

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Geräte

1040A-HPLC-Detection System,	Hewlett-Packard, Böblingen, BRD
Analysenwaage Typ BP 110 und BP 210 D,	Sartorius, Göttingen, BRD
Auto-Injector SIL-10 AXL,	Shimadzu, Japan
CO ₂ -Brutschrank Typ BB6220CU und Cytoperm,	Heraeus, Hanau, BRD
Communications Bus Modul CBM-10 A,	Shimadzu, Japan
Computer Hewlett Packard 9000,	Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, BRD
Dioden Array Detektor SPD-M10 AVP,	Shimadzu, Japan
Dounce-Homogenisator 10 ml und 50 ml,	Wheaton, USA
Durchfluß-Zytometer FACScan,	Becton Dickinson, San Jose, USA
Elektrophoreseeinheit, Model S2,	Biometra, Göttingen, BRD
Eppendorffzentrifuge Typ 5404R und Typ 5417R,	Eppendorf, Hamburg, BRD
Gas-Chromatograph GC-14A und GC-17A,	Shimadzu, Japan
Gas-Chromatograph-Massen-Spektrometer GCMS-QP2000 und -aP5050A,	Shimadzu, Japan
Gelimager BioDocAnalyse System,	Biometra, Göttingen, BRD
Geltrockner Mididry Typ D62,	Biometra, Göttingen, BRD
Laminarbox, Antares 48,	COTECH Vertrieb GmbH, Berlin, BRD
Liquid-Chromatograph LC-10 AT und LC-6A,	Shimadzu, Japan
Luminometer TD-20/20,	Turner Designs, Sunnyvale, USA
Lyophilisator System,	Labconco, Missouri, USA
Messerhomogenisator Ultraturax T25,	Janke&Kunkel, IKA-Labortechnik, BRD
Mikrowellenherd,	Bosch, Stuttgart, BRD
Mini Hybridisations Ofen,	Biometra, Göttingen, BRD
Neubauer-Zählkammer,	Brand Gläser, Wertheim, BRD
Phasenkontrastmikroskop, Modell CK2,	Olympus, Japan
pH-Meter Typ 761,	Calimatic, Knick, BRD
Realtime Thermocycler DNA Engine Opticon® 2,	MJ Research, Inc, über Fa. Biozym Diagnostik, Hessisch-Oldendorf, BRD
Realtime Thermocycler Rotor-Gene RG 3000,	Corbett Research, Sydney, Australien
RF-5001 PC Spektrofluorophotometer,	Shimadzu, Japan

Rotationsverdampfer Typ B-168,	Büchi, Flawil, Schweiz
Semi-Dry-Blot-System,	cti GmbH, Idstein, BRD
Sterilbank Modell Antair BSK 4-MP,	COTECH Vertrieb GmbH, Berlin, BRD
Stromversorgungsgeräte Power Pack P25,	Biometra, Göttingen, BRD
T3 Thermocycler,	Biometra, Göttingen, BRD
Transilluminator,	Biometra, Göttingen, BRD
Ultraschallbad Sonorex Super, Typ RX 512H,	Badelin, Berlin, BRD
Ultraschallgenerator Labsonic U, Typ 853972/3,	B. Braun, Melsungen, BRD
UV-Spektrophotometer (160A, 2100, 2102PC),	Shimadzu, Japan
Wärmeschrank,	Stuart Scientific, Surrey, UK
Chiralcel OD 4,6X150 mm, 5 µm,	Daicel Chemical Industries, Osaka, Japan
Nukleosil 1005C ₈ , Nukleosil 100-7C ₁₈ ; 5-C ₁₈ -AB,	Macherey-Nagel, Düren, BRD
Zorbax Sil 4,6X250 mm, 5 µm,	Dupont Instruments, Delaware, USA

2.1.2. Verbrauchsmaterial

- 6- und 24-Loch-Zellkulturplatten,	Greiner, Nürtingen, BRD
- Deckgläser (Ø 1,2 cm),	Menzel Gläser, Braunschweig, BRD
- Einfrierkästen,	National Lab, Mölln, BRD
- Einfrierröhrchen,	Nunc, Wiesbaden, BRD
- Einmalkanülen G18; G20 (0,9 mm),	Neobject, Gelnhausen, BRD
- Einmalspritzen,	Braun, Melsungen, BRD
- Falcon Gewebekulturflaschen 25 und 75 cm ² ,	Becton Dickinson, Heidelberg, BRD
- Falcon Gewebekulturschalen (Ø3, 6 und 10 cm),	Becton Dickinson, Heidelberg, BRD
- Falcon sterile Plastikröhrchen 15 ml,	Becton Dickinson, Heidelberg, BRD
- Falcon sterile Plastikröhrchen 50 ml,	Becton Dickinson, Heidelberg, BRD
- Filterpapier,	Amersham Biosciences, Freiburg, BRD
- Hyperfilm ECL 5x7 inch und MP 35x43 cm,	Amersham Biosciences, Freiburg, BRD
- Nitrozellulose Blot-Membran 0,2 µm,	Sartorius, Göttingen, BRD
- Nitrozellulose-Membran NC 45,	Serva, Heidelberg, BRD
- Objektträger,	Menzel Gläser, Braunschweig, BRD
- Parafilm [®] ,	American National Can TM , Neeah, USA
- Polystyren-Einmalpipetten, 5, 10 und 25 ml,	Becton Dickinson, Heidelberg, BRD
- Reaktionsgefäße 0,5; 1,5 und 2,0 ml,	Sarstedt, Braunschweig, BRD
- Sterilfilterhalter 0,2 µm FP 030/3,	Schleicher & Schuell, Dassel, BRD

2.1.3. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern hier nicht anders angegeben, von der Firma Sigma (Deisenhofen, BRD) bezogen:

- | | |
|---|--|
| - Alexis GmbH (Grünberg, BRD) | 5-, 12- und 15-HETE; 9- und 13-HODE
(jeweils R- und S-Isomer) |
| - Amersham Biosciences (Freiburg, BRD) | Protein-Molekulargewichtsmarker, <i>Ficoll</i> [®] |
| - BioTez (Berlin, BRD) | Primer |
| - Difco Laboratories (Detroit, USA) | Medien für prokaryontische Zellen |
| - J.T.Baker (Holland) | Lösungsmittel (HPLC-Qualität) |
| - New England Biolabs (Frankfurt am Main) | Restriktionsendonukleasen |
| - PAA Laboratories GmbH (Colbe, BRD) | Nährmedien und Antibiotika für Zelllinien |
| - Promega (Mannheim, BRD) | M-MLV Reverse Transkriptase |
| - Q BIO gene (Illkirch Cedex, F) | PCR-Polymerasen, Agarose |
| - Roth (Karlsruhe, BRD) | Elektrophorese-Medien, dNTP |
| - Sigma (Deisenhofen, BRD) | 15-HpETE und 13-HpODE |
| - Strathmann Biotech AG (Hannover, BRD) | Interleukin-4 und -13 |

2.1.4. Detektionssysteme

- | | |
|--|--|
| - DAB Substrate-Kit (10x), | PIERCE, Rockford, USA |
| - Oligonukleotid Mikroarray-Chip U133A, | Affymetrix, Santa Clara, USA |
| - Roti [®] -Quant, Bradford-Reagenz, | Roth, Karlsruhe, BRD |
| - Western Lightning Chemiluminescence Peagent, | Perkin Elmer Life Science, Boston, USA |

2.1.5. Kits zur Präparation und Transfektion von DNA/RNA

- | | |
|---|------------------------------------|
| - BioArray High Yield RNA Transkriptions-Kit, | Enzo Diagnostics, Farmingdale, USA |
| - FuGENE 6 Transfektion Kit, | Roche Diagnostics, Mannheim, BRD |
| - Kalzium-Phosphate Transfektion Kit, | Invitrogen, Karlsruhe, BRD |
| - Lipofektin-Reagenz, | Gibco/BRL, Eggenstein, BRD |
| - QIA-Plasmid Mini/Midi Kit, | Qiagen, Hilden, BRD |
| - QIAquick Gel Extraction, | Qiagen, Hilden, BRD |
| - QIAquick PCR-Purification, | Qiagen, Hilden, BRD |
| - QuantiTect SYBR Green PCR-Kit, | Qiagen, Hilden, BRD |
| - RNeasy Mini Kit, | Qiagen, Hilden, BRD |
| - TOPO TA Cloning Kit, | Invitrogen, Karlsruhe, BRD |

