

4. Methoden

4.1 Zellkultur-Methoden

Für die beschriebenen Experimente wurden entweder die Zelllinie HaCaT (immortalisierte Keratinozytenzelllinie), folliculäre Keratinozyten (FK) oder dermale Papillenzellen (DPC) des menschlichen Haarfollikels verwendet. Alle erwähnten Zellarten wuchsen adhärent. Daher erfolgte die Zellkultur in 75 -cm² - Zellkulturflaschen in Brutschränken bei einer Temperatur von 37 °C unter 5 % CO₂ -Gehalt und 100 % Luftfeuchtigkeit. Die Dichte des Zellrasens wurde täglich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Um tote Zellen abzuwaschen, wurde ein Mediumwechsel regelmäßig alle 2 - 3 Tage durchgeführt. Dieser erfolgte vorzeitig dann, wenn die Indikatorfarbe des Mediums von rot - orange auf gelb - orange gewechselt hatte.

4.1.1 HaCaT-Keratinozyten

HaCaT-Keratinozyten (*Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes*) sind eine epitheliale, spontan transformierte und nicht tumorigene Zelllinie und als solche über eine hohe Passagenzahl kultivierbar. Ihre Entwicklung wurde 1988 beschrieben (Boukamp et al., 1988). Ursprünglich stammen die Zellen aus der Peripherie eines malignen Melanoms von der Rückenhaut eines 62-jährigen Mannes. Die Kultivierung von HaCaT-Keratinozyten erfolgte im Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) mit 10 % FCS (Hitze-inaktiviert), 4 mM L-Glutamin, 100 000 IU/l Penicillin und 0,1 g/l Streptomycin.

4.1.2 Dermale Papillenzellen (DPC)

Humane Dermale Papillenzellen wurden durch Mikrodissektion von Anagen-Haarfollikeln unter dem Lichtmikroskop gewonnen (Kozłowska et al., 1998). Die Anzucht der Zellen erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), welches 20 % FCS, 0,5 mM L-Glutamin, 100 000 IU/l Penicillin und 0,1 g/l Streptomycin enthielt. Nach der 1. Passage erfolgte die weitere Kultivierung der DPC in dem gleichen Medium, welches dann 10 % FCS enthielt.

4.1.3 Follikuläre Keratinozyten (FK)

Follikuläre Keratinozyten wurden neben HaCaT-Keratinozyten für Untersuchungen genutzt. Diese epithelialen Zellen weisen ein gegenüber HaCaT-Keratinozyten ursprünglicheres Proliferationsverhalten auf, unterscheiden sich aber sonst kaum von ihnen (Boukamp et al., 1988). FK können lediglich bis zur 1. Passage verwendet werden; eine Subkultivierung ohne den Verlust ihrer charakteristischen Merkmale ist nicht möglich. Mit steigender Passage gleichen sich die FK in ihrem Keratinmuster denen von epidermalen Zellen an. Die primären Keratinozyten der äußeren Wurzelscheide des menschlichen Haarfollikels wurden aus Anagen-Haarfollikeln überwiegend männlicher Probanden gewonnen, denen die Haarfollikel mittels einer Trichogramm-Zange aus der Kopfhaut epiliert wurden. Die Kultivierung erfolgte in DMEM/HAM F12 (1:1) mit 10 % FCS; 100 000 IU/l Penicillin; 0,1 g/l Streptomycin; 10 ng/ml EGF; 5 ng/ml KGF; 0,08 µg/ml Cholera-toxin und 0,4 µg/ml Hydrocortison (Detmar et al., 1993). Nach dem ersten Auswachsen der Keratinozyten wurde auf SFM mit 0,1 - 0,2 ng/ml EGF and 25 µg/ml BPE (Gibco, Grand Island, USA) gewechselt. Die Zellen wurden ab einer Konfluenz von ca. 70 - 80 % für Experimente verwendet.

