

Materialien und Methoden

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Agagel Standard	Biometra, Göttingen
Agarosegeldetektionssystem Bio Doc Analyse	Biometra, Göttingen
Autoklav	Guwina Hofmann, Berlin
Brutschrank BB6220	Heraeus, Hanau
ELISA-Reader	Labsystems, Finnland
FACS-Calibur	Becton & Dickinson, Heidelberg
Fluostar Optima	BMG Labtech, Offenburg
HPLC LaChrom [®] -System	Merck Hitachi, Darmstadt
Autosampler L-7250	
Fluoreszenzdetektor L-7480	
Interface L-7000	
Pumpe L-7100	
Säulenofen L-7350	
Merck System Manager Software	
KR-10 M Kamera	RICOH, Düsseldorf
Magnetrührer IKAMAG [®] RO 5 Power	IKA [®] -Werke, Staufen
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm ² /0,1 mm)	Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Nürnberg
Pipetten Eppendorf Reference [®]	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy [®]	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttler IKA [®] MTS 2	IKA [®] -Werke, Staufen
Spektralphotometer Gene-Ray	Biometra, Göttingen
Sterilarbeitsbank LaminAir [®]	Heraeus, Hanau
Szintillationszähler 1450 Microbeta [™] Plus	Wallac, Freiburg
Thermoblock TB-1	Biometra, Göttingen

2. Materialien und Methoden

Thermocycler TGradient	Biometra, Göttingen
Trockenschrank UT5042EK	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Sonorex [®] RK 100	Bandelin, Berlin
Vakuumgerät Vacuboy [®]	Integra Biosciences, Fernwald
Vakuum-Pumpe Universal Vacuum System Plus UVS 400A	Savant, Bethesda, MD
Vortex-Gerät	Bender & Hobei, Zürich, CH
Wasser Deionisierungsanlage MilliQ	Millipore-Waters, Eschborn
Zentrifuge Megafuge [®] 1.0R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Eppendorf 5415 C	Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Agarose for routine use	Sigma-Aldrich, Schnelldorf Rapidozym, Berlin
Agarosegelmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Annexin V-FITC	Axxora, Lörrach
Aphidicolin	Serva, Heidelberg
Borsäure	VWR, Darmstadt
BuP-OH	Freie Universität Berlin
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Capecitabin	Roche Diagnostics, Mannheim
Chloroform, LiChrosolv [®]	VWR, Darmstadt
Dacarbazin	Medac, Wedel
Deckgläschen, Durchmesser 18 mm	Roth, Karlsruhe
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Diclofenac-Natrium	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol)	Leo Pharmaceutical Products, Ballerup, Dänemark
Dihydrosphingosin-1-phosphat, Dihydro-S1P	Biomol, Hamburg
Dikaliummonohydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄), LiChrosolv [®]	VWR, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR, Darmstadt

2. Materialien und Methoden

Dithiothreitol (DTT)	New England Biolabs, Frankfurt
Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
DNA Größenmarker	New England Biolabs, Frankfurt
DNA Polymerase Thermoprime Plus (Taq-Pol.)	ABgene, Hamburg
DNA Polymerase GenTherm (Taq-Pol.)	Rapidozym, Berlin
dNTP Set (10 mM pH 7.0)	ABgene, Hamburg
dNTP Set (100 mM, pH 8.5)	Rapidozym, Berlin
Doxorubicin	Medac, Wedel
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's modified Eagle's Medium/ Nutrition Mixture F12 Ham	Sigma, Taufkirchen
Einmalkanülen (0.8 / 80 mm)	VWR, Darmstadt
Einmalspritzen (Braun Injekt 20 ml)	VWR, Darmstadt
EppendorfgefäÙe Safe-Lock (0,5, 1,5, 2 ml)	VWR, Darmstadt
Essigsäure, konzentriert	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethanol	VWR, Darmstadt
Ethanol, LiChrosolv [®]	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethylendiamintetraesigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
FACS Clean	Becton & Dickinson, Heidelberg
FACS Flow	Becton & Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton & Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen, Falcon	VWR, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
5-Fluorouracil (5-FU)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
HAM's F-12 Medium	Biochrom, Berlin
HM-1	Freie Universität Berlin
HPLC-Zubehör:	
Säule: Kromasil 100-5C18 (250 mm/4,6 mm ID)	Chromatographie Service,
Vorsäule: Kromasil 100-5C18 (20 mm/4,0 mm ID)	Langerwehe
AutosamplergefäÙe: 1,1 ml, konisch	VWR, Darmstadt
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

2. Materialien und Methoden

Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco BRL, Karlsruhe
Indometacin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Keratinozytenbasalmedium (KBM)	Cambrex BioScience, Landen, Belgien
Supplements zur Herstellung von KGM	
- Amphotericin B	
- boviner Hypophysenextrakt (BPE)	
- epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF)	
- Gentamicinsulfat	
- Hydrocortison	
- Insulin	
MEM-Vitamine	Gibco BRL, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Methanol, LiChrosolv [®] , gradient grade	VWR Merck, Darmstadt
Methotrexat (MTX)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Natronlauge (1M)	VWR, Darmstadt
Neutralrot	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco BRL, Karlsruhe
NU-IV-Serum	Becton & Dickinson, Heidelberg
Oligo(dT ₂₅₋₃₀) Primer	Invitrogen, Karlsruhe
ortho-Phthaldialdehyd (OPA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Panserin 801 Keratinozyten Medium	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Supplements:	
- epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF)	
- Insulin	
- Hydrocortison	
- Ethanolamin	
- Phosphoethanolamin	

