

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Autoklav	Guwina-Hofmann, Berlin
Agagel-Standard	Biometra, Göttingen
Agarosegeldetektionssystem Bio Doc	Biometra, Göttingen
Brutschrank BB6220	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Elektrophoresekammern	Biometra, Göttingen
Entwicklungskassette	Kodak, München
FACS-Calibur	Becton & Dickinson, Heidelberg
(Fluorescence-Activated Cell Sorting)	
Fluoreszenzmikroskop BX41	Olympus, Hamburg
Lamin Air-Sterilarbeitsbank	Heraeus Instruments, Düsseldorf
LightCycler480	Roche Diagnostics, Mannheim
Mikroplattenreader FLUOstar OPTIMA®	BMG, Offenburg
Magnetrührer IKAMAG® RCT	Janke &Kunkel, Staufen
Neubauer-Zählkammer	Zeiss, Jena
Nikon Digitalkamera DMX 1200	Nikon, Düsseldorf
pH Meter 766 Calimatec	Knick, Nürnberg
Phasenkontrast-Mikroskop	Zeiss, Jena
Pipetten Eppendorf Reference®	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Eppendorf Research®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy®	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttelmaschine LS10	Gerhardt, Bonn
Schüttler IKA® MT-2	Karow, Berlin
Spektralphotometer, Gene-Ray	Biometra, Göttingen
Standard Power Pack	Biometra, Göttingen
Szintillationszähler 1450 Microbeta™ Plus	Wallac Oy, Turku, Finnland
Tank-Blot	Biometra, Göttingen
Thermoblock TB 1	Biometra, Göttingen
Thermocycler TGradient	Biometra, Göttingen
Transilluminator BioDoc	Biometra, Göttingen
Trockenschrank UT5042EK	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Ultraschallbad Sonorex® RK 100	Bandelin, Berlin
UV-Strahler Sol 2	Hönle, Martinsried
Vakuumgerät Vacuboy®	Integra Biosciences, Fernwald
Vortex	Heidolph, Schwabach
Wasserbad DC3/W26	Haake, Karlsruhe
Wasser Deionisierungsanlage MilliQ	Millipore, Eschborn
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Düsseldorf

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid Rotiphorese® Gel 40	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Agarose for routine use	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Agarosegelmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Annexin V-FITC	Axxora, Lörrach
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Borsäure	VWR, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Deckgläschen, Durchmesser 18 mm	Roth, Karlsruhe
Desoxycholinsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
4,5-Diaminofluoresceindiacetat (DAF-2DA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	New England Biolabs, Frankfurt
DNA Größenmarker	New England Biolabs, Frankfurt
DNA Polymerase GenTherm (Taq-Pol.)	Rapidozym, Berlin
dNTP Set (10 mM pH 7.0)	ABgene, Hamburg
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Sigma, Taufkirchen
Einmalkanülen (0.8 / 80 mm)	VWR, Darmstadt
Einmalküvetten, reduziert	VWR, Darmstadt
Einmalspritzen (Braun Injekt 20 ml)	VWR, Darmstadt
Eppendorfgefäße Safe-Lock (0,5, 1,5, 2 ml)	VWR, Darmstadt
Essigsäure, konzentriert	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethanol	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
FACS Clean	Becton & Dickinson, Heidelberg
FACS Flow	Becton & Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton & Dickinson, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Filme, Kodak X-Omat, XAR-5	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Filmentwickler	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Filmfixierer	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
FTY720	Biozol Diagnostica, Eching
FTY720-P	Freie Universität Berlin, Berlin
Glycerol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glycin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glycogen	GE Healthcare, Freiburg
HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	New England Biolabs, Frankfurt
HRP-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper	New England Biolabs, Frankfurt
HRP-gekoppelter Anti-Ziege-IgG-Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco BRL, Karlsruhe
Insulin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
IGF-I	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
JTE013	Tocris, Ellisville, USA

Kaliumacetat	GE Healthcare, Freiburg
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Keratinocytenbasalmedium (KBM)	Cambrex BioScience, Verviers, Belgien
Supplements zur Herstellung von KGM:	
- Amphotericin B	
- boviner Hypophysenextrakt (BPE)	
- epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF)	
- Gentamicinsulfat	
- Hydrocortison	
- Insulin	
Kontroll siRNA	Santa Cruz, Heidelberg
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
LumiGlo [®] Chemilumineszenz Reagenz	New England Biolabs, Frankfurt
LY294002	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Lysophosphatidsäure (LPA)	Calbiochem/Merck Biosciences, Darmstadt
Magermilchpulver Sucofin [®]	TSI, Zeven
Minimum Essential Medium Eagle (MEME)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Monoklonaler Bcl-2-Antikörper (IgG Maus)	Santa Cruz, Heidelberg
Monoklonaler iNOS-Antikörper (IgG Maus)	Santa Cruz, Heidelberg
Mowiol	Calbiochem/Merck Biosciences, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumorthovanadat (Na ₂ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
N-(1-Naphthyl)ethylendiamin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
N _ω -Nitro-L-argininmethylesterhydrochlorid (L-NAME)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Oligodesoxynukleotide (ODN)	TIP Molbiol, Berlin
Oligo(dT ₂₅₋₃₀) Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Optimem	Biochrom, Berlin
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	Calbiochem/Merck Biosciences, Darmstadt
Panserin 801 Keratinocyten Medium	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Supplements:	
- EGF	
- Insulin	
- Hydrocortison	
- Ethanolamin	
- Phosphoethanolamin	
- BPE	

Parafilm® M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Penicillin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Pertussistoxin (PTX)	Calbiochem/Merck Biosciences, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phosphatgepufferte Salzlösung, Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄), konzentriert	VWR, Darmstadt
PKCδ siRNA	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler eNOS-Antikörper (IgG Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler Phospho-Akt-Antikörper (IgG Kaninchen)	New England Biolabs, Frankfurt
Polyklonaler Phospho-eNOS-Antikörper (IgG Kaninchen)	New England Biolabs, Frankfurt
Polyklonaler Phospho-PKC-Antikörper (IgG Kaninchen)	New England Biolabs, Frankfurt
Polyklonaler Phospho-PKCδ-Antikörper (IgG Kaninchen)	New England Biolabs, Frankfurt
Polyklonaler S1P ₁ -Antikörper (IgG Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler S1P ₂ -Antikörper (IgG Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler S1P ₃ -Antikörper (IgG Ziege)	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler S1P ₄ -Antikörper (IgG Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler S1P ₅ -Antikörper (IgG Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
Polyvinyliden-difluorid (PVDF)-Transfermembran	Millipore, Eschborn
Primer	TIP Molbiol, Berlin
Probenpuffer Agarosegelelektrophorese	New England Biolabs, Frankfurt
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Proteingrößenmarker	New England Biolabs, Frankfurt
QIAshredder®	Qiagen, Foster City, USA
QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit	GE Healthcare, Freiburg
Reagenzgläser Pyrex 16x100 mm mit Deckel	Dunn Labortechnik, Ansbach
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Ribonuklease Inhibitor (RNAsin™)	Fermentas, St. Leon-Rot
Rneasy Kit®	Qiagen, Foster City, USA
Ro-31-8220	Calbiochem/Merck Biosciences, Darmstadt
Rottlerin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Rundboden-Röhrchen, Falcon	VWR, Darmstadt
Salzsäure, konzentriert	VWR, Darmstadt
Serumalbumin vom Rind, Fettsäure-frei (BSA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Serva Blue G (Coomassieblau)	SERVA Electrophoresis, GmbH, Heidelberg
SEW2871	Calbiochem/Merck Biosciences, Darmstadt
Silikonlösung in Isopropanol	Serva, Heidelberg
siRNA-Transfektionsmedium	Santa Cruz, Heidelberg
siRNA-Transfektionsreagenz	Santa Cruz, Heidelberg
siRNA-Verdünnungspuffer	Santa Cruz, Heidelberg
S-Nitroso <i>N</i> -acetylpenicillamin (SNAP)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Sphingosin-1-Phosphat	Biomol, Hamburg
Sterilfilter Minisart [®] , 0,22 µm	Sartorius, Göttingen
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Berlin
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Sulphanilamid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
SuperScript [™] II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green PCR Master Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Szintillationsflüssigkeit Optiphase [®] Supermix	Wallac, Freiburg
[³ H]-Thymidin (spezif. Aktivität 35,0 Ci/mmol)	GE Healthcare, Freiburg
TRANSIT [®] -LT1 Transfektionsreagenz	KMF Laborchemie, Lohmar
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris Base	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris HCl	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tumornekrosefaktor-α (TNF-α)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tween 20	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Wortmannin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 75 cm ²)	VWR, Darmstadt
Zellkulturplatten 6-Loch, Flachboden, TPP	Biochrom, Berlin
Zellkulturplatten 24-Loch, Flachboden, Falcon	VWR, Darmstadt
Zellkulturschalen TPP, 10 cm	Biochrom, Berlin
Zellkulturschaber	Biochrom, Berlin
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	Biochrom, Berlin

