

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

| | | |
|--|--------|-------------------------------|
| Autoklav | | Guwina-Hofmann, Berlin |
| Agagel Standard | | Biometra, Göttingen |
| Brutschrank BB 6220 | | Heraeus, Hanau |
| Elektrophoresekammern | | Biometra, Göttingen |
| Entwicklungskassette | | Kodak, München |
| Fluoreszenzmikroskop BX41 | | Olympus, Hamburg |
| Heißhomogenisator Micron Lab 40 | | APV Gaulin, Lübeck |
| 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 | | |
| Lamin Air–Sterilarbeitsbank | | Heraeus, Hanau |
| Magnetrührer IKAMAG [®] RCT | | Janke & Kunkel, Staufen |
| Neubauer-Zählkammer (0,0025mm ² /0,1mm) | | Zeiss, Jena |
| pH-Meter | | Knick, Nürnberg |
| Phasenkontrast-Mikroskop | | Carl-Zeiss, Jena |
| Pipetten Eppendorf Reference [®] | | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettierhilfe Pipetboy [®] | | Integra Biosciences, Fernwald |
| Schüttelmaschine LS10 | | Gerhardt, Bonn |
| Schüttler IKA [®] MT-2 | | Karow, Berlin |
| Spektralphotometer, Gene-Ray | | Biometra, Göttingen |
| Standard Power Pack | | Biometra, Göttingen |
| Tank–Blot | | Biometra, Göttingen |
| Thermoblock TB 1 | | Biometra, Göttingen |
| Thermocycler TGradient | | Biometra, Göttingen |
| Transilluminator BioDoc | | Biometra, Göttingen |
| Trockenschrank UT5042EK | | Heraeus, Hanau |
| Ultraschallbad Sonorex [®] RK 100 | | Bandelin, Berlin |
| Ultraschallsonotrode Sonoplus GM 70 | | Bandelin, Berlin |
| Ultra-Turrax IKA [®] T25 | | Janke & Kunkel, Staufen |
| Vakuumgerät Vacuboy [®] | | Integra Biosciences, Fernwald |
| Vakuum-Zentrifuge Speed-Vac [®] SC 100A | | Savant, Bethesda, MD |
| Vortex | | Heidolph, Kelheim |
| Wasserbad DC3/W26 | | Haake, Karlsruhe |
| Wasser Deionisierungsanlage MilliQ | | Millipore-Waters, Eschborn |
| X-Omat Film-Entwicklungsgerät | | Kodak, München |
| Zentrifuge Eppendorf 5415 C | | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge Megafuge 1,0 R | | Heraeus, Hanau |

2.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--|
| Acrylamid/Bisacrylamid 40 %, 29:1 | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Agarose (Elektrophorese-Grad) | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Agarosegelmarter | New England Biolabs, Frankfurt/M |
| Ammoniumpersulfat | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Amphotericin B | Biochrom, Berlin |
| Aprotinin | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Borsäure | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| boviner Hypophysenextrakt, BPE | Cell Systems, St. Katharinen |
| Bradford Reagenz | Biometra, Göttingen |
| Brij 35 | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Bromphenolblau | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Calciumchlorid | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Chloroform, LiChrosolv [®] | VWR, Darmstadt |
| Compritol [®] 888 ATO | Gatefossé, Saint-Priest, Frankreich |
| Coomassieblau | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Cy3-gekoppelter Anti-Mäuse-IgG-Antikörper | Dianova, Hamburg |
| Deckgläschen, Ø 18 mm | Roth, Karlsruhe |
| Deoxycholinsäure | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Diethylpyrocarbonat, DEPC | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Dikaliummonohydrogenphosphat, K ₂ HPO ₄ , LiChrosolv [®] | VWR, Darmstadt |
| Dihydrosphingosin-1-phosphat, Dihydro-S1P | Biomol, Hamburg |
| Dimethylsulfoxid, DMSO | VWR, Darmstadt |
| Dithiothreitol, DTT | New England Biolabs, Frankfurt/M |
| DNA-Größenmarker | New England Biolabs, Frankfurt/M |
| DNTP Set (10 mM, pH 7,0) | Advanced Biotechnologies Ltd, Epsom, Surrey, U.K. |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrition Mixture F 12 Ham | Sigma/ Aldrich, Deisenhofen |
| Einmalküvetten, reduziert | VWR, Darmstadt |
| Eisessig | VWR, Darmstadt |
| Ethidiumbromid, EtBr | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| humaner epidermaler Wachstumsfaktor, hEGF | Cell Systems, St. Katharinen |
| Eppendorf Reaktionsgefäße, Safe-Lock | Merck/Eurolab, Berlin |
| Ethanol, LiChrosolv [®] | VWR, Darmstadt |
| Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| fetales Kälberserum, FKS | Biochrom, Berlin |
| Filme, Kodak X-OMAT, XAR-5 | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Filmentwickler | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Filmfixierer | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Filterpapier, Ø 10 cm | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |

| | |
|---|--|
| FITC-gekoppelter Anti-Mäuse-IgG-Antikörper | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| FuGENE 6 [®] | Roche, Mannheim |
| Gelatine | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Geleol [®] | Gatefossé, Saint-Priest, Frankreich |
| Gentamicinsulfat | Cell Systems, St. Katharinen |
| Glycin | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Glycogen | Amersham, Buckinghamshire, U.K. |
| HPLC-Zubehör: | |
| Säule: Kromasil 100-5C18 (250 mm/4,6 mm ID) | CS, Langerwehe |
| Vorsäule: Kromasil 100-5C18 (20 mm/4,0 mm ID) | CS, Langerwehe |
| Autosamplergefäße: 1,1 ml, konisch | VWR Merck, Darmstadt |
| HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper | Santa Cruz, Heidelberg |
| HRP-gekoppelter Anti-Mäuse-IgG-Antikörper | New England Biolabs, Frankfurt/M |
| HRP-gekoppelter Anti-Ziegen-IgG-Antikörper | Santa Cruz, Heidelberg |
| Hydrocortison | Cell Systems, St. Katharinen |
| Imwitor [®] 900 | Sasol, Witten |
| Insulin | Cell Systems, St. Katharinen |
| Kaliumacetat | Amersham, Buckinghamshire, U.K. |
| Kaliumchlorid, KCl | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄ | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Keratinocyten-Basalmedium (KBM) | Cell Systems, St. Katharinen |
| Leupeptin | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| L-Glutamin | Sigma/Aldrich, Darmstadt |
| LumiGlo [®] Chemilumineszenz Reagenz | New England Biolabs, Frankfurt/M |
| Lysophosphatidsäure, LPA | Calbiochem, Bad Soden/Ts |
| Mercaptoethanol | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Methanol, LiChrosolv [®] , gradient grade | VWR Merck, Darmstadt |
| Monoklonaler α-SMA-Antikörper (IgG Maus) | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Monoklonaler E-Cadherin-Antikörper (IgG Maus) | BD Biosciences, Heidelberg |
| Monoklonaler Fibronectin-Antikörper (IgG Maus) | Santa Cruz, Heidelberg |
| Monoklonaler Smad1,2,3-Antikörper (IgG Maus) | Santa Cruz, Heidelberg |
| Monoklonaler Smad4-Antikörper (IgG Maus) | Santa Cruz, Heidelberg |
| Monosteol [®] | Gatefossé, Saint-Priest, Frankreich |
| Mowiol | Calbiochem, Bad Soden/Ts |
| Miglyol [®] 812 | Caelo, Minden |
| Natriumazid | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Natriumchlorid, NaCl | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Natriumdodecylsulfat, SDS | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Natriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄ | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Natriumhydroxid, NaOH | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Natriumorthovanadat, Na ₃ VO ₄ | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Natriumpyruvat | Invitrogen, Karlsruhe |
| Nonidet P-40 | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Objektträger | Menzel-Gläser, Braunschweig |

| | |
|---|--|
| Oligodesoxynucleotide, ODN | TIP Molbiol, Berlin |
| Oligo(dT) 25-30-Primer | Invitrogen, Karlsruhe |
| Optimem | Invitrogen, Karlsruhe |
| Oregon Green [®] 488 Phalloidin | Invitrogen, Karlsruhe |
| Ortho-Phtaldialdehyd (OPA) | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Paraformaldehyd | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Penicillin | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Pertussistoxin, PTX | Calbiochem, Bad Soden/Ts |
| PD98058 | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung, Calcium- und Magnesium-frei | Invitrogen, Karlsruhe |
| Poloxamer 188 | BASF, Ludwigshafen |
| Polyklonaler PAI-1-Antikörper (IgG Maus) | Santa Cruz, Heidelberg |
| Polyklonaler Smad3-Antikörper (IgG Ziege) | Santa Cruz, Heidelberg |
| Polyklonaler Smad4-Antikörper (IgG Ziege) | Santa Cruz, Heidelberg |
| Polyvinyliden-difluorid (PVDF)-Transfermembran | Millipore, Eschborn |
| Precirol [®] ATO 5 | Gatefossé, Saint-Priest, Frankreich |
| Primer, spezifische | Roth, Karlsruhe |
| Probenpuffer Agarosegelelektrophorese | New England Biolabs, Frankfurt/M |
| Proteingrößenmarker | New England Biolabs, Frankfurt/M |
| Proteinstandards MMP-2 und MMP-9 | Biomol, Hamburg |
| QuickPrep [™] Micro-mRNA Purification Kit | Amersham, Buckinghamshire, U.K. |
| Reagenzgläser, Pyrex ,16 x 100 mm mit Deckel | Dunn Labortechnik, Ansbach |
| RNAasin [™] Ribonuklease-Inhibitor | MBI Fermentas, Litauen |
| Salzsäure, konzentriert | VWR Merck, Darmstadt |
| SB431542 | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Serumalbumin vom Rind, Fettsäure-frei (BSA) | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| SEW2871 | Calbiochem, Bad Soden/Ts |
| Silikonlösung in Isopropanol | Serva, Heidelberg |
| SiRNA-Transfektionsmedium | Santa Cruz, Heidelberg |
| SiRNA-Transfektionsreagenz | Santa Cruz, Heidelberg |
| SiRNA-Verdünnungspuffer | Santa Cruz, Heidelberg |
| Smad4-siRNA | Santa Cruz, Heidelberg |
| Sphingosin-1-Phosphat, S1P | Biomol, Hamburg |
| Sterilfilter Minisart [®] (0,22 µM) | Sartorius, Göttingen |
| Streptomycin | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| SuperScript [™] II Reverse Transcriptase | Invitrogen, Karlsruhe |
| N,N,N,N-Tetramethylenethylendiamin, TEMED | Biometra, Göttingen |
| Thermus "islandicus" (Thermoprime+) | Advance Biotechnologies Ltd, Epsom, Surrey, U.K. |
| DNA-Polymerase | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Transformierender Wachstumsfaktor-β1, TGF-β1 | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Tris Base | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Tris-HCl | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Triton X-100 | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Trypsin | Biochrom, Berlin |

| | |
|---|---------------------------------------|
| Tumor-Nekrose-Faktor- α , TNF- α | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Tween 20 | ICN, Eschwege |
| Vancomycin | Sigma/Aldrich, Deisenhofen |
| Zellkulturflaschen TPP (25 cm ² und 75 cm ²) | Biochrom, Berlin |
| Zellkulturplatten TPP, sechs-/zwölfloch | Biochrom, Berlin |
| Zellkulturschalen TPP, 10 cm | Biochrom, Berlin |
| Zellschaber | Renner, Dannstadt |
| Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml) | Biochrom, Berlin |
| Ziegenserum | DakoCytomation, Glostrup, Dänemark |

2.3 Nährmedien und Lösungen

2.3.1 Zellkultur-Medien

Keratinocyten-Medium

Für die Anzucht der Keratinocyten wurde Keratinocyten-Wachstumsmedium (KGM, 0,15 mM Calcium), für die Versuche sowohl KGM als auch Calcium-reduziertes KGM (0,05 mM Calcium) verwendet. Die Herstellung erfolgte aus Keratinocyten-Basalmedium (KBM, 0,15 mM Calcium) bzw. aus KBM 0,15 mM Calcium mit Calcium-freiem KBM im Verhältnis 1:2 durch Zugabe folgender Substanzen:

| | |
|----------------|------------------|
| 30 μ g/ml | BPE |
| 0,1 ng/ml | hEGF |
| 0,5 μ g/ml | Hydrocortison |
| 5 μ g/ml | Insulin |
| 50 ng/ml | Amphotericin B |
| 50 μ g/ml | Gentamicinsulfat |

Für siRNA-Versuche wurde antibiotikafreies KGM eingesetzt.