4.1.4 Kultivierung von Ganzfollikel-Kulturen (WOC)

Die Gewinnung von humanen Ganzfollikel-Kulturen erfolgte in modifizierter Weise nach einer veröffentlichten Methode (Philpott et al., 1996) durch Mikrodisektion von Haarfollikeln aus Kopfhaut, die im Rahmen von chirurgischen Operationen im Bereich des Kopfes anfielen. Die Kultur erfolgte in 24-well-Platten in serumfreien Williams-E-Medium, welches 2 mM L-Glutamin; 10 ng/ml Hydrocortison; 10 µg/ml Insulin; 100 000 IU/l Penicillin und 0,1 g/l Streptomycin enthält.

4.1.5 Zellzählung

Die Zellen wurden wie unten beschrieben von ihrer Unterlage gelöst und durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml frischem Medium gut resuspendiert und aus diesem ein Volumen von ca. 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer gebracht. Durch manuelles Zählen der Zellen wurde die Zellzahl unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Zählkammer bestimmt.

4.1.6 Subkultivierung von Zellen

Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurde das Wachstumsmedium abgesaugt, und die Zellen wurden zweimal mit je 10 ml sterilem PBS gewaschen. Nach dessen Entfernung (durch Absaugen) wurden die Zellen anschließend unter der Einwirkung von 3 ml Trypsinlösung (+ EDTA) vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. Unter Einfluss von Trypsin begannen die Zellen ihren Zell-Zell-Kontakt zu verlieren, lösten sich vom Untergrund ab und bekamen ihre ursprüngliche rundliche Form. Zur Beendigung der proteolytischen Wirkung des Trypsins wurde 10 ml FCS-haltiges Wachstumsmedium hinzugegeben und die Zellsuspension in ein 15-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 200 g für 10 min wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in frischem Wachstumsmedium aufgenommen. Die Zellen wurden gezählt und in der gewünschten Zelldichte in unbenutzten Zellkulturgefäßen ausgebracht.

4.1.7 Hitze-Inaktivierung von FCS

Das tiefgefrorene Serum wurde in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Nach dem Auftauen des Serums wurde die Temperatur des Wasserbades auf 56 °C erhöht und das Serum darin für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Serums zum normalen Wachstumsmedium der Zellen.

4.1.8 Einfrieren von Zellen

Für das Einfrieren von Zellen zwecks Konservierung wurde der Zellrasen einer zu ca. 70 % konfluent bewachsenen Zellkulturflasche verwendet. Die Zellen wurden abgelöst, wie oben beschrieben, gewaschen und dann pelletiert. Das Pellet wurde in 3 ml Einfrierlösung I resuspendiert. Anschließend wurden 3 ml DMSO-haltige Einfrierlösung II hinzugefügt, um die Kristallbildung im Inneren der Zellen zu verhindern, und diese Zellsuspension auf 6 Kryoröhrchen verteilt. Es folgte das fraktionierte Einfrieren der Zellen bei 4 °C für 30 min unter mehrmaligem Schwenken, bei - 20 °C für 1 h, bei - 70 °C über Nacht bis mehrere Tage und letztendlich in N₂ (l) bei - 196 °C, in welchem sie auch gelagert wurden.

4.1.9 Auftauen von Zellen

Während beim Einfrieren von Zellen diese schrittweise dem nächsten Kältegrad zugeführt wurden, sollte der umgekehrte Prozess des Auftauens möglichst rasch ablaufen. Die gefrorenen Zellen wurden in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend in 10 ml vortemperiertem (37 °C), FCS-haltigem Medium resuspendiert. Nach Zentrifugation der Zellen wurde das Pellet in frischem Medium aufgenommen und in eine mittlere Zellkulturflasche ausgebracht. Der erste Mediumwechsel erfolgte frühestens nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen im Brutschrank.

