

6. Methoden

6.1. Zellkultur

Benötigte Lösungen und Medien:

-PBS

-Trypsin-Lösung (0,3 % in PBS)

-RPMI-Medium mit 10 % FCS:

500 ml RPMI,

50 ml fötales Kälberserum,

5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (50.000 E. Penicillin/ml und 50 mg/ml Streptomycin),

5 ml 200 mM L-Glutamin

-KGM-Medium (Boyce und Ham, 1983):

500 ml KBM,

0,5 ml 100 ng/ml hEGF,

0,5 ml 5 mg/ml Insulin,

0,5 ml 0,5 mg/ml Hydrokortison,

2 ml 7,5 mg/ml Rinderhypophysenextrakt,

0,5 ml 50 mg/ml Gentamycinsulphat

Die Medien werden bei 4 °C aufbewahrt.

6.1.1. Kultivieren der Zellen

HaCaT-Zellen werden in RPMI-Medium mit 10 % FCS in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ enthält, kultiviert. Diese Zelllinie wächst adhärent auf dem Boden der Schalen. Das Zellmedium wird jeden zweiten bis dritten Tag erneuert, wobei vor jedem Mediumwechsel die Zellen mit sterilem PBS gespült werden, um sowohl tote Zellen als auch saure Stoffwechselprodukte zu entfernen.

Zum Passagieren werden die konfluent gewachsenen Zellen zuerst einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,3 % Trypsin behandelt. Nach Ablösung der Zellen werden sie von der Kulturflasche abgespült und in ein mit RPMI-Medium gefülltes 50 ml- Zentrifugenröhrchen

überführt. Die Trypsinlösung sollte nicht länger als 10 min auf den Zellen sein, da sie zellschädigend wirkt. Die Zellen werden 3 min bei 900 Upm pelletiert und in RPMI-Medium resuspendiert. Um für einen Versuchsansatz eine definierte Zellzahl pro Kulturschale zu erhalten, werden die Zellen mit Hilfe eines Hämozytometers gezählt und entsprechend auf die neuen Schalen verteilt. Unmittelbar vor Versuchsbeginn werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen.

6.1.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen

HaCaT-Zellen werden im konfluenten Zustand einmal mit PBS gewaschen und wie gewohnt trypsinisiert. Nach dem Zentrifugieren wird das Pellet in 1 ml FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in 1 ml Gefrier Röhrchen überführt. Das DMSO verhindert die Kristallbildung innerhalb der Zellen. Das Einfrieren sollte langsam vorangehen, um Schäden durch Kristallisationsprozesse zu vermeiden. Deshalb werden die Röhrchen in Zellstoff eingewickelt und zunächst bei -80 °C für zwei Tage gelagert. Danach werden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Das Auftauen der Zellen sollte schnell geschehen, daher werden die Röhrchen nach der Entnahme aus dem Stickstofftank in lauwarmes Wasser gehalten. Der Inhalt jedes aufgetauten Röhrchens wird in 10 ml Medium gegeben und bei 900 Upm 3 min zentrifugiert. Das Pellet wird in neuem Medium aufgenommen und kann auf zwei Kulturflaschen verteilt werden. Am folgenden Tag werden die Zellen zur Entfernung der nichtadhärierten Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

6.2. Radioisotopenmarkierung

Das Medium wird entfernt und die Zellen werden nach Waschen mit PBS mit dem Markierungsmedium KGM, das $3,7 \times 10^4$ Bq/ml [Methyl-³H]-Cholinchlorid enthält, 72 h inkubiert. Vor der Behandlung mit Stimulationsmedium werden die Zellen einmal mit PBS gespült.

6.3. Totallipidextraktion

Die Totallipidextraktion wird nach einer modifizierten Methode von Bligh und Dyer durchgeführt (Bligh und Dyer, 1959).

Benötigte Reagenzien:

- Methanol/Chloroform/Wasser-Gemisch (10:5:4, v/v),
- Chloroform.

Durchführung:

Nach der Stimulation mit den verschiedenen Agonisten werden die Cholin-markierten Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 400 µl PBS mit einem Zellschaber geerntet. Die Zellen werden bei 13.000 Upm für 5 min zentrifugiert und anschließend gefriergetrocknet. Das Pellet wird in 95 µl Methanol/Chloroform/Wasser-Gemisch (10:5:4, v/v) aufgenommen und 10 min im Ultraschall-Wasserbad behandelt, um die Lipide in Lösung zu bringen. Die Phasentrennung erfolgt durch Zugabe von 25 µl Wasser und 25 µl Chloroform. Die untere organische Phase wird nach dem Zentrifugieren (13.000 Upm, 5 min, RT) in ein anderes Eppendorfgefäß überführt. Die Chloroformphase kann entweder unter Stickstoffzufuhr eingedampft oder unter dem Abzug zum Abdampfen stehen gelassen werden. Die Proben werden bei -80 °C gelagert.

6.4. Bestimmung der Sphingomyelin-Hydrolyse

Der Versuch wurde nach einer bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Jayadev et al., 1994). Dabei wird der Sphingomyelin-Gehalt in den Totallipidextrakten indirekt über die Freisetzung des markierten Phosphocholins durch eine bakterielle Sphingomyelinase bestimmt. Phosphocholin ist im Gegensatz zu Ceramid und den übrigen Lipiden wasserlöslich und kann deshalb über die Herstellung von zwei Phasen getrennt werden.

Benötigte Lösungen:

-Sphingomyelinase-Inkubationspuffer:

	f. c.	Menge
Tris-HCl	100 mmol/l	1,21 g
Magnesiumdichlorid-6-hydrat	6 mmol/l	121,80 mg
Triton X-100	1 %	100 µl

mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen, pH 7,4 einstellen.

-Sphingomyelinase aus *Streptomyces species*,

-Chloroform/Methanol (2:1, v/v).

Durchführung:

Die Totallipidextrakte werden in 100 µl Puffer aufgenommen und 5 min mit Ultraschall behandelt. 1 U/ml Sphingomyelinase wird zu den Proben gegeben und im 37 °C Wasserbad 2 h unter mäßigem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 ml Chloroform/Methanol-Gemisch (2:1, v/v) gestoppt. Anschließend wird durch Zugabe von 100 µl Wasser die Phasen getrennt (Folch et al., 1957). Die obere wäßrige Phase (400 µl) wird in ein Szintillationsröhrchen überführt. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit wird die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

6.5. Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure

Der Proteingehalt einer Probe wird mit einem käuflichen Kit der Firma Pierce (Weiskirchen) bestimmt. Die Methode wurde von Smith und Mitarbeitern (Smith et al., 1985) beschrieben. Diese Proteinnachweismethode basiert darauf, daß die Stickstoffgruppe der Proteine im alkalischen Medium Kupfer(II)-Kationen zu Kupfer(I)-Kationen reduzieren können. Kupfer(I) reagiert dann mit zwei BCA-Molekülen (Bicinchoninic acid) zu einem violetten Komplex, der photometrisch bei 562 nm zu messen ist.

Benötigte Lösungen:

Lösung A:

	f. c. [mM]	Menge [g]
Dinatriumbicinchoninat	26	10
Natriumcarbonat-Monohydrat	161	20
Natriumtartrat-Dihydrat	7	1,6
Natriumhydroxid	100	4
Natriumhydrogencarbonat	113	9,5

mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen.

Lösung B: 1 g Kupfersulfat-Pentahydrat wird in 25 ml Aqua bidest aufgelöst.

