim
Lipofectamine	Invitrogen, Heidelberg
Nitrocellulose-Membran	Schleicher&Schüll, Deutschland
Nystatin	PAA, Deutschland
ortho-Vanadat	Merck, Deutschland
Penicillin	PAA, Deutschland
Phytohämagglutinin	Sigma, München
PMSF	Sigma, München
Poly-Hydroxyethylmethacrylat	Sigma, München
Poly-L-Lysine	Sigma, München
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma, München
Streptomycin	PAA, Deutschland
Viralex10x	PAA, Deutschland

# 12 Methoden

## 12.0.6 Zellbiologische Methoden

### Zellkultur von HaCaT-Zellen, SCC-25-Zellen und Primärfibroblasten

Alle Säugerzelllinien werden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert.

Besonders das Verhalten von HaCaT-Zellen ist abhängig von der Zellzahl, der Passage und der Dauer der Zellkultur. Deswegen wurden, wenn bei den Experimenten nicht gesondert erwähnt, immer die folgenden Bedingungen für HaCaT- und auch SCC-25-Zellen eingehalten. Nach dem Auftauen wurden die Zellen eine Woche in Wachstumsmedium kultiviert, zwei Tage vor Beginn eines Experiments wurden die Zellen in der jeweiligen Zellzahl ausgebracht und mit Keratinozyten-Wachstumsmedium inkubiert. Es wurden nur Zellen der Passage 20-35 verwendet.

HaCaT-Zellen wachsen adhärent als einzellige Schicht in RPMI-Medium. Bei 80-90%iger Konfluenz werden die Zellen mit PBS/EDTA gewaschen, mit Viralex/Trypsin (PAA, Cölbe, Deutschland) in PBS/EDTA 5-10min bei 37°C inkubiert. Die so abgelösten Zellen werden für 3min bei 900rpm zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wird in Medium resuspendiert, verdünnt und auf Zellkulturflaschen/-schalen ausgebracht und im Brutschrank kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgt alle 2-3 Tage. Zwei Tage vor dem jeweiligen Experiment werden die Keratinozyten nach dem Waschen mit PBS auf supplementiertes Defined-Keratinocyte-Medium (Invitrogen) gesetzt. In diesem Medium ist die Wachstumsrate von Keratinozyten gegenüber voll supplementiertem RPMI-Medium verlangsamt, unspezifische Serumeffekte werden aber vermindert und die Empfindlichkeit der Zellen gegen die Phospholipidanaloga wird erhöht.

SCC-25-Zellen wachsen adhärent, allerdings weisen sie keine Kontaktinhibition auf, so dass bei Erreichen der Konfluenz die Zellen rosettenartig wachsen. Auch SCC-25-Zellen werden bei Erreichen von 80-90%iger Konfluenz mit PBS/EDTA gewaschen. Das Ablösen, Kultivieren und Verdünnen erfolgt analog zu HaCaT-Zellen. Auch SCC-25-Zellen werden 2 Tage vor Beginn eines Experiments nach dem Waschen mit PBS auf supplementiertes Defined-Keratinocyte-Medium gesetzt.

Primärfibroblasten wachsen ebenfalls adhärent. Sie werden wie HaCaT-Zellen kultiviert.

Nährmedien und Puffer		
Wachstumsmedium für HaCaT-Zellen	450mL 50mL 50MU 50mg 220mg	RPMI-Medium fötale Kälberserum Penicillin Streptomycin L-Glutamin
Keratinocyten-Wachstumsmedium	500mL 1Vial 50MU 50mg	Defined Keratinocyte SFM supplement factor Penicillin Streptomycin
Wachstumsmedium für SCC-25-Zellen	350mL 150mL 50MU 50mg 200µg	Ham's F12:DMEM 1:1 fötale Kälberserum Penicillin Streptomycin Hydrocortison
Wachstumsmedium für Primärfibroblasten	400mL 100mL 50MU 50mg 220mg	RPMI-Medium fötale Kälberserum Penicillin Streptomycin L-Glutamin
PBS-Puffer	150mM 3mM 8mM 1mM	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit H <sub>2</sub> O (bidest.) auf 1L; pH 7,2; 300mosm mit NaCl einstellen
PBS-EDTA-Lösung	0,5g	EDTA mit H <sub>2</sub> O (bidest.) auf 1L

### **Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren von Zellen werden Zellpellets in einem kleinen Volumen 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) / 90% inaktiviertem fetalem Kälberserum resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein Einfrier-Röhrchen überführt, langsam heruntergefroren und anschließend bei -80°C gelagert. DMSO verhindert die Bildung von Wasserkristallen, die die Zellmembranen verletzen könnten. Für längere Lagerdauer werden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Beim Auftauen von Zellpellets muss schnell gearbeitet werden. Das gefrorene Zellpellet wird mit vorgewärmtem Medium bis zum vollständigen Auftauen umspült. Durch Zentrifugation (3min, 900rpm) wird das DMSO entfernt, die Zellen werden in Medium resuspendiert und in Kultur genommen.

## Gewinnung von PBMCs (peripher blood monocytic cells)

Für diese Versuche wurde von gesunden Probanden Vollblut entnommen. Das Blut wird zur Vermeidung der Koagulation in mit Heparin beschichteten Röhren gesammelt. Zur Entfernung der Erythrozyten werden je 10mL Vollblut mit 3mL Plasmasteril (6%HES; Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland) unter Vermeidung von Blasenbildung gemischt und 30-45min ruhig stehen gelassen. Der Überstand wird 10min bei 2000rpm zentrifugiert, die Leukozyten, die das Pellet ausmachen, werden in vorgewärmtem RPMI-Medium resuspendiert. Zu gleichen Teilen überschichtet man mit dieser Zellsuspension „Ficoll-Paque<sup>®</sup>“. Daran schließt sich eine Zentrifugation bei 13°C, 3000rpm (ohne Bremse) für 30min an. Die opaleszierende Zwischenschicht, in der sich die Leukozyten befinden, wird in 50mL RPMI-Medium aufgenommen. Zur vollständigen Entfernung des „Ficoll-Paque“ wird nochmals für 10min bei 2000rpm zentrifugiert. Danach werden die Leukozyten in voll supplementiertem RPMI-Medium in Kultur genommen.