2. Materialien und Methoden

- boviner Hypophysenextrakt (BPE)	
Parafilm® M	Brand GmbH + Co., Wertheim
Penicillin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phosphatgepufferte Salzlösung, Calcium- und Magnesiumfrei	Sigma, Taufkirchen
PMEA, PMEG, PMEDAP	Akademie der Wissenschaften, Prag, Tschechische Republik
Probenpuffer Agarosegelelektrophorese	New England Biolabs, Frankfurt
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit	Amersham, Freiburg
Reagenzgläser Pyrex 16x100 mm mit Deckel	Dunn Labortechnik, Ansbach
Ribonuklease Inhibitor (RNAsin™)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Qiagen, Hilden
RPMI 1640 Medium	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure, konzentriert	VWR, Darmstadt
Serumalbumin vom Rind, Fettsäure-frei (BSA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Silikonlösung in Isopropanol	Serva, Heidelberg
Spezifische Primer	TIB Molbiol, Berlin
Sphingosin-1-Phosphat	Biomol, Hamburg
Sterilfilter Minisart®, 0,22 µm	Sartorius, Göttingen
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Berlin
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Szintillationsflüssigkeit Optiphase® Supermix	Wallac, Freiburg
[³ H]-Thymidin (spezif. Aktivität 35,0 Ci/mmol)	Amersham, Buckinghamshire, U.K.
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris Base	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris HCl	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tumornekrosefaktor-α (TNF-α)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Vancomycin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Zalcitabin (ddC)	Roche Diagnostics, Mannheim
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 75 cm ²)	VWR, Darmstadt
Zellkulturplatten 6-Loch, Flachboden, TPP	Biochrom, Berlin

2. Materialien und Methoden

Zellkulturplatten 24-Loch, Flachboden, Falcon	VWR, Darmstadt
Zellkulturschalen TPP, 10 cm	Biochrom, Berlin
Zellkulturschaber	Renner, Dannstadt
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	Biochrom, Berlin

2.1.3. Nährmedien und Lösungen

Keratinocyten-Anzuchtmedium. Für die Anzucht der Primärkultur der isolierten Keratinocyten wurde das Panserin 801 Keratinocytenmedium verwendet, das ein Wachstum von Fibroblasten in der Kultur unterdrückt. Das Medium wurde unter Zusatz folgender Supplements hergestellt:

hEGF	5 ng/ml	Ethanolamin	0,1 mM
Insulin	5 µg/ml	Phosphoethanolamin	0,1 mM
Hydrocortison	0,5 µg/ml	BPE	25 µg/ml

Keratinocytenmedium. Für die Kultivierung der Keratinocyten sowie für Experimente wurde Keratinocytenwachstumsmedium (KGM) eingesetzt. Die Herstellung erfolgte aus Keratinocytenbasalmedium (KBM) durch Zusatz folgender Supplements:

BPE	30 µg/ml	Insulin	5 µg/ml
hEGF	0,1 ng/ml	Amphotericin B	50 ng/ml
Hydrocortison	0,5 µg/ml	Gentamicinsulfat	50 µg/ml

Medium für die immortalisierte Keratinocyten Zelllinie HaCaT. Für die Kultivierung der HaCaT-Zelllinie sowie für die meisten Experimente wurde HaCaT Wachstumsmedium verwendet. Für einige Experimente (s. Angaben) wurde ein Basalmedium ohne Zusatz von FKS verwendet. Die Medien wurden aus RPMI 1640 Medium mit folgenden Zusätzen hergestellt:

FKS	10 %	Penicillin	100 I.U./ml
L-Glutamin	2 mM	Streptomycin	100 µg/ml

2. Materialien und Methoden

Medium für die humane Endothel Zelllinie HBMEC. Für die Kultivierung der Zelllinie HBMEC und für die meisten Experimente wurde ein Wachstumsmedium verwendet. Für einige Experimente diente ein Basalmedium ohne Zusatz von FKS und NU-IV-Serum. Die Medien wurden aus RPMI 1640 Medium unter Zusatz folgender Supplements hergestellt:

FKS	10 %	L-Glutamin	2 mM
NU-IV-Serum	10 %	Natriumpyruvat	1 mM
Penicillin	100 I.U./ml	Nicht essentielle Aminosäuren	1 %
Streptomycin	100 µg/ml	MEM-Vitamine	1 %

Medium für die Zelllinie SCC-25 aus einem Plattenepithelkarzinom der Zunge (ATCC #CRL-1628). Für die Kultivierung der Zelllinie SCC-25 und für die meisten Experimente wurde ein SCC-25 Wachstumsmedium verwendet. Für einige Experimente diente ein Basalmedium ohne Zusatz von FKS. Die Medien wurden durch Mischen von DMEM/Nutrition Mixture F12 Ham und HAM's F-12 Medium im Verhältnis 1:1 unter Zusatz folgenden Supplements hergestellt:

FKS	15 %
Penicillin	100 I.U./ml
Streptomycin	100 µg/ml
Hydrocortison	0,4 µg/ml

Einfriermedien

Keratinozyten, HBMEC: DMEM unter Zusatz von 10 % FKS und 10 % DMSO

HaCaT, SCC-25: FKS unter Zusatz von 10 % DMSO

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

KCl	0,2 g/l
NaCl	8,0 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,44 g/l

in Aqua bidest

2. Materialien und Methoden

Stop-Medium

FKS 10 %
Penicillin 100 I.U./ml
Streptomycin 100 µg/ml
in DMEM

Transportmedium

Gentamicinsulfat 50 µg/ml
Vancomycin 50 µg/ml
in DMEM

Trypsin-EDTA-Lösung

Trypsin 1,67 mg/ml
EDTA 0,67 mg/ml
in PBS

2.1.4. Lösungen für Experimente

Apoptosebestimmung

Annexin V-Bindungspuffer (pH 7,4)

HEPES/NaOH 10 mM
NaCl 140 mM
CaCl₂ 2,5 mM
in Aqua bidest

Im Anschluss erfolgte eine Sterilisation des Puffers durch Sterilfiltration oder Autoklavierung.

Zellzyklusuntersuchung

PI-Master Mix

PI 40 µg/ml
RNase A 100 µg/ml
in PBS ohne Calcium und Magnesium

2. Materialien und Methoden

MTT-Test

MTT-Lösung

Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid (MTT) 5 mg/ml in PBS

Die Lösung wurde anschließend steril filtriert, aliquotiert und lichtdicht bei -20°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Neutralrotaufnahme

Neutralrot Stammlösung

Neutralrot 0,4 g
Aqua bidest 100 ml

Die Lösung wurde anschließend steril filtriert und lichtdicht bei Raumtemperatur bis zum Gebrauch aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde 1 ml dieser Lösung in 79 ml des entsprechenden Zellkulturmediums verdünnt.