Arbeitslösung: 50 Teile Reagenz A werden mit einem Teil Reagenz B gemischt.

Durchführung:

Es wird zuerst eine Proteinstandardreihe (0-200 µg/ml) aus einer BSA-Stammlösung (2 mg/ml) hergestellt. Je 10 µl der zu untersuchenden Proben (mindestens Doppelwerte) und der Standardreihe werden auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Die Arbeitslösung wird frisch angesetzt. Es werden je 200 µl auf die Proben gegeben werden. Nach einer halbstündigen Inkubation bei 37 °C werden die Proben bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Nach Erstellen einer Standardkurve werden die Proteinkonzentrationen der Proben aus der Graphik abgelesen.

6.6. Bestimmung der Enzymaktivität von der sauren und neutralen Sphingomyelinase

Der Versuch wurde nach der von Wiegmann und Mitarbeitern beschriebenen Methode durchgeführt (Wiegmann et al., 1994). Da die neutrale Sphingomyelinase sehr instabil ist, werden viele Protease-Inhibitoren eingesetzt. Außerdem ist darauf zu achten, daß der Versuch zügig durchgeführt wird. Bei der Bestimmung der sauren Sphingomyelinase sind keine Protease-Inhibitoren nötig und das Zellysat kann eingefroren werden. Die Zellen werden nach der Vorinkubation mit KBM und 2 % BSA statt mit Trypsinlösung, mit PBS/EDTA abgelöst, da das Trypsin als eine Protease die TNF- α -Rezeptoren angreifen könnte. EDTA löst die Zellen ab, weil es die für die Adhäsion wichtigen Calciumionen abfängt. Als Enzymquelle

dienen die Zellysate, die in definierten Mengen mit am Cholin Kopf markierten Sphingomyelin als Substrat inkubiert werden.

Benötigte Lösungen:

-KBM mit 2 % BSA

-PBS mit 2 mM EDTA

-Bird-Puffer:

	f. c. [mM]	[ml]
(1 M) HEPES, pH 7,2	20 mM	2
(1 M) Natriumfluorid	10 mM	1
(1 M) Magnesiumchlorid	10 mM	1
(0,5 M) EDTA	2 mM	0,4
ad 100 ml mit Aqua bidest.		

Zusätze, die kurz vor Versuchsansatz zum Birdpuffer gegeben werden:

	f. c.	[μ l]
(1,5 M) Nitrophenylphosphat	30 mM	50
(0,1 M) Natriumvanadat	0,1 mM	50
(0,1 M) Natriummolybdat	0,1 mM	50
(0,1 M) β -Glycerophosphat	10 mM	50
(0,1 M) PMSF	1 mM	50
(30 mg/ml) Pepstatin	30 μ g/ml	50
(30 mg/ml) Leupeptin	30 μ g/ml	50
(30 mg/ml) Aprotinin	30 μ g/ml	50
(10 %) Triton X-100	0,2 %	100
(0,1 M) ATP	750 μ M	38
ad 5 ml mit Bird-Puffer.		

- neutrale Sphingomyelinase-Puffer:

	f. c. [mM]	[ml]
(1 M) HEPES, pH 7,2	20	1
(1 M) Magnesiumchlorid	10	0,5
(0,1 M) ATP	0,25	0,125
ad 50 ml mit Aqua bidest.		

- saure Sphingomyelinase-Puffer (pH 5,0, mit Essigsäure):

	f. c.	[ml]
(3 M) Natriumacetat	250 mM	4,2
(0,5 M) EDTA	1 mM	0,1
(10 %) Triton X-100	0,1 %	0,5

ad 50 ml mit Aqua bidest.; pH mit Essigsäure auf 5,0 einstellen.

-[C¹⁴]-Sphingomyelin (13 nmol/ μ Ci)

-Chloroform/Methanol (2:1, v/v)

Durchführung:

HaCaT-Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und 2 h mit KBM, das 2 % BSA enthält, inkubiert. Das Medium wird anschließend abgenommen und PBS/EDTA auf die Zellen gegeben und wieder in den Brutschrank gestellt. Nachdem sich die Zellen abgelöst haben, werden sie in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1800 Upm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird erneut mit KBM gewaschen, in KBM aufgenommen und in 500 μ l-Portionen auf 1,5 ml-Eppendorfgefäße verteilt. Diese werden in 37 °C-Wasserbad gestellt. Sowohl der Bird-Puffer als auch das Methanol/Trockeneis-Bad (Trockeneis wird zum Methanol gegeben) werden hergestellt. Die Zellen werden nun entweder mit TNF α (Stammlösung wird in KBM angesetzt), 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ oder den Kontrollen behandelt. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten werden die Eppendorfgefäße für ca. 10 sec. in das Methanol/Trockeneis-Bad gehalten, wobei die Proben nicht einfrieren dürfen, dann sofort auf Eis gestellt und bei 13000 Upm für 30 sec. zentrifugiert. Auf Eis wird der Überstand abgesaugt und 50-200 μ l Bird-Puffer (je nach eingesetzter Zellzahl) oder wenn die saure Sphingomyelinase bestimmt wird, 0,2 % Triton X-100 auf die Pellets gegeben. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen durch 3-5maliges Aufziehen mit einer 25 G Kanüle homogenisiert. Für die Bestimmung der neutralen Sphingomyelinase werden die Lysate bei 2800 Upm und der sauren Sphingomyelinase bei 13000 Upm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände werden in neue Eppendorfgefäße überführt und auf Eis gestellt. Mit Hilfe der BCA-Methode wird der Proteingehalt in den Lysaten bestimmt. Zur Herstellung der Substratlösung wird C¹⁴-markiertes Sphingomyelin abgefüllt (pro Ansatz 2,25 μ l) und unter Stickstoff eingedampft. Mit absolutem Ethanol wird die Radioaktivität auf ihr ursprüngliches Volumen aufgefüllt. Dadurch wird das in der radioaktiven Lösung enthaltene Toluol entfernt, was die Enzymreaktion stören würde. Die Substratlösung wird für 5 min ins Ultraschallbad gestellt und anschließend mit neutraler Sphingomyelinase-Puffer (oder saurer Sphingomyelinase-Puffer) auf Anzahl der Proben mal 30 μ l aufgefüllt, da die

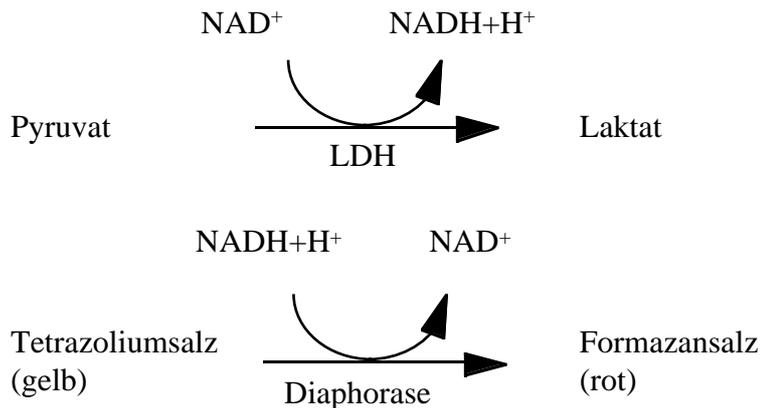
Radioaktivität in einem Volumen von 30 µl zu den entsprechenden Proben gegeben wird. 20-50 µg Protein werden in einem Volumen von 20 µl Puffer in ein Eppendorfggefäß gegeben. Nach Zugabe von 30 µl Substratlösung, d. h. das Endvolumen beträgt 50 µl, werden die Proben 2 h bei 37 °C inkubiert. Gestoppt wird die Reaktion durch Zugabe von 800 µl Chloroform/Methanol-Gemisch. Eine Phasentrennung wird vollzogen durch Zugabe von 250 µl bidest. Wasser. Die Proben werden gut gemischt und bei 13000 Upm für 5 min zentrifugiert. Von der oberen wäßrigen Phase werden 200 µl in Szintillationsröhrchen überführt. Es werden 3 ml Szintillationsflüssigkeit dazupipettiert und die Proben im Zähler gemessen.