Fibroblasten-Medium

Die Anzucht der Fibroblasten erfolgte in DMEM Nutrition Mixture F 12 Ham unter Zugabe von:

| | |
|---------------|------------------|
| 10 % | FKS |
| 2 mM | L-Glutamin |
| 50 μ g/ml | Gentamicinsulfat |
| 250 ng/ml | Amphotericin B |

Am Vortag der Versuche wurden die Zellen auf FKS- und L-Glutamin-freies Fibroblasten-Basalmedium umgestellt. Für siRNA-Versuche wurde antibiotikafreies Medium eingesetzt.

2.3.2 Lösungen zur Zellkultivierung

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

| | |
|----------|----------------------------------|
| 0,2 g/l | KCl |
| 8,0 g/l | NaCl |
| 0,2 g/l | KH ₂ PO ₄ |
| 1,44 g/l | Na ₂ HPO ₄ |
| in | Aqua bidest. |

Antibiotikallösung

| | |
|-----------|------------------|
| 50 µg/ml | Gentamicinsulfat |
| 2,5 µg/ml | Amphotericin B |
| in | PBS |

Transportmedium

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

Trypsin-EDTA-Lösung

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

Stoppmedium

| | |
|------|------|
| 10 % | FKS |
| in | DMEM |

Einfriermedium

| | |
|------|------|
| 10 % | DMSO |
| 10 % | FKS |
| in | DMEM |

2.3.3 Oligonukleotide

DEPC-Wasser

0,1 % DEPC wurde deionisiertem Wasser über Nacht beigesetzt, anschließend erfolgte eine Autoklavierung. DEPC-Wasser diente zur Lösung der Oligonukleotide und zur Herstellung der Puffer, in denen diese eingesetzt wurden, da es durch Bindung an Histidin-Ketten im katalytischen Zentrum der RNAsen diese irreversibel inhibiert.

Oligodesoxynukleotide (ODN)

Für die Antisense-Untersuchungen wurden folgende Thioat-geschützte ODN der Firma TIP Molbiol verwendet:

Smad2/3 Antisense: 5'-GCAGGATGGACGACAT-3'

Smad2/3 Scrambled: 5'-GTGGACAGCTAGAGAC-3'

Die ODN (Synthesemaßstab 500 nM, OD 90) wurden in DEPC-Wasser zu einer Endkonzentration von 500 µM gelöst.

Primer

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden spezifische Primer (Tab. 2) der Firma Roth mit DEPC-Wasser zu einer Konzentration von 100 µM gelöst. Diese Stammlösungen wurden mit DEPC-Wasser zu Gebrauchslösungen mit einer Konzentration von 10 µM verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tab. 2: *Primer für die semiquantitative PCR*

| Produkt | Hin-Primer | Rück-Primer | bp |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|------|
| E-Cadherin | 5'-AGCCATGGGCCCTTGGAG-3' | 5'-CCAGAGGCTCTGTACCTTC-3' | 653 |
| Fibronectin | 5'-CGAAATCACAGCCAGTAG-3' | 5'-ATCACATCCACACGGTAG-3' | 639 |
| α-SMA | 5'-GCGTGGCTATTCTTCGTTAC-3' | 5'-CATAGTGGTGCCCCCTGATAG-3' | 331 |
| MMP-2 | 5'-TTCCCCTTCTTGTTCAATGG-3' | 5'-ATTTGTTGCCAGGAAAGTG-3' | 376 |
| MMP-9 | 5'-AGACCTGAGAACCAATCTCAG-3' | 5'-GGCACTGAGGAATGATCTAA-3' | 1100 |
| GAPDH | 5'-ATGCAACGGATTTGGTCGTAT-3' | 5'-TCTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3' | 221 |

2.3.4 Lösungen für Zellyse und Proteinbestimmung

Puffer zur Bestimmung von α -SMA, E-Cadherin, Fibronectin und PAI-1

| | |
|--------|------------------|
| 50 mM | Tris-HCl, pH 8,0 |
| 150 mM | NaCl |
| 1 mM | EDTA |
| 1 % | Nonidet P-40 |

supplementiert mit

| | |
|--------------|-----------|
| 1 mM | PMSF |
| 1 μ g/ml | Leupetin |
| 1 μ g/ml | Pepstatin |
| 1 μ g/ml | Aprotinin |

RIPA-Puffer

| | |
|--------|-------------------|
| 50 mM | Tris-HCl, pH 7,5 |
| 150 mM | NaCl |
| 1 % | Nonidet P-40 |
| 0,5 % | Desoxycholinsäure |
| 0,1 % | SDS |
| 1 mM | EDTA |

supplementiert mit

| | |
|--------------|---------------------------------|
| 1 mM | PMSF |
| 1 μ g/ml | Leupeptin |
| 1 μ g/ml | Pepstatin |
| 1 μ g/ml | Aprotinin |
| 1 mM | Na ₃ VO ₄ |
| 50 mM | NaF |

Bradford-Reagenz (5fach)

| | |
|--------|------------------------------------|
| 125 mg | Coomassieblau |
| 125 ml | Ethanol 96% |
| 250 ml | H ₃ PO ₄ 85% |
| 125 ml | Aqua bidest. |

Die Lösung wurde vor Gebrauch 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt.

2.3.5 Lösungen für Western Blot-Analyse und Zymographie

Trenngelpuffer (pH 8,8)

| | |
|--------|--------------|
| 1,88 M | Tris |
| 30 % | HCl 1 M |
| in | Aqua bidest. |

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,5 M Tris
 48% HCl 1 M
 in Aqua bidest.

Laufpuffer (pH 8,3)

14,4 mg/ml Glycin
 3,02 mg/ml Tris
 1 mg/ml SDS
 in Aqua bidest.

Blotpuffer (pH 8,3)

14,4g/ml Glycin
 3,00g/ml Tris
 in Aqua bidest.