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen

2.2.1.1 Zellkulturmedien und Lösungen zur Zellkultur

Keratinocyten-Anzuchtmedium

Dem serumfreien Panserin 801 wurden kurz vor Gebrauch folgende Supplemente hinzugefügt:

1 µl/ml	EGF
1 µl/ml	Insulin
1 µl/ml	Hydrocortison
1 µl/ml	Ethanolamin
1 µl/ml	Phosphoethanolamin
3 µl/ml	BPE

Keratinocyten-Wachstumsmedium

Für die Kultivierung humaner Keratinocyten wurde Keratinocyten-Wachstumsmedium (KGM, 0,15 mM Ca²⁺) aus KBM durch Zugabe folgender Substanzen hergestellt:

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

Antisense- und siRNA-Experimente wurden in Antibiotika-freiem KGM durchgeführt. Außerdem erfolgte bei Experimenten mit Insulin-Stimulationen ein Mediumwechsel auf Insulin-freies KGM.

BAEC-Wachstumsmedium (BAEC, bovine aortic endothelial cells)

10 %	FKS
2 mM	L-Glutamin
100 u/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
in	MEME Medium

Am Vortag der Versuche fand ein Mediumwechsel auf serumfreies Basalmedium statt.

Transportmedium

100 u/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
in	DMEM

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

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

Trypsin-EDTA-Lösung

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

Stopmedium

10 %	FKS
100 u/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
in	Dulbecco`s modified Eagle`s medium (DMEM)

Antibiotikallösung

100 u/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
in	PBS-Lösung

Einfriermedium

10 %	DMSO
10 %	FKS
in	DMEM

2.2.1.2 Gewinnung und Kultivierung humaner Keratinozyten

Humane epidermale Keratinozyten werden aus juveniler Vorhaut isoliert, die bei Zirkumzisionen in den kinderchirurgischen Ambulanzen der Berliner Ärzte Dr. Jung und Dr. Schildknecht sowie dem St. Joseph-Krankenhaus, Berlin Tempelhof, und dem Operationszentrum Birkenwerder anfiel und dem Arbeitskreis nach Genehmigung durch die Ärztekammer Berlin zur Verfügung gestellt wurde. Diese Hautstücke wurden nach den Operationen in Transportmedium bei 4 °C gekühlt

befördert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Haut mit eiskalter PBS-Lösung gewaschen und 1 h bei 37 °C oder alternativ 12 h über Nacht bei 4 °C in Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Die Serinprotease löste die epidermalen Zellen aus dem Zellverband. Zur Beendigung der Enzymreaktion wurden die Hautstücke in Stoppmedium geschwenkt. Dieses enthält FKS und diente nun als Substrat des Enzyms. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Haut zwei weitere Male mit kalter PBS-Lösung gewaschen und die Lösungen im Zentrifugenröhrchen vereinigt und zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4 °C). Nach Dekantierung des Überstands, Resuspension des Zellpellets in kalter PBS-Lösung und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in Panzerin Keratinozyten-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pipette vereinzelt und in 25 cm²-Zellkulturflaschen mit 5 ml vorgewärmtem Medium eingesät. Die auf diese Weise gewonnenen Keratinozyten befanden sich in der Vorkultur und wurden als Zellen der 0. Passage bezeichnet und bei 37 °C, 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchte kultiviert. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um nicht anhaftende Zellen und tote Blutzellen zu entfernen.

2.2.1.3 Passagierung

Nachdem ein Konfluenzgrad von etwa 50 - 70 % erreicht war (üblicherweise nach fünf bis zwölf Tagen), wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen und durch Zusatz von 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung bis zum Ablösen im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der adhären Zellen wurde durch intermittierendes Klopfen beschleunigt, um eine Schädigung der Zellen durch die Protease zu verhindern. Das Ablösen wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 3,5 ml Stoppmedium beendet. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Flasche wurde mit PBS-Lösung gespült und die vereinigten Zellsuspensionen anschließend zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4 °C). Nach einem Waschgang mit PBS-Lösung, um serumfreie Kulturbedingungen zu garantieren, wurden die Zellen in KGM resuspendiert und vereinzelt. Anschließend wurden die Keratinozyten in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät, in denen 13 ml Wachstumsmedium vorgelegt worden war. Diese Zellen wurden nun als Zellen der 1. Passage bezeichnet. Die Verbreiterung erfolgte jeweils im Verhältnis 1:3, sobald ein Konfluenzgrad von

50 - 70 % erreicht war. Um interindividuelle Unterschiede auszuschließen, wurden für alle Experimente Keratinozyten von mindestens drei Spendern vereinigt. Da die Mitoseaktivität der Keratinozyten ab der 5. Passage deutlich abnimmt, fanden in den Experimenten vorzugsweise subkonfluente Keratinozyten der 1. bis 3. Passage mit hoher Mitoseaktivität Verwendung.

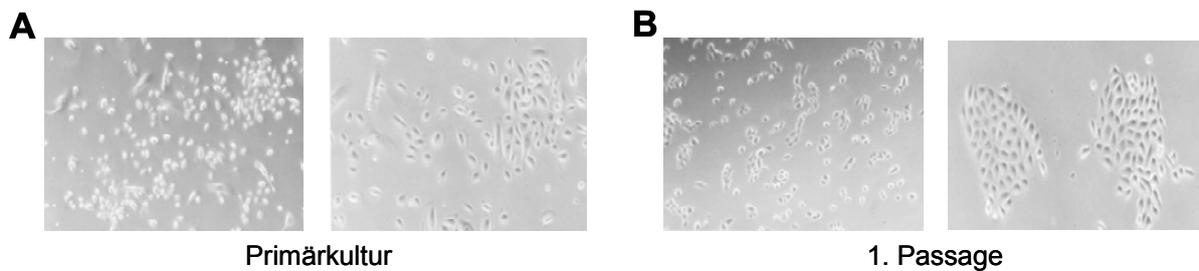


Abb. 9: Phänotyp der humanen Keratinozyten. Dargestellt sind Keratinozyten in der Primärkultur (A) und Keratinozyten der 1. Passage (B) (links: 50fache Vergrößerung; rechts: 100fache Vergrößerung).

2.2.1.4 Kultivierung von BAEC

Die Kultivierung der primären bovinen Endothelzelllinie BAEC erfolgte in BAEC-Wachstumsmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchte. Es wurden Zellen der Passagen 10 bis 35 für Experimente eingesetzt.