6.7. Messung der Zytotoxizität

Klassisch wird der unspezifische Zelltod, auch Nekrose genannt, über Plasmamembranschäden nachgewiesen. Wirkt eine Substanz zytotoxisch auf Zellen, dann schwillt die Zellmembran an und platzt. Der Zellinhalt wird in den Zellkulturüberstand abgegeben. Es gibt verschiedene Methoden, um die Zytotoxizität einer Substanz auf die Zellen zu bestimmen, u. a. über die Aufnahme oder Ausschluß von bestimmten Farbstoffen wie Trypanblau, Eosin und Propidiumiodid. Eine weitere Methode ist die Messung von zytoplasmatisch lokalisierten Enzymen (alkalische Phosphatase, Laktatdehydrogenase...), die nach Schäden an der Plasmamembran aus der Zelle austreten.

6.7.1. Messung der Laktatdehydrogenase (LDH)

Die Laktatdehydrogenase ist ein stabiles Enzym, das in fast allen Zellen vorkommt. Mit Hilfe des käuflich erwerblichen Kits von der Firma Boehringer Mannheim wird LDH in einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen. Im ersten Schritt katalysiert LDH die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wobei NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Im zweiten Schritt überträgt die Diaphorase H/H^+ auf das Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyl-tetrazolium) (gelb), welches dann zu Formazan (rot) reduziert wird, das im ELISA-Reader gemessen werden kann. Der Überstand kann auch bei 4 °C für ein paar Tage aufbewahrt werden ohne, daß die Aktivität von LDH abnimmt. Der Anstieg der LDH-Aktivität im Zellüberstand ist proportional der Anzahl der toten bzw. geschädigten Zellen.



Benötigte Reagenzien (keine näheren Angaben des Herstellers):

Lösung 1: Katalysator

Lösung 2 : Farbstoff

Arbeitslösung für 30 Proben:

Lösung 1: 75 μ l

Lösung 2: 3,45 ml.

Durchführung

Nach der Behandlung der Zellen in 24er Kulturschalen mit der zu untersuchenden Substanz werden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten 100 μ l Zellüberstand entnommen, zentrifugiert und auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Als Reaktionsgemisch (kurz vorher ansetzen) werden Lösung 1 und 2 in einem bestimmten Verhältnis gemischt und in 100 μ l-Portionen auf die Überstände gegeben und die Platte unter Abdunkelung bei RT bis zu 30 min inkubiert. Die Absorption des Farbstoffes wird bei 490 nm gemessen.

6.7.2. Messung der alkalischen Phosphatase

Alkalische Phosphatase ist eine unspezifische Phosphatase, die in fast allen Zellen vorkommt, jedoch in geringeren Mengen als LDH. Die Messung der Aktivität der alkalischen Phosphatase basiert auf einer bereits von Culvenor und Mitarbeitern beschriebenen Methode (Culvenor et al., 1981) und wurde mit einem käuflichen Kit der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt.

Benötigte Reagenzien:

-Reaktionspuffer:

1 mmol/L Diethanolamin-Puffer, pH 9,8

0,5 mmol/L Magnesiumchlorid,

-Substrat: 10 mmol/L p-Nitrophenylphosphat, in Tablettenform.

-Triton X-100,

-Stopplösung: 0,5 mmol/L Natronlauge,

Reaktionslösung: 1 Tablette + Triton X-100 (f. c. 10 %) in 25 ml Reaktionspuffer.

Durchführung:

Zellen werden in 24er Kulturschalen 6 h mit der zu untersuchenden Substanz behandelt. Danach wird das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Je 250 µl der kurz vorher angesetzten Reaktionslösung werden auf die Zellen gegeben und die Platte bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert bis eine deutliche Gelbfärbung zu sehen ist (bis zu 30 min). Die Reaktion wird gestoppt durch Zugabe von je 250 µl Natronlauge. Von den nun insgesamt 500 µl Zellüberstand werden je 100 µl in eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei 405 nm gemessen.

6.8. Bestimmung der Proliferation

Um eine eindeutige Aussage über das Proliferationsverhalten der Zellen treffen zu können, werden verschiedene Methoden angewandt. Hierzu gehören die Messung der Aufnahme von radioaktivem [³H]-Thymidin in die Zelle, Bestimmung des Zellzyklusstadiums mit Hilfe von FACS-Analysen, Enzymaktivitätsmessungen und einfacherweise die Bestimmung der Zellzahl, wozu die nachfolgend von der Arbeitsgruppe um Gillies beschriebene Kristallviolett-Methode gehört (Gillies et al., 1986). Kristallviolett ist ein Farbstoff, der an die DNA bindet, ungeachtet dessen, ob die Zelle lebt oder nicht. Bei adhären wachsenden Zellen wie die Keratinozyten, lösen sich die toten Zellen von der Kulturschale ab und gehen so in den Kulturüberstand, der abgesaugt wird. Deswegen werden mit dieser Methode nur die lebenden, adhären Zellen erfaßt.

Benötigte Lösungen:

-PBS

-0,1 % Glutardialdehyd in PBS

-0,1 % Kristallviolett in PBS

-0,2 % Triton-X-100 in PBS

Durchführung:

HaCaT-Zellen werden in einer 24er Kulturschale ausgesät. Die Zellen werden mit den entsprechenden Substanzen in KGM behandelt, wenn sie ca. 30 % konfluent sind. Nach der Behandlungsdauer von mindestens 24 h wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS abgewaschen. Es werden je 500 µl 0,1 % Glutardialdehyd auf die Zellen gegeben und für 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Glutardialdehyd fixiert die Zellen auf der Kulturschale. Anschließend wird das Glutardialdehyd abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Jetzt wird in 500 µl-Portionen 0,1 % Kristallviolett zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT (Schüttler) wird der nichtgebundene Farbstoff abgewaschen, in dem die Kulturschale für ca. 10-15 min in deionisiertes Wasser gelegt wird. Der Farbstoff wird mit je 200 µl 0,2 % Triton X-100 aus den Zellen herausgelöst. Nach ca. 1 h bei RT, wenn der Farbstoff aus den Zellen vollständig herausgelöst worden ist (eventuell unter Mikroskop beobachten), werden je 100 µl in eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei 570 nm im ELISA-Reader bestimmt. Die Höhe der Extinktion entspricht der Anzahl von Zellen. Die Werte stellen 4-fach Ausführungen dar und werden in Prozent der Kontrolle angegeben.