Trenngele

| | | | |
|-----------------------------|--------|--------|--------|
| Polyacrylamidkonzentration | 12,5 % | 10 % | 7,5 % |
| Temed | 10 µl | 10 µl | 10 µl |
| Ammoniumpersulfat | 60 µl | 60 µl | 60 µl |
| Acrylamid/Bisacrylamid 40 % | 3,7 ml | 3,0 ml | 2,3 ml |
| Trenngelpuffer | 2,4 ml | 2,4 ml | 2,4 ml |
| SDS-Lösung 1 % | 1,2 ml | 1,2 ml | 1,2 ml |
| Aqua bidest. | 4,7 ml | 5,4 ml | 6,1 ml |

Zymographiegel (Polyacrylamid 7,5% mit Gelatine 0,25%)

10 µl Temed
 60 µl Ammoniumpersulfat
 2,3 ml Acrylamid/Bisacrylamid 40 %
 2,4 ml Trenngelpuffer
 1,2 ml SDS-Lösung 1 %
 3 ml Gelatine-Lösung 1%
 3,1 ml Aqua bidest.

Sammelgel (Polyacrylamid 5 %)

4 µl Temed
 20 µl Ammoniumpersulfat
 0,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid 40 %
 0,8 ml Sammelgelpuffer
 0,4 ml SDS-Lösung 1 %
 2,3 ml Aqua bidest.

TBST-Puffer

2 mM Tris (pH 7,4)
15 mM NaCl
0,05 % Tween 20
in Aqua bidest.

Blockpuffer

5 % Magermilchpulver in TBST

Inkubationspuffer (pH 7,5)

50 mM Tris-HCl
200 mM NaCl
10 mM CaCl₂
0,02 % Brij 35

Coomassie-Färbelösung

2,5 g Coomassieblau
100 ml Eisessig
200 ml Methanol
200 ml Aqua bidest.

Entfärbungslösung

200 ml Eisessig
400 ml Methanol
400 ml Aqua bidest.

2.3.6 Lösungen für die Elektrophorese von Agarose-Gelen

TBE-Puffer (pH 8)

445 mM Tris
445 mM Borsäure
10 mM EDTA

Agarosegel:

2 g Agarose (Elektrophoresegrad), gekocht in 100 ml TBE Puffer

2.3.7 Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie

IHC-Blocklösung

| | |
|-----------|------------------|
| 2 % | Ziegenserum |
| 1 % | BSA |
| 0,1 % | Triton X-100 |
| 0,05 % | Tween 20 |
| 0,05 % | NaN ₃ |
| in 0,01 M | PBS |

Mowiol-Lösung (pH 7,4)

| | |
|-------|--------------|
| 6 g | Glycerol |
| 2,4 g | Mowiol |
| 6 ml | Aqua bidest. |
| 12 ml | Tris 0,2 M |

2.3.8 Lösungen für die HPLC

Derivatisierungsmischung

| | |
|----------|--|
| 1 mg/ml | ortho-Phtaldialdehyd |
| 1 µl/ml | 2-Mercaptoethanol |
| 20 µl/ml | Ethanol |
| in | Borsäure 3 % (pH 10,5 eingestellt mit KOH) |

2.3.9 Lösungen der Testsubstanzen

S1P und Dihydro-S1P wurden in Methanol zu 5×10^{-4} M gelöst und bei -80 °C gelagert.

Für chromatographische Bestimmungen wurden die Stammlösungen vor den Versuchen mit Methanol verdünnt.

Für Zellkulturexperimente mit S1P wurde das Methanol der Stammlösung unter Stickstoff abgedampft, der Rückstand mit 0,4 % BSA in PBS (sterilfiltriert) aufgenommen und zur vollständigen Lösung für 3 min unter Eiskühlung in einem Ultraschallbad behandelt. Die eingesetzte Verdünnung betrug 10^{-4} M, aus dieser wurden weitere Verdünnungen mit 0,4 %iger BSA-Lösung hergestellt.

TGF- β wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,1 % BSA in 4 mM HCl/PBS gelöst und wie die Stammlösungen von FTY720 und LPA (jeweils 5×10^{-4} M in Aqua bidest.) aliquotiert bei -80°C gelagert. TNF- α wurde zu 10 $\mu\text{g/ml}$ in 1 % BSA in PBS aufgenommen und aliquotiert unter Lichtausschluss bei -80°C gelagert. SEW2871 wurde zu 5×10^{-3} M in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und bei -20°C gelagert. Gefriergetrocknetes PTX wurde in Aqua bidest. zu 100 $\mu\text{g/ml}$ gelöst und bei 4°C gelagert. PD98058 wurde in einer Stammkonzentration von 50 μM in DMSO gelöst und wie die Stammlösung von SB431542 (10 $\mu\text{g/ml}$ in DMSO) aliquotiert bei -20°C gelagert.

Unmittelbar vor Testbeginn wurden die in dem Experiment benötigten Konzentrationen durch Verdünnung mit Medium hergestellt. In den Kontrollexperimenten wurden entsprechende Lösungsmittelmengen eingesetzt.

2.4 Methoden

2.4.1 Gewinnung und Kultivierung humaner epidermaler und dermaler Zellen

Keratinocyten

Humane epidermale Keratinocyten wurden aus juveniler Vorhaut isoliert, die bei Zirkumzisionen in der kinderchirurgischen Ambulanz der Berliner Ärzte Dr. Jung, Dr. Knoblauch, Dr. Schildknecht sowie dem St. Joseph-Krankenhaus, Berlin Tempelhof, anfiel und dem Arbeitskreis nach Genehmigung durch die Ärztekammer Berlin zur Verfügung gestellt wurde. Diese Hautstücke wurden nach den Operationen im Transportmedium gekühlt befördert und anschließend 1 h bei 37°C oder alternativ 12 h über Nacht bei 4°C in Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Nach Beendigung der Enzymreaktion durch Stoppmedium erfolgte die Isolierung der Keratinocyten durch Schwenken der Hautstücke mit Hilfe einer Pinzette in Stoppmedium und PBS. Die Keratinocyten suspension wurde mit einer Pipette homogenisiert, in sterile 15-ml-Röhrchen überführt und bei 300 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes, Resuspension des Pellets in kalter PBS-Lösung und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in KGM resuspendiert und in Zellkulturflaschen mit vorgewärmtem Medium eingesät. Die so

gewonnenen Keratinozyten wurden als Zellen der nullten Passage bezeichnet und bei 37 °C, 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchte kultiviert.

Fibroblasten

Fibroblasten wurden aus dem verbliebenen, hauptsächlich aus Korium bestehenden Hautstück durch weitere Trypsinierung für 10 min bei 37 °C gewonnen. Die Zellen wurden anschließend abgekratzt, filtriert, nach Zentrifugation in Fibroblasten-Wachstumsmedium aufgenommen und bei 37 °C, 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchte kultiviert.