4.1.10 Medien für die Zellkultur

- PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺ (Fa. Biochrom oder Fa. PAA)
- Trypsinlösung: Trypsin 0,5 g (0,1 % (w/v)); EDTA 0,1 g (0,02 % (w/v)) ad 500 ml PBS, steril filtriert, aliquotiert, bei - 20 °C gelagert
- Einfrierlösung I: entsprechendes Wachstumsmedium 50 % (v/v), FCS 50 % (v/v)
- Einfrierlösung II: entsprechendes Wachstumsmedium 80 % (v/v), DMSO 20 % (v/v)

4.2 Proteinchemische Methoden

4.2.1 Proteinbestimmung

4.2.1.1 BCA-Methode (Smith et al., 1985)

Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , welches dann mit Bicinchoninsäure (BCA) einen Farbkomplex bildet, dessen Entstehung photometrisch bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ im ELISA-Reader gemessen werden kann (siehe Schema). Für die Reduktion werden die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin verantwortlich gemacht.

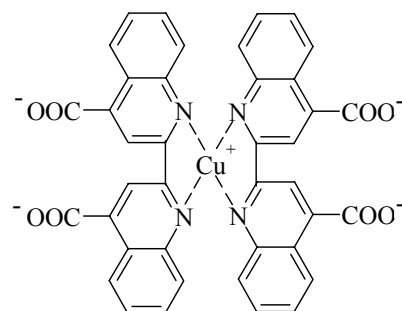
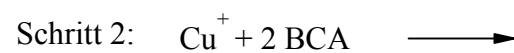
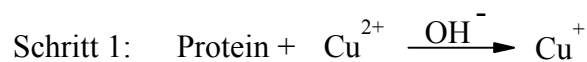
Von den auf ihren Proteingehalt zu bestimmenden Proben wurden Verdünnungen hergestellt. Ein Volumen von $10 \mu\text{l}$ dieser Proben wurde in Mikrotiterplatten gegeben, mit $200 \mu\text{l}$ Farbregenz versetzt und für 30 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ in einem ELISA-Reader bestimmt. Die Proteinkonzentration ergab sich durch Vergleich eines gleichbehandelten BSA-Standards (Konzentrationen zwischen 25 und $1500 \mu\text{g/ml}$) mit den Proben. Der Proteingehalt einer Probe wurde dreifach bestimmt.

Die Reaktion wird nicht durch Detergenzien und hohe Salzkonzentrationen, aber durch Reduktionsmittel gestört.

Lösungen

Farbreagenz: Fa. Pierce: 50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B

Reaktionsschema:



4.2.1.2 Bradford-Methode

Diese Methode beruht auf der Bindung von Proteinen an Coomassie brilliant blue G-250, wodurch sich im sauren Milieu das Absorptionsmaximum von $\lambda = 465$ nm (ohne Protein) nach $\lambda = 595$ nm (mit Protein) verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei letzterer Wellenlänge ist das Maß für den Proteingehalt. Da diese Methode unempfindlicher gegenüber Reduktionsmitteln ist, wurde dieser Test bei ihrem Vorhandensein der BCA-Methode vorgezogen.

Die auf ihren Proteingehalt zu bestimmende Probe wurde mit H₂O auf ein Volumen von 800 μ l gebracht und mit 200 μ l Bradford-Reagenz versetzt. Ein mitgeführter BSA-Standard ($c = 1$ mg/ml) wurde gleich behandelt und enthielt Proteinmengen zwischen 1 und 40 μ g. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden 300 μ l der Proben und der Standards in eine 96-well-Platte gegeben und ihre Extinktion wurde bei $\lambda = 595$ nm gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben ergab sich durch Vergleich der gemessenen OD₅₉₅-Werte der Proben mit denen der Standards. Diese Reaktion wird durch Detergenzien gestört.

Lösungen

Bradford-Reagenz: 0,06 % (w/v) Coomassie brilliant blue G-250
3 % (v/v) HClO₄

4.2.2 Eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Verfahren der SDS-PAGE nach Lämmli (1970) diente zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrem Molekulargewicht.