6.9. Messung des apoptotischen Zelltodes mittels eines Sandwich-ELISAs

Der in einer Zelle eingeleitete Prozeß der Apoptose kann über verschiedene Methoden gemessen werden. Eine der aussagekräftigsten Methoden zur Erfassung der Apoptose ist die Bestimmung der DNA-Fragmentierung, die einen irreversiblen Schritt darstellt. Die am Ende der Apoptose-Signalkaskade aktivierte Endonuklease schneidet die DNA an den für das Enzym zugänglichen Linkerregionen der Nukleosomen, so daß DNA-Histon-Komplexe entstehen, deren DNA-Länge ein Vielfaches von 200 Basenpaaren darstellt. Nach einer Lyse von Zellen, gehen diese kleinen DNA-Histon-Komplexe in den Überstand, wohingegen intaktes Chromatin in den lysierten Zellen verbleibt. Der Assay, durchgeführt mit dem

käuflichen „Cell death detection ELISA“ Kit der Firma Boehringer Mannheim, wird in einer Mikrotiterplatte angesetzt, die mit Streptavidin beschichtet ist. Nach Zugabe des Zellysats wird eine Lösung zugegeben, die einen Gemisch aus anti-Histon-Biotin-Antikörper und anti-DNA-Antikörper gekoppelt mit Peroxidase enthält, so daß ein sogenannter Sandwich-Komplex (siehe Abb.26) gebildet wird. Die Zugabe des Substrats bewirkt, daß eine grüne Farbreaktion entsteht, welche im ELISA-Reader gemessen werden kann. Je mehr Fragmente im Zellysat vorhanden sind, desto stärker ist die Farbreaktion.

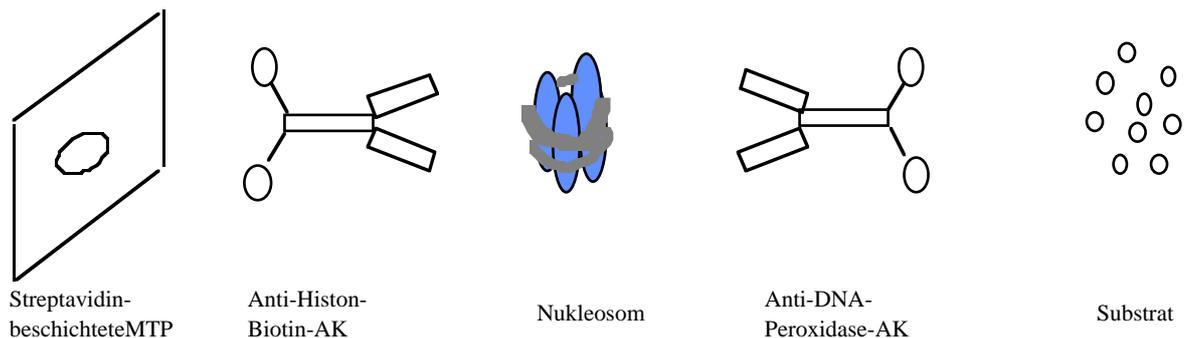


Abb.27. Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA-Prinzips.

Benötigte Lösungen:

- 0,3% Trypsinlösung
- anti-Histon-Antikörper gekoppelt mit Biotin
- anti-DNA-Antikörper gekoppelt mit Peroxidase
- Inkubationspuffer
- Lysispuffer
- Positivkontrolle (im Kit enthalten)
- Substratlösung (2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat])
- Konjugatlösung für 30 Proben:

120 µl anti-Histon-Antikörper
120 µl anti-DNA-Antikörper
2160 µl Inkubationspuffer

Durchführung:

HaCaT-Zellen werden in 24er-Kulturschalen ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit der zu untersuchenden Substanz behandelt. Nach der Inkubationszeit werden die Zellüberstände in Eppendorfgefäße

überführt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl Trypsinlösung versehen. Wenn die Zellen sich abgelöst haben, werden zum Abstoppen des Trypsins 500 µl RPMI zugegeben, die Zellen zu den entsprechenden Überständen gegeben und bei 13.000 Upm 5 min (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen noch einmal mit je 500 µl RPMI gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wird wieder abgesaugt und das Zellpellet in 500 µl Lysispuffer aufgenommen und 30 min bei RT unter mäßigem Schütteln inkubiert. Die Proben werden bei 13.000 Upm für 10 min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Danach werden je 20 µl der Lysate auf die vorbeschichtete Mikrotiterplatte gegeben. 80 µl Konjugatlösung werden zu den 20 µl Zellysaten gegeben und 2 h bei RT unter mäßigem Schütteln inkubiert. Die Mikrotiterplatte wird ausgekippt und die Löcher mit je 200 µl Inkubationspuffer dreimal gewaschen. 100 µl Substratlösung werden in die einzelnen Löcher pipettiert und die Mikrotiterplatte abgedeckt, da die Substratlösung lichtempfindlich ist. Nach ca. 10-15 min wird die Platte im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen. Werte werden als Prozent der Kontrolle angegeben.

6.10. Ribonuklease (RNase)-freies Arbeiten

Ribonukleasen sind sehr stabile und aktive Enzyme, die im allgemeinen keine Kofaktoren für ihre Funktion brauchen, weswegen sie sehr schwer zu inaktivieren sind. Spuren von RNasen reichen aus um RNA zu zerstören. RNasen können nur mit sehr starken Reduktionsmittel wie Diethylpyrocarbonat (DEPC), β-Mercaptoethanol oder starker Hitze inaktiviert werden. Alle benutzten Rührfische, Glas- und sonstige thermostabilen Materialien müssen vor dem Versuch von potentieller RNase-Kontamination befreit werden. Hierfür können sie bei 220 °C für ca. 16 h in den Trockenschrank gelegt werden. Geräte wie Gelkammer oder pH-Meter-Stab werden vor der Benutzung mit DEPC-vorbehandeltem bidest. Wasser gespült. Alle Puffer werden mit DEPC-Wasser hergestellt. Hierfür wird in einem RNase-freien Gefäß bidest. Wasser mit 0,05 % DEPC versetzt und über Nacht gerührt. Im Anschluß daran wird das Wasser autoklaviert, um DEPC zu entfernen. DEPC zerfällt zu Ethanol und Wasser. Während der Arbeit mit RNA müssen jederzeit Handschuhe getragen werden.

6.10.1. Isolierung der mRNA aus Zellen

Konfluente HaCaT-Zellen werden mit 100 nM $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃, Calcipotriol, Tacalcitol, EB 1213, GS 1500 oder den entsprechenden Kontrollen in KBM inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wird die mRNA aus den Zellen mit dem käuflichen Kit von der Firma Stratagene (Heidelberg) entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert. mRNA wird über seinen poly (A)-Schwanz an Oligo-Thymidin, das an Zellulose gekoppelt ist, gebunden und kann so von der übrigen RNA getrennt werden.

Benötigte Lösungen (keine näheren Angaben des Herstellers zu den Lösungen):

- Denaturierungslösung,
- β -Mercaptoethanol
- (0,04 g/ml) Oligo(dT)-Zellulose,
- hochkonzentrierte Salzlösung,
- niedrigkonzentrierte Salzlösung,
- Elutionspuffer,
- (5 M) Natriumchlorid,
- (3 M) Natriumacetat,
- (20 mg/ml) Glykogen,
- (75 %) RNase freies Ethanol.