Passagierung

Nachdem ein Konfluenzgrad von etwa 50 - 70 % erreicht war (üblicherweise nach sieben bis zwölf Tagen), wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung bis zum Ablösen der Zellen im Brutschrank inkubiert. Die Zugabe von 6 ml Stoppmedium beendete die Enzymreaktion, die Zellen wurden mit einer Pipette homogenisiert, in 15-ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C). Nach einem Waschvorgang mit PBS wurden sie erneut in Wachstumsmedium resuspendiert, in 25-cm²-Zellkulturflaschen mit 10 ml vorgelegtem Wachstumsmedium ausgesät und als Zellen der ersten Passage bezeichnet. Die Verbreiterung erfolgte jeweils im Verhältnis 1:3. Für alle Experimente wurden Keratinozyten bzw. Fibroblasten von mindestens drei Spendern vereinigt. Keratinozyten wurden lediglich bis zur dritten Passage verwendet, da ihre Teilungsfähigkeit später sinkt. Fibroblasten weisen in Kultur eine längere Lebensdauer auf als Keratinozyten und teilen sich häufig, so dass sie bis zur fünften Passage verwendet wurden.

Quantifizierung und Einsaat von Zellen für Versuche

Für die Wachstumsgeschwindigkeit kommt der bei der Einsaat eingesetzten Zellzahl eine große Bedeutung zu. Zu dünn ausgesäte Zellen wachsen aufgrund des mangelnden Zell-Zell-Kontaktes langsamer, andererseits erforderten manche Versuche eine geringe Konfluenz, die einen Tag nach der Aussaat erreicht werden sollte. Für die Zählung einer Zellsuspension stand ein Hämozytometer (Neubauer Zählkammer) zur Verfügung. Nachdem das Deckgläschen unter Ausbildung von Newtonringen auf die Zählkammer gedrückt worden war, wurde ein Tropfen der gut

homogenisierten Zellsuspension in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Zählkammer gefüllt. Die Zellzahl pro ml wurde bestimmt, indem vier große Quadrate ausgezählt, der Mittelwert berechnet und mit 10^4 multipliziert wurde. So konnten definierte und identische Volumen der Zellsuspension für die jeweiligen Versuche in gleiche Mengen vorgelegten Mediums eingesät werden.

2.4.2 Ausschaltung des Smad-Wegs

Antisense-Untersuchungen

Das Prinzip der Antisense-Anwendung besteht in der Translationshemmung eines Proteins durch eine ODN-Sequenz, die komplementär an die mRNA bindet und mit ihr eine kurze doppelsträngige Region ausbildet. Somit stellt das ODN eine Antisense-Struktur zu einer bestimmten mRNA-Sequenz (sense) des betreffenden Proteins dar. Spezifische Antisense-ODN wurden so konstruiert, dass sie im Bereich der Initiationsstelle angreifen, da dies normalerweise zu der effektivsten Inhibierung der Translation führt. Als Kontrolle diente ein ODN bestehend aus identischen Nukleotiden in willkürlicher Sequenz (Scrambled-ODN). ODN werden aufgrund der im Medium enthaltenen Nukleasen sehr schnell abgebaut. Der Einbau von Phosphothioatgruppen führt zu einer entscheidenden Verlängerung der Halbwertszeit, weil ein nicht-bindendes Sauerstoff- durch ein Schwefelatom ersetzt wird. Für Antisense-Untersuchungen wurden Fibroblasten in Wachstumsmedium in einer Zelldichte von ca. 13.000 Zellen/cm² in Sechsllochplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Basalmedium transfiziert. Dazu wurden zu einer entsprechenden Menge Optimem die ODN zugegeben und dann FuGENE 6-Transfektionsreagenz zugesetzt, so dass das Volumenverhältnis der ODN zum Endvolumen 1:50 betrug. FuGENE 6 wurde im Verhältnis 2:1 zur DNA eingesetzt (1 µg DNA entspricht 2 µl FuGENE 6). Nach 15 min Inkubation wurden jeder Versuchsschale 100 µl des Transfektionsmix zugesetzt, die ODN-Endkonzentration betrug 500 nM. Die behandelten Zellen wurden für vier Tage im Brutschrank inkubiert. Zur Kontrolle einer effektiven Ausschaltung des Proteins wurde die Expression mittels Western Blot-Analytik bestimmt.

siRNA-Untersuchungen

Eine weitere, effiziente Methode zur Ausschaltung von Zielgenen ist die Behandlung der Zellen mit spezifischen kleinen interferierenden RNA-Molekülen (siRNA). SiRNAs sind kurze Stränge, die RNA-Interferenz vermitteln, einen natürlich ablaufenden Mechanismus zur selektiven Hemmung und Regulation spezifischer Gene. Sie entstehen aus langer, doppelsträngiger RNA, die vom RNase-III-Typ-Enzym, dem so genannten *Dicer*, in 21 bis 28 Nukleotide zerteilt wird. Die siRNA bildet mit Proteinen den RNA-induzierten *Silencing-Complex*, dieser lagert sich an komplementäre Sequenzen der mRNA an und baut sie schließlich ab. Als Kontrolle dient ein Nukleotidduplex gleicher Größe mit zufälliger Sequenz, der selbst nicht zum spezifischen Abbau einer bekannten zellulären mRNA führt. Die siRNA wurde in siRNA-Verdünnungspuffer (Tris-EDTA in RNase-freiem Aqua bidest., pH 8, Santa Cruz) gelöst. Für siRNA-Untersuchungen mit Fibroblasten wurde siRNA-Transfektionsreagenz und siRNA-Transfektionsmedium der Firma Santa Cruz eingesetzt. Die Fibroblasten wurden mit einer Zelldichte von ca. 20.000 Zellen/cm² in antibiotikafreiem Wachstumsmedium in Sechsllochplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf antibiotikafreies Basalmedium umgesetzt und transfiziert. Dazu wurden siRNA und siRNA-Transfektionsreagenz (im gleichen Volumenverhältnis) jeweils getrennt zum siRNA-Transfektionsmedium zugegeben, nach 5 min Inkubationszeit wurden beide Ansätze vorsichtig gemischt. Nach weiteren 20 min Inkubation wurde jede Versuchsschale mit 100 µl Transfektionsmix versetzt, die Endkonzentration der siRNA betrug 25 nM. Es folgte die Inkubation der behandelten Zellen für 36 h im Brutschrank. Keratinozyten wurden ebenfalls in antibiotikafreiem Wachstumsmedium ausgesät (10.000 - 12.000 Zellen/cm²) und transfiziert. Da das siRNA-Transfektionsreagenz toxisch auf Keratinozyten wirkt, wurde stattdessen FuGENE 6 im Verhältnis 6:1 zur DNA eingesetzt. Die effektive siRNA-Konzentration betrug 25 - 50 nM bei einer Inkubationsdauer von 36 - 48 h. Die Reduktion der Protein-Expression wurde mittels Western Blot-Analytik nachgewiesen.