## Zytotoxizitätsassays

Es werden zwei verschiedene Zytotoxizitätsassays angewendet. Als insensitivere Methode wird die Färbung der Zellen mit Trypanblau eingesetzt.  $2,5 \times 10^6$  HaCaT-Zellen wurden auf eine 10cm Ø Kulturschale ausgesät, nach 48h werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit den jeweiligen Testsubstanzen behandelt. Mit Trypsin/Viralex in PBS/EDTA werden die Zellen abgelöst und ein Aliquot (20µL Zellsuspension+80µL Trypanblau) wird mit Trypanblau gefärbt.

Trypanblau färbt nur tote Zellen, da diese keine intakte Plasmamembran mehr aufweisen. Mit Hilfe der Neubauerzählkammer wird nach 3min die Zellsuspension ausgezählt und der Anteil der toten Zellen bestimmt. Der Anteil toter Zellen ergibt sich aus:  $(\text{Mittelwert der blau-gefärbten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4) / (\text{Mittelwert aller gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4) \times 100\%$ . Als Kontrolle dienen Zellen, die nur mit dem Keratinozyten-Medium inkubiert werden.

Als sensitivere Methode wird der Lactat-Dehydrogenase-Assay durchgeführt. Dieser Test beruht auf der Detektion des cytosolischen Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand, das nur aus beschädigten Zellen freigesetzt werden kann. Lactat-Dehydrogenase vermittelt die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, gleichzeitig wird  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert. Eine zweite enzymatische Reaktion überträgt das Proton von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  auf ein Tetrazolsalz, das dadurch seine Farbe von blassgelb nach rot wechselt. Je toxischer eine Substanz wirkt, desto mehr Lactat-Dehydrogenase wird freigesetzt, desto intensiver ist der Farbumschlag.  $10^5$  Zellen werden in 1mL Wachstumsmedium für HaCaTs resuspendiert, 100µL der Zellsuspension werden in ein Well einer 96Well-Platte pipettiert. Nach 24h wird den Zellen 100µL Wachstumsmedium für Keratinozyten zugesetzt und die Zellen werden mit 100µL der jeweiligen Testsubstanz und -konzentration inkubiert. Als Negativ-Kontrolle dienen hier Zellen, die nur mit supplementiertem RPMI-Medium inkubiert werden. Zellen, die mit 2%iger Triton X-100 Lösung lysiert werden, dienen als Positiv-Kontrolle. Anschließend werden 100µL Zellkulturüberstand in eine neue 96Well-

Platte übertragen. Für die Auswertung von 100 Proben stellt man eine Mischung von 250 $\mu$ L Katalysator-Lösung + 11,25mL Färbelösung her. Mit je 100 $\mu$ L dieser Mischung werden die Zellkulturüberstände abgedunkelt für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgt am ELISA-Reader bei 490nm. Die Toxizität ergibt sich als Quotient aus: ( gemessener Wert - Negativ-Kontrolle) / (Postiv-Kontrolle - Negativ-Kontrolle) ) x 100%. Zur Auswertung werden aus vier Einzelmessungen der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Lösungen		
Trypanblau-Lösung	0,1% Trypanblau	in H <sub>2</sub> O (bidest.) filtrieren
Lösung für LDH-Test	Katalysator-Lyophilisat Färbelösung	aufnehmen in 1mL H <sub>2</sub> O (bidest.) gebrauchsfertig

### Proliferationsassays

Es werden Proliferationsassays durchgeführt, die auf dem Einbau von 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) (Roche, Mannheim, Deutschland) in die DNA beruhen. Je höher die Proliferationsrate der Zellen, desto mehr BrdU wird in die DNA eingebaut. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen ist die Reaktion des farbigen Substrats Tetramethylbenzidin direkt proportional zu der Menge des Peroxidase gekoppelten anti-BrdU Antikörpers. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wird die 96Well-Platte im ELISA-Reader photometrisch bei 405nm ausgewertet. Pro Test wurden 10<sup>4</sup>Zellen/96Well ausgesät und für den jeweiligen Zeitraum mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Als Kontrolle dienen Zellen, die nur mit Medium inkubiert werden.

Aufgrund der langsameren Proliferation von Leukozyten wird zur Bestimmung der Proliferation dieser Zellen der "AQueos One Solution Cell Proliferation Assay" (Promega, Madison, USA) angewandt. Bei diesem wird ein wasserlösliches, membrangängiges Formazansalz zu den Zellen gegeben. Durch Dehydrogenase-Aktivität lebender Zellen wird das Absorptionsmaximum des Formazans verschoben. Diese Farbvertiefung ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen. Für diesen Test werden 10<sup>5</sup>Zellen/96Well ausgesät und mit den Phospholipidanaloga inkubiert. Zellen, die nur mit Medium inkubiert werden, dienen als Negativ-Kontrolle. Nach 4h Inkubation bei 37°C wird die 96Well-Platte im ELISA-Reader photometrisch bei 492nm ausgewertet. Aus vier Einzelmessungen werden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Lösungen		
Cell proliferation ELISA Bestandteile des Kits	BrdU labeling reagent FixDenat  Anti-BrdU-POD  Antikörper-Verdünnungslösung Waschlösung Färbelösung	1000x, in PBS, steril Fixierungs- Denaturierungslösung Lyophilisat des mono- klonalen Antikörpers, Peroxidase gekoppelt gebrauchsfertig 10x PBS Tetramethylbenzidin, gebrauchsfertig
AQueos One Solution	1,9mg/mL	MTS-Salz in Dulbeccos PBS, gebrauchsfertig