Die bei der SDS-PAGE eingesetzte Gelmatrix bestand aus Polyacrylamid, welches durch eine radikalische Reaktion aus Acrylamid (AA) und N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis) entstand. Die Porenweite des Gels kann durch das Verhältnis des Acrylamids zum Bisacrylamid gesteuert werden. Die Reaktion ist radikalischer Natur und wird durch den Zerfall von Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet, welches in Lösung freie Radikale bildet. N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurde der Lösung zugesetzt, da es in Form freier Radikale existieren kann und somit die Gelbildung katalysiert.

Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch Zusatz von Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol (DTT) oder β -Merkaptoethanol, welche Disulfid-Brücken reduzieren, und des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS). SDS lagert sich, vollständige Entfaltung des Proteins vorausgesetzt, entsprechend dem Molekulargewicht der Proteine an und verleiht diesen

negative Ladung. Die SDS-Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode und werden nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Bei dem Verfahren der diskontinuierlichen SDS-PAGE wurde ein Sammelgel (pH 6,8) mit niedrigerer Prozentigkeit über ein Trenngel (pH 8,8) mit höherer Prozentigkeit gegossen.

Die Methode der SDS-PAGE diente zur Ermittlung der Molekulargewichte von Proteinen. Der Quotient aus den Abständen der Proteinbande und der Bromphenolblau-Front, jeweils vom Anfang des Trenngels aus gemessen, ist definiert als die relative Mobilität (r_m -Wert) des Proteins. Da die Logarithmen der Molekulargewichte umgekehrt proportional zum r_m -Wert der Proteine sind, ließen sich mit einem Diagramm, in dem die Logarithmen der Molekulargewichte von Standardproteinen gegen ihre r_m -Werte aufgetragen sind, die Molekulargewichte unbekannter Proteine ermitteln. Die Methode weist einen relativen Fehler von $\pm 10\%$ und einen absoluten Fehler von ± 2 kDa auf.

Proteine mit speziellen gebundenen Komponenten können ein erheblich abweichendes Verhalten zeigen. Da die hydrophilen Zucker glykolysierter Proteine kein SDS binden, unterscheidet sich das Ladungs- zu Masse-Verhältnis der SDS-Komplexe glykolysierter Proteine von dem nichtglykolysierter Proteine. Erstere laufen daher aufgrund unterschiedlicher Kohlenhydrat-Reste (Glykoformen) untypisch in der SDS-PAGE und ergeben breitere Banden.

Lösungen

- Acrylamid (AA/Bis)-Stammlösung:

BioRad, # 161-0158

- Sammelgelpuffer (0,5 M Tris):

Tris(hydroxymethyl)aminomethan 36,3 g ad 500 ml H₂O; mit HCl auf pH 6,8 eingestellt

- Trenngelpuffer (1,5 M Tris):

Tris(hydroxymethyl)aminomethan 90,8 g ad 500 ml H₂O; mit HCl auf pH 8,8 eingestellt

- Elektrophoresepuffer (10 x E-Puffer):

Tris(hydroxymethyl)aminomethan 30,3 g; Glyzin 144,13 g; SDS 10 g ad 1000 ml H₂O. Vor Gebrauch: 100 ml 10 x E-Puffer ad 1000 ml H₂O

- reduzierender Probenpuffer (2 x):

Sammelgelpuffer 12,5 ml; 10 % (w/v) SDS 23 ml; Glycerin 10 g (10 % (w/v)); Bromphenolblau 0,1 g (0,1 % (w/v)); Dithiothreitol 0,154 g ad 100 ml H₂O

- 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS):

APS 100 mg ad 1 ml H₂O, tiefgefroren und unmittelbar vor Gebrauch entnommen

4.2.3 Analytische SDS-PAGE

Zur analytischen SDS-PAGE wurde ein Minigel-Elektrophoresesystem (BioRad, München, D) mit diskontinuierlichen Gelen verwendet. Die Gele hatten die Maße von (83 x 76 x 0,75) mm. Die Trennstrecke belief sich auf 56 mm, die Höhe des Sammelgels auf 16 mm, wobei die Taschenhöhe 12 mm betrug. Die Sammelstrecke war 4 mm.