Neutralrot-Desorb-Lösung

Eisessig 1 %
Ethanol 50 %
Aqua bidest 49 %

Diese Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch (< 1h) frisch hergestellt.

Agarosegelelektrophorese

Agarosegel

2 g Agarose werden in 100 ml TBE Puffer gekocht.

TBE-Puffer (pH 8.0)

Tris Base 445 mM
Borsäure 445 mM
EDTA 10 mM
in Aqua bidest

2. Materialien und Methoden

2.1.5. Oligonukleotide

DEPC-behandeltes Wasser

Deionisiertem Wasser wurde über Nacht 1/1000 Volumen (0,1 %) DEPC beigesetzt, anschließend erfolgte eine Autoklavierung. DEPC-behandeltes Wasser diente zur Lösung der Oligonukleotide und zur Herstellung der Puffer, in denen diese eingesetzt wurden.

Primer

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden die jeweiligen Primer mit DEPC-behandeltem Wasser zu einer Konzentration von 100 µM gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser 10 µM Gebrauchslösungen hergestellt (Tab. 2.1.1)

Produkt / RefSeq	Vorwärts-Primer 5'-3'	Rückwärts-Primer 5'-3'	DNA Fragment
MRP4 / NM_005845	CCA TTG AAG ATC TTC CTG G	GGT GTT CAA TCT GTG TGC	239 bp
MRP5 / NM_005688	AGC TGG GTA CTT CCA GAG CA	TCT GTC AAC AGC CAC TGA GG	217 bp
hENT-1 Iso1 NM_00107817 7.1	AGT GGC TCG GAG CTA TCA GA	GGG CTG AGA GTT GGA GAC TG	237 bp
TK-1 / NM_003258	CTT GAG GAG TAC TCG GGT TCG TG	CTT TTT CCT GAG AAC ATC GGC	115 bp
TP / NM_001953	CTG CTG TAT CGT GGG TCA GA	CCT CCG AAC TTA ACG TCC AC	171 bp
dCK / NM_00788	AGC AAG GCA TTC CTC TTG AA	AAC CAT TTG GCT GCC TGT AG	226 bp
dGK Iso1 / NM_080916	GCT GGT GTT GGA TGT CAA TG	AGA GTG CTC CAG GGA TGA GA	210 bp
SPHK1 Iso1/ NM_021972	ATC CAG AAG CCC CTG TGT AGC CTC C	GCA GCA AAC ATC TCA CTG CCC AGG T	524 bp
GAPDH / NM_002046	ATG CAA CGG ATT TGG TCG TAT	TCT CGC TCC TGG AAG ATG GTG	221 bp

Tab. 2.1.1: Primer für die semiquantitative PCR und die Referenz Sequenz (RefSeq) aus GenBank

2. Materialien und Methoden

Einige Primer wurden anhand von Literatur ausgewählt (MRP 4: (Kool et al., 1997); TK-1: (Lipson and Baserga, 1989)). Die Sequenz wurde mit online verfügbaren Programmen (UCSC Genome Browser; Primer3) auf Ihre Übereinstimmung mit der mRNA Sequenz überprüft und gleichzeitig die zu erwartende Länge des DNA Fragments ermittelt. Alternativ konnte mit Hilfe der mRNA Sequenz aus GenBank (PubMed) mit denselben Programmen geeignete Primer generiert werden. Die erwartete Primerlänge wurde anhand der mRNA Sequenz überprüft.

2.2. Methoden

2.2.1. Lösungen der Testsubstanzen

Von den zu untersuchenden Substanzen wurden zunächst 10^{-2} M - im Fall von DMSO als Lösungsmittel 2×10^{-2} M - Stammlösungen hergestellt und steril filtriert. Weitere sterile Verdünnungen wurden aus diesen Stammlösungen erhalten.

Substanz	Lagerung der Trockensubstanz	Lösungsmittel	Lagerung der Lösung
5-FU	Raumtemperatur (RT)	PBS	2 – 8 °C, lichtdicht
Aphidicolin	2 – 8 °C	DMSO	- 20 °C
BuP-OH	2 – 8 °C	DMSO	2 – 8 °C
Calcitriol	- 80 °C*	Ethanol (96 %)	- 80 °C
Capecitabin	RT	Aqua bidest	2 – 8 °C, lichtdicht
Dacarbazin	2 – 8 °C	Aqua bidest	2 – 8 °C, lichtdicht
Dexamethason	2 – 8 °C	Ethanol (96 %)	- 80 °C
Diclofenac	RT	Ethanol (96 %)	2 – 8 °C, lichtdicht
Doxorubicin	2 – 8 °C	Aqua bidest	2 – 8 °C
HM-1	2 – 8 °C	DMSO	2 – 8 °C
Indometacin	RT	Ethanol (96 %)	2 – 8 °C
Methotrexat	2 – 8 °C	A. bidest + 0,1 N NaOH q.s.	- 20 °C
PMEA	RT	Aqua bidest	- 20 °C
PMEDAP	RT	Aqua bidest	- 20 °C
PMEG	RT	Aqua bidest	- 20 °C
Zalcitabin	RT	Aqua bidest	2 – 8 °C

Tab 2.2.1: Aufstellung der Lösungsmittel und Lagerhinweise der untersuchten Substanzen (* 4 mM in Isopropanol)

2. Materialien und Methoden

Die Lösungen von Calcitriol und Dexamethason wurden nach ca. einem Monat neu hergestellt. Eine Lösung von 5-FU war 4 Wochen im Kühlschrank haltbar, wobei die Sterilfiltration die Lagerstabilität erhöhte. Eine Lösung von Aphidicolin war 6 Wochen bei -20 °C haltbar, eine MTX-Lösung nur einen Monat. Die anderen Lösungen waren ausreichend stabil und wurden nur nach Aufbruch neu hergestellt.