Durchführung:

Für den Versuch werden HaCaT-Zellen aus Kulturschalen mit 15 cm Durchmesser eingesetzt. Je zwei Schalen werden für einen Zeitpunkt der Behandlung genommen. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen einmal mit PBS gespült. Beide Schalen eines Zeitpunktes werden mit insgesamt 5 ml Denaturierungsreagenz, das 1 % β -Mercaptoethanol enthält, versetzt und geerntet. Das Zellysate wird dann in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die aufgrund der DNA dickflüssige Lösung wird mit einer Kanüle homogenisiert, indem die Lösung mehrmals mit einer Spritze aufgezogen wird. 10 ml Elutionspuffer werden auf die Proben gegeben und gut gemischt. Für jede Probe werden 1,3 ml Elutionspuffer in einem 1,5 ml- Eppendorfgefäß in einem 68 °C heißen Wasserbad bereitgestellt. Die Proteine werden bei 12.000 x g für 10 min bei RT pelletiert. Der Überstand wird zu 5 ml Oligo(dT)-Zellulose gegeben, die vorher im 50 ml-Röhrchen durch mäßiges Schütteln in Suspension gehalten wurde. Das Röhrchen wird weitere 15 min bei RT geschüttelt und anschließend bei 700 x g und RT 3 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellulose-Pellet mit

5 ml hochkonzentriertem Salzpuffer dreimal gewaschen. Das Pellet wird danach in 5 ml niedrigkonzentriertem Salzpuffer resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wird wieder mit 5 ml niedrigkonzentriertem Salzpuffer aufgenommen und in zwei Portionen auf die Säule gegeben, wobei der Puffer mit dem Stempel herausgedrückt wird, so daß die an die Zellulose gebundene RNA übrigbleibt. Nacheinander werden dreimal 400 µl des heißen Elutionspuffers durch die Säule gedrückt und in den drei vorher beschrifteten Eppendorfgläsern aufgefangen.

Präzipitation:

Zu jeder Probe werden 40 µl 3 M Natriumacetat gegeben, geschüttelt und für 30 min bei 13.000 Upm und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen und die RNA-Pellets werden 5 min getrocknet. Die Resuspension der drei Pellets einer Probe erfolgt in insgesamt 40 µl Elutionspuffer.

6.10.2. Isolierung der Total-RNA nach Quiagen

Die Isolierung der Total-RNA wird mit den Komponenten des Kits der Firma Quiagen (Hilden) entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Benötigte Lösungen (keine näheren Angaben des Herstellers):

- RLT-Puffer,
- RW1-Puffer,
- RPE-Puffer,
- DEPC-Wasser,
- Sammelgefäße (1,5 ml und 2 ml),
- Mini Spin Säulen,
- β-Mercaptoethanol,
- 70 % Ethanol,
- Lysispuffer: pro ml RLT 10 µl β-Mercaptoethanol.

Durchführung:

Die behandelten Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und mit 600 µl Lysispuffer (für 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen) lysiert. Nach Überführung der Lysate in Zentrifugenröhrchen, werden sie gut gemischt bzw. gevortext bis keine Klumpen mehr sichtbar sind. Die Lysate werden zum Homogenisieren auf QIAshredder Säulen (Quiagen) gegeben und für 2 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Ein Volumen (600 µl) 70 % iges Ethanol wird den Lysaten

zugefügt und gut gemischt. Das gesamte Lysat wird in zwei Schritten auf die Mini Spin Säule gegeben und bei 10.000 Upm 15 sec. zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen. Zum Waschen der nun gebundenen RNA werden nacheinander 700 µl RW1-Puffer und 2 x 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und jedesmal der Durchfluß verworfen. Die Säule wird zum Schluß 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um Ethanolreste zu entfernen. Die RNA wird von der Säule heruntergespült durch Zugabe von 2 x 50 µl DEPC-Wasser und Zentrifugieren bei 10.000 Upm für 1 min. Die RNA-Menge wird photometrisch bestimmt. Dafür werden die Proben verdünnt, um so wenig wie möglich RNA zu verlieren, und bei 260 nm und 280 nm im UV-Photometer gemessen. Der Quotient von 260 nm/280 nm (sollte ungefähr 2 betragen) sagt darüber aus, ob die RNA-Proben mit Protein verunreinigt sind. Die RNA-Mengen werden über die folgende Gleichung ausgerechnet:

$$1 \text{ Absorption}_{260\text{nm}} = 40 \mu\text{g/ml.}$$

6.11. Northern-Blot

Für die Analyse der mRNA wird diese nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Die Membran kann nun mit der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert werden. Durch Auflegen eines Röntgenfilmes oder einer PhosphoImagerplatte kann das Ergebnis der Hybridisierung durch Schwärzung des Films visualisiert werden.

Benötigte Lösungen:

-10 x MOPS Puffer:

	f. c.	
Morpholinopropansulfonsäure	0,4 M	83,7 g
Natriumacetat-3-hydrat	0,1 M	13,6 g
EDTA-dinatrium-2-hydrat	10 mM	11,87 g
DEPC-Wasser		1 Liter
pH mit Natronlauge auf 7,2 einstellen		

-1,5 % Agarosegel:

Für ein großes Gel (ca 20 x 20 cm) werden 4,5 g Agarose in ein Erlenmeyerkolben eingewogen, mit DEPC-Wasser auf 255 ml aufgefüllt und in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht, so daß die Agarose vollständig aufgelöst ist und keine Schlieren mehr zu sehen

sind. 30 ml 10 x MOPS-Puffer und unter dem Abzug 16,2 ml 37 % (w/v) Formaldehyd (säurefrei) werden zugegeben. Das Gel wird gut gemischt und wenn es leicht abgekühlt ist, in die dafür vorgesehene Kammer gegossen.

- 10 x Probenpuffer (Aliquots bei - 20 °C lagern):

	f. c.	ad 10 ml
87 % Glycerol	25 %	2,87 ml
0,5 M EDTA	1 mM	20 µl
2,5 % Bromphenolblau	0,25 %	1 ml
DEPC-Wasser		6,11 ml

- Denaturierungslösung,

- RNA-Marker,

- 20 x SSC-Puffer:

	f. c. [M]	Menge [g]
Natriumchlorid	3	175,35
Natriumcitrat-2-hydrat	0,3	88,23

pH auf 7,0 einstellen und mit DEPC-Wasser auf 1 Liter auffüllen.

-10 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Stammlösung:

100 g SDS in 1 L Aqua bidest. auflösen und den pH-Wert auf 7,2 einstellen (Staubmaske tragen).

-Whatman 3 MM-Filterpapier

-Laufpuffer: 1 x MOPS-Puffer

Durchführung:

Die RNA-Proben, die ganze mRNA (aus 2×10^7 Zellen) oder 25-30 µg Total-RNA, werden getrocknet und in 20 µl Probenpuffer resuspendiert. Es werden je 2 µl von zwei RNA-Markern mit 15 µl Probenpuffer versetzt. Nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid zu allen Proben, werden diese bei 95 °C für 5 min denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt. 1 x MOPS-Puffer wird als Laufpuffer in die Gelkammer eingefüllt. Die Proben werden auf das Gel aufgetragen und bei 80 Volt elektrophoretisch aufgetrennt, bis die Bromphenolbande dreiviertel des Gels durchlaufen hat (ca. 3 h).