### Adhäsionsassays

Ob die Zell-Matrix-Adhäsion auf spezifischen Komponenten der extrazellulären Matrix beeinflusst wird, wird in diesem Assay untersucht. Das Ausmaß der unspezifischen integrinunabhängigen Adhäsion wird durch Adhäsion auf Poly-L-Lysin bestimmt. 75µL/Well werden zur Beschichtung (96Well-Platte) bei 4°C über Nacht eingesetzt. Nach dem Waschen mit PBS werden unspezifische Bindungsstellen mit Blockierungslösung für 4h bei 4°C blockiert. Vor dem Aussäen der Zellsuspension wird die 96Well-Platte mit PBS gewaschen. Die Zellen werden in einer Dichte von 5x10<sup>4</sup> Zellen/96Well ausgesät, 15min bei 4°C und anschließend für 2h bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen werden die Zellen für 20min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend für 30min bei Raumtemperatur mit Kristallviolett gefärbt. Überschüssige Kristallviolett-Färbung wird vollständig ausgewaschen und die adhärenen Zellen mit Permeabilisierungslösung für 5-6h permeabilisiert. Die Intensität des freigesetzten Kristallvioletts wird photometrisch am ELISA-Reader bei 570nm bestimmt und ist der Anzahl adhärenen Zellen direkt proportional. Zur Auswertung werden jeweils aus vier Einzelmessungen der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Lösungen		
Poly-L-Lysin	20µg/mL	in H <sub>2</sub> O
Collagen IV, Fibronectin, Laminin-1	20µg/mL	in PBS
Blockierungslösung	1% BSA	in PBS
Fixierungslösung	1% Glutardialdehyd	in H <sub>2</sub> O
Kristallviolettlösung	0,1% Kristallviolett	in H <sub>2</sub> O filtriert
Permeabilisierungslösung	0,5% Triton X-100	in H <sub>2</sub> O

## **Bestimmung der Motilität von Zellen mittels Transwell-Assays und Wundheilungs-Assays**

Für die Wundheilung und die Invasivität ist die Motilität von Zellen von essenzieller Bedeutung.

Mit Hilfe von modifizierten Boyden-Kammer-Assays wird der Einfluss auf die haptotaktische Migration entlang eines Matrixgradienten untersucht. Die Porengröße der Filter beträgt  $8,5\mu\text{m}$ . Die Unterseite des Transwell-Filters (Corning, München, Deutschland) wird mit  $50\mu\text{L}$  Collagen IV oder Laminin-1 für 30min bei Raumtemperatur beschichtet. Unspezifische Bindungsstellen werden durch 30minütige Inkubation mit einer Blockierungslösung blockiert. Danach wird die Filteraußenseite vorsichtig mit PBS gespült. In die Außenkammer des Filtereinsatzes werden  $500\mu\text{L}$  Wachstumsmedium für Keratinozyten vorgelegt, der beschichtete Filter wird eingesetzt und die Zellsuspension ( $5,5 \times 10^4$  Zellen) wird in die Filterinnenkammer pipettiert. Um hydrostatische Beeinflussungen zu vermeiden, wird das Volumen der Filter-Innen-Kammer dem Stand des Volumens der Außenkammer angepasst. Die Versuchsreihen werden bei  $37^\circ\text{C}$  für 6h inkubiert. Für die Auswertung wird die Filterinnenseite gründlich gereinigt, die Zellen werden für je 10min bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert. Nach dem Waschen in PBS werden die Zellen mit Kristallviolett für 25min bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wird mikroskopisch die Zellzahl der migrierten Zellen auf der Filteraußenseite ausgezählt. Zur Kontrolle wird bei einem Filter die Innen- und Außenseite gereinigt. Der Mittelwert der bestimmten Zellzahl in diesem Ansatz wird von den anderen Ergebnissen substrahiert. Zur Auswertung werden die Zellen von vier unterschiedlichen Bereichen des Filters am Mikroskop ausgezählt und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Mit einem Wundheilungs-Assay untersucht man die Fähigkeit von Zellen, eine künstliche Wunde, die man durch das Zufügen eines schmalen Ritzes in den Zell-Monolayer mit einer Pipettenspitze erzeugt hat, zu verschließen.  $2 \times 10^5$  transient transfizierte HaCaT-Zellen werden auf eine Collagen IV beschichtete 8Well-Kammer in RPMI-Medium ausgesät und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS fügt man dem Monolayer eine Wunde zu. Danach wird nochmals gründlich mit PBS gewaschen und dann die Inkubation der Zellen in Keratinozyten-Wachstumsmedium (mit oder ohne Phospholipidanaloga) für die indizierten Zeiträume fortgesetzt. Nach Beendigung der Inkubation werden die Zellen so weiter behandelt, wie es bei der indirekten Immunfluoreszenz beschrieben ist. Die Breite der Wunde wird mit Hilfe der AxioVision Software (Zeiss, Göttingen, Deutschland) bestimmt und in  $\mu\text{m}$  angegeben.



Lösungen		
Collagen IV, Laminin-1	20µg/mL	in PBS
Blockierungslösung	1% BSA	in PBS
Fixierungslösung	3,7% Paraformaldehyd	
	0,025% Saponin	in H <sub>2</sub> O
Kristallviolettlösung	0,1% Kristallviolett	in H <sub>2</sub> O filtriert
Permeabilisierungslösung für Transwell-Assays	0,5% Triton X-100	in H <sub>2</sub> O
Permeabilisierungslösung für Wundheilungs-Assays	1% Glutardialdehyd	in H <sub>2</sub> O

### Differenzierungsassay

In gesunder menschlicher Haut besteht ein genau reguliertes Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten. Das ermöglicht der Haut eine effektive und effiziente Antwort sowohl auf äußere Reize, wie Verwundung oder UV-Strahlen, als auch auf innere Reize, wie Körpertemperatur oder Schwitzen.

Erkrankungen wie Psoriasis (Schuppenflechte) oder atopische Dermatitis sind unter anderem durch eine gestörte Proliferations/Differenzierungs-Balance gekennzeichnet.

In diesen Versuchen soll untersucht werden, ob die verwendeten Phospholipide dieses Gleichgewicht beeinflussen. Dafür werden  $2,5 \times 10^6$  HaCaT-Zellen in Wachstumsmedium für HaCaTs auf einer 10cm Ø Kulturschale ausgesät. Am Tag nach dem Aussäen und nach zwei Tagen Inkubation im Brutschrank werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Wachstumsmedium für Keratinozyten inkubiert. Als Positiv-Kontrolle dienen in Suspension gehaltene HaCaT-Zellen. Dazu werden 10cm Ø Kulturschalen mit 4mL einer Poly-Hydroxyethylmethacrylat-Lösung (Poly-HEMA) beschichtet. Auf dieser unphysiologischen Matrix können HaCaT-Zellen nicht mehr adhären, als Folge wird die Proliferationsrate herunter- und die Differenzierungsrate hochreguliert. Das Lösungsmittel dieser Substanz wird in der Zellkulturbank abgedampft, die Beschichtung wird noch einmal wiederholt und die Platten werden über Nacht in der Zellkulturbank getrocknet. Vor dem Auftragen der HaCaT-Zellsuspension werden die so behandelten Schalen mit PBS gewaschen.