2.1.6. Puffer, Lösungen und Nährmedien

2.1.6.1. PCR-Lösungen

- M-MLV-RT-5x-Reaktionspuffer 250 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei 25°C,
375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT
- 10x Pyra-PCR-Puffer 100 mM Tris-HCl, pH 9,0 bei 25°C,
500 mM KCl, 30 mM MgSO₄, 0,1% Tween[®]-20

2.1.6.2. Agarose-Elektrophorese

- 1x TAE-Puffer (Tris/Azetat/EDTA-Puffer) 40 mM Tris, pH 7,8 bei 25°C,
20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA
- 10x Ladepuffer für DNA-Elektrophorese 20% *Ficoll* 400, pH 8,0 bei 25 °C
1% SDS, 0,1 M EDTA, 0,025% Bromphenolblau

2.1.6.3. SDS-Elektrophorese

- Sammelgelpuffer 0,5 M Tris, pH 6,7 bei 25°C, 0,4% SDS
- Trenngelpuffer 1,5 M Tris, pH 8,8 bei 25°C, 0,6% SDS
- 5x Elektrophoresepuffer 125 mM Tris, pH 7,8 bei 25°C,
100 mM Glyzin, 17 mM SDS
- 10x TBE 890 mM Tris, pH 8,0 bei 25°C,
890 mM Borsäure, 20 mM EDTA
- 5x PBS 7,8 g Na₂HPO₄·2H₂O, pH 7,4 bei 25°C
0,815 g KH₂PO₄, 43,83g NaCl
- Coomassie-Lösung 0,2% (w/v) Coomassiebrillantblau
in 10% Methanol, 20% Essigsäure (v/v)
- Entfärber-Lösung 40% Methanol, 10% Essigsäure, 50% H₂O (v/v/v)
- Anodenpuffer I 0,3 M Tris, pH 10,4 bei 25°C, 20% Methanol
- Anodenpuffer II 25 mM Tris, pH 10,4 bei 25°C, 20% Methanol
- Katodenpuffer 25 mM Tris pH 9,4 bei 25°C
40 mM 6-Aminokapronsäure, 20% Methanol

12,5%-iges Akrylamidtrenngel	5 ml NF-Akrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1), 3 ml Trenngelpuffer, 4 ml H ₂ O (bidest.), 20 µl TEMED, 120 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat
4%-iges Akrylamidsammelgel	1,35 ml NF-Akrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1), 2,5 ml Trenngelpuffer, 6 ml H ₂ O (bidest.), 20 µl TEMED, 100 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat

2.1.6.4. Bakterien-Medien

Luria Bertani (LB)-Medium	1% Bacto-Tryptone, 0,5% Hefe-Extrakt, 0,5% NaCl, 1 mM NaOH, 100 mg/L Ampizillin
Luria Bertani (LB)-Agar	1% Bacto-Tryptone, 0,5% Hefe-Extrakt, 0,5% NaCl, 1 mM NaOH, 100 mg/L Ampizillin, 1,5% Bacto-Agar
SOC-Medium	2% Bacto-Tryptone, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose

2.1.7. Bakterienstämme und Zellen

Bakterien: *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, BRD); Genotyp der TOP10: F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* *galU* *galK* Δ (*ara-leu*)7697 *rpsL* (*Str*^R) *endA1* *nupG*

Zelllinien: Die Zelllinien wurden von folgenden Quellen bezogen: HL60 (human, myeloblastisch), U937 (human, promyelomonozytisch), THP1 (human, monozytisch) von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; A549 (human Lungenepithelzellen) von der A.T.C.C. (*American Type Culture Collection*), Rockville, MD, U.S.A.

2.1.8. Plasmide

- pcDNA3 mammalia Expressionsvektor,	Invitrogen, Karlsruhe
- pCR 2.1-TOPO,	Invitrogen, Karlsruhe
- pGEM-T Klonierungsvektor,	Promega, Mannheim

2.1.9. Antikörper

2.1.9.1. Primär-Antikörper

Anti-Kaninchen-12/15-LOX-AK: Gereinigter [FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) Fraktion IgG] polyklonaler Antikörper gegen die Kaninchen 12/15-LOX; gezogen im Mehrschweinchen; kreuzreagiert mit der humanen 12/15-LOX, der Schweine-12/15-LOX und der Maus 12/15-LOX; kreuzreagiert nicht mit der humanen 5-LOX, der humanen Plättchen-12-LOX und den humanen epidermalen LOXn. Hergestellt im Labor der Arbeitsgruppe Prof. Kühn

Anti-Mensch-MAO-A-AK: Polyklonaler, affinitätsgereinigter Antikörper. gegen den C-Terminus der humanen MAO-A; gezogen in der Ziege; kreuzreagiert mit der MAO-A aus Maus und Ratte. Vertrieb über Santa Cruz Biotech. (USA); Kat.Nr. sc-18396

Anti-Mensch-FN1-AK: Polyklonaler, affinitätsgereinigter Antikörper gegen humanes FN1; gezogen im Kaninchen; kreuzreagiert mit FN1 aus Maus, Ratte, Ziege, Schaf, Schwein, Meerschweinchen, Rind und Huhn; kreuzreagiert nicht mit Kollagen IV, Laminin, Vitronectin und Chondroitinsulfat vom Typ A, B und C. Vertrieb über Sigma, Deisenhofen; Kat.Nr. F3648

Anti-Mensch-FN1-AK: Monoklonal gereinigter (Protein G Chromatographie, IgG₁) Antikörper gegen humanes FN1; gezogen in der Maus; kreuzreagiert mit FN1 aus Maus, Ratte und Schwein; besonders geeignet für immunhistochemische Untersuchungen; Klonbezeichnung TV-1. Vertrieb über NeoMarkers (USA); Kat.Nr. MS-167-P

Anti-Mensch-F13A1-AK: Monoklonal gereinigter Antikörper (Protein G Chromatographie, IgG₁/κ) gegen den humanen F13A1; gezogen in der Maus; besonders geeignet für immunhistochemische Untersuchungen; Klonbezeichnung AC-1A1. Vertrieb über NeoMarkers (USA); Kat.Nr. MS-1237-P

Anti-Mensch-CD4-AK: FITC-konjugierter, monoklonaler gereinigter Antikörper (Protein G Chromatographie, IgG₁/κ) gegen humanes CD4; gezogen in der Maus; besonders geeignet für die FACS Analyse; Klonbezeichnung RPA-T4. Vertrieb über BD Biosciences (BRD); Kat.Nr. 11-0049 (555346)

Anti-Mensch-CD184-AK: PE-Konjugierter, monoklonaler gereinigter Antikörper (Protein G Chromatographie, IgG_{2a}/κ) Antikörper gegen humanes CD184 (CXCR4, Fusin); gezogen in der Maus; besonders geeignet für die FACS Analyse; Klonbezeichnung 12G5. Vertrieb über BD Biosciences (BRD); Kat.Nr. 12-9999 (555974)

2.1.9.2. Sekundär-Antikörper

Peroxidase-markierter Anti-Ziege IgG AK: Monoklonaler gereinigter Antikörper (Protein G Chromatographie, IgG₁/κ) gegen IgG der Ziege; gezogen in der Maus. Vertrieb über Sigma, Deisenhofen (BRD); Kat.Nr. A5420

Peroxidase-markierter Anti-Maus IgG AK: Monoklonaler gereinigter Antikörper (Protein G Chromatographie, IgG₁/κ) gegen IgG der Maus; gezogen in der Ziege. Vertrieb über Sigma, Deisenhofen (BRD); Kat.Nr. A2554

2.2. Methoden

2.2.1. Lipid-Extraktion nach Bligh und Dyer

Mit der Methode nach Bligh und Dyer [BLIGH und DYER, 1959] können Lipide aus einem wässrigen System extrahiert und gleichzeitig von wasserlöslichen Salzen, Aminosäuren, Zuckern und anderen Nichtlipiden getrennt werden. Entsprechend dem Ausgangsvolumen wurde bei einem Volumen-Mischungsverhältnis von Chloroform/ Methanol/ Wasser von 1:2:0,8 ein Monophasen-System erhalten, das durch Zugabe von Chloroform und Wasser auf folgendes Verhältnis gebracht wird: Chloroform/ Methanol/ Wasser im Volumenverhältnis von 1:1:0,9. Dabei entsteht ein Zweiphasen-System, das in der Chloroform-Phase die Lipide enthält.