Nach der Elektrophorese wird das Gel dreimal 5 min mit Aqua bidest. gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen. Die RNA wird im Gel aufgelockert, indem das Gel 30 min im 10 x SSC-Puffer mäßig geschüttelt wird. Währenddessen werden mehrere Rechtecke in der Größe des Gels aus 3 MM Filterpapier und ein Rechteck aus einer Nylonmembran

geschnitten. Das Transferieren der RNA auf die Membran geschieht über die Kapillarkräfte der Filterpapiere, d.h. die aufgelockerte RNA wird an die positiv geladene Nylon-Membran angesaugt. Es wird über Nacht transferiert. Nach 15 min Lufttrocknen wird die Membran bei 80 °C 2 h getrocknet, um sowohl die RNA an die Membran zu fixieren als auch die Reste an Formaldehyd zu zerstören. Falls Agarosereste an der Membran kleben, können sie vor dem Trocknen in 2 x SSC-Puffer abgespült werden.

6.11.1. Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

Die DNA-Stränge werden denaturiert und mit Random-Primer (Hexamere mit zufälliger Sequenz) hybridisiert. Das Polymerase I-Klenowfragment synthetisiert kurze komplementäre Stränge. Die radioaktive Markierung erfolgt durch Einbau einer mit P^{32} markierten Base, in diesem Fall mit dCTP.

Benötigte Reagenzien:

- TNF α -DNA-Fragment,
- Ready-to-go kit,
- α - P^{32} -dCTP (3000 μ Ci/mmol),
- Sephadex-Säule GS 50
- TE-Puffer:
 - 10 mM Tris-HCl, pH 7.5,
 - 1 mM EDTA, pH 8.0

Durchführung:

25-50 ng TNF α -DNA werden bei 95 °C für 5 min aufgeschmolzen und auf Eis gestellt. Ein Reaktionsgefäß des Ready-to-go kits wird in Aqua bidest aufgenommen. 50 μ Ci dCTP und danach die denaturierte DNA werden zu dem Kit gegeben. Es sollte darauf geachtet werden, daß das Endvolumen 50 μ l nicht überschreitet. Die Probe wird ca. 30 min bei 37 °C inkubiert.

Reinigung:

Die DNA wird von der nichteingebauten Radioaktivität getrennt. Das geschieht über eine Sephadex GS 50-Säule. Die Trennung erfolgt über die Molekülgröße. Da kleinere Moleküle ein größeres Volumen zu durchlaufen haben, werden sie viel später eluiert.

Durchführung:

Zu der Probe werden 50 µl 1 x TE-Puffer gegeben. Die Schutzlösung wird von der Säule entfernt und die Säule mit 1 x TE-Puffer gespült und equilibriert. Die ganze Probe wird mit kreisenden Bewegungen auf das Säulenbett aufgetragen. Die Elution der Probe erfolgt durch Zugabe von zweimal 400 µl 1 x TE-Puffer, wobei die ersten 400 µl verworfen werden. Die Einbaurrate der Radioaktivität kann grob abgeschätzt werden, indem man 1 µl der Probe vor und nach der Reinigung im Szintillationszähler mißt. Die Einbaurrate sollte mindestens 40 % betragen.

6.11.2. Prähybridisierung und Hybridisierung der Membran mit der Sonde

Benötigte Lösungen:

-Prähybridisierungspuffer:

5 x SSC,
10 % Dextranulphat, Natriumsalz (MW ≈ 500.000),
1 % SDS,

-denaturierte, kleingeschnittene nichthomologe DNA vom Seelachs

-Waschlösung 1:

100 ml 20 x SSC (2 x SSC),
10 ml 10 % SDS (0,1 %),
ad. 1 L Aqua bidest.

-Waschlösung 2:

5 ml 20 x SSC (0,1 % SSC),
10 ml 10 % SDS (0,1 %).

Durchführung:

Das Hybridisierungsrohr wird mit Wasser gefüllt und die eingerollte Membran hineingetan. Die Membran wird im Glasrohr aufgedreht und das Wasser ausgekippt, so daß keine Luftblase zwischen Membran und Glasrohrwand ist. Dabei sollte darauf geachtet werden, daß die transferierte Seite ins Glasinnere schaut, da das im Glas enthaltene Borsilikat einen starken Hintergrund auf der Membran verursacht. 80-100 µl auf 60 °C aufgewärmte Hybridisierungslösung pro cm² Membran werden auf die Membran verteilt und ca 3 h bei 60 °C prähybridisiert. 100 µg/ml Endkonzentration (im Hybridisierungspuffer) Seelachs-DNA

werden zu der gereinigten Sonde gegeben, um den unspezifischen Hintergrund auf der Membran abzudecken. Die Probe wird bei 95 °C 5 min denaturiert. 1 ml Puffer aus dem Glasrohr werden zu der Probe gegeben und diese dann ins Glasrohr zu der Membran pipettiert, so daß die Sonde nicht direkt auf die Membran kommt, sondern in den Puffer gelangt. Nach über Nacht Hybridisierung bei 60 °C wird der Puffer in den Radioaktivitätsabfallbehälter gegossen, und die Membran zweimal mit Waschlösung (RT) kurz gewaschen und anschließend in die gleiche Lösung, aufgewärmt auf 60 °C, gegeben. Die Membran wird 2 x 30 min in der Lösung unter Schütteln gewaschen. Zwischendurch wird mit einem Detektor die Radioaktivität auf der Membran kontrolliert. Eventuell wird die Lösung ausgewechselt. Ist noch sehr viel Radioaktivität im Hintergrund, dann wird die Membran in Lösung 2 kurz gewaschen. Die Membran wird anschließend mit Papier abgetupft, in Frischhaltefolie eingeschweißt und in eine Filmkassette eingelegt. Entweder kann ein Film oder eine PhosphoImagerplatte aufgelegt werden.

6.12. Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine nach Laemmli modifizierte Methode (Laemmli, 1970) mit der denaturierte Proteine nach Ladung-zu-Masse Verhältnis getrennt werden. Die Proteine wandern durch ein elektrisches Feld in einem Polyacrylamid-Netzwerk, der als Molekularsieb fungiert. Die radikalische Polymerisation von Acrylamid mit dem Quervernetzer *N,N'*-Methylenbisacrylamid erfolgt mit Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalbildner und *N,N,N',N'*-Tetramethyldiamin (TEMED) als Radikalstabilisator.

Benötigte Lösungen:

AA-BIS (Bio-Rad) 30 %	f. c.	Menge
Acrylamid	4 M (30 %)	145 g
<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid	65 mM	5 g
Aqua bidest		ad 500 ml

Das Verhältnis von Acrylamid zu Methylenbisacrylamid beträgt 29:1 (w/w).

5 x Trenngelpuffer:

	f. c. (1 x Puffer)	
Tris	375 mM	113,53 g

Natriumdodecylsulfat	3,5 mM	2,5 g
Aqua bidest		ad. 500 ml
pH-Wert mit HCl auf 8,8 einstellen.		

10 % APS:

	f. c.	Menge
Ammoniumperoxodisulfat	0,44 M	0,1 g
Aqua bidest		1 ml
Die Lösung ist für ein Monat bei 4 °C haltbar.		

4 x Sammelgelpuffer:

	f. c. (1 x Puffer)	
Tris	175 mM	16,95 g
Natriumdodecylsulfat	3,5 mM	0,8 g
Aqua bidest.		ad 200 ml
pH-Wert mit HCl auf 6,8 einstellen.		

10 x Elektrophoresepuffer:

	f. c. (1 x Puffer)	Menge
Tris	25 mM	60,55 g
Glycin	190 mM	285,27 g
Natriumdodecylsulfat	3,5 mM	20,19 g
Aqua bidest.		ad 2000 ml
Der pH-Wert darf nicht eingestellt werden und sollte im Elektrophoresepuffer etwa 8,3 betragen.		