2.4.3 Analyse der mRNA-Transkription

mRNA-Isolierung

Die mRNA aus Keratinozyten wurde mit Hilfe des kommerziellen QuickPrep Micro-mRNA Aufreinigungskits der Firma Amersham nach Herstellerangaben isoliert. Hierzu wurden die Zellen zunächst gesplittet und 1 ml einer Zellsuspension (4×10^6 Zellen in PBS) in ein 2-ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 10.000 g wurde der Überstand verworfen und 400 µl Extraktionspuffer (enthält Guanidium-Thiocyanat und N-Lauryl-Sarkosin) zum Pellet gegeben. Hierdurch erfolgte der Aufschluss der Zellen sowie die Inhibition endogener RNAsen. Nach Erhalt einer homogenen Suspension wurde der Ansatz mit 800 µl Elutionspuffer (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA) verdünnt und bei 10.000 g zentrifugiert. 1 ml des Überstands wurde auf Oligo(dT)-beschichtete Cellulosepartikel gegeben, an die die polyA-haltige mRNA adsorbieren konnte. Die mit mRNA beladenen Cellulosepartikel wurden in eine MikroSpin-Säule überführt, fünfmal mit 1 ml Puffer hoher Salzkonzentration (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,5 M NaCl) und dreimal mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,1 M NaCl) gewaschen, anschließend erfolgte die Elution der mRNA mit 400 µl warmem Elutionspuffer bei 70 °C.

Zur Quantifizierung der mRNA wurde das gesamte Eluat in Quarzküvetten überführt. Diese wurden zur Zerstörung von RNAsen zuvor 1 h in eine 1:1 Mischung aus konzentrierter Salzsäure und Methanol eingelegt und mehrmals mit DEPC-Wasser gespült. Aus der UV-Absorption bei 260 nm konnte die RNA-Konzentration wie folgt berechnet werden:

$$[\text{RNA}] \mu\text{g/ml} = \text{Abs}_{260} \times 40$$

Nach der Messung erfolgte die Aufkonzentrierung der mRNA durch Ethanol-fällung. Hierzu wurde das mRNA-Eluat mit 10 µl Glycogen-Lösung (10 mg Glycogen in DEPC-Wasser) und 40 µl 2,5 M Kaliumacetat-Lösung pH 5 versetzt und mit 1 ml eiskaltem absoluten Ethanol durch Lagerung bei -20 °C für 1 h zur Fällung gebracht. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in Elutionspuffer aufgenommen und durch Zugabe einer entsprechenden Menge an Elutionspuffer eine mRNA-Konzentration von 100 - 200 ng/µl eingestellt, wobei eine 70 %ige Ausbeute bei der RNA-Fällung zugrunde gelegt wurde.

cDNA-Synthese

Für die Synthese einzelsträngiger cDNA wurden je Reaktion 1 - 2 µg mRNA zunächst mit 1 µl (1 pM) Oligo(dT)-Primern versetzt, für 3 min bei 80 °C denaturiert und anschließend für 10 min bei 37 °C abgekühlt. Die daraufhin zugegebene Reaktionsmischung enthielt 4 µl fünffach konzentrierten Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 2 µl DTT 0,1 M, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM Lösungen von dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 µl RNasin Ribonuklease-Inhibitor und 1 µl (200 u) Superscript Reverse Transkriptase. Die Negativkontrollen enthielten anstelle der Superscript Reversen Transkriptase 1 µl DEPC-Wasser. Die reverse Transkription erfolgte durch 1,5 h Inkubation bei 37 °C, daran schloss sich eine Inkubation für 10 min bei 37 °C mit 20 µl NaOH-Lösung (0,4 M) an, wodurch die noch enthaltene mRNA inaktiviert wurde. Nach Neutralisation mit 20 µl Tris-HCl-Lösung (1 M, pH 7,5) konnte die erhaltene cDNA bei -20 °C für mehrere Monate gelagert werden.

PCR

2 µl der cDNA-Lösung diente als Matrize für die PCR, die Reaktionsmischung setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl Mischung der jeweiligen spezifischen Primer (5 µM), 5 µl zehnfach konzentrierter Reaktionspuffer (200 mM (NH₄)₂SO₄; 750 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % V/V Tween 20), 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 3 µl MgCl₂-Lösung (25 mM), 0,25 µl Thermus "islandicus" DNA-Polymerase (1,25 u), ergänzt auf 50 µl mit DEPC-Wasser.

Die Reaktionsmischung wurde zu Beginn zur Denaturierung der Matrizen-DNA für 1 min auf 94 °C erhitzt, daraufhin wurde 30- bis 35-mal folgender Zyklus gefahren:

- | | |
|-----------------|--|
| 1 min bei 94 °C | Denaturierung |
| 1 min bei 55 °C | Anlagerung der Primer |
| 2 min bei 72 °C | Polymerisation und Synthese der neuen komplementären DNA |

Eine abschließende Polymerisationsphase von 2 min bei 72 °C diente der Ergänzung der begonnenen DNA-Stränge. Die Reaktion wurde durch Abkühlung auf 4 °C für 1 s beendet. Um Verunreinigungen durch genomische DNA bei der RNA-Extraktion auszuschließen, wurden Reaktionsansätze ohne reverse Transkriptase mitgeführt. In

diesen Negativkontrollen durften keine Reaktionsprodukte gefunden werden. Die amplifizierte DNA wurde anschließend in 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt und nach interkalierender Ethidiumbromid-Färbung im UV-Durchlicht bei 254 bzw. 366 nm im Transilluminator mit der Software BioDocAnalyse detektiert.