Die Zellen werden mit den Phospholipiden für unterschiedliche Zeiträume bei 37°C inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen. Mit Hilfe eines Zellschabers werden die Zellen in  $2 \times 200 \mu\text{L}$  PBS vom Boden der Kulturschalen abgelöst, in Eppendorf-Gefäße überführt und 3min bei 900rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Pellets werden bis zur Aufarbeitung mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse bei -20°C eingefroren.

Lösungen		
Poly-HEMA-Lösung	12mg/mL	in 95% Ethanol

## Transglutaminase-Aktivitätsbestimmung

Transglutaminasen sind wichtige Enzyme der Differenzierung von Keratinozyten, weil sie die Bildung der Isopeptid-Querverbindungen zwischen glutamin- und lysinhaltigen Proteinen katalysieren.

Primärkeratinozyten werden zu  $2 \times 10^5$  Zellen/6Well ausgesät und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wird mit den indizierten Phospholipidanaloga in einem Gesamtvolumen von 3mL für 96h im Brutschrank inkubiert. Als Positiv-Kontrolle dienen Zellen, die mit  $10\mu\text{M}$  Sphingosin-1-phosphat inkubiert wurden (Manggau et al., 2001). Nach Beendigung der Inkubation wird mit PBS gewaschen und die Zellen werden mit  $2 \times 200\mu\text{L}$  Tris-HCl-Puffer abgeschabt. Der Zellaufschluss erfolgt durch 7 Einfrier- und Auftauzyklen in flüssigem  $\text{N}_2$  und  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasser. Anschließend wird bei  $4^\circ\text{C}$  für 20min bei 12.000rpm zentrifugiert und  $100\mu\text{L}$  des Überstandes werden für die Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität verwendet. Der Überstand wird mit  $600\mu\text{L}$  Inkubationspuffer für 1h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Durch Zugabe von  $600\mu\text{L}$  10%iger, eiskalter Trichloressigsäure wird die Reaktion beendet. Das gesamte Volumen wird auf einen Glaswoll-Filter (Whatman, Cambridge, GB) übertragen und anschließend 3x mit 5%iger eiskalter Waschlösung und 1x mit 95% EtOH gewaschen. Der Filter wird in  $2\text{mL}$  Szintillationsflüssigkeit gründlich gevortext. Der Liquid-Scintillation-Counter (Perkin-Elmer, Rodgau) ermittelt die radioaktive Strahlung, die als spezifische Aktivität in  $\text{cpm}/\text{mg}$  Protein angegeben wird (modifiziert nach Egberts et al., 2004).

Lösungen		
Tris-HCl-Puffer	20mM Tris 2mM EDTA	in $\text{H}_2\text{O}$ , pH 8
Inkubations-Puffer	50mM Tris 10mM $\text{CaCl}_2$ 5mM DTT 540 $\mu\text{g}$ Dimethylcascin 1mM Putrescin	
Waschlösung	2,5 $\mu\text{Ci}/600\mu\text{L}$ [ $^3\text{H}$ ]-Putrescin 5% Trichloressigsäure 10mM Putrescin	in $\text{H}_2\text{O}$ in $\text{H}_2\text{O}$

## Transiente Transfektion von HaCaT-Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Nucleofection mit dem System von amaxa biosystems (amaxa GmbH, Köln) werden HaCaT-Zellen bis zum Erreichen einer  $\geq 90\%$  Konfluenz in supplementiertem RPMI-Medium kultiviert. Die Zellen werden mit PBS/EDTA gewaschen und mit Trypsin/Viralex bis zum Ablösen der Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.  $3 \times 10^6$  HaCaT-Zellen werden in einem Eppendorf-Gefäß zentrifugiert (3min, 900rpm), mit  $5\mu\text{g}$  der entsprechenden Plasmid-DNA,  $100\mu\text{L}$  Nucleofector<sup>TM</sup>-Lösung gemischt und in eine Amaxa-Küvette übertragen. Die Transfektion erfolgt mit dem Programm U-20. Nach der Transfektion werden  $500\mu\text{L}$  RPMI-Medium in die Küvette gegeben und die Zellsuspension wird auf eine 6Well-Platte

übertragen, die zuvor mit 5mL RPMI-Medium im Brutschrank für 30min vorinkubiert wurde. Die Zellen werden im Brutschrank inkubiert, nach Adhäsion und Spreiten der Zellen wird mit PBS gewaschen und das RPMI-Medium erneuert und die Inkubation über Nacht fortgesetzt. Danach wird mit PBS gewaschen und die Inkubation für den indizierten Zeitraum in Keratinozyten-Wachstumsmedium unter Zellkulturbedingungen fortgesetzt. Die Effizienz der Transfektion wird mittels Tricin-SDS-Gelelektrophorese und anschließender Western-Blot oder indirekter Immunfluoreszenz-Analyse überprüft.

### **Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse**

Mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse können Proteine durch gegen sie gerichtete Antikörper detektiert werden. Die Primärantikörper werden anschließend in einem weiteren Schritt durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte anti-Primärantikörper detektiert. Dazu werden 8-Kammer-Objektträger mit  $200\mu\text{L}$  einer Matrixproteinlösung über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  beschichtet. Nach dem Waschen mit PBS werden unspezifische Bindungsstellen der Matrix mit Blockierungslösung für 4h bei  $4^\circ\text{C}$  blockiert, mit PBS gewaschen und die Zellsuspension in einer Dichte von  $5,5 \times 10^4$  Zellen/Well ausgesät. Das Endvolumen soll in jeder Kammer  $200\mu\text{L}$  betragen. Der Objektträger wird 15min im Kühlschrank und anschließend 90min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Bei Bedarf kann die Inkubationsphase im Brutschrank verlängert werden, bis die Zellen wieder gespreitet sind (nach Transfektionen kann diese Zeitspanne bis zu 4h betragen). Jetzt wird vorsichtig mit PBS gewaschen, die Zellen werden für 15min bei Raumtemperatur fixiert oder fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen werden mit einer Blockierungslösung für 30min bei Raumtemperatur blockiert. Nach nochmaligem Waschen mit PBS wird der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung zugegeben und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wird der entsprechend verdünnte Sekundärantikörper dazugegeben und abgedunkelt für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem abschließenden Waschschrift mit PBS wird der Objektträger abgedunkelt getrocknet und im Anschluss mit einem geringen Volumen Elvanol mit einem Deckglas unter Ausschluss von Luftblasen eingedeckelt. Die Ergebnisse wurden am Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland) als .zvi- oder .tif-Dateien gespeichert.