2.2.1.5 Quantifizierung und Einsaat von Zellen für die Versuche

Bei der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen kommt der bei der Einsaat eingesetzten Zellzahl eine große Bedeutung zu. Mangelnder Zell-Zell-Kontakt lässt die Zellen nur langsam wachsen. Um reproduzierbare Bedingungen für die Experimente zu gewährleisten, ist die Aussaat einer definierten Zellzahl notwendig. Der Konfluenzgrad kann dabei für die jeweiligen Experimente variieren. Für die Zählung einer Zellsuspension stand ein Hämozytometer (Neubauer Zählkammer: 0,0025 mm² / 0,1 mm) zur Verfügung. Nachdem ein Deckgläschen unter Ausbildung von Newtonringen auf die Zählkammer gedrückt worden war, wurden 10 µl der gut homogenisierten Zellsuspension in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Zählkammer gefüllt. Die Zellzahl pro ml wurde bestimmt, indem die vier großen Quadrate ausgezählt, der Mittelwert berechnet und mit 10⁴ multipliziert wurde. So konnten definierte und identische Zellzahlen für die jeweiligen Versuche in das vorgelegte und vorgewärmte Medium eingesät werden.

2.2.1.6 Lagerung und Reaktivierung der Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Dazu wurde eine Zellsuspension durch Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung, Stoppmedium und nachfolgenden Waschschritten aus der Kulturflasche gewonnen und nach der Zentrifugation bei $300 \times g$, 4 °C für 5 min mit einer Zelldichte von $1 - 2 \times 10^6$ Zellen pro ml in Einfriermedium resuspendiert. 1,5 ml dieser Zellsuspension wurde in gekühlte Cryoröhrchen überführt und, durch mehrere Lagen Zellstoff geschützt, für mindestens zwei Wochen bei -80 °C gelagert, bevor sie in -196 °C kalten flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Die Reaktivierung der Zellen erfolgte durch schnelles Auftauen unter sanften Schwenken des Cryoröhrchens im 37 °C warmen Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen in eine 75 cm^2 Kulturflasche mit 13 ml vorgelegtem Wachstumsmedium überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS-Lösung gewaschen und 13 ml frisches Wachstumsmedium in die Kulturflasche gegeben. Keratinozyten wurden nur in der 1. und 2. Passage cryokonserviert.

2.2.2 Lösungen der Testsubstanzen

S1P wurde in Methanol zu $5 \times 10^{-4}\text{ M}$ gelöst und bei -80 °C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde die Stammlösung zur verbesserten Lösung für 10 min unter Eiskühlung in einem Ultraschallbad behandelt. Für Zellkulturexperimente mit S1P wurde das Methanol der Stammlösung unter Stickstoff abgedampft, der Rückstand in einer sterilen Lösung von 0,4 % BSA in PBS-Lösung aufgenommen und zur vollständigen Lösung nochmals für 10 min auf Eis in einem Ultraschallbad behandelt. FTY720-P wurde in einer Konzentration von 10^{-3} M in DMSO/HCl gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Ebenso wurden Aliquots von IGF-I bei -20 °C verwahrt, nachdem es in sterilem Aqua bidest. zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst wurde. SEW2871 wurde zu 10^{-3} M in DMSO gelöst und wie die Stammlösungen von TPA (10 mg/ml in DMSO), JTE013 (1 mM in Ethanol) und Rottlerin (1 mM in DMSO) bei -20 °C aufbewahrt. Actinomycin D wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml in DMSO gelöst und wie die Stammlösungen von Ro-31-8220 (100 μM in Aqua bidest.) unter Lichtausschluss bei -20 °C gelagert. TNF α wurde zu 10 $\mu\text{g/ml}$ in 1 % BSA in PBS-Lösung aufgenommen und aliquotiert bei -80 °C aufbewahrt. LPA wurde in einer Konzentration von $5 \times 10^{-4}\text{ M}$ in sterilem Aqua bidest. gelöst und wie auch die

Lösungen von Wortmannin (2 mM in DMSO) und LY294002 (20 nM in DMSO) bei -80 °C gelagert. Gefriergetrocknetes PTX wurde in Aqua bidest. zu 100 µg/ml gelöst und auf die gleiche Weise wie die Stammlösung von PI (5 mg/ml in Aqua bidest.) bei 4 °C aufbewahrt; letztere unter Lichtausschluss.

Eine Stammlösung des L-NAME wurde am Tag des Experiments frisch in einer Konzentration von 100 mM in Aqua bidest. gelöst. Ebenso wurde eine 25 mM Stammlösung des SNAP kurz vor dem Experiment hergestellt. Als Lösungsmittel diente hierbei eine Lösung aus 194 µl PBS-Lösung und 6 µl NaOH (1 M).

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

2.2.3 Gezieltes Ausschalten von Genen

Die spezifische Kontrolle der Genexpression durch die Antisense-Strategie oder mittels siRNA (small interfering RNA) findet in der RNA Interferenz (RNAi) und ihren Mechanismen eine gemeinsame Basis. Im Gegensatz zum „Knock-Out“ durch Genunterbrechung führt die RNAi zu einer Repression des Gens („Knock-Down“). Seit dem ersten erfolgreichen Versuch, in Bakterien über komplementäre RNA die Expression eines Gens spezifisch zu inhibieren, ist die Antisense-Technik als effiziente Strategie zur spezifischen Ausschaltung von Genen inzwischen etabliert (Mizuno et al. 1984). Hierbei kommt eine ODN-Sequenz zum Einsatz, die komplementär zur mRNA des betreffenden Gens ist. Diese Antisense-Struktur bindet komplementär an die mRNA des Zielgens und bildet mit dieser eine kurze doppelsträngige Region aus. Die Mechanismen, wie komplementäre RNA zum Gene-Silencing führen kann, wurden konträr diskutiert. Inzwischen ist klar, dass nicht das Antisense ODN, sondern die entstehende doppelsträngige RNA, durch RNAi zum Gene-Silencing führt. Die RNAi wird durch kleine doppelsträngige RNA ausgelöst, die als siRNA bezeichnet wurden. Sie entstehen, indem doppelsträngige RNA von RNase-III Homologen, dem sogenannten Dicer, in 20 bis 23 bp (base pair) kleine doppelsträngige RNA Fragmente zerteilt wird. Diese siRNA wird vom RISC (RNA induced silencing complex) Proteinkomplex gebunden und entwunden. Der Komplex nutzt den Antisense-Strang zur Bindung an die Ziel-mRNA und kann mittels seiner ssRNase-Aktivität (ss, single strand) zur Degradation der Ziel-mRNA führen (Schmidt 2005).

2.2.4 Antisense Untersuchungen

Bei der Antisense-Technik kommt ein ODN mit komplementärer Struktur zu einer bestimmten mRNA-Sequenz des Zielgens (Antisense ODN, ASO) sowie als Kontrolle ein ODN aus den identischen Nukleotiden jedoch in willkürlicher Reihenfolge (Scrambled ODN) zum Einsatz. Durch Einbau von Phosphothioatgruppen wird die Halbwertszeit der ODN wesentlich verlängert, da nicht geschützte ODN durch im Medium enthaltene Nukleasen rasch abgebaut werden.