5 x Probenpuffer:

	f. c. (1 x Puffer)	Menge
(1 M) Tris, pH 6,8	30 mM	750 µl
Glycerol	0,7 M	1,25 ml
Natriumdodecylsulfat	35 mM	0,25 g
1,4-Dithiothreitol	0,1 M	0,39 g
(15 mM) Bromphenolblau	0,15 mM	250 µl
Aqua bidest.		ad 5 ml

Pipettierschema für zwei Gele der Größe 80 mm x 60 mm x 1,5 mm

	Trenngel					Sammelgel
	6 %	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	3 %
H ₂ O [ml]	10,7	9,8	8,3	6,8	5,3	5,1
5 x Trenngel-puffer [ml]	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	-
4 x Sammel-gelpuffer [ml]	-	-	-	-	-	2,0
AA-BIS 30 % [ml]	3,6	4,5	6,0	7,5	9,0	0,8
TEMED [µl]	5	5	5	5	5	6
10 % APS [µl]	95	95	95	95	95	55

Durchführung:

Die Zusätze für das Trenngel werden zusammengegeben und bis ca. 2 cm unter den Rand der kleineren Glasplatte in die Gelkammer pipettiert. Das Trenngel wird mit Isopropanol/Wasser-Gemisch (1:1, v/v) überschichtet. Nach ungefähr 30-45 min. ist die Polymerisation abgeschlossen, das Isopropanol/Wasser-Gemisch wird abgegossen und mit Filterpapier vollständig abgesaugt. Das Sammelgel wird zusammengemischt und auf das Trenngel gegeben und mit einem Probenkamm versehen. Wenn das Sammelgel polymerisiert ist (ca. 30 min.), wird die Gelkammer in der mit Elektrophoresepuffer gefüllten Pufferkammer zusammengesetzt und der Probenkamm gezogen.

Zur Vorbereitung der Proben werden diese mit dem entsprechenden Puffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration und gleiche Volumina gebracht und mit 5 x Probenpuffer versetzt, so daß die Endkonzentration des Probenpuffers einfach beträgt. Die Proben werden bei 95 °C für 5 min. denaturiert und in die Probenaschen gegeben. Der Marker wird ebenfalls mit dem Puffer auf das gleiche Volumen aufgefüllt und in die Tasche pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt, indem zu Beginn die Stromstärke für 15 min. auf 30 mA je Gel und anschließend auf 20 mA je Gel eingestellt wird. Die Proteine laufen von der Kathode zur Anode. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die Bromphenolbande gerade ausläuft.

6.13. Immunpräzipitation von $\text{TNF}\alpha$

Das $\text{TNF}\alpha$ -Protein wird nach Behandlung mit $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 über die Methode der Immunpräzipitation mit anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörpern und Protein A-Sepharose sowohl aus den Zellysaten als auch aus dem Zellkulturüberstand ausgefällt und im Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Protein A ist ein thermostabiles Zellwandprotein aus *Staphylococcus aureus*, mit einer relativen Molekülmasse von 42.000. Es besitzt zwei unterschiedliche Regionen: Die N-terminale Region ist extrazellulär lokalisiert und besteht aus vier, strukturell sehr ähnlichen Domänen mit jeweils etwa 58 Aminosäuren ($M_r = 27.000$). Diese N-terminale Region bindet Immunglobuline über hydrophobe Wechselwirkung der Domänen mit den $\text{C}_{\text{H}2}$ - und $\text{C}_{\text{H}3}$ -Domänen zweier Immunglobulinmoleküle. Die C-terminale Region ist zellwandständig ($M_r = 15.000$). Protein A ist entweder an Sepharose-Kügelchen gekoppelt, oder es werden ganze, fixierte *Staphylococcus aureus*-Zellen zur Immunpräzipitation eingesetzt.

Die von der Zelle unter Behandlung neu synthetisierten Proteine werden mit ^{35}S -gelabelten L-Cystein/L-Methionin radioaktiv markiert. Mit diesem Experiment kann man nachweisen, ob das $\text{TNF}\alpha$ -Protein neu synthetisiert und anschließend in den Zellkulturüberstand sezerniert wird.

Benötigte Lösungen:

- L-Cystein/L-Methionin-freies DMEM,
- Lysispuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,2,
 - 150 mM Natriumchlorid,
 - 1 % Triton X-100,
 - 0,5 % Natriumdeoxycholat,
 - 0,1 % SDS,
 - 1 mM PMSF,
 - 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin,
- L- ^{35}S -labeled Pro-mixTM (in vitro cell labeling mixture)
- anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper,
- Protein A-Sepharose,
- SDS-Probenpuffer
- Acrylamid,
- *N,N'*-Methylenbisacrylamid,

- TEMED,
- APS.

Durchführung:

Konfluente HaCaT-Zellen werden 2 h mit L-Cystein/Methionin-freiem DMEM vorbehandelt. Die Zellen werden mit 10 $\mu\text{Ci/ml}$ L-³⁵S-labeled Pro-mixTM von Amersham (Braunschweig) 2 h markiert und anschließend mit 100 nM 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ oder als Kontrolle mit 1% Ethanol behandelt. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wird der Zellkulturüberstand entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 2 ml Lysispuffer gerntet. 20 μl des anti-TNF α -Antikörpers werden zu 2 ml Zellkulturüberstand und zu 2 ml Zellextrakt gegeben und die Proben über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um TNF α immunopräzipitieren, werden 5 mg Protein A-Sepharose genommen. Nach 5 h bei 4 °C unter mäßigem Schütteln wird der Immunkomplex durch Zentrifugieren bei 4 °C und dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS sedimentiert. Schließlich werden 90 μl eines nicht-reduzierenden SDS Probenpuffers zugegeben und die Proben 5 min gekocht. Die Protein A-Sepharose wird durch Zentrifugieren sedimentiert und der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel (15 % Acrylamid) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele werden getrocknet und die zur TNF α korrespondierenden Banden mit Hilfe eines PhosphoImagers sichtbar gemacht und analysiert. Unter den beschriebenen Umständen wandert TNF α mit einem Molekulargewicht von 17 kDa, welches mit einem „prestained“ SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese Marker bestätigt wurde.

6.14. Synthese von der zur RNA komplementären DNA (cDNA)

Die cDNA-Synthese erfolgt mit dem käuflichen Kit „SuperScriptTM Preamplification System“ der Firma Gibco BRL (Eggenstein) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Polymerase, die den zur RNA komplementären Erststrang synthetisiert, ist SuperScript II Ribonuklease H⁻ (RNase H⁻) Reverse Transkriptase, die so verändert worden ist, daß die RNase H-Aktivität nicht mehr vorhanden ist. Als Primer können entweder ein Gemisch von nichtspezifischen Hexameren (random Primer) mit zufälliger Sequenz oder Oligo(dT) genommen werden. Bei der ersten Methode dient die ganze RNA einer Population als Matrix für die Erststrang-Synthese. Sie wird angewandt vor allem dann, wenn eine bestimmte mRNA schwer als Ganzes zu kopieren ist, weil das Vorhandensein einer bestimmten Sequenz die Reverse Transkriptase veranlaßt die Synthese zu unterbrechen. Das optimale Verhältnis von Primer zur RNA sollte für jede RNA-Präparation neu bestimmt werden. Eine

spezifischere Methode ist der Gebrauch von Oligo(dT), die an den Poly(A)-Schwanz der mRNA hybridisieren (siehe Abb. 27). Da der Anteil von mRNA an der Gesamt-RNA nur 1-2 % beträgt, ist die cDNA-Ausbeute natürlich hier geringer. Dafür muß das Verhältnis von Oligo(dT) zur RNA nicht optimiert werden, weil die Oligo(dT) sehr spezifisch ist. Eine weitere hochspezifische Methode, die jedoch nicht so häufig angewandt wird, ist der Gebrauch von Gen-spezifischen Primern.