Trenngel (10 ml / Gelansatz):

Die Komponenten der Gele wurden für die jeweils benötigte Acrylamidkonzentration gemäß Tabelle 5 zusammenpipettiert. Nach Zusatz von 50 µl TEMED und 100 µl 10 %-iger APS-Lösung erfolgte das Eingießen in die Gelkammer. Zur Ausbildung einer glatten Gelkante wurde mit 1-Butanol überschichtet, welches nach dem Polymerisationsprozess sorgfältig entfernt wurde. Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur und dauerte ungefähr 30 min.

Tabelle 5: Pipettierschema für Polyacrylamid-Gele

Acrylamid / %	H ₂ O / ml	Gelpuffer */ml	AA/Bis-Stammlösung / ml
5 %	5,80	2,50	1,67
7 %	5,15	2,50	2,33
8 %	4,80	2,50	2,67
9 %	4,45	2,50	3,00
10 %	4,15	2,50	3,33
11 %	3,80	2,50	3,67
12 %	3,45	2,50	4,00

*Sammelgelpuffer oder Trenngelpuffer

Sammelgel (10 ml / 2 Gelansätze):

Grundsätzlich erfolgte die Herstellung des Sammelgels wie die des Trenngels unter Benutzung des entsprechenden Puffers.

Die Proteinproben wurden mit gleichem Volumen Probenpuffer versetzt, durch Vortexen gut vermischt, kurz anzentrifugiert und im Wasserbad für 5 min auf 100 °C erhitzt. Zum Probenauftrag wurde eine Hamilton-Spritze (Hamilton Corporation, Reno, USA) verwendet.

Die Elektrophorese wurde mit einem Netzgerät POWERPAC 1000 (BioRad) durchgeführt und erfolgte bei einer Spannung von 100 V.

Zur Ermittlung der apparenten Molekulargewichte wurde eine Spur mit Proteinstandards (BioRad) beladen. Für verschiedene Molekulargewichtsbereiche standen verschiedene Standards zur Verfügung (Tabelle 6). Die Molekulargewichte der einzelnen Komponenten

unterschieden sich von Charge zu Charge, aber nicht mehr als ca. ± 5 kDa. Die exakten Werte waren für jede Charge auf einem Beipackzettel angegeben. Auf einem diskontinuierlichen Gel wurden 5 - 10 μ l der Standards aufgetragen.

Tabelle 6: Molekulargewichtsbereiche der Standards für die SDS-PAGE

Protein	MG ohne Farbe / kDa	MG mit Farbe / kDa	Low Range	High Range	Broad Range
Myosin	200 000	*200 000		X	X
β -Galactosidase	116 250	134 000		X	X
Phosphorylase B	97 400	108 000	X	X	X
Serum-Albumin	66 200	80 000	X	X	X
Ovalbumin	45 000	50 900	X	X	X
Carboanhydrase	31 000	34 800	X		X
Trypsininhibitor	21 500	27 300	X		X
Lysozym	14 400	20 900	X		X
Aprotinin	6 500	7 400			X

*Herstellerangabe; „X“ bedeutet die Anwesenheit des links stehenden Proteins im jeweiligen Markergemisch.

4.2.4 Western-Blot

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine ließen sich elektrophoretisch auf eine Membran transferieren (”blotten”). Die Membran bestand aus Nitrocellulose (NC), auf der Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen binden. Dieses Verfahren des elektrophoretischen Transfers auf immobilisierende Membranen wird ”Western-Blot” genannt und bei Towbin et al. (1979) beschrieben. Im Anschluss an den Transfer wurden die auf der Membran befindlichen Proteine bei einer Immunfärbung detektiert. Bei der indirekten Variante der Immunfärbung wurde die Bindung des Antikörpers an das Antigen durch einen zweiten Spezies-spezifischen Antikörper nachgewiesen, der mit Peroxidase (HRP) konjugiert war.