2.2.4.1 Oligodesoxynukleotide

Für die Antisense-Untersuchungen wurden folgende Thionat-geschützte ODN der Firma TIP Molbiol (Berlin) verwendet:

Tab. 4: Sequenz der Oligonukleotide

Protein	Scrambled ODN	Antisense ODN
S1P ₁ R	5'-atggggcccaccagcgtc-3'	5'-gacgctgggtggccccc-3'
S1P ₂ R	5'-catcactagccacttgaagcaggcca-3'	5'-gttgagcaggggaattcagggtggaga-3'
S1P ₃ R	5'-atggcaactgccctcccg-3'	5'-cgggagggcagttgccat-3'
S1P ₄ R	5'-acctagccaaccctccatgaaggc-3'	5'-gaaggccagcaggatcatcagcac-3'
S1P ₅ R	5'-gcaacaacataacggggccagca-3'	5'-caacatgccacaaaggccaggag-3'

Die ODN (Synthesemaßstab: 0,02 µmol) wurden vom Hersteller in 1 ml Wasser gelöst.

2.2.4.2 Transfektion

Für Antisense-Untersuchungen wurden die Keratinozyten in einer Zelldichte von 6×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte (Western Blot) oder 2×10^4 Zellen in jede Vertiefung einer 24-Loch-Platte (Proliferation) im Wachstumsmedium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Antibiotika-freiem KGM transfiziert. Dazu wurde das TransIT[®]-LT1 Transfektionsreagenz mit Optimem nach Herstellerangaben versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Transfektionsreagenz wurde im Verhältnis 3:2 zur DNA eingesetzt (3 µg DNA entspricht 2 µl TransIT[®]-LT1). Anschließend wurden die ODN dem Komplexbgemisch zugesetzt. Nach 15 min

Inkubation wurde jeder Versuchsschale 100 µl Transfektionsmix (50 µl in der 24-Loch-Platte) zugesetzt. Die ODN Endkonzentration betrug 500 nM. Die behandelten Zellen wurden für 48 - 72 h im Brutschrank inkubiert. Zur Kontrolle der effektiven Ausschaltung des Proteins wurde die Expression über Western Blot-Analyse oder Real-Time PCR bestimmt.

2.2.5 siRNA Untersuchungen

Keratinocyten wurden in einer Zelldichte von 6×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte (Western Blot) oder 2×10^4 Zellen in jede Vertiefung einer 24-Loch-Platte (Proliferation) in Antibiotika-freiem Wachstumsmedium ausgesät. Die siRNA wurde in einer Konzentration von 10 µM in RNase-freiem Aqua bidest. gelöst. Als Kontrolle diente ein Nukleotidduplex gleicher Größe mit zufälliger Sequenz, der selbst nicht zum Abbau einer bekannten zellulären RNA führt. Die Zellen wurden mit 40 – 50 nM siRNA unter Verwendung des siRNA-Transfektionsreagenzes und des siRNA-Transfektionsmediums der Firma Santa Cruz (Heidelberg) entsprechend den Herstellerangaben transfiziert. Für die Transfektion in der 6-Loch-Platte wurde eine Lösung aus 8 µl siRNA (entspricht 1 µg siRNA) bzw. Kontroll-siRNA und 92 µl Transfektionsmedium sowie eine separate Lösung von 8 µl Transfektionsreagenz in 92 µl Transfektionsmedium pro Versuchsschale hergestellt. Diese wurden vorsichtig gemischt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unmittelbar vor der Transfektion fand ein Mediumwechsel auf 0,8 ml Transfektionsmedium statt. Jede zu transfizierende Versuchsschale wurde mit 200 µl Transfektionsmix versetzt. Für die Transfektion in der 24-Loch-Platte wurde 50 µl Transfektionsmix aus 2,5 µl siRNA in 22,5 µl Transfektionsmedium und 2,5 µl Transfektionsreagenz in 22,5 µl Transfektionsmedium hergestellt. Der Mediumwechsel erfolgte mit 200 µl Transfektionsmedium, dem der Transfektionsmix hinzugefügt wurde. Um den toxischen Effekt auf die Keratinocyten zu minimieren, wurde nach 5 h Inkubation im Brutschrank jeder Versuchsschale 2 ml bzw. 0,5 ml Antibiotika-freies KGM hinzugefügt. Die Reduktion der Proteinexpression wurde nach einer Transfektionsdauer von 48 h mittels Western Blot-Analytik nachgewiesen.

2.2.6 Untersuchung der mRNA-Transkription

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaktion) wurde erstmalig 1984/1985 durch Kary B. Mullis als Verfahren beschrieben (Saiki et al. 1985). Sie

beruht auf dem Doppelstrang-Prinzip der DNA und ermöglicht die selektive Vervielfältigung beliebiger DNA-Abschnitte und damit den Nachweis bestimmter Gensequenzen bzw. auch ganzer Gene. Die PCR ist das Standard-Verfahren zur Charakterisierung und zum quantitativen Nachweis von mRNA in verschiedenen Proben.

2.2.6.1 Lösungen zur Untersuchung der mRNA-Transkription

DEPC-Wasser

0,1 Vol.-% DEPC wurde deionisiertem Wasser über Nacht beigesetzt und anschließend autoklaviert.

TBE-Puffer (pH 8,0) (5x)

445 nM	Tris-Base
445 nM	Borsäure
10 mM	EDTA
in	Aqua bidest.

Agarosegel

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

2.2.6.2 Primer für die semiquantitative PCR

Für die PCR wurden Primer der Firma TIP Molbiol (Berlin) (Synthesemaßstab: 0,01 µmol) mit DEPC-Wasser zu einer Konzentration von 100 µM gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurden Gebrauchslösungen zu 10 µM mit DEPC-Wasser hergestellt.

Tab. 5: Primer für die semiquantitative PCR

Produkt	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
eNOS	5'-caaccaacgtcctgcagaccgtgc-3'	5'-ggcggacctgagtcgggcagccgc-3'
iNOS	5'-ctctatgtttgcgggatgt-3'	5'-ttctcgctcgtaaggaaa-3'
nNOS	5'-cttcaagaagctagcagaagctgt-3'	5'-acaaggaccagagtttcatgttc-3'
GADPH	5'-atgcaacggatttggctgat-3'	5'-tctcgctcctggaagatggtg-3'

2.2.6.3 Primer für die Real-Time PCR

Für die Real-Time PCR wurden Primer der Firma TIP Molbiol (Berlin) (Synthesemaßstab: 0,01 µmol) mit molekularbiologisch reinem Wasser zu einer Konzentration von 0,5 µM gelöst.

Tab. 6: Primer für die Real-Time PCR

Produkt	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
S1P₁	5'-cgtgttcagctctcctcg-3'	5'-ctgatgcagttccagcc-3'
S1P₂	5'-gtagccaggatggtctt-3'	5'-caacagagcgagacttca-3'
S1P₃	5'-cgcttcagtgtaacaacg-3'	5'-gagggtcacacagcatt-3'
S1P₄	5'-aagaccagccgcgtcta-3'	5'-ccaggcagaagaggatgt-3'
S1P₅	5'-ggaaatgcagccaaagg-3'	5'-ccattattcatcaccgagtt-3'
Cyclophylin A	5'-tttgcttaattctacacagtacttagat-3'	5'-ctaccctcaggtggtctt-3'

2.2.6.4 Isolierung der mRNA

Die mRNA der Keratinozyten wurde mit Hilfe des kommerziellen QuickPrep[®] Micro mRNA Aufreinigungskits der Firma GE Healthcare (Freiburg) nach einer von Chirgwin et al. beschriebenen Methode gemäß den Herstellerangaben isoliert (Chirgwin et al. 1979). Hierzu wurden die Zellen gesplittet und 1 ml der Zellsuspension (10⁶ Zellen/ml PBS-Lösung) in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 10.000 x g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet durch Extraktionspuffer aufgeschlossen, dessen Zusatz gleichzeitig zur Hemmung endogener RNasen führte. Durch Verdünnung des homogenisierten Extrakts mit 800 µl Elutionspuffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl) wurde eine erste Aufreinigung durch Präzipitation enthaltener Proteine erreicht. Nach Zentrifugation bei 10.000 x g wurde der Überstand auf Oligo(dT)-beschichtete Cellulosepartikel gegeben, an der die Polyadenylat-haltige mRNA adsorbieren konnte. Die an Oligo(dT) Cellulose gebundene mRNA wurde in eine MicroSpin-Säule überführt und fünfmal mit 1 ml Puffer hoher Salzkonzentration (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl) und dreimal mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration

(10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl) gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der mRNA mit 400 µl 70 °C warmem Elutionspuffer. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Aus der UV-Absorption konnte die mRNA-Konzentration wie folgt berechnet werden:

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

Nach der Gehaltsbestimmung erfolgte die Aufkonzentrierung der mRNA durch Ethanolfällung. Hierzu wurde das mRNA-Eluat mit 10 µl Glykogen-Lösung (10 mg Glykogen in DEPC-Wasser) und 40 µl 2,5 M Kaliumacetat-Lösung pH 5 versetzt und mit 1 ml eiskaltem absolutem Ethanol durch Lagerung bei -20 °C für 1 h zur Fällung gebracht. Nach der Zentrifugation (4 °C, 30 min, 10.000 x g) wurde die mRNA für den weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

Für die Real-Time PCR wurde die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Keratinozyten mit dem RNA Isolierungskit (Rneasy Kit®) der Firma Qiagen (Foster City, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden direkt in der Versuchsschale mit 350 µl Lyse-Puffer lysiert. Danach wurden die Proben auf eine QIAshredder®-Säule gegeben und bei 14.000 x g für 3 min bei 4 °C zentrifugiert. Es folgte die Mischung des RNA-haltigen Zentrifugats mit 70 %igem Ethanol im Verhältnis 1:1. Anschließend wurde dieses Gemisch auf eine RNeasy spin®-Säule gegeben und für 15 s bei 8.000 x g zentrifugiert. Dadurch wurde die Bindung der RNA an das Säulenmaterial erreicht. Nun folgte die Entfernung der genomischen DNA aus der Säule. Zu diesem Zweck wurde nach dem ersten Waschen mit dem RW1 Puffer 1 µl DNase in 80 µl DNase-Puffer auf die Säule gegeben und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Danach wurde die Säule erneut mit RW1 Puffer und schließlich zweimal mit RPE-Puffer gewaschen. Die Gesamt-RNA wurde aus der Säule mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte photometrisch bei 260 nm in 10 mM Tris-HCl (pH 7).

2.2.6.5 Synthese von cDNA

Für die Gewinnung von einzelsträngiger cDNA wurde die mRNA zu einer Konzentration von 100 - 200 ng/µl in DEPC-Wasser gelöst. Je Reaktion wurde 1 - 2 µg mRNA zunächst mit 1 µl Oligo(dT)-Primer (1 pM) versetzt, für 3 min bei 80 °C denaturiert und anschließend für 10 min bei 37 °C abgekühlt. Die daraufhin zugegebene Reaktionsmischung enthielt 1 µl Superscript™ Reverse Transkriptase

(200 u), 1 µl RNasin Ribonuklease-Inhibitor, 1 µl dNTP-Mix (Mischung aus je 10 mM Lösungen von dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 2 µl DTT (0,1 M) und 4 µl fünffach konzentriertem Reaktionspuffer (zusammengesetzt aus: 20 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂). Die Negativkontrollen enthielten anstelle der Reversen Transkriptase 1 µl DEPC-Wasser. Dieser Ansatz wurde zur reversen Transkription der mRNA für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Daran schloss sich eine Inkubation für 10 min bei 37 °C in Anwesenheit von 20 µl NaOH (0,4 M) an, wodurch verbliebene mRNA inaktiviert wurde. Nach Neutralisation mit 20 µl Tris/HCl-Lösung (1 M, pH 7,5) wurde die cDNA direkt für die PCR-Analyse eingesetzt oder für den späteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Für die Real-Time PCR wurde die cDNA Synthese mit Hilfe des RevertAidTMFirst Strand cDNA Synthesis Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.6.6 Amplifizierung von DNA mittels PCR

Die Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) ermöglicht eine relative Quantifizierung der mRNA einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Dazu diente 2 µl der cDNA als Matrize für die PCR. Ihr wurde folgendes Reaktionsgemisch hinzugefügt: 5 µl der Mischung der jeweiligen spezifischen Primer (5 µM), 5 µl zehnfach konzentrierter Reaktionspuffer (enthält 200 mM (NH₄)₂SO₄, 750 mM Tris-HCl pH 8,8 und 0,1 Vol.-% Tween 20), 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 3 µl MgCl₂-Lösung (25 mM), 0,25 µl Thermus „*islandicus*“ DNA-Polymerase (1,25 u), ergänzt auf 50 µl mit DEPC-Wasser. Die Amplifizierung der gewünschten DNA-Sequenz erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem Reaktionsverlauf, welcher 30 bis 35 Male wiederholt wurde:

- | | |
|-----------------|---|
| 1 min bei 94 °C | Denaturierung der doppelsträngigen cDNA |
| 1 min bei 55 °C | Anlagerung der Primer |
| 2 min bei 72 °C | Polymerisation der komplementären DNA-Stränge |

Eine abschließende Polymerisationsphase von 2 min bei 72 °C diente der Ergänzung begonnener DNA-Stränge. Die Reaktion wurde durch Abkühlung auf 4 °C für 1 s beendet. Die PCR-Amplikons wurden anschließend in 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt und nach Ethidiumbromid-Färbung im UV-Durchlicht bei 254 bzw. 366 nm im Transilluminator detektiert.

2.2.6.7 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR Technologie beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, bietet aber zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Die quantitative Echtzeitanalyse erfolgt über die Messungen Laser-induzierter Fluoreszenzsignale am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green interkaliert in die doppelsträngige DNA. Daher korreliert die Zunahme der Fluoreszenz mit der Zunahme an PCR-Amplifikaten. Für die Amplifikation wurde ein LightCycler480 der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Amplifiziert wurde die cDNA jeweils in Triplikaten in einer 96-Loch-Platte. Die Reaktionsansätze enthielten ein Endvolumen von 20 µl mit 1 µl der jeweiligen Lösung des Primers (0,5 µM), 10 µl des zweifach konzentrierten SYBR Green Master-Mix und RNase-freiem Wasser. Die Primer wurden mit Hilfe der Primer Design Software der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) berechnet (Tab. 6). Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung für 5 min bei 95 °C, gefolgt von 47 Zyklen mit 10 s bei 95 °C und 7 s bei 55 °C für Hybridisierung und 6 s bei 72 °C für die Elongation. Anschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die mögliche Bildung von unspezifischen Primerdimeren zu kontrollieren. Im Anschluss an die Normalisierung der einzelnen Daten gegen Cyclophilin A als Referenzgen wurde die relative mRNA Expression quantifiziert.

2.2.7 Proteinanalytische Methoden

Die Western Blot-Analyse ermöglicht eine Identifizierung und/oder Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches unter Verwendung spezifischer Antikörper. Hierbei kommt es zur Auftrennung eines Proteingemisches mittels Gelelektrophorese, Transfer der Proteine auf eine Membran („blotten“) und der Proteindetektion durch Antikörper, die spezifisch an antigene Epitope des auf der Membran fixierten Zielproteins binden.