Lösungen		
Collagen IV, Laminin-1	20µg/mL	in PBS
Blockierungslösung	1% BSA	in H <sub>2</sub> O, filtriert
Fixierungslösung	3,7% Paraformaldehyd	in PBS
Permeabilisierungslösung	3,7% Paraformaldehyd	
	0,025% Saponin	in PBS
Elvanol-Lösung	3g Polyviol	in 40mL PBS über 16h lösen
	15mL Glycerin	zugeben und weitere 16h lösen
		15min bei 12000rpm zentrifugieren
	1mL Phenylendiamin	den Überstand dekantieren und
		pro mL Gesamtvolumen zusetzen
	250µL Mercaptoethanol	lichtgeschützt lösen lassen, pH 8
		zugeben, lichtgeschützt lösen lassen
		aliquotieren und bei -20°C lagern

### Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence-activated cell-scanning)

Sorgfältig vereinzelte Zellen passieren eine Messkammer, die von einem Laserstrahl angestrahlt wird. Aus der Beugung des Laserstrahls an der Zelle lassen sich Rückschlüsse auf Größe und Granularität der Zellen ziehen. Ist an die Zelle zusätzlich ein spezifischer, fluoreszenzgekoppelter Antikörper gebunden, lassen sich Aussagen über Zellart und -zustand treffen.

Für die Messungen wird das FACS-Gerät von BD Bioscience Immunocytometry Systems eingesetzt, das über einen Argon-Laser und drei Emissionskanäle verfügt. Wenn die Emissionen der einzelnen Fluorophore sich nicht überlagern, können in einer Probe drei verschiedene farbstoffgekoppelte Proteine simultan gemessen werden.

**FACS-vermittelter Nachweis von oberflächenständigen Integrinen:** HaCaT- oder SCC-25-Zellen, die mit den Phospholipiden inkubiert wurden, werden mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und 3x mit 3mL PBS gewaschen. Das Zellpellet wird in 500µL FACS-Puffer (BD, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert, unspezifische Bindungsstellen werden mit Blockierungslösung für 30min auf Eis blockiert. Die Blockierungslösung wird mit 3mL PBS ausgewaschen. Das Zellpellet wird in 500µL FACS-Puffer resuspendiert und mit dem entsprechend verdünnten Primärantikörper für 45min auf Eis inkubiert. Nach dem zweimaligen Waschen mit 3mL PBS wird jetzt der Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung zugesetzt und für weitere 45min abgedunkelt, auf Eis inkubiert. Als Negativ-Kontrolle dienen Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Alle Zentrifugationsschritte erfolgen für 3min bei 900rpm.

**Untersuchung des Einflusses auf den Zellzyklus:** HaCaT- und SCC-25-Zell-DNA wird mit Propidiumiodid gefärbt. Hierfür wird das Zellkultur-Medium in ein FACS-Röhrchen überführt und 10min bei 3500rpm zentrifugiert, während die Zellen mit Trypsin-Lösung abgelöst und für 6min mit 1200rpm zentrifugiert werden. Die Pellets werden vereint, in 1mL 70% Ethanol resuspendiert und über Nacht bei -20°C fixiert und permeabilisiert.

Der Ethanol wird mit 3mL PBS ausgewaschen (6min, 1200rpm) und das Pellet in 500µL PI-Mix bei 4°C über Nacht inkubiert.

**Bestimmung apoptotischer Leukozyten mittels FACS-Analyse:** die Zellen werden mit Annexin V-FITC/Propidiumiodid gefärbt. Dazu werden die Zellen 3min bei 1200rpm abzentrifugiert, mit 4mL eiskaltem Bindungspuffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in 195µL eiskaltem Bindungspuffer resuspendiert, dazu werden 5µL Annexin V-FITC gegeben und für 20min auf Eis abgedunkelt inkubiert. Kurz vor der Messung am FACS-Gerät wird das Propidiumiodid zur Zellsuspension gegeben bis eine Endkonzentration von 0,2µg/mL erreicht wird.

**Untersuchungen der Leukozyten:** hierfür werden die Zellen zu 10<sup>6</sup>Zellen/24Well in supplementiertem RPMI-Medium 24h oder 48h bei 37°C inkubiert. Je 100µL werden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit eiskaltem PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen werden mit eiskalter Blockierungslösung blockiert und die jeweiligen, fluoreszenzmarkierten Primäantikörper dazugegeben und 45min auf Eis inkubiert. Danach wird mit 3mL eiskaltem PBS gewaschen und die Proben bis zur Analyse auf Eis und abgedunkelt gelagert. Um tote Zellen aus den Messungen ausschließen zu können, werden 100µL der jeweiligen (wie oben beschrieben vorbehandelten) Probe direkt vor der Messung mit 5µL Propidiumiodid gefärbt und analysiert. Hierbei erfolgt die Zentrifugation für 3min bei 1200rpm.

Lösungen und Puffer		
Blockierungslösung	1% BSA	in H <sub>2</sub> O, filtriert
PI-Mix	10µg Propidiumiodid	in PBS, abgedunkelt
	10µg DNase freie RNase	
	2mM EDTA	
Bindungspuffer	10mM Hepes	in H <sub>2</sub> O (bidest.), pH 7,4
	150mM NaCl	
	5mM KCl	
	1mM MgCl <sub>2</sub>	
	1mM CaCl <sub>2</sub>	

## 12.0.7 Proteinbiochemische Methoden

### Solubilisation

Um intrazelluläre Proteine zu untersuchen oder zu quantifizieren, müssen die Zellen aufgeschlossen, solubilisiert, werden. Dafür werden die Zellen mit Trypsin-Lösung von den Kulturschalen abgelöst und für 3min bei 900rpm pelletiert. Das Pellet wird in Triton X-100 Solubilisierungspuffer, der zusätzlich 1:500 Proteinase-Inhibitor-Cocktail, 1mM PMSF und 1:100 ortho-Vanadat enthalten kann, aufgenommen. Mit einer Kanüle werden die Zellen gründlich vereinzelt und für 2h auf Eis solubilisiert. Danach wird bei 4°C 5min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand enthält das Solubilisat, während sich im Pellet Zellkerne und Zytoskelettbestandteile befinden.