2.2.2. Gewinnung und Kultivierung von primären Hautzellen und Zelllinien

Gewinnung und Kultur primärer Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wurden aus juveniler Vorhaut isoliert und anschließend kultiviert. Vorhaut, die bei Zirkumzisionen in kinderchirurgischen Ambulanzen der Ärzte Dr. Jung, Dr. Knoblauch, Dr. Schildknecht, Dr. Eule und dem St. Joseph-Krankenhaus anfiel, wurde uns – nach Genehmigung durch die Berliner Ärztekammer – freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Häute wurden sofort nach operativer Entfernung in unter aseptischen Bedingungen hergestelltem Transportmedium bei 4 °C gekühlt transportiert und anschließend eine Stunde bei 37 °C oder alternativ 24 Stunden bei 4 °C mit Trypsin/EDTA inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Überführen der Häute in Stop-Medium beendet. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Häute in Stop-Medium und anschließend in PBS geschwenkt. Bei diesem Prozess lösten sich die Keratinozyten ab. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei $250 \times g$ für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, in Panserin 801-Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (25 cm^2) eingesät (0. Passage). Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C , 95 % Luftfeuchte und 5 % CO_2 Gehalt kultiviert. Nachdem die Zellen nach einigen Tagen angewachsen waren, wurden mögliche Co-Kulturen mit Fibroblasten durch Absaugen des Mediums, Waschen mit PBS und Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA abgetrennt. Durch diese Behandlung lösten sich die Fibroblasten. Sie wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und weiter behandelt. Auf die verbliebenen Keratinozyten wurde erneut Trypsin/EDTA gegeben und nach wenigen Minuten Inkubation bei 37 °C lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Stop-Medium beendet, die Zellsuspension wie oben beschrieben zentrifugiert, die Zellen mit PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert und in KGM resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (75 cm^2)

2. Materialien und Methoden

eingesät (1. Passage). Keratinozytenkulturen wurden bei einem Konfluenzgrad von 50 - 70 % im Verhältnis 1:3 verbreitert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 - 3 Tage. Um starke interindividuelle Unterschiede zwischen den gespendeten Zellen auszugleichen, wurden Zellen von mindestens drei Spendern der 0. Passage vereint und so weiterkultiviert. Für die Versuche dienten Zellen der 2. - 4. Passage.

Kultivierung, Einfrieren und Auftauen der HaCaT-Zelllinie. HaCaT-Zellen wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Fusenig (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ kultiviert. Diese sehr schnell wachsende Zelllinie musste dreimal pro Woche ca. 1:10 verbreitert werden. Die Zellen wurden dazu einmal mit 5 ml PBS gewaschen und dann einige Minuten mit 1,5 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurde durch leichtes Klopfen des Bodens und der Seiten der Zellkulturflaschen beschleunigt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 3,5 ml Stop-Medium beendet. Diese Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellkulturflasche zweimal mit je 5 ml PBS nachgewaschen. Diese Waschlösung wurde mit der Zellsuspension vereinigt, bei 4 °C für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Wachstumsmedium aufgenommen und pro Zellkulturflasche etwa 5×10^5 Zellen in 10 ml vorgelegten Medium ausgesät.

Die Zellen (10^6) wurden zum Einfrieren in 1 ml FKS aufgenommen, das 10 % DMSO enthielt und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zum langsamen Einfrieren zunächst in Zellstoff verpackt bei - 80 °C eingefroren und nach frühestens drei Tagen zur längeren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Die Reaktivierung der Zellen erfolgte durch schnelles Auftauen in einem 37 °C warmen Wasserbad. Die Zellsuspension wurde in einer Zellkulturflasche (75 cm²) in 10 ml vorgewärmten Medium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

Kultivierung, Einfrieren und Auftauen der SCC-25 Zelllinie. SCC-25 Zellen (ATCC #CRL-1628) wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Reutter (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, CCBF Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zweimal die Woche 1:3 oder 1:5 passagiert.

2. Materialien und Methoden

Die Zellen wurden wie für HaCaT-Zellen bereits beschrieben behandelt (s.o.). Auch Einfrieren und Reaktivieren eingefrorener Zellen erfolgte analog.

Kultivierung, Einfrieren und Auftauen der HBMEC Zelllinie. HBMEC Zellen wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Liesenfeld (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ kultiviert und zweimal die Woche 1:10 passagiert. Die Zellen wurden wie für HaCaT-Zellen bereits beschrieben behandelt (s.o.). Auch Einfrieren und Reaktivieren eingefrorener Zellen erfolgte analog.

2.2.3. Viabilitätsuntersuchungen

MTT-Test. Mittels MTT-Reduktionsassay wurde der Einfluss der Referenz- und Test-Substanzen auf die Viabilität primärer Keratinozyten, HaCaT-Zellen und SCC-25 Zellen untersucht (Gysler et al., 1997). Das Testprinzip beruht auf der Umwandlung des gelben MTT zu blauem Formazan durch die mitochondriale Succinat-Tetrazolium Reduktase (Abb. 2.2.1). Da diese Umwandlung ein aktives Reduktase-System erfordert, korreliert die Menge des gebildeten Farbstoffs mit der Zahl lebender Zellen. Die Zellen wurden in einer Dichte von etwa 4×10^4 Zellen pro Loch einer 24-Loch Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgten ein Mediumwechsel, wobei SCC-25 Zellen in späteren Versuchen auf basal gesetzt wurden, und die Inkubation mit der jeweiligen Substanz für 24 h oder 48 h. Dabei lagen die Endkonzentrationen von Ethanol bei maximal 1 % und die von DMSO bei maximal 0,5 %. Das entsprechende Lösungsmittel der Testsubstanz wurde zu Kontrollzwecken untersucht. Für die letzten 4 h wurde unter Lichtausschluss die gelbe MTT-Lösung (Endkonzentration 0,5 mg/ml) zugegeben. Nach beendeter Inkubation wurden das Medium vorsichtig abgesaugt und die blauen Formazan Kristalle in 250 µl DMSO gelöst. Diese Lösung wurde etwa 30 Minuten bei 300 rpm geschüttelt und anschließend bei $\lambda = 540$ nm photometrisch (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenburg) vermessen. DMSO diente als Leerwert.