2.2.7.1 Lösungen zur Zellyse

Lysepuffer

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
1 %	Nonidet P-40
0,5 %	Desoxycholinsäure
0,1 %	SDS
1 mM	EDTA
in	Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -freier PBS-Lösung

supplementiert mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren

1 mM	PMSF
1 µg/ml	Leupeptin
1 µg/ml	Pepstatin
1 µg/ml	Aprotinin
1 mM	Na ₃ VO ₄
50 mM	NaF

2.2.7.2 Zellyse

Für Western Blot-Experimente wurden Keratinozyten in einer Zelldichte von $1,2 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung der 6-Loch-Platte eingesät. Nach der jeweiligen Stimulation wurden die Zellen mit eiskalter PBS-Lösung gewaschen, auf Eis mit 40 µl Lysepuffer behandelt und anschließend bei 5 °C für 5 min auf einem Schaukelschüttler inkubiert. Die Lyse wurde durch Abschaben der Zellen aus den Versuchsschalen vervollständigt und die Lysate in Eppendorf-Röhrchen überführt. Die festen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 x g für 30 min abgetrennt und die Überstände direkt der Proteinbestimmung unterworfen.

2.2.7.3 Lösungen zur Proteinbestimmung

Bradford-Reagenz (5x)

125 mg	Coomassieblau (Serva Blue G)
125 ml	Ethanol, 96 %
250 ml	H ₃ PO ₄ , 85 %
125 ml	Aqua bidest.

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

2.2.7.4 Proteinbestimmung

Die Quantifizierung der einzelnen Zellysate erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Bradford (Bradford 1976). Diese basiert auf einem Farbumschlag des Coomassieblau-Farbstoffs, denn unter stark sauren Bedingungen liegt der Farbstoff in einer zweifach protonierten, roten Form vor, die jedoch bei Proteinbindung in eine unprotonierte, blaue Form übergeht. Der blaue Komplex kann bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch vermessen werden. Zunächst wurde eine Standardkurve mit BSA erstellt. Die verschiedenen Volumina BSA-Lösung (50 µg/100 µl Aqua bidest.), die 0 - 20 µg Protein entsprechen, wurden mit 5 µl Lysepuffer zu 100 µl Aqua bidest. ergänzt und mit 1 ml Bradford-Lösung gemischt. Für die Proteinbestimmung wurden 5 µl Zellysat, 95 µl Aqua bidest. und 1 ml Bradford-Lösung gemischt. Die Berechnung des Proteingehalts aus den Extinktionswerten erfolgte durch eine lineare Regressionsanalyse der Standardkurve.

2.2.7.5 Probenaufbereitung für die direkte Western Blot-Analyse

Für die Western Blot-Analyse wurden die 20 - 40 µg Protein äquivalenten Volumina Zellysat im Verhältnis 2:1 mit dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer, dem 10 % DTT zugesetzt wurde, vermischt. Das reduzierende Agens DTT sorgt für eine Aufspaltung der Disulfidbrücken in den Polypeptidketten. Das anionische Detergenz SDS hebt die hydrophoben Wechselwirkungen im Protein auf: Höhere Proteinstrukturen gehen verloren und die Proteine gehen in eine lineare Form über. Zur vollständigen Denaturierung werden die Proben für 3 min auf 95 °C erhitzt. Die so aufgearbeiteten Proben wurden direkt verwendet oder bei -80 °C gelagert.

2.2.7.6 Lösungen für die Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse

Trenngelpuffer (pH 8,8)

224,8 g/l	Tris-Base
in	Aqua bidest.

Trenngele*Tab. 7: Trenngelzusammensetzung*

Polyacrylamidkonzentration	7,5 %	10 %	12,5 %
Aqua bidest.	6,15 ml	5,4 ml	4,65 ml
SDS (1 % in Aqua bidest.)	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml
Trenngelpuffer	2,4 ml	2,4 ml	2,4 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
APS (0,1 g/ml in Aqua bidest.)	60 µl	60 µl	60 µl
Acrylamid Rotiphorese® Gel 40	2,25 ml	3 ml	3,75 ml

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

60 g/l Tris-HCl
in Aqua bidest.

Sammelgel (5 % Polyacrylamid)

2,3 ml Aqua bidest.
0,4 ml SDS (1 % in Aqua bidest.)
0,8 ml Sammelgelpuffer
4 µl TEMED
20 µl APS (0,1 g/ml in Aqua bidest.)
0,5 ml Acrylamid Rotiphorese® Gel 40

Laufpuffer (10x, pH 8,3)

144 g/l Glycin
30,2 g/l Tris-Base
10 g/l SDS
in Aqua bidest.

Blotpuffer (10x, pH 8,3)

144 g/l Glycin
30 g/l Tris-Base
in Aqua bidest.

TBS Puffer (10x)

12,14 g/l Tris-HCl
87,66 g/l NaCl
in Aqua bidest.

Zur Herstellung von TBST wurde 0,1 % Tween 20 hinzugefügt und der pH Wert von 8 eingestellt.

Blockpuffer

5 % Magermilchpulver Sucofin®
in TBST

Strip-Puffer

3,51 g Tris-HCl
0,34 g Tris-Base
3,57 ml β -Mercaptoethanol
10 g SDS
ad 500 ml Aqua bidest.

2.2.7.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte elektrophoretisch durch die diskontinuierliche Gelelektrophorese, mit der Trennung der Proteine nach ihrer Molekularmasse. Das eigentliche Trenngel (7,5 - 12,5 % Polyacrylamid) wurden mit einem 5 %igem Sammelgel überschichtet, um die Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel zu fokussieren und einen gleichzeitigen Eintritt zu erzielen. Die Elektrophorese fand bei 35 mA im Sammelgel und bei 55 mA im Trenngel in einer mit 500 ml Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer unter Wasserkühlung statt.

Tab. 8: Bei der SDS-PAGE eingesetzte Polyacrylamidkonzentrationen

	Molekulargewichte [kDa]	% Polyacrylamidgel
eNOS	135	7,5
Phospho-eNOS (Ser ¹¹⁷⁷)	140	7,5
iNOS	130	7,5
Phospho-Akt (Ser ⁴⁷³)	60	10
Phospho-PKC (pan)(β II Ser ⁶⁶⁰)	78, 80, 82, 85	10
Phospho-PKC δ (Thr ⁵⁰⁵)	78	10
S1P ₁ R	43	10
S1P ₂ R	39	10
S1P ₃ R	42	10
S1P ₄ R	42	10
S1P ₅ R	42	10
Bcl-2	26	12,5

2.2.7.8 Western Blot-Analyse

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden zur Immundetektion auf PVDF-Membranen übertragen, die zunächst zur verbesserten Bindekapazität in Methanol hydrophobisiert wurden. Vor der Schichtung des Blot-Sandwichs wurden Gele, Membranen und Filterpapier in Blotpuffer equilibriert. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 100 mA über Nacht in einem mit 1100 ml Blotpuffer befüllten Tank-Blot. Anschließend wurden die Membranen durch Inkubation in 5 %iger Magermilchlösung in TBST bei 37 °C geblockt, um unspezifische Bindungen von Proteinen an der Membran zu verhindern. Nach drei Waschschritten mit TBST für jeweils 5 min bei Raumtemperatur wurden die Membranen mit dem primären Antikörper (1:1000 in Aqua bidest. verdünnt) behandelt, um die Zielproteine spezifisch zu markieren. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schaukelschüttler. Danach wurde die Lösung des Primärantikörpers entfernt und die Membran erneut dreimal mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper (1:1000 in Blocklösung verdünnt) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper mit Hilfe des LumiGlo[®] Chemilumineszenz Reagenzes. Dazu wurde die Membran für 1 min mit Lumineszenzfarbstoff sowie Peroxid-Lösung (jeweils 1:20 Verdünnung) behandelt. Die Bindung des sekundären Antikörpers führte zu Bereichen, die Lumineszenz zeigten und bei Kontakt mit einem lichtempfindlichen Film in einer Expositionskassette eine Schwarzfärbung erzeugten. Für die Detektion von weiteren Proteinen auf der gleichen Membran wurden die Antikörper durch Inkubation der Membran in 50 ml Strip-Puffer bei 50 °C entfernt und einem erneuten Immunoblot unterzogen.