2.2.2. Milde alkalische Hydrolyse von Lipiden

Mit dieser Methode können Esterbindungen in Lipiden gespalten werden. Veresterte Lipide (1-10 μM) wurden in ein gut verschließbares Eppendorfgefäß überführt und im Argonstrom vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurden 170 μl Methanol und 30 μl Kaliumhydroxid (40%) hinzugefügt und das Gemisch unter Argon-Atmosphäre gesetzt. Nach einer Inkubation von 20 min bei 60°C wurde der Reaktionsansatz auf 0°C abgekühlt, und die Reaktion durch Zusatz von 30 μl konzentrierter Essigsäure gestoppt.

2.2.3. Umkehrphasen-HPLC-Analytik (RP-HPLC)

Die Umkehrphasen-HPLC-Analytik (RP-HPLC) wurde an der HP-Chemstation mit dem HP 1040A Diodenarraydetektor durchgeführt. Als Trennsäule diente eine Nukleosil 120-5-C₁₈-Säule (250 mm x 4,6 mm, Machery-Nagel, Düren) mit einer entsprechenden Nukleosil-C₁₈-Vorsäule (30 mm x 4 mm). Als Laufmittel wurde Methanol/ Wasser/ Essigsäure im Volumenverhältnis von 80:20:0,1 eingesetzt. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Es wurden die Absorptionen bei verschiedenen Wellenlängen detektiert. Die Detektion erfolgte im Extinktionsmaximum der zu untersuchenden Verbindung:

- 210 nm nicht-oxygenierte Fettsäuren
- 235 nm konjugierte Diene, oxygenierte Fettsäuren
- 242 nm doppelt-konjugierte Diene
- 270 nm konjugierte Triene
- 300 nm konjugierte Tetraene

Der absorbierende Hauptpeak wurde dann aufgrund der Ko-Chromatographie mit einem authentischen Standard identifiziert und über eine mit authentischem Standard erstellte Eichkurve konnten die entsprechenden Verbindungen über die Flächen des zu detektierenden Peaks quantifiziert werden. Zur weiteren Analyse der Positionsisomeren wurden einzelne Produkte aufgefangen und nach Verdampfen des Laufmittels unter Vakuum der Normalphasen-HPLC (SP-HPLC) unterworfen.

2.2.4. Normalphasen-HPLC-Analytik (NP-HPLC)

Dazu wurden die zur Trockne eingedampften Proben aus der RP-HPLC in *n*-Hexan/ 0,1% Essigsäure aufgenommen und über die Normalphasen-HPLC (SP-HPLC) weiter untersucht. Dies erfolgte über eine Nukleosil 100-7-Säule (250 mm x 4 mm, von Machery-Nagel, Düren) mit einem SPD-M6A-Detektor von Shimadzu. Die Detektion erfolgte wie bei der RP-HPLC beim Extinktionsmaximum des zu untersuchenden Produktes. Als Laufmittel diente *n*-Hexan/ Isopropanol/ Essigsäure im Volumenverhältnis von 97,9:2:0,1 bei einer Flussrate von 1 ml/min.

2.2.5. Chiralphasen-HPLC-Analytik (CP-HPLC)

Nach der milden alkalischen Hydrolyse (siehe 2.2.2.) wurden die Hydrolyseprodukte zuerst über eine Umkehrphasen-HPLC (2.2.3.) und anschließend über eine Normalphasen-HPLC (2.2.4.) getrennt. Zur Überprüfung, ob tatsächlich ein enzymatisches Produkt vorlag, musste die Enantiomeren-Zusammensetzung bestimmt werden. Dazu wurde die aufgefangene Fraktion der Normalphasen-HPLC im Rotationsverdampfer eingedampft und zwecks Enantiomeren-Analytik einer Chiralphasen-HPLC (CP-HPLC) unterworfen [KÜHN *et al.*, 1987; KÜHN und WIESNER, 1990]. Mit Hilfe der Chiralcel OD-Säule (4,6 x 150) mm, 5 µm von Daicel Chemical Industries, USA, wurde die lipoxygenierte Fettsäuren mit dem SPD-M6A-Detektor bei einer Wellenlänge von $\lambda=235$ nm identifiziert. Als Laufmittel diente *n*-Hexan/ 2-Propanol/ Essigsäure im Volumenverhältnis von 94,9:5:0,1.

2.2.6. Massenspektrometrie

Produkte, für die es keinen identischen Standard für die Ko-Chromatographie in der HPLC gab, wurden über die Massenspektrometrie (MS) bestimmt.

LC/MS: HPLC-gereinigte Substanz wurde in einem 1:1 Gemisch aus Methanol und 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 8.0 aufgenommen und über die Negativ-Ionen-Massenspektroskopie analysiert. Aliquots der Probe wurden mit 3 µl/min in die auf 200°C erhitzte Injektions-Kapillare eines LCQ-Ionenfallen-Massenspektrometers (Thermoquest, Engelsbach) eingespritzt. Die Detektion von Ionen erfolgte im negativen Modus in einem Bereich von m/z 100-500. Weitere Fragmentierung einzelner Molekül-Ionen erfolgte bei einer Spannung zwischen 10 und 40 Volt.

GC/MS: Polare Gruppen der RP- bzw. SP-HPLC gereinigten Produkte wurden zuerst derivatisiert, bevor sie durch GC/MS analysiert wurden. Die Karboxylgruppen wurden mit Diazomethan verestert (2.2.6.1.) und die Hydroxygruppen mit N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroazetamid (BSTFA, 2,2,2-Trifluor-N,O-bis(trimethylsilyl)-azetamid) in trockenem Pyridin silyliert. Die Messungen wurden an einem Shimadzu GC/MS QP-2000 bzw. QP-5050 System, ausgerüstet mit einer *fused silica* Kapillare DB 1 (30 m x 0,32 mm, Beschichtungsdicke 0,25 µm), durchgeführt. Eine Injektor-Temperatur von 270°C, Ionenquellen-Temperatur von 180°C und Elektronen-Energie von 70 eV wurden eingestellt. Die Fettsäurederivate wurden mit folgendem Temperaturprogramm eluiert: 2 min 180°C isotherm, danach Erhöhung der Temperatur mit einer Rate von 5°C/min auf 290°C, abschließend 5 min isotherm bei 290°C.

2.2.6.1. Herstellung von Diazomethan und Veresterung von Karboxylgruppen

Da sowohl Diazomethan als auch Nitrosomethylharnstoff zu den Karzinogenen zählen wurden alle Arbeiten unter dem Abzug durchgeführt (Schutzbrille!). 100 ml Diethylether wurden mit 35 ml gekühlter 40%-iger Kaliumhydroxid-Lösung unterschichtet. In einem Eisbad wurden unter Schwenken und in kleinen Portionen vorsichtig 10,3 Gramm N-Nitroso-N-methylharnstoff dazugegeben und 2 h stehen gelassen. Die etherische Phase mit dem gelösten Diazomethan wurde dann in einen trockenen Erlenmeyerkolben mit Kaliumhydroxid-Plätzchen überführt und vorbeugend wegen der bestehenden Explosionsgefahr der Lösung bei -20°C gelagert. Für die Veresterung der Karboxylgruppen wurde zu der eisgekühlten methanolischen Fettsäure- bzw. Hydro(pero)xyfettsäure-Lösung die Diazomethan-Lösung dazugegeben bis die Gelbfärbung über mehrere Minuten konstant blieb. Anschließend wurde der Diethylether mit Stickstoff verblasen.

2.2.7. Molekularbiologische Methoden

Für grundlegende molekularbiologische Methoden wie, z.B. DNA/RNA-Präparationen, Reinigung von DNA-Fragmenten, Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA, Agarosegel-Elektrophorese, Ligationen, Transformationen in *Escherichia coli*, Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und Transfektion von Zell-Linien wurden Versuchsprotokolle verwendet, die von den Herstellern der entsprechenden Analysen- bzw. Präparationskits zur Verfügung gestellt wurden.

2.2.7.1. RNA-Isolierung

Zellen bzw. Gewebe wurden steril präpariert und mehrfach mit PBS gewaschen. Bei kultivierten Zellen wurden Zellpellets von jeweils 10^6 Zellen zur RNA-Präparation eingesetzt. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe der Komponenten des RNeasy-Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Nach Lyse und Homogenisierung der biologischen Proben wurde die Gesamt-RNA selektiv an den Silikongel-Membranen der RNeasy-Säulen gebunden und anschließend mit nuklease-freiem Wasser eluiert.