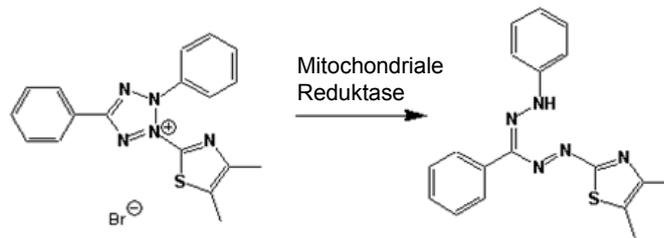


Abb. 2.2.1 Reduktive Umwandlung des gelben Farbstoffes MTT in blaues Formazan

$$\text{Viabilität (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{Messwert}} - \text{OD}_{\text{Leerwert}}}{\text{OD}_{\text{Messwert}} - \text{OD}_{\text{Leerwert}}} \times 100$$

Neutralrotaufnahme. Die Neutralrot Aufnahme ist eine weitere Möglichkeit, die Viabilität von Zellen zu untersuchen. Der ungeladene Farbstoff Neutralrot diffundiert durch die Zellmembran und akkumuliert in den sauren Lysosomen. Durch Verlust der Membranintegrität wird diese „Ionenfalle“ aufgehoben und der Farbstoff kann nicht länger in der Zelle gehalten werden, so dass der Farbstoffgehalt direkt mit der Anzahl intakter, lebender Zellen korreliert werden kann.

Die Zellen wurden analog der Beschreibung für den MTT-Test ausgesät und inkubiert. Für die letzten drei Stunden der Inkubation wurde der Farbstoff in Form eines Mediumwechsels unter Lichtausschluß zugegeben. Nach Beendigung der Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die adhärennten, gefärbten Zellen vorsichtig mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 250 µl NR-Desorb-Lösung aufgelöst. Diese Lösung wurde etwa 30 Minuten bei 300 rpm geschüttelt und anschließend bei $\lambda = 540 \text{ nm}$ photometrisch vermessen. NR-Desorb-Lösung diente als Leerwert (Liebsch M., 1998).

$$\text{Membranintegrität (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{Messwert}} - \text{OD}_{\text{Leerwert}}}{\text{OD}_{\text{Messwert}} - \text{OD}_{\text{Leerwert}}} \times 100$$

2.2.4. Untersuchungen zur Zellproliferation

Proliferierende Zellen synthetisieren für die Zellteilung u.a. DNA, wofür sie Nukleotide benötigen. Extrazellulär angebotenes, radioaktivmarkiertes Thymidin wird in der Zelle

2. Materialien und Methoden

zum Triphosphat aktiviert und in die DNA eingebaut, daher korreliert die Radioaktivität der Kultur mit der Zahl proliferierender Zellen.

Die Zellen wurden wie für den MTT-Test beschrieben ausgesät und inkubiert. Zu Beginn dieser Arbeit wurden die Zellen auch in 6-Loch Platten (10^5 Zellen/ Loch) ausgesät. Die Zellen wurden für 24 h, 48 h oder 72 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Zugabe von 1 μCi [^3H -methyl]Thymidin erfolgte für die letzten 23 h, später für die letzten drei Stunden der Inkubation, da sich diese Zeitspanne als ausreichend erwiesen hatte. Nach Beendigung der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig einmal mit 250 μl eiskaltem PBS und weitere zweimal mit je 250 μl TCA gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 250 μl NaOH (0,3 N) durch Schütteln für etwa eine Stunde bei 300 rpm aufgeschlossen. Danach wurde die NaOH-Lösung in Eppendorf-Caps (2 ml) überführt, die 1,5 ml Szintillations-Cocktail enthielten. Zur vollständigen Mischung der beiden Flüssigkeiten wurden die Caps geschüttelt und gevortext. Die Strahlen-induzierte Fluoreszenz des Szintillations-Cocktails wurde schließlich in einem Betacounter quantifiziert.

2.2.5. Untersuchungen zur Apoptose und Nekrose

Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate mittels Durchflußzytometrie (FACS). Das in der Frühphase der Apoptose an die Außenseite der Zellmembran translozierte Phosphatidylserin ist einer Bindung an Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-gekoppeltes Annexin V zugänglich [Annexin V⁺/ PI⁻; (Vermes et al., 1995)]. Nekrotische und spät apoptotische Zellen verlieren ihre Membranintegrität, so dass sie nun mit Propidiumiodid (PI), das normalerweise von einer Penetration ausgeschlossen ist, DNA interkalierend angefärbt werden können. Diese Zellen sind anhand der Doppelfärbung mit Annexin und PI (Annexin V⁺/ PI⁺) detektierbar.

Einstellung des Durchflußzytometers vor der Messung. Zunächst musste eine Einstellung des Zytometers nach Größe (Forwardscatter FSC) und Granularität der Zellen (Sidewardscatter SSC) erfolgen. Anhand von viablen, ungefärbten Zellen wurde die Hauptzellpopulation ausgewählt. Um nur tatsächlich gefärbte Zellen auch als diese zu erkennen, erfolgte nun eine Einstellung der FL2- und FL1-Achsen einer ungefärbten Zellpopulation anhand ihrer Eigenfluoreszenzintensität. Dabei sollten

sich möglichst alle Zellen im linken unteren Quadranten befinden. Die Unterscheidung der Fluoreszenzemission von Annexin V-FITC (525 nm, FL1) und von PI (575 nm, FL2) erforderte eine Kompensation jeweils einfach angefarbter Zellen. Doppelgefärbte viable Zellen sollten möglichst wenige Signale außerhalb des linken unteren Quadranten zeigen. Erst nach den Grundeinstellungen des Durchflußzytometers konnten die Proben analysiert werden.