2.4.4 Proteindetektion mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot-Analytik und Zymographie

Zellyse

Fibroblasten oder Keratinozyten wurden in einer Zelldichte von 10.000 - 20.000 Zellen/cm² in Sechslöchplatten eingesät. Nach der Stimulationszeit wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit dem Lysepuffer 15 min auf Eis auf einem Schaukelschüttler inkubiert. Die Medienüberstände wurden gegebenenfalls für die Zymographie verwendet oder bei -80 °C für eine Analyse zu späterem Zeitpunkt gelagert. Nach Abschaben der Zellen von den Versuchsschalen und Überführung in Eppendorfgefäße wurden die Lysate 30 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert, aus den Überständen wurde der Proteingehalt bestimmt und die Proteindetektion durchgeführt.

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Lysate erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Bradford, die auf einem Farbumschlag von Coomassieblau von braunrot nach braungrün bei Bindung an Protein beruht. Anhand der Extinktion bei 595 nm wurde eine Standardkurve mit BSA (0 - 20 µg) erstellt. Die verschiedenen Volumina der BSA-Lösung (50 µg/100 µl Aqua bidest.) wurden mit 5 µl des jeweiligen Lysepuffers und Aqua bidest. zu 100 µl ergänzt und mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt. Für die Proteinbestimmung wurden 5 µl Zelllysat, 95 µl Aqua bidest. und 1 ml Bradford-Reagenz gemischt. Für die Umrechnung der Extinktionswerte in den Proteingehalt der Proben wurde die Standardkurve durch lineare Regressionsanalyse ermittelt.

Probenaufbereitung für die Western Blot-Analyse und die Zymographie

Für die Western Blot-Analyse wurden die einer Proteinmenge von 5 - 20 µg äquivalenten Volumina mit dem Lysepuffer auf gleiche Konzentrationen eingestellt.

Anschließend wurden die Lysate mit dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer, dem das reduzierende Agens Dithiothreitol (DTT) zur Spaltung der Disulfidbrücken zugesetzt wurde, im Verhältnis 2:1 vermischt und zur Denaturierung der Proteine 3 - 5 min auf 95 °C erhitzt. Die so aufbereiteten Proben wurden direkt verwendet oder bei -80 °C gelagert.

Für die Zymographie wurden die Mediumüberstände der Zellen verwendet. Äquivalente Mengen (30 - 40 µl) wurden mit SDS unter nicht-reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen mit dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer im Verhältnis 2:1 vermischt und direkt für die Gelelektrophorese verwendet.

SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Zelllysate-Proben anhand ihres Molekulargewichts erfolgte in 7,5 - 12,5 %igen Polyacrylamid-Trenngelen, denen Sammelgele mit 5 % Polyacrylamid vorgeschaltet waren. Zur Zymographie wurden 7,5 %ige Polyacrylamidgele eingesetzt, die 0,25 % Gelatine enthielten. Die Auftrennung der Proben erfolgte mit 35 mA im Sammelgel und 55 mA im Trenngel (bei der Zymographie wurde im Trenngel eine konstante Spannung von 200 V angelegt) in einer mit 500 ml Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer.

Western Blot von Smad4, E-Cadherin, α -SMA, Fibronectin und PAI-1 aus Zelllysaten

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden zur Immundetektion auf Polyvinyliden-difluorid (PVDF)-Membranen übertragen. Um einen optimalen Transfer zu gewährleisten, mussten die Membranen zunächst mit Methanol hydrophobisiert und zusammen mit dem Gel in Blotpuffer equilibriert werden. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 100 mA über Nacht in einem Tank-Blot, der mit 1.100 ml Blotpuffer gefüllt war. Zur Absättigung der unspezifischen Bindungen wurde die Membran im Anschluss 1 h in einer 5 %igen Magermilchlösung in TBST bei 37 °C geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran mit der primären Antikörperlösung versetzt, um die Zielproteine spezifisch zu markieren. Primärantikörperlösungen gegen Smad4, Fibronectin und PAI-1 wurden in einer 1:1.000-Verdünnung in Aqua bidest. eingesetzt, die Behandlung erfolgte 2 h bei Raumtemperatur (RT). Anti-E-Cadherin- und Anti- α -SMA-Antikörper wurden 1:2.000 bzw. 1:4.000 in Aqua bidest. verdünnt und die Membran 1 h bei RT inkubiert. Zur

Entfernung des überschüssigen Primärantikörpers wurden die Membranen dreimal in TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion durch Inkubation für 1 h bei RT mit einer Sekundärantikörperlösung aus 1:1.000 verdünntem Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper in Blocklösung. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit Lumineszenzfarbstoff (Verdünnung 1:20) sowie Peroxid-Lösung (Verdünnung 1:20) des LumiGlo-Kits für 1 min benetzt. Dies führte in den Bereichen, wo der sekundäre Antikörper binden konnte, zu einer Chemolumineszenz, die einen Röntgenfilm in einer Expositionskassette schwarz färbte.

Zymographie von Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9

Im Gegensatz zur herkömmlichen SDS-PAGE enthielt das Zymographiegel zusätzlich Gelatine, so dass in den Proben enthaltene Gelatinasen (MMP-2, MMP-9) oder ihre Vorstufen, die durch SDS aktiviert wurden, das Substrat enzymatisch abbauen konnten. Hierzu wurden die Gele nach der Elektrophorese zur Entfernung des SDS zweimal 30 min bei RT in einer 2,5 % Triton X-100-Lösung gewaschen. Nach 5 min Waschen mit Aqua bidest. wurde das Gel über Nacht bei 37 °C im Inkubationspuffer geschüttelt, da die enzymatische Wirksamkeit der Gelatinasen unter diesen Bedingungen am höchsten ist. Die Färbung erfolgte 4 h bei RT in Coomassie-Färbelösung. Dort, wo die Gelatine abgebaut worden war, bildeten sich in dem ansonsten blau gefärbten Gelatinegel helle Banden. Es schloss sich für 2 - 3 h eine Behandlung mit Entfärbungslösung an, bei der unter mehrmaligem Wechsel der Lösung die Gele so entfärbt wurden, dass sich die Banden deutlich von dem blauen Hintergrund abhoben. Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9 wurden anhand von Protein-Standards detektiert.

Quantifizierung der Western Blots und Zymogramme

Zur Abschätzung der Bandenstärke bei Western Blot-Analyse und Zymographie erfolgte die Vermessung der Banden mit der AxioVision Software, bei der die Intensität der Fläche bestimmt wurde. Da die absolute Bandenintensität bei unterschiedlichen Versuchen variierte, wurde sie in Relation zur jeweiligen Kontrolle angegeben.