2.2.8 Untersuchungen zur Zellproliferation

Die Proliferation der Zellen wurde durch den Einbau von [³H]Thymidin in die DNA sich teilender Zellen quantifiziert. Dazu wurden 4 x 10⁴ Keratinozyten je Vertiefung einer 24-Loch-Platte im Wachstumsmedium eingesät. Einen Tag nach der Einsaat erfolgte nach einem Mediumwechsel auf Insulin-freies Wachstumsmedium die Inkubation der Testsubstanzen über 24 h. Nach 20 h erfolgte die Zugabe von

1 μCi sterilem radioaktiv markiertem [^3H]Thymidin pro Versuchsschale, was 10 μl der 1:10 Verdünnung der Stammlösung entsprach. Nach Ablauf der 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zunächst mit kalter PBS-Lösung sowie anschließend zweimal mit 5 %iger eiskalter Trichloressigsäure gewaschen. Das Präzipitat wurde durch Inkubation in 200 μl 0,3 N NaOH für eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gelöst. Die NaOH-Lösung wurde vollständig in ein Eppendorf-Röhrchen mit 2 ml Optiphase-Szintillationsflüssigkeit überführt und bis zur vollständigen Phasenmischung gevortext. Die Radioaktivität des inkorporierten [^3H]Thymidins wurde in einem Beta-Counter mit einer Zählzeit von 1 min gemessen. Der Einbau des [^3H]Thymidin in die DNA ist proportional zur Proliferationsrate der Zellen.

2.2.9 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate

Zur Sortierung und Charakterisierung von Zellen und Zellbestandteilen können durchflusszytometrische Verfahren, auch FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)-Analysen genannt, genutzt werden. Eine im Durchflusszytometer vermessene Zelle verursacht Streulicht durch Beugung und Streuung eines monochromatischen Laserstrahls in Abhängigkeit zellulärer Eigenschaften. Dabei ist Vorwärtsstreulicht (FSC) ein Maß für die Größe einer Zelle und Seitwärtsstreulicht (SSC) ein Maß für deren Granularität. Darüber hinaus ist neben der Charakterisierung zellulärer Größen die quantitative Analyse von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen durch Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern bzw. fluoreszierenden Farbstoffen möglich.

Zur Detektion apoptotischer und nekrotischer Marker wurden die Zellen mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markiertem Annexin V und dem Fluoreszenzfarbstoff PI markiert und anschließend hinsichtlich der Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch analysiert. Der gebundene Fluoreszenzfarbstoff wurde durch den Laser angeregt und das emittierte Licht detektiert, was zu einer Bestimmung der Zellzahl gefärbter und ungefärbter Zellen führte.

In der frühen Phase der Apoptose wird Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran zur Außenseite transloziert, an welches spezifisch Annexin V zu binden vermag (Vermes et al. 1995). Früh-apoptotische Zellen sind nur mit Annexin V anfärbbar, wohingegen spät-apoptotische und nekrotische Zellen durch

eine gleichzeitige Färbung mit PI detektierbar sind, da PI nur in Zellen mit durchlässiger Zytoplasmamembran eindringt. Es erfolgte auf diese Weise eine Bestimmung der früh- und spät-apoptotischen Zellen.

2.2.9.1 Lösungen zur FACS-Analyse

Bindungspuffer (pH 7,4)

8,18 g/l	NaCl
20 g/l	HEPES
5 g/l	CaCl ₂
in	Aqua bidest.

Der Puffer wurde autoklaviert.

2.2.9.2 Zellstimulation und Präparation der Zellen zur Detektion apoptotischer und nekrotischer Zellen über die FACS-Analyse

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden Keratinozyten (5×10^4 Zellen) und BAEC (1×10^5 Zellen) je Vertiefung einer 6-Loch-Platte in den entsprechenden Wachstumsmedien eingesät. Dabei ist eine geringe Konfluenz der Kultur besonders wichtig für das erfolgreiche Auslösen der Apoptose. Am Folgetag wurde das Medium gegen 1 ml des jeweiligen Basalmediums ausgetauscht. Vor der Induktion der Apoptose erfolgte eine entsprechende Stimulation mit den Testsubstanzen und Kontrollvehikeln. Die Apoptose wurde durch Stimulation mit 20 ng/ml TNF α und 0,1 μ g/ml Actinomycin D ausgelöst. Nach 16 h erfolgte die Präparation der Zellen für die FACS-Analyse. Dazu wurde das Medium mit den darin enthaltenen apoptotischen oder nekrotischen Zellen abgenommen und in ein Rundboden-Röhrchen überführt. Die anhaftenden Zellen wurden mit Trypsin/EDTA und Stoppmedium geerntet und ebenfalls ins Röhrchen überführt. Danach erfolgte ein Waschen der Vertiefungen der Kulturplatten. Die vereinigten Zellsuspensionen wurden bei 300 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit kaltem Bindungspuffer gewaschen und in 185 μ l Bindungspuffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation der Zellsuspensionen mit Annexin V-FITC in einer Endkonzentration von 0,5 μ g/ml für 10 min in der Dunkelheit. Die Gegenfärbung mit PI in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml erfolgte durch Inkubation für 1 min unmittelbar vor der Messung der jeweiligen Probe.

2.2.9.3 Einstellung des Durchflusscytometers und Messung

Annexin V ist an den gelbgrünen Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt, welcher ein Absorptionsmaximum von 495 nm besitzt. Dies ermöglicht eine Detektion mit dem Durchflusscytometer, da der Argonlaser mit der Wellenlänge 488 nm den Farbstoff anregt. Das Fluoreszenzemissionsmaximum des FITC liegt um 519 nm. Das emittierte Licht wird im Fluoreszenzkanal 1 (FL1: $\lambda = 530$ nm) vermessen. Das rote PI zeigt ein Absorptionsmaximum von 536 nm und kann damit ebenso durch den Laserstrahl angeregt werden. Das Fluoreszenzemissionsmaximum des PI liegt bei 617 nm. Das emittierte Licht dieses Fluoreszenzfarbstoffes wird im Fluoreszenzkanal 2 (FL2: $\lambda = 585$ nm) vermessen. Die Filter FL1 und FL2 ermöglichen, dass in diesen Kanälen spezifisch nur das emittierte Licht des einen Fluorochroms durchgelassen und detektiert wird.

Vor der Messung wurde das Durchflusscytometer entsprechend der Zellpopulation eingestellt und eine Kompensation durchgeführt. Zunächst wurde eine vitale Zellpopulation in einem Dot Plot nach ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) gegeneinander aufgetrennt. Die zu untersuchende Hauptzellpopulation wurde durch Legen eines „Gates“ ausgewählt. Für die Kompensation der Fluoreszenzen wurde ein Annexin V-FITC (FL1)/PI (FL2) Dot Plot geöffnet. Eine solche Kompensation ist nötig, da sich die Emissionswellenlängenbereiche der beiden Fluorochrome überlappen, was ohne Kompensation zur Detektion falsch positiver Signale führt. Um die unspezifische (Eigen)-fluoreszenz der Zellen zu unterdrücken, wurden nun zunächst ungefärbte Zellen vermessen. Die Autofluoreszenz sollte sich bei beiden Detektionswellenlängen im linken unteren Bereich des Dot Plot befinden. Die eigentliche Kompensation wurde mit einfach gefärbten Zellen durchgeführt. Die Einstellungen erfolgten so, dass der Farbstoff nur in seinem Fluoreszenzkanal ein Signal ergab: Annexin V-FITC-gefärbte Zellen sollten möglichst wenig Fluoreszenz im FL2 Kanal und PI-gefärbte Zellen möglichst wenig Fluoreszenz im FL1 Kanal zeigen. Nach diesen Grundeinstellungen wurden die Proben vermessen und die Daten unter Verwendung der Software winmdi Version 2.8 ausgewertet. Die gemessenen Werte wurden auf den Mittelwert der jeweils erzielten Apoptoserate, der ausschließlich mit TNF α und Actinomycin D behandelten Zellen bezogen.