Puffer		
Triton X-100 Solubilisierungspuffer	1% Triton X-100 150mM NaCl 1mM MgCl <sub>2</sub> 1mM CaCl <sub>2</sub> 50mM Hepes	in H <sub>2</sub> O (bidest.), pH 7,5

### Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wird mit der BCA-Methode ermittelt. Es wurden die BCA-Test-Kits der Firma Pierce (Rockford, USA) verwendet. Die Methode basiert auf der Reduktion von Cu<sup>2+</sup>-Ionen zu Cu<sup>+</sup>-Ionen durch Proteine im alkalischen Milieu und anschließender Chelatisierung der Cu<sup>+</sup>-Ionen durch Bicinchonin-4-carbonsäure (BCA). Der so gebildete Chelat-Komplex weist eine violette Färbung auf. Diese wird photometrisch am ELISA-Reader bei 570nm bestimmt. Die Quantifizierung erfolgt mittels einer Standardreihe mit bekannter, aufsteigender BSA-Konzentration. Von den zu quantifizierenden Proteinen werden 2µL/Well pipettiert und ebenfalls zu 20µL mit Triton X-100 Solubilisationspuffer ergänzt. Für eine gründliche Durchmischung der Proben wird die 96Well-Platte sanft gevortext. Anschließend werden 200µL einer 1:50 Mischung aus den Test-Kit Substanzen A und B dazu gegeben und die 96Well-Platte wird 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgt am ELISA-Reader bei 570nm.

Bestandteile des BCA-Kits		
A	BCA-Lösung	gebrauchsfertig
B	4% CuSO <sub>4</sub> -Lösung	gebrauchsfertig

### SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur eindimensionalen elektrophoretischen Proteinauftrennung wurde von der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) das Mini-Protean-System II verwendet. Die Lösungen für Trenn- und Sammelgel werden nacheinander gemischt und auch nacheinander zwischen die vorbereiteten Gelplatten gegossen (diskontinuierliches System) (Tabelle 12.1). Die Arbeiten wurden unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Dafür werden die Solubilisate mit reduzierendem, 5x konzentriertem Probenpuffer im Verhältnis 5:1 gemischt und 5min bei 95°C aufgeköcht. Beim Einlaufen in das Sammelgel wird mit einer konstanten Spannung von 120V gearbeitet. Diese wird beim Erreichen des Trenngels auf 170V-200V erhöht.

Ein beispielhaftes Pipettierschema für zwei 7,5%ige SDS-Trenn- mit je 4%igen SDS-Sammelgelen ist in Tab. 12.2 gegeben.

### Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Um Proteine zwischen 1-100kDa besser aufzutrennen, verwendet man Tricin-SDS-PAGE. Das Glycerol im Trenngelpuffer erlaubt das gleichzeitige Befüllen von Trenn- und Sammel-

Tabelle 12.1: Lösungen für SDS-Sammel- und SDS-Trenngele

Lösungen		
A	30%	Acrylamid
	0,8%	N,N Methylenebisacrylamid
B	0,2%	SDS
	1,5M	Tris-HCl, pH 8,8
C	0,2%	SDS
	0,5M	Tris-HCl, pH 6,8
10x Laufpuffer	0,25M	Tris, pH 8,8
	1,92M	Glycin
	1%	SDS
5x Probenpuffer	12,5%	SDS
	0,3M	Tris-HCl, pH 6,8
	50%	Glycerol
Probenpuffer (red.)	0,015%	Bromphenolblau
	+50mM	Dithiothreitol

Tabelle 12.2: 7,5%iges SDS-Trenn- und 4%iges SDS-Sammelgel

Trenngel	
2,25mL	Lösung A
2,5mL	Lösung B
4,5mL	Aqua bidest.
45 $\mu$ L	APS (10%)
3 $\mu$ L	TEMED
Sammelgel	
0,4mL	Lösung A
0,75mL	Lösung C
1,85mL	Aqua bidest.
12 $\mu$ L	APS (10%)
3 $\mu$ L	TEMED

Tabelle 12.3: Tricin-SDS-Gele

Lösungen		
Anoden-Puffer	0,2M	Tris-HCl, pH 8,9
Kathoden-Puffer	0,1M	Tricin
	0,1%	SDS
	0,1M	Tris-HCl, pH 8,3
Gel-Puffer	0,3%	SDS
	3M	Tris-HCl, pH 8,45

Tabelle 12.4: 7,5%iges Tricin-SDS-Sammel- und 4%iges Tricin-SDS-Trenngel

Trenngel	
1,5mL	Lösung A
1,5mL	Gel-Puffer
0,45mL	Glycerol
1,05mL	Aqua bidest.
25µL	APS (10%)
2,5µL	TEMED
Sammelgel	
0,2mL	Lösung A
0,37mL	Gel-Puffer
0,93mL	Aqua bidest.
12,5µL	APS (10%)
1,3µL	TEMED

gel (Tabelle 12.3). Im Bereich des Sammelgels wird mit konstanter Spannung von 80V, im Trenngel mit Spannung zwischen 100V-120V gearbeitet.

Ein beispielhaftes Pipettierschema für ein 7,5%iges Tricin-SDS-Trenngel mit 4%igem Tricin-SDS-Sammelgel ist in Tab. 12.4 gegeben.