2.2.7.2. Quantifizierung der RNA

Die Gesamt-RNA-Konzentration wurde durch Bestimmung der Extinktion in Quarzküvetten am Spektrophotometer ermittelt. Die Extinktion (E) wurde bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Eine optische Dichte von 1 bei einer Wellenlänge (λ) von 260 nm entsprach einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ für RNA und 50 $\mu\text{g/ml}$ für DNA. Die Extinktion bei $\lambda=280$ nm und das Verhältnis E_{260}/E_{280} gab Aufschluss über die Verunreinigung der RNA-Präparation durch Proteine. Bei hinreichend guten RNA-Präparationen sollte der genannte Quotient nach Angaben des Kit-Herstellers zwischen 1,5 und 1,9 liegen. Für die Quantifizierung wurde ein Aliquot der Lösung mit destilliertem Wasser 1:100 verdünnt und die Extinktion dieser Lösung im Spektrophotometer gemessen. Folgende Formel diente zur Berechnung der Konzentration:

$$\text{RNA- bzw. DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{Verdünnung} \times 40 \text{ bzw. } 50 \mu\text{g/ml} \times E_{260 \text{ nm}}$$

$E_{260 \text{ nm}}$: Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm

2.2.7.3. Reverse Transkription (RT)

Während der reversen Transkriptions-Reaktion (RT) wurde mit Hilfe der M-MLV-Reverse-Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, aus der zuvor isolierten einzelsträngigen RNA die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Der Oligo-dT₁₈-Primer

bindet spezifisch an die poly-A-Enden der mRNA und startet die Umschreibereaktion. Die Reaktion erfolgte in einem 45 µl-Ansatz mit folgender Zusammensetzung:

3 µg Gesamt-RNA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,2), 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 mM DTT, 100 µg/ml BSA, 30 U RNase-Inhibitor, 166 µM dNTP, 0,5 µg/µl Oligo dT₁₈-Primer und 100 U M-MLV-Reverse-Transkriptase. Nach 120 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 95°C für 10 min gestoppt (Reverse-Transkriptase ist thermolabil) und anschließend auf 10°C abgekühlt. Der Erfolg der reversen Transkription wurde über die Polymerasekettenreaktion (PCR) der Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) überprüft, ein „Haushalts“-Enzym, das in allen Zellen vorkommt (*housekeeping enzyme*).

2.2.7.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) - Primer

Für die durchgeführten Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurde folgendes Standardprogramm als Grundlage verwendet. *Für bestimmte mRNA-Spezies wurden die PCR-Bedingungen (*Annealing*-Temperaturen und Anzahl der PCR-Zyklen) spezifisch modifiziert und den verwendeten Primerstrukturen angepasst.

1. Vordenaturierung	95°C	5 min	} 29 - 35 Zyklen*
2. Denaturierung	95°C	40 s	
3. Primer-Anlagerung (<i>Annealing</i>)	60°C*	60 s	
4. Kettenaufbau (<i>Elongation</i>)	72°C	2 min	
5. Nach- <i>Elongation</i>	72°C	10 min	
6. Aufbewahrung	10°C	Pause	

Bei jeder PCR-Reaktion wurden zwei Kontrollen mitgeführt, um die verwendeten Lösungen auf Kontaminationen zu testen. Es wurde jeweils eine Probe ohne DNA-Vorlage (*template*) und eine Probe ohne Primer angesetzt. In beiden Kontrollen konnte nur im Falle einer Kontamination ein PCR-Produkt entstehen. Die erforderlichen Sequenzierungen wurden von der Firma InViTek (Berlin, BRD) oder MWG Biotech AG (Ebersberg, BRD) durchgeführt.

Tabelle 4: Primer-Kombinationen für den Nachweis der Expression verschiedener Gene
Die Primer-Sequenzen wurden so gewählt, dass sie aus hochkonservierten Region stammen, so dass sie auch zur Amplifikation artfremder, nicht-humaner cDNA geeignet sind. Einige Primer-Sequenzen wurden bereits erfolgreich mit muriner cDNA getestet.

Gen	Accession Nr.	Pos.	Primer-Sequenz	PCR
<i>15-LOX-1</i> (<i>ALOX15</i>)	M23892	1510	5' ACT GAA ATC GGG CTG CAA GGG 3'	521
		2031	5' GGG TGA TGG GGG CTG AAA TAA 3'	

Gen	Accession Nr.	Pos.	Primer-Sequenz	PCR
<i>5-LOX</i> (<i>ALOX5</i>)	J03571	1509	5' TCT ACT ACG AGG GCG ACC AGG 3'	549
		2058	5' AGA TGG CCA CAC TGT TCG GAA 3'	
<i>ANXA1</i>	X05908	250	5' GTG TGG ATG AAG CAA CCA TCA TTG 3'	736
		986	5' GAA CGG GAA ACC ATA ATC CTG ATC 3'	
β -Aktin (<i>ACTB</i>)	NM001101	49	5' CGT CCA CAC CCG CCG CCA G 3'	577
		626	5' GTC CCG GCC AGC CAG GTC C 3'	
<i>CCL22</i>	BC027952	44	5' CCT CGT CCT CCT TGC TGT GGC 3'	212
		256	5' GCA CTC TGG GAT CGG CAC AGA T 3'	
<i>CCR5</i>	AH005786	4946	5' TCA ACC TGG CCA TCT CTG ACC TG 3'	496
		5442	5' CTC ACA GCC CTG TGC CTC TTC TT 3'	
<i>CD1c</i>	M28827	614	5' TTC TCT TGG GTC TCC TGG ATG CA 3'	309
		923	5' CCT GGC CTC CTA GAC TGC TGT G 3'	
<i>CD23</i>	M14766	292	5' CTG GGC TGC TGA CTC TGC TTC 3'	684
		976	5' CCC GCA TCA TCA CGC AGT CCT 3'	
<i>CD4</i>	BC025782	562	5' AGA GCC TGA CCC TGA CCT TGG 3'	268
		830	5' GCG AGT GGG AAG GAG AAC TCC 3'	
<i>COX-1</i> (<i>PTGS1</i>)	S36271	727	5' CTG CGG CTC TTT AAG GAT GGG A 3'	555
		1282	5' GCG AGA GAA GGC ATC CAC CAG 3'	
<i>COX-2</i> (<i>PTGS2</i>)	F04636	927	5' GTC CCT GAG CAT CTA CGG TTT G 3'	530
		1457	5' CTC TGG TCA ATG GAA GCC TGT G 3'	
<i>CXCR4</i>	AF005058	3856	5' CAA GGG CCA CCA GAA GCG CAA 3'	307
		4163	5' TTT GGA GAG GAT CTT GAG GCT GGA 3'	
<i>CYSLTR2</i>	NM020377	152	5' TCT GGG GAG TCT TGG GAA ATG G 3'	331
		483	5' CCA CAG AGG ATC CAG GCA CTC C 3'	
<i>F13A1</i>	M14354	1244	5' CTG TTG GAT TTG GAG GCT GGC A 3'	957
		2201	5' GCT TCC GAT GCC CAG AGA CCC 3'	
<i>FLAP</i>	NM001629	121	5' CCC TCA TCA GCG TGG TCC AGA 3'	282
		403	5' GGG TGC TCT GCG TTC TCT CTC 3'	
<i>FNI</i>	X02761	6365	5' AGG CAT AAG GTT CGG GAA GAG GT 3'	462
		6827	5' GCA GTT GTC ACA GCG CCA GCC 3'	