Durchflußzytometrische Bestimmung der Apoptoserate. Die Zellen wurden in einer Dichte von ca. 10^5 Zellen/Loch einer 6-Loch Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgten ein Mediumwechsel und die entsprechende Stimulation. Die Aufarbeitung der Proben begann mit der Überführung des Mediums in auf Eis stehende FACS Röhren. Die Zellen wurden mit je 500 µl eiskaltem PBS vorsichtig gewaschen. Durch Zugabe von 250 µl Trypsin und Inkubation bei 37 °C für einige Minuten lösten sich die Zellen von der Zellkulturplatte. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 750 µl Stop-Medium beendet und das gesamte Volumen in die entsprechenden FACS-Röhren überführt. Auch die Zellkulturplatten standen nach erfolgter Trypsinierung auf Eis. Die Löcher wurden zweimal mit je 500 µl PBS gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in die Röhren überführt. Nach Zentrifugieren bei 300 x g für 5 Minuten bei 4 °C wurde das Zellpellet mit 1 ml Bindungspuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das in 200 µl Bindungspuffer aufgenommene Pellet wurde 10 Minuten auf Eis in Dunkelheit mit Annexin-V FITC (0,5 µg/ml) inkubiert. Direkt vor der Messung wurde PI zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben.

2.2.6. Zellzyklus-Untersuchungen

Veränderungen der Zellzyklus-Verteilung durch Stimulation der verschiedenen Zelllinien und der primären Keratinozyten mit den Testsubstanzen können mit Hilfe der Durchflußzytometrie nachgewiesen werden. Der DNA-Gehalt wird durch Anfärbung mit der interkalierenden Substanz PI bestimmt. Bevor sich eine Zelle teilt (Mitose, M-Phase), durchläuft sie verschiedene Stadien der Interphase, die als G1-, S- und G2-Phase bezeichnet werden (Abb. 2.2.2). Ruhende Zellen befinden sich in der G0 Phase. Zellen, die sich in G1 oder G0 befinden haben einen diploiden Chromosomensatz. Nach der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) besitzen die Zellen

2. Materialien und Methoden

einen tetraploiden Chromosomensatz (G2-Phase), der während der Mitose auf zwei Tochterzellen verteilt wird.

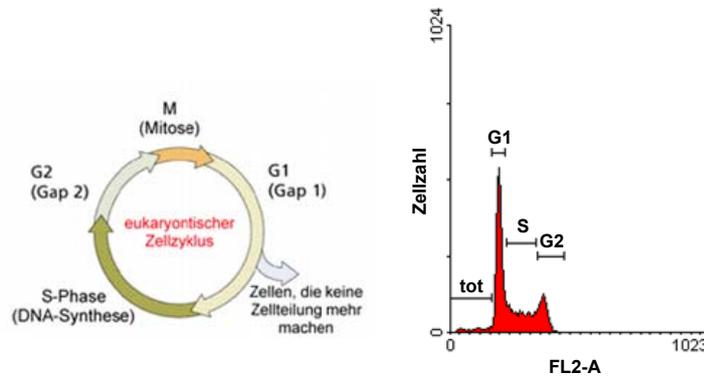


Abb. 2.2.2 Schema Zellzyklus und Beispiel Histogramm

PI interkaliert stöchiometrisch in die DNA, so dass das Signal von Zellen in der G2-Phase sich deutlich von dem der Zellen der G0/G1-Phase unterscheidet. Zellen der S-Phase finden sich zwischen diesen beiden Bereichen. Wenn es durch apoptotische und nekrotische Zellschädigung zu DNA-Strangbrüchen kommt, werden diese DNA-Fragmente als breite Signale vor dem G1-Peak detektiert (Abb. 2.2.2).

Einstellung des Durchflußzytometers vor der Messung. Zunächst wurde mit Hilfe der Kontrollzellen in einem FL2-A (x-Achse) gegen FL2-W (y-Achse) Dot Plot die Spannung so verändert, dass die Zellen jeweils ungefähr bei Kanal 200 lagen (Abb. 2.2.3 A). Um dies genau verfolgen zu können, wurde in der Cell Quest Software jeweils ein Histogramm für FL2-W und FL2-A geöffnet (Abb. 2.2.3 B und C). Durch Veränderung der Spannung bei FL2-H konnte die Höhe im FL2-A Plot, durch Änderung der PMT Spannung von FL2-W die Lage des Signals in diesem Histogramm geändert werden.

Durch Legen eines Gates in dem Dot Plot sollte nun sichergestellt werden, dass nur einzelne Zellen berücksichtigt und Zellcluster ausgeschlossen werden, da diese die relative Zellzyklus Verteilung verfälschen würden. Dubletten von G0/G1 Zellen könnten z.B. als G2 Peak gesehen werden. Die weitgehende Vermeidung von Zellclustern wurde durch eine sorgfältige Aufarbeitung und Fixierung der Zellen mit Ethanol ermöglicht.

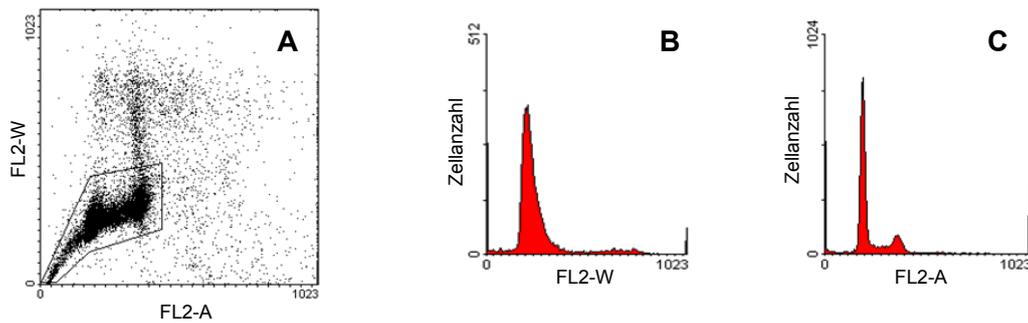


Abb. 2.2.3 Einstellung des Durchflußzytometers mit einer Kontrollzell-Population für Zellzyklus Untersuchungen: A: FL2-A/FL2-W Dot Plot B: FL2-W Histogramm C: FL2-A Histogramm

Durchflußzytometrische Bestimmung der relativen Zellzyklus Verteilung.