2.4.5 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Die Einsaat von Keratinozyten erfolgte in Zwölflochplatten mit eingesetzten Deckgläsern in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/Loch. Am nächsten Tag wurden die Zellen stimuliert und nach drei bis fünf Tagen mit eiskaltem PBS zweimal gewaschen. Es folgte die Fixierung mit 3,7 %iger Formaldehydlösung für 10 min, daran schloss sich nach zweimaligem Waschen mit PBS die Permeabilisierung mit einer 0,1 % Triton X-100-Lösung für 5 min an. Die Zellen wurden wiederum zweimal mit PBS gewaschen und für 20 min mit der IHC-Lösung geblockt. Nach zweimaligem Waschen mit einer 1 % BSA/PBS-Lösung wurden die Zellen für 30 min mit einer primären Antikörperlösung (1:500 in 1 %iger BSA/PBS-Lösung) behandelt. Zur Entfernung der überschüssigen Antikörperlösung wurden die Zellen wiederum dreimal mit 1 %iger BSA/PBS-Lösung gewaschen und dann unter Lichtausschluss mit einer Sekundärantikörperlösung (1:500 in 1 %iger BSA/PBS-Lösung) 30 min lang inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Anti-Maus-IgG-Antikörper gekoppelt mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) verwendet; schloss sich allerdings eine Färbung mit Oregon Green 488 Phalloidin an, das ebenfalls im grünen Bereich fluoresziert, wurde alternativ ein Anti-Maus-IgG-Antikörper mit dem rot fluoreszierendem Konjugat Carbocyanin 3 (Cy3) verwendet. In diesem Fall wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS für 20 min unter Lichtausschluss mit einer Oregon Green 488 Phalloidin-Lösung ($0,85 \mu\text{M}$) inkubiert. Nach dem letzten Färbeschritt wurden die Zellen abschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden aus der Zwölflochplatte entfernt, nach 15 min Lufttrocknung mit $10 \mu\text{l}$ Mowiol-Lösung auf Objektträgern fixiert und unter Lichtausschluss gelagert. Die mikroskopische Aufnahme erfolgte am Olympus BX41, ausgestattet mit der Digitalkamera Nikon DXM1200 und AxioVision Software.

2.4.6 Untersuchungen topischer S1P-Zubereitungen

Herstellung S1P-haltiger SLN

Zur Produktion fester Lipidnanopartikel (solid lipid nanoparticles, SLN) mit 0,05 % S1P wurden 12,5 % Compritol als Lipidphase, NaOH-Lösung (10 mM) als wässrige

Phase und 2,5 % Poloxamer 188 als Emulgator eingesetzt. S1P wurde in der wässrigen Phase, in der auch der Emulgator solubilisiert wurde, durch Erhitzen bei 90 °C gelöst und mit der auf gleiche Temperatur gebrachten aufgeschmolzenen Fettphase für 30 s im Ultra-Turrax bei 9.500 U/min vorhomogenisiert. Es folgten drei Zyklen im Heißhomogenisator, die erhaltenen Produkte wurden bei 20 °C abgekühlt.

Charakterisierung der S1P-haltigen SLN

Die laserdiffraktometrischen Messungen erfolgten im wässrigen Dispersionsmedium. Für Messungen mit dem Photonenkorrelationsspektroskop wurden die Proben mit destilliertem Wasser auf eine empfohlene Streulichtintensität verdünnt, um Mehrfachstreuungen zu reduzieren. Die Gesamtmesszeit betrug 200 s (10 Einzelmessungen à 20 s), gemessen wurde in einem Winkel von 90 °.

Gehaltsbestimmung von S1P

Zur Bestimmung von S1P aus S1P-haltigen SLN mittels HPLC wurden die SLN mit Aqua bidest. 1:100 verdünnt und extrahiert. Die bei der Extraktion und chromatographischen Analytik verwendeten Glasgeräte wurden vor ihrer Anwendung zweimal mit einer Silikonlösung benetzt und anschließend bei 125 °C getrocknet. 100 µl der wässrigen Lösung sowie der interne Standard Dihydro-S1P wurden zu 1 ml einer 0,25 %igen HCl/Methanol-Lösung gegeben. Nach Zugabe von 1 ml NaCl-Lösung (1 M), 100 µl NaOH-Lösung (3 M) und 1 ml CHCl₃ wurden im Anschluss an intensives Vortexen durch 5 min Zentrifugation bei 450 g die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die organische Phase ein weiteres Mal mit 0,5 ml Methanol, 0,5 ml NaCl-Lösung (1 M) und 50 µl NaOH-Lösung (3 M) extrahiert. Nach Vereinigung der wässrigen Phasen wurden diese mit 1,5 ml CHCl₃ und 100 µl HCl versetzt und intensiv gevortext. Durch 5 min Zentrifugation bei 50 g wurden die Phasen getrennt und die organische Phase abgenommen. Die wässrige Phase wurde erneut mit 1,5 ml CHCl₃ extrahiert und die vereinten organischen Phasen bei 45 °C in der Vakuumzentrifuge eingedampft. Der Rückstand wurde in 275 µl eines Gemisches aus K₂PO₄ (0,07 M)/Methanol (2:8) aufgenommen und mit 25 µl der Derivatisierungsmischung versetzt. Nach 15 min Inkubationszeit unter Lichtausschluss bei 4 °C, in der die primäre Aminogruppe der Sphingolipide mit ortho-Phtaldialdehyd und 2-Mercaptoethanol zum entsprechenden Isoindolderivat

umgesetzt wurde, erfolgte die chromatographische Trennung mit folgendem Gradienten:

| 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 |
| 56 | 0 | 100 |
| 60 | 24 | 76 |

Die Fließgeschwindigkeit betrug dabei 1,3 ml/min. Es wurde eine mit Kromasil gefüllte Reversed-Phase-Säule (RP-18) verwendet, die im Säulenofen auf 35 °C temperiert wurde. 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.

2.4.7 Statistik

Die Ergebnisse wurden in allen Fällen in mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Untersuchungen verifiziert. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) von mindestens drei Versuchen bzw. Dreifachbestimmungen. Konnte die Homogenität der Varianzen mittels F-Test bewiesen werden, wurde die Signifikanz mit dem Student'schen t-Test geprüft; erwiesen sich die Varianzen als inhomogen, wurde der Welch-Test zur Signifikanz-Analyse herangezogen. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.