Gen	Accession Nr.	Pos.	Primer-Sequenz	PCR
<i>GAPDH</i>	M33197	278	5' CCA TCA CCA TCT TCC AGG AGC GA 3'	447
		725	5' GGA TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG 3'	
<i>HMOX1</i>	X06985	129	5' CTG AAG GAG GCC ACC AAG GAG G 3'	350
		479	5' GCG TGG GCC ACC AGC AGC TC 3'	
<i>HSPA8</i>	BC019816	1241	5' GAT GTC ACT CCT CTT TCC CTT GG 3'	735
		1976	5' CCC TGA GGA AGC ACC ACC AGA 3'	
<i>IL-10</i>	NM000572	285	5' GGT TAC CTG GGT TGC CAA GCC 3'	170
		455	5' CAG GGA AGA AAT CGA TGA CAG CG 3'	
<i>IL-13</i>	X69079	199	5' GCA ATG GCA GCA TGG TAT GGA G 3'	197
		396	5' CTG GGC CAC CTC GAT TTT GGT 3'	
<i>IL-18</i>	NM008360	314	5' AAA TGA CCA AGT TCT CTT CGT TGA C 3'	407
		721	5' GAG TGA ACA TTA CAG ATT TAT CCC C 3'	
<i>IL-2Rg</i>	D11086	394	5' CAT TTG TTG TTC AGC TCC AGG ACC 3'	562
		956	5' GAC ACA CCA CTC CAG GCC GAA A 3'	
<i>IL-4</i>	M13982	50	5' ATC GAC ACC TAT TAA TGG GTC TCA 3'	441
		491	5' TCG TCT TTA GCC TTT CCA AGA AGT 3'	
<i>IL-4Ra</i>	X52425	1248	5' TGG TGC GAT GTG TGG AGT TGT TTG 3'	1092
		2340	5' CGC ACA GGT GGC AGG TAA GGG 3'	
<i>IL-8</i>	NM000584	219	5' TAC TCC AAA CCT TTC CAC CCC AA 3'	153
		372	5' CTC CAC AAC CCT CTG CAC CCA 3'	
<i>iNOS</i>	AF049656	1508	5' TGA GGC CCA GGA GGA GAG AGA 3'	529
		2037	5' TCA CAG GCT GCC CGG AAG GTT 3'	
<i>LTC4S</i>	NM145867	146	5' TGC TGC AAG CCT ACT TCT CCC T 3'	153
		299	5' AGA GCG TGG CGA GGA ACA GC 3'	
<i>MAO-A</i>	NM000240	879	5' GCC AAG ATT CAC TTC AGA CCA GAG 3'	368
		1247	5' TGC TCC TCA CAC CAG TTC TTC TC 3'*	
<i>MAO-B</i>	NM000898	936	5' ACT CGT GTG CCT TTG GGT TCA G 3'	317
		1253	5' TGC TCC TCA CAC CAG TTC TTT TC 3'*	
<i>MCP-1 (CCL2)</i>	NM002982	88	5' CCC TTC TGT GCC TGC TGC TCA 3'	348
		436	5' GGT GTC TGG GGA AAG CTA GGG 3'	

Gen	Accession Nr.	Pos.	Primer-Sequenz	PCR
<i>Rb15LOX</i>	M27214	28	5' ATG GGT GTC TAT CGC GTC TGC 3'	2006
		2034	5' CCA GGG CAG GCA GCT CAA AT 3'	
<i>Rb15LOX</i> (<i>BstNI</i>)	M27214	917	5' TGG CTG CCC CGC TGG TCA TG 3'	326
		1243	5' CCT GGC GCG GAC GTT GAT CTC 3'	
<i>TIMP3</i>	F14394	393	5' TGC AAC TCC GAC ATC GTG ATC CG 3'	452
		845	5' CGG ATG CAG GCG TAG TGT TTG GA 3'	
<i>TNFα</i>	NM000594	166	5' CAC CAT GAG CAC TGA AAG CAT GAT 3'	477
		643	5' CGG CTG ATG GTG TGG GTG AGG 3'	

Für die hier beschriebenen Arbeiten wurde die PCR mit einer Pyra-DNA-Polymerase durchgeführt. Ein Ansatz von 30 μ l enthielt 25 ng cDNA, den Vorwärts- und den Rückwärts-Primer (je 200 nM), dNTP-Mix (120 μ M), 2,4 U Pyra-DNA-Polymerase, MgSO₄ (1 mM), 3 μ l 10x Pyra-PCR-Puffer und Wasser. Die Angaben in Klammern sind Endkonzentrationen. Die PCR-Produkte wurden in einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt, das als Farbstoff Ethidiumbromid (500 ng/ml in 1x TAE-Puffer) enthielt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA. Als Standard dienten ein 100-Basenpaar- und ein 1-Kilo-Basenpaar-DNA-Molekulargewichtsmarker der Firma New England BioLabs. Die DNA-Banden wurden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte nach Gelextraktion der entsprechenden Bande und anschließender Klonierung in den Plasmiden pGEM-T bzw. TOPO-TA entsprechend den Angaben der Hersteller.

Aufgrund der hohen Amplifizierungsrate lässt sich die RT-PCR nur schwer quantifizieren, da der Anstieg der Konzentration der PCR-Produkte nicht *online* gemessen werden kann. Dabei kann es unbemerkt zur Sättigung der Amplifikationskurven kommen, was eine exakte Quantifizierung unmöglich macht. Deshalb haben die mit der normalen RT-PCR ermittelten Daten nur semi-quantitativen Charakter. Für eine exakte Quantifizierung wurde deshalb die Echtzeit-PCR (*realtime*-PCR) verwendet. Mit dieser Methode war es möglich, den Verlauf der Amplifikation kinetisch zu verfolgen. In meinen Untersuchungen wurde der SYBR Green PCR-Kit von Qiagen (Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers angewandt. Für die Eichkurve wurden gelgereinigte und photometrisch quantifizierte PCR-Produkte als DNA-Vorlage verwendet. Es wurde eine Acht-Punkte-Standardkurve erstellt. Die Echtzeit-PCR erfolgte gleichzeitig für das zu untersuchende Gen und das Referenzgen der GAPDH.

2.2.7.5. Restriktionsstrategie zur Unterscheidung der LOX-Isoformen

Nach der Amplifizierung und Transfektion des Kaninchen-15-LOX-Vektors in Top10 Zellen erfolgte deren Unterscheidung von der 12-LOX mit Hilfe einer kombinierten PCR-Restriktionsstrategie. Kaninchen-15-LOX und Kaninchen-12-LOX besitzen eine ca. 95% Sequenzhomologie. Damit erforderte eine Differenzierung zwischen beiden Isoformen eine komplette Sequenzierung eines Amplifikationsproduktes. Um diese aufwendige Prozedur zu vereinfachen, wurde eine DNA-Sequenz ausgesucht, in der sich beide cDNA unterscheiden und in der bei einem der Enzyme eine *BstNI* Spaltstelle vorhanden ist (15-LOX). Beim anderen Isoenzym (12-LOX) ist diese Spaltstelle nicht vorhanden. Durch Amplifikation des entsprechenden DNA-Abschnittes mit dem Primerpaar "Rb15LOX (*BstNI*)" und anschließender Spaltung mit *BstNI* konnte entschieden werden, für welche LOX-Isoform das entsprechende PCR-Fragment oder Plasmid kodiert.

2.2.7.6. Rechnergestützte Sequenzanalyse

Zur Analyse von DNA-, RNA- und Proteinsequenzen wurden die Programme DNA-Strider[®] von Dr. Christian Marck, DNAssist[®] von DNAssist (<http://www.dnassist.org>) und Lasergene[®] von DNASTar (<http://www.dnastar.com>) verwendet.

Mit dem Programm „MatInspector“ (<http://www.genomatix.de>) wurden potenzielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren auf einer vorgegebenen DNA-Sequenz durchsucht. Dazu greift das Programm auf eine Datenbank zurück und überprüft kurze Bindemotive bekannter Transkriptionsfaktoren, die als „core“-Matrix (Kernsequenz-Ähnlichkeit) bezeichnet werden, ob und mit welcher Wahrscheinlichkeit sie in der zu untersuchenden DNA-Sequenz auftreten. Die Ergebnisse werden prozentual als Kernsequenzähnlichkeit angegeben.

Für die Herstellung genspezifischer Primer wurde das Programm „Oligo 5.0“ von den Gebrüdern Wojciech und Piotr Rychlik (Plymouth, MN 55447 USA) verwendet.

Weiterhin wurde auf folgende Internetressourcen zurückgegriffen:

Genbank des nationalen Zentrums für biotechnologische Informationen (NCBI; Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) die weltweit größte Datenbank für Literatur, DNA- und Protein-Sequenzen, Proteinstrukturen, Software usw.

Homologie-Suche in Nukleotid- und Protein-Datenbanken: <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>.

Zugang zu EMBL- und GeneBank-Datenbanken: <http://www.ebi.ac.uk>.

Zugang zu Proteinsequenz-Datenbanken über <http://www.expasy.ch>.