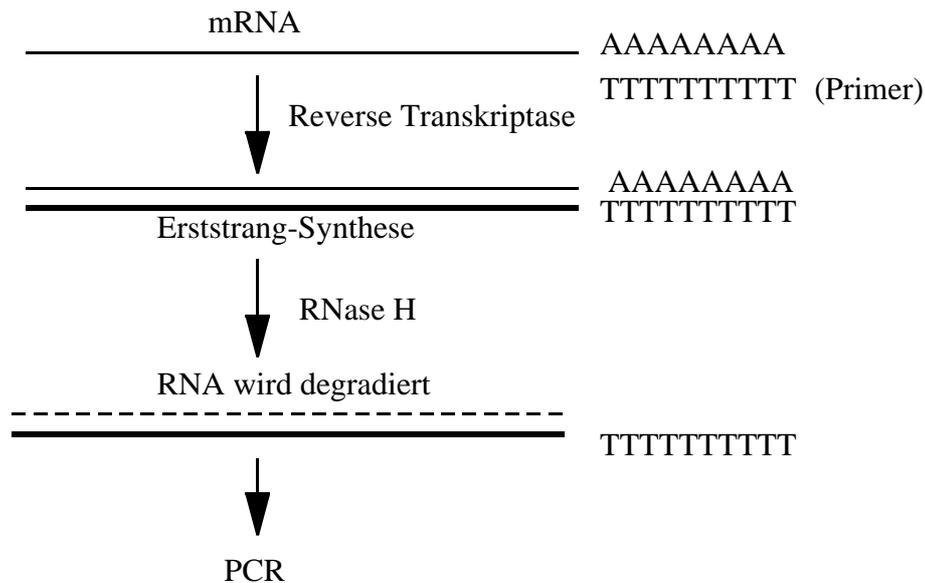


Abb.28. zeigt schematisch die Umwandlung der mRNA in cDNA.

Benötigte Reagenzien:

- 50 ng/µl Random Hexamere
- 10 x PCR-Puffer
- 25 mM Magnesiumchlorid
- 0,1 M Dithiothreitol (DTT)
- 10 mM dNTP-Mix (je 10 mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 200 U/µl SuperScript II RT
- 2 U/µl *E. coli* RNase H

Durchführung:

Zuerst wird ein RNA-Primer-Gemisch hergestellt in einem Volumen von 12 µl. Die optimale RNA-Menge, die eingesetzt wurde, ist 1,6 µg. Die Proben werden bei 70 °C 10 min inkubiert und dann für 10 min auf Eis gestellt. Folgender Reaktionsmix wird angesetzt:

	je Ansatz	Anzahl der Proben (n) + 1
10 x PCR-Puffer	2 µl	2 x (n+1) µl
25 mM MgCl ₂	2 µl	2 x (n+1) µl
10 mM dNTP mix	1 µl	1 x (n+1) µl
0,1 M DTT	2 µl	2 x (n+1) µl

Je 7 µl des Reaktionsmix werden zu den RNA-Proben gegeben, vorsichtig gemischt und bei 25 °C 5 min inkubiert. 1 µl der Reversen Transkriptase wird zu jeder Probe pipettiert und für weitere 10 min bei 25 °C stengelassen. Die Proben werden anschließend für 50 min bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion wird beendet, indem die Proben auf 70 °C für 15 min geheizt, um die Transkriptase zu zerstören, und dann auf Eis gestellt werden. Nach kurzem Zentrifugieren wird je 1 µl RNase H zu jeder Probe gegeben und 20 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Schritt dient dazu, um die noch an der cDNA anheftenden RNA zu zerstören. Die cDNA wird mit DEPC-Wasser 1:10 verdünnt und kann nun für PCR-Versuche eingesetzt werden. Der Verdünnungsschritt dient dazu, daß statt 1 µl cDNA 10 µl im PCR-Ansatz eingesetzt werden können.

6.15. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der Amplifikation von DNA aus geringsten Mengen genetischen Materials wurde 1985 von Kary Mullis erfunden (Saiki et al., 1985). Seitdem wird die Polymerasekettenreaktion besonders in der biologischen Grundlagenforschung, der medizinischen Diagnostik, der Humangenetik und Genomanalyse und der Gerichtsmedizin angewandt. Als Ausgangsmaterial dient Doppel-/Einzelstrang-DNA. Durch Erwärmen wird der Doppelstrang denaturiert und mit zwei kurzen Oligonukleotiden als Primer der DNA-Synthese, die die gesuchte Sequenz begrenzen, hybridisiert und durch eine thermostabile Polymerase (Taq-Polymerase) verlängert. Der eine Primer sollte komplementär zum Plus-Strang und der andere zum Minus-Strang sein. Die Reaktionen eines Zyklus, Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer (*annealing*) und DNA-Polymerisation laufen bei unterschiedlichen Temperaturen ab. Die Anzahl der entstehenden DNA-Moleküle wird in jedem durchlaufenen Zyklus verdoppelt. Nach in der Regel 20-30 Zyklen wird das Reaktionsprodukt über die Größe der gelelektrophoretisch aufgetrennten Fragmente analysiert. Die PCR-Reaktionen werden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Um Kontaminationen der verwendeten Lösungen zu überprüfen, wird für jedes Primer-Paar ein Reaktionsansatz pipettiert, der keine cDNA enthält.

Für ein Reaktionsansatz wird folgender Gemisch zusammenpipettiert:

	f. c.	[μ l]
H ₂ O		30,25
10 x PCR (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl)	1 x (20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl)	5
20 μ M 3'-Primer	2,5 μ M	1
20 μ M 5'-Primer	2,5 μ M	1
50 mM MgCl ₂	1,5 mM	1,5
10 mM dNTPs (je Nukleotid 10 mM)	0,2 mM	1
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	1,25 U/50 μ l	0,25
cDNA (template)		10

Das PCR-Programm wurde für das jeweilige Primer-Paar optimiert. Entweder wird die *annealing*-Temperatur und/oder die Anzahl der durchlaufenen Zyklen variiert. Im Folgenden wird beispielhaft ein PCR-Programm dargestellt. Ein Zyklus beinhaltet Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer (*annealing*) und DNA-Polymerisation:

1 min 94 °C, 1 min annealing Temperatur, 1 min 72 °C	2 x
1 min 92 °C, 1 min 60 °C, 1 min 72 °C	35 x
1 min 92 °C, 1 min 60 °C, 10 min 72 °C	1 x, mit diesem Zyklus werden bereits begonnene DNA-Stränge zu Ende synthetisiert.
Abkühlen auf 4 °C	

6.16. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Im Ergebnisteil dieser Arbeit werden für alle Meßwerte (im Falle von Drei- oder Mehrfachbestimmung) der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Sowohl die Standardabweichung als auch der Vergleich von Mittelwerten zweier Messungen auf signifikante Unterschiede mit dem Students t-test wurde mit dem Computer berechnet. Das verwendete Programm war: Microsoft Excel-Version 5.0a für den Power Macintosh™.