### Western-Blot-Analyse

Mit den Blotapparaturen der Firma Bio-Rad wird nach dem Tank-Blot-Verfahren gearbeitet. Im Sandwich-Blot wird das Gel direkt nach der elektrophoretischen Proteinauftrennung blasenfrei auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt, die zur Anode zeigt, und der Transfer wird in Blotpuffer bei 4°C für mindestens 1h bei konstanter Stromstärke von 0,25mA durchgeführt. Der Transfer wird durch Färbung der Proteinbanden mit Ponceau S überprüft. Dazu wird die Nitrocellulose-Membran ca. 1min in der Ponceau-Lösung gefärbt und anschließend mit 0,1-1%iger Essigsäure-Lösung bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden entfärbt. Vor dem Weiterbearbeiten des Blots muss dieser in PBS oder PBS/Tween vollständig entfärbt werden. Wegen der erhöhten Empfindlichkeit von phosphoX-Blotmem-



Tabelle 12.5: Lösungen für den Western-Blot

Transfer-Puffer	
150mM	Glycin
20mM	Tris-HCl, pH 8,3
10%	Methanol
Ponceau-Färbelösung	
2%	Ponceau-Rot
30%	Trichloressigsäure
30%	Sulfosalicylsäure
Ponceau-Entfärbelösung	
0,1-1%	Essigsäure
PBS-Waschpuffer	
140mM	NaCl, pH 7,8
8,1mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,5mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-Tween-Waschpuffer	
+0,1%	Tween 20
TBS-Waschpuffer	
140mM	NaCl
10mM	Tris-HCl, pH 7,6
TBS-Tween-Waschpuffer	
+0,1%	Tween 20

branen werden diese nicht mit Ponceau-Lösung gefärbt und man nimmt für alle Waschschriffe TBS bzw. TBS/Tween (Tabelle 12.5).

### Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf Blotmembranen

Für den Nachweis spezifischer Proteine auf den Blotmembranen werden diese im allgemeinen für 1h bei Raumtemperatur in 10% Magermilch/PBS/Tween blockiert. Eine Ausnahme stellen bspw. empfindliche phosphoX-Blotmembranen dar, diese werden für 1h bei Raumtemperatur in 2% BSA/TBS/Tween blockiert. Auch alle weiteren Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen in TBS oder TBS/Tween.

Im Anschluss wird die Membran 3x 10min in PBS oder PBS/Tween gewaschen und die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt bei 4°C über Nacht. Vor der 2stündigen (Raumtemperatur) Inkubation mit dem Sekundärantikörper wird die Membran noch mal 3x 5min mit PBS oder PBS/Tween gewaschen. Durch die Entwicklung des Blots mit Luminol werden die gesuchten Proteinbanden sichtbar gemacht. Die Blotmembran wird vorsichtig mit einem Whatman-Papier abgetrocknet und dann mit einer Mischung

Tabelle 12.6: Proteine auf Blotmembranen

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

aus 10 $\mu$ L Lösung A, 1mL Lösung B und 3 $\mu$ L Lösung C kurzzeitig inkubiert. Mit dem digitalen Imaging-System (Fujifilm) werden die Signale erfasst (Tabelle 12.6). Für schwache Signale wird ein Röntgenfilm für einen geeigneten Zeitraum exponiert. Die Signale werden anschließend durch Entwicklung (Kodak GBX Entwicklerkonzentrat, 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnen) - und Fixierung (Kodak GBX Fixierkonzentrat, 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnen) (Kodak, Rochester, USA) sichtbar gemacht.

## 12.0.8 Pharmakologische Methoden

### Penetrationsstudien an humaner Haut

Die bei -20°C gelagerten Hautschnitte werden auf der Oberfläche mit PBS gereinigt, die dermale Seite wird von groben Resten subdermalen Fettgewebes befreit. Mit einem Stanzring von  $\varnothing$  2cm wird eine „punch“-Biopsie ausgestanzt. Diese wird so auf der Franz-Zelle positioniert, dass die dermale Seite in Kontakt mit dem Akzeptor-Medium, PBS, steht. Durch das Ansatzstück und die Fixierklemme wird die Biopsie über den Versuchszeitraum in dieser Position gehalten. Auf die epidermale Seite werden 100 $\mu$ L der zu testenden Emulsion gegeben, wobei der Hautschnitt nicht abgedeckt wird. Die Temperatur des Akzeptor-Mediums wird durch Umspülen mit 37°C warmen Wasser konstant gehalten.

### Generierung von Gefrierschnitten von humaner Haut

Nach dem Penetrationsversuch wird die epidermale Hautseite vorsichtig mit PBS abgetupft und mittig wird mit einem Stanzwerkzeug von  $\varnothing$  1cm erneut eine Biopsie ausgestanzt. Diese wird mit Gewebekleber auf dem Schnittteller des Gefriermikrotoms bei -20°C eingefroren. Damit die Haut möglichst plan einfriert, wird die Oberfläche mit einem Objektträger beschwert. Das Messer des Mikrotoms wird parallel zum Hautschnitt eingestellt und Schnitte von 10 $\mu$ m Dicke werden abgeschnitten.

Für die Auswertung mit MALDI-TOF-MS werden entweder 10x10 $\mu$ m Schnitte in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt oder ein Teil des Schnitts wird direkt auf das MALDI-Target aufgetragen. Für Längsschnitte wird das gefrorene Hautstück in der Mitte mit einem Skalpell geteilt und mit Gewebekleber auf der Schnittseite erneut auf dem Schnittteller des Mikrotoms fixiert.

Um die Schnitte auf den Objektträger zu übertragen, wird dieser auf Handwärme erwärmt und mit der Oberseite auf den Hautschnitt gelegt. Durch die Wärme bleibt

der Hautschnitt auf dem Objektträger, zusätzlich sorgt der wärmere Objektträger dafür, dass sich der Schnitt nicht verformt. Anschließend wird der Schnitt vorsichtig mit Fixierungslösung für 20min bei Raumtemperatur fixiert. Unspezifische Bindungsstellen werden mit Blockierungslösung für 20min bei Raumtemperatur blockiert. Die Färbung mit dem Primärantikörper erfolgt bei 4°C über Nacht. Nach dem Waschen mit PBS wird mit dem Sekundärantikörper für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abschluss wird der Schnitt mit PBS gewaschen, getrocknet und mit Elvanol eingedeckelt. Die Ergebnisse wurden am Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop als .zvi- oder .tif- Dateien gespeichert.

Lösungen		
Fixierungslösung	3,7% Paraformaldehyd 0,025% Saponin	in PBS, filtriert
Blockierungslösung	1% BSA	in H <sub>2</sub> O, filtriert

### Phospholipid-Analytik mittels MALDI-TOF-MS

Die MALDI-TOF Experimente wurden von M. Zimmermann-Kordmann und D. Grunow durchgeführt.

Die „matrix assisted laser desorption/ionisation - time of flight“-Massenspektrometrie hat sich in den letzten Jahren zu einer weitverbreiteten Methode zur Analyse von Proteinen, Nukleinsäuresequenzen, Strukturen, Reinheitsgraden, posttranslationalen Proteinmodifikationen oder Kohlenhydraten entwickelt.