Die Ideogramme stammen aus <http://genome-www.stanford.edu/genecards/> und die Abbildungen über die Position der Gene im Chromosom aus dem NCBI (Bethesda, USA).

2.2.8. Enzymologische und proteinchemische Methoden

2.2.8.1. 12/15-Lipoxygenase-Aktivitätsbestimmung

Kultivierte Zellen wurden geerntet, mit PBS (ohne Kalzium- und Magnesium-Ionen) dreimal gewaschen und anschließend gezählt. In einem 15 ml-Plastikröhrchen wurden 10^6 Zellen in je 500 μ l PBS resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe von Ultraschall 15 s bei 40 W lysiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 1,5 μ l einer 33 mM Arachidonsäure- bzw. Linolsäure-Stammlösung (Endkonzentration 99 μ M) für 20 min bei 37°C im Wasserbad. Die Reaktion wurde mit 500 μ l Methanol gestoppt. Durch Zugabe von 50 μ l Eisessig wurde eine Protonierung der Fettsäuren erreicht. Die durch die LOX gebildeten Hydroperoxyfettsäuren wurden schließlich mit Natriumborhydrid zu den entsprechenden Hydroxysäuren reduziert. Nach 15 min im Eisbad wurden die Ansätze 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Von den etwa 900 μ l Überstand wurden 300 μ l umgehend mit Hilfe der Shimadzu-HPLC-Anlage analysiert. Die Trennung des Endproduktes vom nicht umgesetzten Substrat sowie von Mehrfach-Oxygenierungsprodukten erfolgte über eine Umkehrphasen-HPLC mit einer Nucleosil 100-5 C₈-Säule. Mit dem Dioden-Array-Detektor SPD 1040 A (Hewlett Packard) wurde bei folgenden Wellenlängen detektiert: $\lambda=210$ nm (nicht umgesetztes Substrat), $\lambda=235$ nm (oxygeniertes Produkt) und $\lambda=270$ nm (konjugierte Triene).

2.2.8.2. Monoaminoxidase-A-Aktivitätsbestimmung

Das Prinzip der Monoaminoxidase-Aktivität beruht auf dem Umsatz radioaktivmarkierter MAO-Substrate unter gleichzeitiger Verwendung von isoform-spezifischen Inhibitoren. Für die MAO-B-Aktivitätsmessung wurde den Zell-Lysaten der irreversibel wirkende MAO-A-Hemmstoff Clorgylin zugesetzt. Für die Messung der MAO-A-Aktivität wurde der MAO-B-spezifische Hemmstoff Pargylin zur Probe zugegeben. Für den Aktivitätsassay wurden Zellen mit PBS gewaschen und 5 min bei 400 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) zu einer Protein-Endkonzentration von 1,0 mg/ml resuspendiert.

Aliquots (50 μ l) wurden entnommen und mit gleichem Puffer auf 180 μ l aufgefüllt und bei 37°C für 5 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 μ l einer 0,5 mM (0,01 μ Ci) ¹⁴C-Tyramin-Lösung (spezifische Radioaktivität: 1 mCi/mmol) gestartet. Die Proben wurden 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μ l 0,5 M Salzsäure gestoppt. Die Extraktion der radioaktiv-markierten Reaktionsprodukte erfolgte mit 3 ml einer 1%-igen 2,5-Diphenyloxazol-Lösung (Toluen/ Ethylazetat im 1:1 Volumenverhältnis als Lösungsmittel). Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem

Flüssigkeitsszintillationszähler. Die Monoaminoxidase-Aktivität wurde als Radioaktivität in dpm/mg zelluläre Proteine angegeben. Die Durchführung der Aktivitätsassays erfolgte im Labor von Dr. Ellen Billett, (School of Science, Faculty of Science and Land Based Studies, The Nottingham Trent University, Clifton Lane, Nottingham NG11 8NS, UK).

2.2.8.3. SDS-Gelelektrophorese

Für die SDS-Elektrophorese wurden die entsprechenden Proteinextrakte in Ladepuffer (Roti[®]-Quant von Roth) 10 min bei 95°C unter reduzierenden Bedingungen denaturiert. Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte in einem Akrylamidgel (4%-iges Sammelgel, 12,5%-iges Trenngel). Die aufgetrennten Proteine wurden mit einer Coomassie-Lösung angefärbt. Für die Entfernung des Hintergrundes wurde ein Gemisch aus Methanol/ Essigsäure/ Wasser im Volumenverhältnis von 40:10:50 verwendet. Das Molekulargewicht der interessierenden Proteinbanden konnte mit Hilfe eines Regenbogenmarker-gemisches (Amersham Biosciences) ermittelt werden.

2.2.8.4. Western Blot und Protein-Dot Blot Analyse

Nach der SDS-Elektrophorese wurden die Proteinbanden des entsprechenden SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dafür kam das *Semi-Dry-Blotverfahren* (horizontale Edlestahlelektroden) zur Anwendung, bei dem die einzelnen Komponenten übereinander gelegt und zwischen zwei Elektroden platziert wurden.

- Katode (-)
- 6x Filterpapier getränkt in Katodenlösung
- SDS-Akrylamidgel
- Nitrozellulose-Membran getränkt in Anodenlösung II
- 3x Filterpapier getränkt in Anodenlösung II
- 3x Filterpapier getränkt in Anodenlösung I
- Anode (+)

Die Proteine wurden bei 10 V für 1 h bei Raumtemperatur auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Kontrolle des Proteintransfers erfolgte durch Anfärben der Membran mit einer 0,2%-igen Ponceaurot-Lösung (gelöst in 3%-iger Essigsäure) für 1-2 min, die anschließend mit Wasser gewaschen wurde. Der Proteinblot wurde anschließend mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Vor der Reaktion mit den Antikörpern erfolgte das Blockieren der restlichen freien Proteinbindungsstellen der Membran mit einer 5%-igen Magermilchlösung in PBST (PBS mit 0,1% Tween[®]-20) für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühl-

raum unter sanftem Schütteln. Nach 3-mal 5-minütigem Waschen mit PBST wurde der Blot für 1 h mit dem primären Antikörper (in PBST) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem Waschen des Blots (3-mal 5 min mit PBST) erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Peroxidase-markierten Antikörper für eine weitere Stunde. Der Blot wurde wiederum 3-mal 5 min mit PBST gewaschen. Die Detektion der immunreaktiven Banden erfolgte entweder mittels einer Luminol-Substratlösung und anschließender Messung der entstehenden Chemilumineszenz mit Hilfe der Belichtung eines Films oder Direktmarkierung der immunreaktiven Banden mittels einer 3,3'-Diaminobenzidin/ Wasserstoffperoxid-Mischung.

2.2.9. Zellbiologische Methoden

2.2.9.1. Zell-Kultivierung

Die Kultivierung humaner Zell-Linien erfolgte mit Ausnahme der A549-Zelllinie [DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium)] in RPMI 1640-Medium mit 25 mM HEPES, 1 g/L Glukose, 2 mM Glutamin, 10% FKS, 100 units/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin im Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxid-Anteil in der Atmosphäre. Adhärente Zellen wurden zweimal in der Woche mit Hilfe von Trypsin oder Zellschabern geerntet und weiter passagiert. Zellschaber wurden immer dann benutzt, wenn die Zellen im Anschluss einer Stimulierung unterzogen wurden, um eine mögliche Abspaltung von Oberflächenproteinen durch Trypsin zu vermeiden.

Die Zellzählung erfolgte in einem Neubauer-Hämozytometer unter einem Mikroskop (CK2-TR von OLYMPUS) mit 10-fach bis 40-fach vergrößerndem Objektiv. Dabei wurde gleichzeitig auch die Vitalität der Zellen durch Anfärben mit einer Trypanblau-Lösung geprüft. Vitale Zellen ließen den Farbstoff erst nach ca. 10 min durch die Zellmembran. Das Zytoplasma toter Zellen verfärbte sich dagegen sofort blau. Die Neuaussaat der Zellen erfolgte im Verhältnis 1:5 bis 1:7. Für eine Kryokonservierung wurden 2×10^6 Zellen in einer Lösung aus 70% RPMI 1640-Medium, 20% FKS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen gefüllt. Die Zellsuspensionen wurden zuerst bei -80°C für 24 h eingefroren und anschließend bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für die Revitalisierung wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen, etwa 1-2 min bei Raumtemperatur aufgewärmt und dann in einem Gefäß mit 70% Ethanol bei 37°C unter leichtem Schwenken soweit aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Es folgte eine Zentrifugation von 5 min bei 400 g und 4°C. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment in warmem (37°C) Nährmedium resuspendiert. Danach wur-

den die Zellen in eine Kulturflasche überführt. Am Folgetag wurde das Medium erneut gewechselt, um tote Zellen und letzte Dimethylsulfoxid-Spuren zu entfernen.