Primäre Keratinozyten, HaCaT-Zellen und SCC-25 Zellen wurden für eine 24stündige Stimulation zu ca. $6-7 \times 10^4$ Zellen pro Loch und für eine 48stündige Inkubation zu ca. $4-5 \times 10^4$ Zellen pro Loch einer 6-Loch Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgten ein Mediumwechsel und die Inkubation der Zellen. Die Zellen müssen dünn ausgesät werden, um eine mögliche Änderung des Zellzyklus durch Zellkontakthemmung zu vermeiden. Nach Beendigung der Stimulation wurde das Medium in FACS-Röhrchen überführt und die Zellen einmal mit 500 μ l eiskaltem PBS (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen. Nach Zugabe von 250 μ l Trypsin/EDTA wurden die Zellen bis zum Ablösen einige Minuten bei 37 °C inkubiert. Dieser Vorgang wurde durch wiederholtes Klopfen der Platte beschleunigt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 750 μ l Stop-Medium beendet. Die Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen überführt und die Löcher der Zellkulturplatten zweimal mit PBS gewaschen. Das durch Zentrifugieren der vereinigten Waschlösungen bei 300 x g für 5 Minuten bei 4 °C erhaltene Zellpellet wurde in 900 μ l PBS aufgenommen und mit 3 x 700 μ l Ethanol (96 %) versetzt. Die Suspension wird für mindestens eine halbe Stunde bei -20 °C gelagert, mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 300 μ l PI Master-Mix für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die durchflußzytometrische Vermessung erfolgte mit FACS Calibur und der Software Cell Quest. Die Messung jeder Konzentration erfolgte als Einfachbestimmung, die Versuche wurden zweimal unabhängig wiederholt.

2.2.7. Mikroskopische Untersuchung der Zellen

Die SCC-25 Zellen wurden in 6 well Platten ausgesät (4×10^4 Zellen/Loch) und über Nacht anwachsen gelassen. Am nächsten Tag erfolgten ein Mediumwechsel und die Stimulation mit HM-1 10^{-4} M. Die Zellen wurden nach 48 Stunden mit einem Phasenkontrast Mikroskop (Axiovert 135) in 5facher Vergrößerung (Carl Zeiss Objektiv Agrostimat 5x/0,12) betrachtet. Fotos von den Zellen wurden mit einer Ricoh Kamera (KR-10M) unter Verwendung eines Kodak Films (35 mm) aufgenommen und digital entwickelt.

2.2.8. Untersuchung der mRNA-Transkription

Isolierung der mRNA. Zur Isolierung der mRNA aus Hautzellen diente der Quick-Prep™ Micro mRNA Aufreinigungskit der Firma Amersham (Freiburg). Dieser Kit enthält: oligo(dT) Cellulose (25 mg/ml), Extraktionspuffer (enthält Guanidinthiocyanat und N-Laurylsarcosin), „High-Salt“ Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl), „Low Salt“ Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl), Elutionspuffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA), Glycogen-Lösung (5-10 mg/ml in DEPC-behandeltem Wasser), Kaliumacetat-Lösung (2,5 M pH 5,0), MicroSpin Säulen. Zunächst wurden die Zellen trypsinisiert, die Reaktion mit Stop-Medium beendet, zentrifugiert und das in 1 ml PBS aufgenommene Zellpellet in ein 2 ml Eppendorf Cap überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei $10.000 \times g$ ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, 3 Minuten) erfolgte die Lyse der Zellen in 400 μl Extraktionspuffer, dessen Zusatz gleichzeitig endogene RNasen inhibiert. Verdünnung des homogenisierten Extrakts mit 800 μl Elutionspuffer führte zu einer ersten Aufreinigung durch Präzipitation der Proteine. Nach Zentrifugation bei $10.000 \times g$ (RT, 1 Minute) wurde 1 ml des Überstandes auf den Niederschlag von 1 ml ebenfalls zentrifugierter oligo(dT) Cellulose pipettiert. Sanftes Schwenken des Caps ermöglichte die Adsorption der polyA-haltige mRNA an der oligo(dT) Cellulose-Lösung. Die so gebundene mRNA wurde fünf Mal mit 1 ml „High Salt“ Puffer und zwei Mal mit 1 ml „Low Salt“ Puffer gewaschen, bevor sie in eine MicroSpin Säule überführt und noch weitere drei Mal mit 500 μl „Low Salt“ Puffer gewaschen wurde. Die so gereinigte mRNA wurde mit insgesamt 400 μl Elutionspuffer ($65 \text{ }^\circ\text{C}$) eluiert und anschließend photometrisch bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ quantifiziert. Aus der UV-Absorption konnte die mRNA-Konzentration wie folgt berechnet werden: $[\text{RNA}] = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml}$

2. Materialien und Methoden

Nach der Gehaltsbestimmung wurde die mRNA durch Zugabe von 10 µl Glycogen-Lösung, 40 µl Kaliumacetat-Lösung und 1 ml eiskaltem Ethanol (96 %) durch Lagerung bei - 20 °C für eine Stunde ausgefällt. Die mRNA wurde bei 4 °C für 30 min zentrifugiert (10.000 x g) und bis zum weiteren Gebrauch bei - 80 °C gelagert.

Synthese von cDNA. Für die Gewinnung einzelsträngiger cDNA wurden zunächst 500 ng mRNA in 10 µl DEPC-Wasser gelöst und mit 1 µl Oligo(dT₂₅₋₃₀) Primer (1 pmol) versetzt. Dieser Ansatz wurde zur Auflösung von Sekundärstrukturen für drei Minuten bei 80 °C inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 37 °C abgekühlt. Daraufhin wurden 9 µl des folgenden Reaktionsgemisches zugegeben: 4 µl 5fach konzentrierter Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µl RNAsinTM Ribonuklease-Inhibitor und 1 µl (200 U) SuperscriptTM Reverse Transkriptase. Die Negativkontrollen enthielten anstatt der reversen Transkriptase 1 µl DEPC-behandeltes Wasser. Dieser Ansatz wurde zur reversen Transkription der mRNA für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die noch enthaltene mRNA durch Zugabe von 20 µl NaOH (0,4 M) während einer 10 minütigen Inkubation inaktiviert. Nach Neutralisation mit 20 µl Tris-HCl (1 M, pH 7,5) wurde die cDNA direkt für die PCR-Analyse eingesetzt oder für den späteren Gebrauch bei - 20 °C gelagert.