Diese Methode wurde angewendet, um zu untersuchen, ob Inositol-C2-PAF in die Membran von HaCaT-Zellen inkorporiert wird und ob die phospholipidhaltigen Nanoemulsionen durch humane Vollhaut penetrieren. Als Matrix dient 0,5M 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB). Diese Matrix ist in der Lage, die Phospholipid-Proben zu protonieren. In einem Hochspannungsfeld können diese Proben durch Laser-Bestrahlung aus der Matrix herausgelöst werden. Entsprechend ihrer elektrischen Ladung und ihrer Masse werden die Substanzen unterschiedlich abgelenkt.

Für die Analytik der Phospholipide aus den Penetrationsstudien wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Als Erstes wurden 10x10µm starke Hautschnitte in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt, daraus wurden die Lipide mit Methanol extrahiert. 0,5µL des Extrakts wurden mit 0,5µL der Matrix bedeckt und trocken gelassen. Als Zweites wurden die 10µm starken Hautschnitte unterschiedlicher Tiefe direkt auf das MALDI-Target aufgebracht und mit 0,5µL-2µL der Matrix bedeckt und getrocknet.

## 12.0.9 Pharmazeutisch-technologische Methoden

### Herstellung von phospholipidhaltigen Nanoemulsionen

Emulsionen sind zwei- oder mehrphasige Systeme nicht miteinander mischbarer Flüssigkeiten. Der Spezialfall der Nanoemulsionen ist durch die Partikelgröße im Bereich von  $50nm-1000nm$  gekennzeichnet. HePC- und Inositol-C2-PAF-haltige Nanoemulsionen wurden mittels Hochdruckhomogenisation hergestellt. Um eine gute Verarbeitung zu gewährleisten, wird eine Öl-in-Wasser Voremulsion hergestellt. Dazu verwendet man einen Rotor-Stator-Rührer, den Ultra-Turrax IKA T25 (Janke&Kunkel, Staufen, Deutschland) mit 800rpm/min für 30sek. Die anschließende Hochdruckhomogenisation in einem Kolben-Spalt-Homogenisator LAB 40 (APV Gaulin, Lübeck, Deutschland) wird standardisiert bei einem Druck von 500bar und Raumtemperatur durchgeführt. Der Herstellungsvorgang wird dreimal wiederholt, um eine enge Partikelgrößenverteilung und eine gleichmäßige Durchmischung zu gewährleisten (Tabelle 12.7).

Tabelle 12.7: Nanoemulsionen

Zusammensetzung	
0,05g	Inositol-C2-PAF/ HePC
1,0g	Miglyol 812
0,5g	Poloxamer F188
ad 20g	Aqua bidest.

# 13 Statistische Auswertung

Um die gemessenen Werte auszuwerten und zu beurteilen, bedient man sich statistischer Testverfahren. Diese Testverfahren werden verwendet, um bestimmte Annahmen über die Grundgesamtheit zu überprüfen.

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem SHAPIRO-WILK-Test, der für Stichproben mit  $n$  Einzelwerten zwischen  $2 \leq n \leq 50$  geeignet ist. Eventuelle Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach DIXON, siehe Abbildung 13.1, ermittelt. Der Zweistichprobent-Test (Student t-Test) wurde durchgeführt, um zu ermitteln, ob zwei Meßwertreihen, die verschiedene Mittelwerte haben, zwei Grundgesamtheiten mit verschiedenen Mittelwerten zugrunde liegen. Sofern nicht gesondert angegeben, wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  von 5% zugrunde gelegt.

Die Standardabweichung  $s$  berechnet sich wie folgt:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

SHAPIRO-WILK-Test:

$$W = \frac{b^2}{Q}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad b = \sum_{i=1}^k a_i (x_{n-i+1} - x_i)$$

Student-t-Test:

$$t = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \cdot \sqrt{\frac{n}{s_1^2 + s_2^2}}$$

Als verteilungsunabhängiges Testverfahren wurde der Mann-Whitney-Test (U-Test) durchgeführt.

$$U_1 = n \cdot m + \frac{n(n+1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n \cdot m + \frac{n(n+1)}{2} - R_2$$

Die Schwellenwerte und Signifikanzgrenzen wurden Tabellen aus Biometrika (Vol. 51 und 52, 1965), "Annals of the Institute of Statistical Mathematics" (Vol. 22, 1951) und "Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research" (1963) entnommen.

Prüfgrößen und Schwellenwerte zum Ausreißerkriterium von Dixon <sup>1)</sup>

n	Prüfgröße	Schwellenwert für 1- $\alpha$	
		95%	99%
3	$\frac{x_{(n)} - x_{(n-1)}}{x_{(n)} - x_{(1)}}$	0,941	0,988
4	$\frac{x_{(n)} - x_{(n-1)}}{x_{(n)} - x_{(1)}}$	,765	,889
5	oder	,642	,780
6	$\frac{x_{(2)} - x_{(1)}}{x_{(n)} - x_{(1)}}$	,580	,698
7	$\frac{x_{(n)} - x_{(n-1)}}{x_{(n)} - x_{(1)}}$	,507	,637
8	$\frac{x_{(n)} - x_{(n-1)}}{x_{(n)} - x_{(2)}}$	,554	,683
9	oder	,512	,635
10	$\frac{x_{(2)} - x_{(1)}}{x_{(n-1)} - x_{(1)}}$	,477	,597
11	$\frac{x_{(n)} - x_{(n-2)}}{x_{(n)} - x_{(2)}}$	,576	,679
12	oder	,546	,642
13	$\frac{x_{(3)} - x_{(1)}}{x_{(n-1)} - x_{(1)}}$	,521	,615
14		,546	,641
15		,525	,616
16	$\frac{x_{(n)} - x_{(n-2)}}{x_{(n)} - x_{(3)}}$	,507	,595
17		,490	,577
18	oder	,475	,561
19		,462	,547
20	$\frac{x_{(3)} - x_{(1)}}{x_{(n-2)} - x_{(1)}}$	,450	,535
21		,440	,524
22		,430	,514
23		,421	,505
24		,413	,497
25		0,406	0,489

1) Nach W. J. Dixon: Ratios Involving Extreme Values. Ann. Math. Stat. 22, 1951, S. 63. Dort können weitere Schwellenwerte entnommen werden.

Abbildung 13.1: Prüfgröße und Schwellenwerte von DIXON