2.2.9.2. Isolierung, Kultivierung und Zytokin-Stimulierung humaner Blutmonozyten

Periphere humane Blutmonozyten wurden aus „buffy coats“ gesunder Spender durch Dichtegradientenzentrifugation über ein Lymphozytentrennungsmittel (*Ficoll*[®]) und anschließende selektive Adhäsion an der Plastikoberfläche isoliert. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilbank.

„Buffy coats“, präpariert aus ca. 400 ml Vollblut von gesunden männlichen Spendern, konnten von der Blutspende-Zentrale des Universitätsklinikums Charité erhalten werden. Frisch präparierte „buffy coats“ wurden auf 120 ml mit HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) aufgefüllt und in vier sterile 50 ml Polypropylenröhrchen (*Falcon Tubes*) mit je 30 ml Zellsuspension verteilt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit je 15 ml *Ficoll*[®]-Lösung (Dichte 1,077) vorsichtig mit einer sterilen Spritze unterschichtet und 30 min bei 400 g und 12°C ohne Abbremsen zentrifugiert. In der Interphase zwischen roten Blutzellen und Blutplasma erschien die Lymphozyten/Monozyten-Population als weiße Schicht. Sie wurde mit einer 10 ml-Pipette entnommen und in neue 50 ml-Polypropylenröhrchen überführt. Diese wurden dann mit HBSS auf 45 ml aufgefüllt und bei 200 g und 12°C für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in Nährmedium (RPMI 1640 mit 25 mM HEPES, 10% FKS, 1 g/L Glukose, 2 mM Glutamin, 100 units/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin) resuspendiert und in sterile 10 cm (Durchmesser) Zellkulturschalen ausgesät. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurden alle nicht adhärennten Zellen durch dreimaliges, gleichmäßiges Waschen mit PBS entfernt. Der Rest wurde abgeschabt, in neue Petrischalen ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Monozyten dreimal mit PBS gewaschen und frisches Nährmedium dazugegeben.

Zur Induktion der 15-LOX-1 wurde einem Teil der Monozyten 10 ng/ml humanes IL-4 bzw. IL-13 für 72 Stunden zugesetzt. Kontrollzellen wurden ohne Zusätze über die entsprechende Zeit kultiviert. Alle 24 Stunden wurde das Nährmedium erneuert, und frisches Interleukin wurde dazugegeben. Die Monozyten wurden nach 72 Stunden mit einem Zellschaber abgeschabt, gezählt und 10 min bei 400 g und 12°C abzentrifugiert.

Bei der Inkubation der Zellen mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) wurde das Nährmedium durch PBS ausgetauscht. Allerdings überlebten die Zellen in diesem Medium nicht für längere Zeit, so dass die Inkubationszeit auf maximal 24 Stunden begrenzt wurde.

2.2.9.3. Zyto-Spin

50 μ l Zellsuspension (6×10^4 Zellen) wurden für die immunhistochemischen Färbungen in der Zytospin-Zentrifuge auf Objektträgern als Zellspot immobilisiert. Die Zentrifugation erfolgte für 5 min in speziellen Zytospin-Kammern bei 500 g. Überschüssiges Medium wurde durch Filterpapier aufgefangen.

2.2.9.4. Immunhistochemie

Um die intrazelluläre Lokalisation der 15-LOX-1 in den Monozyten zu untersuchen, wurden Monozyten nach dem Zyto-Spin auf dem Objektträger für 10 min mit eiskaltem Methanol fixiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 min in PBSTr (PBS mit 0,1% Triton[®] X-100) permeabilisiert. In einer dunklen, feuchten Kammer erfolgte für 30 min die Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt 1:1000). Nichtgebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBSTr entfernt. Der sekundäre Antikörper anti-Meerschweinchen IgG Alexa 488 (Molecular Probes, USA) wurde 1:200 verdünnt und für 30 min inkubiert. Für den Nachweis der MAO-A-Expression wurden als primärer Antikörper der Ziege anti-human MAO-A (Santa Cruz, USA) in einer Verdünnung von 1:50 und der sekundäre Kaninchen anti-Ziege IgG Alexa 568 in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Für den Nachweis des Faktors XIII-A wurden als primärer Antikörper der Maus anti-human Faktor XIII-A (Santa Cruz, USA) in einer Verdünnung von 1:50 und der sekundäre Ziege anti-Maus IgG Alexa 568 in einer Verdünnung von 1:200 verwendet.

Nach der spezifischen Immunfärbung erfolgte für 10 min eine Kernfärbung mit dem Nucleinsäurefarbstoff DRAQ5 (Biostatus, Leics, UK). Nach abschließendem Waschen der Zellen mit PBSTr wurden die Präparate mit *Mounting Solution* (Sigma) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Zur Analyse der gefärbten Zellen wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100) verwendet, an dem ein Bio-Rad MRC 1024ES Laser Erkennungs-System (Bio-Rad Microscience, Hemel Hempstead, UK) angeschlossen war. Mit geeigneten Filtersätzen wurden bei verschiedenen Wellenlängen die dazugehörigen sekundären Antikörper zum Leuchten angeregt (für Alexa 488: bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm betrug die Emissionswellenlänge 519 nm; für Alexa 568: bei einer Anregungswellenlänge von 578 nm betrug die Emissionswellenlänge 603 nm). Eine digitale CCD-Kamera gab die Bildinformationen an das Programm „*Lasersharp 2000*“ (Bio-Rad Microscience) weiter. Die Weiterbearbeitung der Bilder erfolgte mit dem Programm „*Adobe Photoshop*“. Die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte im Labor von Dr. O'Donnell (De-

partment. of Medical Biochemistry & Immunology, University of Wales College of Medicine, Heath Park, Cardiff, CF14 4XN, UK).

2.2.9.5. Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting)

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden Zellen mit kalter PBS/ EDTA-Lösung (PBS pH 7,4 und 0,25% EDTA) in Kulturschalen zweimal gewaschen und bei 400 g für 5 min und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im *FACS-Puffer* (PBS pH 7,4; 1% FKS und 0,1% NaN₃) zu einer Zelldichte von 5x10⁶ Zellen/ml resuspendiert. Je 100 µl (ca. 5x10⁵ Zellen) wurden dann mit jeweils 10 µl des entsprechenden FITC- bzw. PE-konjugierten Antikörpers für 45 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden zweimal gewaschen, zentrifugiert und das Pellet in 200 µl *FACS-Puffer* resuspendiert. Die aufgenommenen Daten von 1x10⁵ Zellen wurden über das Programm „*FACScan Research*“ (BD, Heidelberg, BRD) analysiert. Tote Zellen und Zelltrümmer wurden anhand des Streulichts identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte über eine nichtgefärbte Probe.

2.2.9.6. Transformation kompetenter Zellen

100 µl kompetente Bakterienzellen (TOP10) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 ng Vektor-DNA gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Hitzeschock-Behandlung bei 42°C für 45 Sekunden. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 500 µl LB-Medium bzw. SOC-Medium dazugegeben und der Ansatz wurde 60 min bei 37°C am Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 50-400 µl des Transformationsansatzes auf einer LB-Ampizillin-Agarplatte, die 200 µg/ml Ampizillin enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit den erhaltenen Kolonien wurden 5 ml Schüttelkulturen angezogen, um daraus kleine Mengen an Plasmid-DNA zu präparieren (*Mini-preps*). Für größere Mengen wurden Alternativ 120 ml Schüttelkulturen angezogen (*Midi-preps*).

Zum Anlegen einer Glycerinkultur wurden 500 µl Bakterienkultur-Lösung mit 500 µl autoklaviertem Glycerol vermischt und bei -20°C oder -80°C aufbewahrt. Aus der Glycerinkultur konnte direkt eine Kultur zur Präparation von Plasmid-DNA angeimpft werden.