Amplifizierung von DNA mittels PCR. Für die Amplifizierung von DNA diente die sogenannte Taq DNA-Polymerase, die ursprünglich aus dem Stamm *Thermus aquaticus* isoliert und in *E. coli* überexprimiert wurde. Diese thermostabile 5'-3' DNA-Polymerase hat eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität aber keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. 2 µl cDNA Lösung (äquivalent zu 33 ng umgeschriebene mRNA) wurden mit folgenden Reagenzien versetzt: 5 µl 10fach konzentrierter Reaktionspuffer (200 mM (NH₄)₂SO₄, 750 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % (V/V) Tween 20), 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 0,25 µl DNA-Polymerase (1,25 U), je 2,5 µl der 3'- und 5'-Primer (5 µM), 34,75 µl DEPC-behandeltes Wasser. Die Amplifizierung der gewünschten DNA Sequenz erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem Reaktionsablauf: Denaturierung der doppelsträngigen cDNA durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 94 °C für eine

2. Materialien und Methoden

Minute, Anlagerung der Primer bei 55 °C für eine Minute und Polymerisation der komplementären DNA-Stränge bei 72 °C für eine Minute.

Es wurden 30 Zyklen durchlaufen. Die PCR-Amplikons wurden anschließend elektrophoretisch in einem 2 %igen Agarosegel getrennt und nach 30 minütiger Färbung in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml) im UV-Licht bei 254 nm detektiert.

2.2.9. HPLC Analytik des S1P Gehaltes in HBMEC

Der S1P Gehalt wurde wie zuvor beschrieben (Ruwisch et al., 2001) bestimmt. HBMECs ($2,5 \times 10^6$ Zellen/10 mm Zellkulturschale) wurden über Nacht in Wachstumsmedium anwachsen gelassen. Nach Ersatz des Mediums durch Basalmedium wurden die Zellen mit DEX 100 nM für 24 h stimuliert. Das Lösungsmittel Ethanol diente als Kontrolle. Die bei der Extraktion und chromatographischen Analytik verwendeten Glasgeräte wurden vor ihrer Anwendung zweimal mit einer Silikonlösung benetzt und anschließend bei 125 °C getrocknet. Zu Beginn des Experiments wurden die Zellen pro Zellkulturschale gezählt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml Methanol (0,25 % HCl) aus den Schalen gekratzt und in Glasröhrchen überführt. Als interner Standard wurde Dihydro-S1P (50 pmol) zugegeben und die Lipide wurden durch Zugabe von 1 ml Chloroform und 500 µl NaCl (1 M) extrahiert. Zur Alkalisierung wurden 100 µl NaOH (3 M) zugegeben. Die alkalische wässrige Phase wurde in ein neues Glasröhrchen überführt und die organische Phase noch einmal mit 0,5 ml Methanol, 0,5 ml NaCl (1 M) und 50 µl NaOH (3 M) extrahiert. Die vereinigte wässrige Phase wurde mit 100 µl HCl konz. gesäuert und zweimal mit 1,5 ml Chloroform extrahiert. Durch fünf Minuten Zentrifugation bei 1500 rpm wurden die Phasen getrennt und die organische Phase abgenommen. Die wässrige Phase wurde erneut mit 1,5 ml Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen bei 45 °C in der Vakuumzentrifuge eingedampft. Zu dem in 275 µl Methanol/0,07 M K_2HPO_4 (8:2) aufgenommenem Rückstand wurden 25 µl der Derivatisierungsmischung (10 µg o-Phthaldialdehyd, 200 µl Ethanol, 10 µl 2-Mercaptoethanol und 10 ml Borsäure (3 %), mit KOH auf pH 10,5 eingestellt) bei Raumtemperatur den Proben zugegeben und vor der Analyse 15 Minuten unter Lichtausschluß bei 4 °C stehen gelassen. Die primäre Aminogruppe der Sphingolipide reagiert mit ortho-Phthaldialdehyd und 2-Mercaptoethanol zum entsprechenden Isoindolderivat. Die chromatographische

2. Materialien und Methoden

Trennung bei 35 °C erfolgte mit einer Kromasil gefüllten Reversed-Phase-Säule (RP-18) mit dem in Tab 2.2.2 genannten Gradienten, die Fließgeschwindigkeit betrug 1,3 ml/min. Die Fluoreszenzanregung des Isoindolderivats geschah bei 340 nm, die Emission wurde bei 455 nm gemessen. Die Chromatogramme wurden mit der HPLC-System-Manager-Software ausgewertet.

Zeit (min)	K ₂ PO ₄ (0,07 M)	Methanol
0	24 %	76 %
10	24 %	76 %
30	16 %	84 %
40	8 %	92 %
46	0 %	100 %
60	0 %	100 %

Tab 2.2.2 Fließmittelgradient für die Trennung der Sphingolipide aus HBMEC

2.3. Statistik

Sofern nicht anders angegeben wurden die Versuche als Dreifachbestimmungen durchgeführt, jeder Versuch wurde zweifach wiederholt. Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte (MW) angegeben. Als Maß für die Genauigkeit wurde die Streuung um den Mittelwert (\pm SEM) berechnet.

Die Prüfung auf Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test oder dem D'Agostino & Pearson Omnibus Normalitätstest durchgeführt. Der Prüfung auf Signifikanz von Konzentrationsreihen diente die einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA), nachdem die Varianzhomogenität mit Hilfe des Bartlett's Test überprüft worden war. Sollten die Stichproben gegen die Kontrollgruppe getestet werden, wurde der Dunnett's post-hoc Test angewendet. Bei nicht gegebener Normalverteilung wurden die Stichproben mit dem Wilcoxon Vorzeichenrangtest geprüft. Zur Testung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurde der Student's t-Test verwendet, nachdem mittels F-test die Varianzhomogenität überprüft worden war. Erwiesen sich die Varianzen als inhomogen wurde der Welch-Test verwendet. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % festgelegt ($p < 0.05$).