2.2.10 Quantifizierung der NO-Produktion

NO ist äußerst reaktiv und besitzt eine extrem kurze Halbwertszeit. Seine chemische Instabilität erschwert die quantitative Bestimmung in biologischen Medien.

2.2.10.1 Griess-Assay zur indirekten Detektion

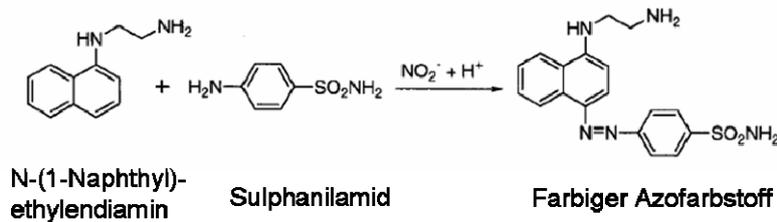


Abb. 10: Griess-Reaktion (Nagano 1999)

Der Griess-Assay beruht auf einer indirekten Detektion des gebildeten NO über eine Reaktion von Nitrit (NO_2^-), welches ein stabiles Oxidationsprodukt des NO darstellt. Diese spektrometrische Methode beruht auf der Griess-Reaktion (Abb. 10) und stellt eine etablierte Methode für die Analyse von Nitrit und Nitrat in flüssigen Medien dar (Schmidt et al. 1992). Bei der von Griess beschriebenen Reaktion handelt es um eine Diazotierungsreaktion, bei welcher Sulphanilamid durch HNO_2 diazotiert wird (Griess 1864). Das entstandene Diazoniumsalz koppelt anschließend mit *N*-(1-Naphthyl)ethyldiamin zu einer rot gefärbten Azoverbindung, die bei 540 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Zur Analyse der durch Keratinozyten gebildeten NO-Mengen wurden 5×10^4 Zellen je Vertiefung einer 96-Loch-Platte in 100 μl Wachstumsmedium eingesät. Vor der Stimulation am nächsten Tag erfolgte kein Wechsel des Mediums. Die Analyse der Testsubstanzen erfolgte als Vierfachbestimmung. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 24 h wurde das Kulturmedium abgenommen und für 5 min bei 4 °C bei 300 x g zentrifugiert. Es wurde entweder direkt für den Griess-Assay eingesetzt oder bei -80 °C gelagert. Je 50 μl der zu untersuchenden Medien wurde in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte überführt. Jeder Probe wurde nun unter Lichtausschluss 50 μl 1 %ige Sulphanilamidlösung in 5 % H_3PO_4 hinzugefügt. Im Anschluss an eine Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 15 min wurde 50 μl 0,1 %ige wässrige *N*-(1-Naphthyl)ethyldiamin-Lösung jeder Versuchsschale hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubation für 15 min wurde die Absorption der Proben mit einem

Plattenphotometer bei 540 nm gemessen. Um die Nitrit-Konzentration im Medium berechnen zu können, wurde bei jeder Messung ein Standard mitgeführt. Dieser setzte aus einer Lösung von Natriumnitrit in Wachstumsmedium in einem Konzentrationsbereich von 100 μM bis 1,56 μM zusammen.

2.2.10.2 Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie

Mowiol-Lösung (pH 7,4)

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

2.2.10.3 Direkte NO-Bestimmung durch DAF-2DA

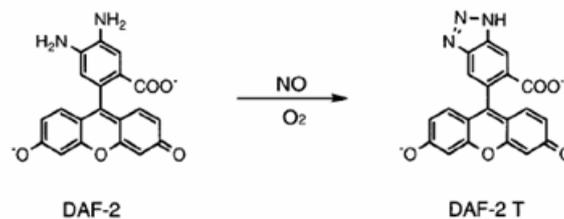


Abb. 11: NO-Bestimmung mit DAF-2 (Nagano 1999)

Eine Möglichkeit der Detektion der intrazellulären NO-Bildung bietet die Fluoreszenzmikroskopie, wobei nicht fluoreszierende Verbindungen mit dem NO-Radikal zu einer fluoreszierenden Verbindung reagieren. Der Fluoreszenzfarbstoff DAF-2DA ist lipophil und damit membrangängig. Durch intrazelluläre Esterasen entsteht 4,5-Diaminofluoreszein (DAF-2), das mit NO in Anwesenheit von O₂ zum stark fluoreszierenden Triazolofluoreszein (DAF-2T) reagiert (Kojima et al. 1998). Die zugrunde liegende Reaktion ist in Abb. 11 dargestellt.

Zur Detektion der NO-Bildung wurden $1,5 \times 10^4$ Keratinozyten in 100 μl Wachstumsmedium auf ein Deckglas ausgesät. Die Deckgläser befanden sich in den Vertiefungen einer 6-Loch-Platte, in die nach einer Inkubation für 10 h 2 ml Wachstumsmedium hinzugefügt wurde. Am nächsten Tag wurde ein Mediumswechsel auf 1 ml Wachstumsmedium durchgeführt, in dem die Stimulation für 24 h erfolgte. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 30 min in einem Inkubationsschrank bei 37 °C mit DAF-2DA (10 μM) inkubiert. In Anschluss wurden die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen, getrocknet und anschließend mit 10 μl

Mowiol-Lösung fixiert. Die Betrachtung der Zellen erfolgt unter einem invertierten Fluoreszenzmikroskop. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten am Olympus BX41 Mikroskop, das mit der Digitalkamera Nikon DXM1200 und der AxioVision 4.1 Software ausgestattet war.

2.2.11 Statistik

2.2.11.1 Datenpräsentation

Bei den angegebenen Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichungen (\pm SD) von mindestens Zweifachbestimmungen. Die Standardabweichung diente als Maß für die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert.

Bei Apoptoseuntersuchungen wurden die Einzelwerte auf die Apoptosekontrolle des jeweiligen Experimentes bezogen. Die Apoptosekontrolle ist der Mittelwert der Vermessung der Zellen, die ausschließlich mit TNF α und Actinomycin D stimuliert wurden, und wurde in jedem Experiment erneut bestimmt. Bei den angegebenen Daten der Apoptoseuntersuchungen handelt es sich um Mittelwerte \pm SD von Doppelbestimmungen. Bei Proliferationsuntersuchungen wurden die Einzelwerte auf den Mittelwert der unbehandelten Kontrollzellen bezogen. Die Daten der Proliferationsuntersuchungen repräsentieren Mittelwerte \pm SD von Dreifachbestimmungen. Die Daten der NO-Messungen repräsentieren Mittelwerte \pm SD der Absolutwerte von Vierfachbestimmungen.

Die Ergebnisse aller gezeigten Experimente wurden in mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Untersuchungen verifiziert.

2.2.11.2 Statistische Beurteilung

Die Prüfung auf Normalverteilung, die als Voraussetzung für die Prüfung auf Signifikanz gilt, erfolgte mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests. Der Student's t-Test wurde zur Feststellung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten herangezogen, nachdem die Homogenität der Varianzen unter Anwendung des F-Tests überprüft wurde. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % festgelegt. Damit war ein Ergebnis signifikant, wenn die Nullhypothese (H_0 : Es besteht kein Unterschied zwischen den Stichproben) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ abgelehnt werden konnte.