2.2.9.7. Transfektion und Selektion stabiler Transfektanten

Für die Transfektion der Zellen und der Bildung von stabilen Transfektanten wurde das FuGENE 6 Transfektion Kit von Roche Diagnostics (Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Aufgrund des Neomycin-Resistenz-Genes, das als Selektionsmarker auf dem eingebrachten Plasmid sitzt, erfolgte die Selektion der Transfektanten mit Hilfe

des Antibiotikums Geneticin[®] (G418-sulfat), das dem Nährmedium frisch zugesetzt wurde. Transfektanten der U937-Zellen wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen mit 500 µg/ml Geneticin[®] ausselektiert. Scheintransfektanten (*Mock*-Transfektanten) enthielten das gleiche Plasmid ohne die kodierende Sequenz des zu exprimierenden Proteins und dienten somit neben dem Wildtyp als Kontrollen.

2.2.10. DNA-Mikroarray-Analyse

2.2.10.1. RNA-Qualitätskontrolle

Nachdem die Gesamt-RNA isoliert und mittels UV-Spektrophotometrie quantifiziert worden war, erfolgte vor der Mikroarray-Analyse eine Qualitätskontrolle der RNA mit Hilfe eines Chips (LabChip, BioAnalyzer, AGILENT Technologies, Santa Clara, CA). Die Hybridisierung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.10.2. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 5 µg Gesamt-RNA mit 100 pmol T7-(T)₂₄ Primer (HPLC-gereinigt, MWG-Biotech, Ebersberg, BRD) gemischt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach der Abkühlung wurde dem Ansatz Erststrang-Synthese-Puffer [10 mM DTT und dNTP-Gemisch (je 500 µM)] und 20 U/µl Reverse Transkriptase (Superscript II, Gibco BLR) zugesetzt und für weitere 1,5 h bei 43°C inkubiert. Durch Stellen des Ansatzes auf Eis wurde die Reaktion gestoppt.

Die Synthese des zweiten Stranges erfolgte auf Eis. 20 µl des Erststrang-Synthese-Ansatzes wurden mit 130 µl Zweitstrang-Synthese-Puffer [20 mM Tris/HCl, pH 6,9; 4,6 mM NaCl; 90 mM KCl; 0,25 µM Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺); 10 mM (NH₄)₂SO₄]; dNTP-Gemisch (je 200 µM); 1,2 mM DTT; 65 U/ml *E. coli* DNA-Ligase; 250 U/ml *E. coli* DNA-Polymerase I und 13 U/ml RNase H zugesetzt und für 2 h bei 16°C inkubiert. Dann wurden 2 µl T4 DNA-Polymerase dazugegeben (5 U/µl) und für weitere 5 min bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Die Reinigung der synthetisierten doppelsträngigen cDNA erfolgte durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ammoniumazetat-Fällung (5 M in absolutem Ethanol) für 20 min bei -20°C. Nach der Zentrifugation von 20 min bei 16.000 g und 25°C wurde das Pellet zwei Mal in 80%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 12 µl nukleasefreies Wasser resuspendiert. Die Qualität der cDNA wurde auf einem 1%-igen Agarose-Gel überprüfen.

2.2.10.3. *In vitro*-Transkriptions-Markierung

Die *in vitro*-Synthese der biotin-markierten cRNA erfolgte mit dem BioArray High Yield RNA Transkriptions-Kit (Enzo Diagnostics, Farmingdale, USA) gemäß den Vorschriften des Herstellers. Die Reaktion fand im T7-Transkriptionspuffer (7,0 mM ATP; 7,0 mM GTP; 5,3 mM UTP; 1,7 mM biotinmarkiertes UTP; 5,3 mM CTP; 1,7 mM biotinmarkiertes CTP) für 6 h bei 37°C statt. Anschließend wurde die transkribierte cRNA mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) gereinigt und in Gegenwart von 40 mM Tris-Azetat (pH 8,1), 100 mM Kaliumazetat und 30 mM Magnesiumazetat 35 min bei 94°C fragmentiert. Die cRNA Menge wurde quantifiziert und die Verteilung der RNA-Fragmentgrößen mittels Chips (LabChip, BioAnalyzer, AGILENT Technologies, Santa Clara, USA) untersucht.

2.2.10.4. Genchip-Hybridisierung

Für die Genexpressionsanalyse wurde der *HG U133A Oligonukleotid Chip* (Affymetrix) verwendet. Die Genchip-Hybridisierung der fragmentierten cRNA erfolgte in einem *MES*-Hybridisationspuffer [100 mM MES (2-N-Morpholinoethansulfonsäure, Sigma); 1M NaCl; 20 mM EDTA; 0,01% Tween[®]-20], der auch noch folgende Zusätze enthielt (Endkonzentrationen sind angegeben): 0,05 mg/ml fragmentierte cRNA, 50 pM Kontrol-Oligonukleotid B2, eukaryotische Hybridisierungskontrollen (1,5 pM bioB; 5 pM bioC; 25 pM bioD; Affymetrix, Santa Clara, CA), 0,1 mg/ml of Hering-Sperma DNA und 0,5 mg/ml azetyliertes BSA (Sigma). Vor jeder Hybridisierung wurde die Hybridisationslösung auf 95°C erwärmt und anschließend auf 45°C abgekühlt. Durch Zentrifugation wurden Präzipitate entfernt. Die Hybridisierung erfolgte in einem Hybridisationsofen für 16 h bei 45°C.

Schließlich wurde der Chip gewaschen und gefärbt, dabei wurde das „*GeneChip fluidics station protocol EukGE-WS2*“ angewendet. Der Chip wurde 10x bei 25°C mit mildem Wasch-Puffer (0,9 M NaCl; 0,06 M NaH₂PO₄; 6 mM EDTA; 0,01% Tween[®]-20) gewaschen. Der zweite Waschschrift bestand aus 4 Zyklen zu je 15 Waschschriften mit folgendem Wasch-Puffer: 100 mM MES, 0,1 M NaCl und 0,01% Tween[®]-20) bei 50°C.

Die Färbung der Chips erfolgte für 10 min bei 25°C in einem Färbepuffer bestehend aus Streptavidin-Phykoerythrin (*SAPE*)-Lösung [10 µg/ml SAPE (Molecular Probes, Eugene, USA), 2 µg/µl azetyliertes BSA in 100 mM MES; 1 M NaCl und 0,05% Tween[®]-20]. Nach der Färbung wurden die Chips 10x bei 25°C erneut mit dem milden Waschpuffer gewaschen.

Zur Verstärkung des Signals wurde der Chip dann mit einem biotinylierten Ziege-Anti-Streptavidin Antikörper 3 µg/ml (Vector Laboratories, Burlingame, CA) in 100 mM MES; 1 M NaCl, 0,05% Tween[®]-20, 2 µg/µl azetyliertem BSA und 0,1 µg/µl Ziegen IgG (Sigma)

für 10 min bei 25°C versetzt. Schließlich wurde der Chip ein letztes Mal für 15 Zyklen bestehend aus je 4 Waschschrinen mit dem milden Waschpuffer bei 30°C gewaschen.

Nach der Färbung und dem Waschen folgte eine zweifache Messung der Signalintensitäten der Genchips mit Hilfe eines konfokal-optischen Laser-Scanners (Hewlett Packard) mit einer Auflösung von 3 µm. Die Steuerung der Geräte und die Datenarchivierung wurden mit der Software „*Microarray Suite Version 5.0*“ (Affymetrix) durchgeführt. Die gemessenen Daten wurden in einer Excel-Tabelle (Microsoft, BRD) zusammengefasst, exportiert und analysiert.

Die Mikroarray-Hybridisierung und die statistische Auswertung der Rohdaten wurden im Labor für funktionelle Genomforschung der Charité von Frau Dr. U. Ungethüm und Herrn Dr. R. Kuban durchgeführt. Alle Gene bzw. annotierten Zielsequenzen, für die eine bekannte oder hypothetische molekulare Funktion vorlag, wurden nach den Richtlinien des Gene-Ontology-Konsortiums [ASHBURNER *et al.*, 2000] funktionell klassifiziert. Als Quelle hierfür wurde das Internetportal *NetAffx*TM [<http://www.affymetrix.com>; LIU *et al.*, 2003] der Firma Affymetrix verwendet.

Alle Mikroarray-Daten sind in der GEO (*Gene Expression Omnibus*)-Datenbank des nationalen Zentrums für biotechnologische Informationen unter der Zugangs-Nummer GSE805 (*GEO accession*) erhältlich (NCBI; Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).