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurde das Gel mit Transferpuffer befeuchtet und ein sog. ”Sandwich” gebaut. Zu diesem Zweck wurden 2 Lagen feuchtes Whatman-3MM-Filterpapier übereinander gelegt. Darauf kam eine Lage feuchte NC-Membran (0,45 bzw. 0,2 μ m, Schleicher & Schuell). Auf diese Schicht wurde das Gel luftblasenfrei gelegt. Über das Gel kam eine erneute Schicht aus einer NC-Membran mit zwei Whatman-3MM-Filterpapieren. Luftblasen wurden sorgfältig entfernt, da sie den Transfer verhindern. Dieses ”Sandwich” wurde zwischen zwei durchtränkte Schwämme gelegt und in eine Blot-Halterung eingespannt. Diese Anordnung kam in die Blot-Apparatur (Mini Trans Blot, BioRad), welche mit Transferpuffer gefüllt war.

Der Transfer erfolgte bei Eiskühlung und einer konstanten Spannung von 100 V. Während des Blottens wurde der Transferpuffer mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt.

Lösungen

- Tris-Glycin-Puffer:

Tris 36,6 g (100 mM); Glycin 84,38 g (375 mM) ad 3000 ml H₂O

- Transferpuffer:

Tris-Glycin-Puffer 200 ml; Methanol 200 ml (20 % (v/v)) ad 1000 ml H₂O

4.2.5 Indirekte Immunfärbung

Antikörper sind Proteinmoleküle, die von den Lymphocyten der Wirbeltiere als Antwort auf ein fremdes Molekül, das in den Organismus eingedrungen ist, gebildet werden. Antikörper besitzen eine hohe Affinität zu den Antigenen, die die Bildung ursprünglich verursachten. Dieser Umstand lässt sich in der Immunfärbung nutzen.

Im Anschluss an den Western Blot wurde die Blotapparatur auseinandergebaut und die Membran für 2 - 4 min mit Ponceaurot gefärbt. Nach Entfärbung in mehrmals gewechseltem Waschpuffer wurde die Blotmembran zur Abbindung überschüssiger Bindekapazität in Blockpuffer inkubiert. Der Puffer enthielt bei diesem Arbeitsschritt 5 % (w/v) Magermilchpulver; die Inkubation erfolgte bei RT und dauerte mindestens 1 h. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper in vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen. Die Antikörper-Verdünnungen wurden in Blockpuffer angesetzt und die Membranen mit diesen wahlweise bei 37 °C für 2 h oder üN bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Konjugatinkubation. Diese dauerte 1 h und wurde ebenso bei RT ausgeführt. Als 2. Antikörper diente anti-Spezies-IgG-konjugierte Peroxidase, welche in Blockpuffer verdünnt wurde. Nach dieser Inkubation wurde die Blotmembran unter mehrmaligem Wechsel des Waschpuffers gewaschen. Sämtliche Inkubations- und Waschschrte erfolgten unter leichtem Schütteln. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte durch Inkubation der Membran in ECL-Lösung (Renaissance[®], NEN, USA). Die Lösung wurde hierzu nach Herstellerangabe angesetzt, auf 37 °C temperiert und die Membran in dieser für 2 min inkubiert. Anschließend wurde ein Film exponiert, und anhand des Ergebnisses wurden die Expositionszeiten weiterer Filme gewählt.

Lösungen

- Blockpuffer:

Tris 1,21 g (10 mM); NaCl 8,76 g (150 mM); Tween-20 (0,05 % (v/v)); Magermilchpulver (5 % (w/v)) ad 1000 ml H₂O; auf pH 8,0 eingestellt

- Waschpuffer:

Tris 1,21 g (10 mM); NaCl 8,76 g (150 mM); Tween-20 (0,05 % (v/v)) ad 1000 ml H₂O; auf pH 8,0 eingestellt

4.2.6 Entfernung von Antikörpern

Primäre und sekundäre Antikörper lassen sich von Blotmembranen entfernen („stripfen“), wodurch die Membran einer zweiten Inkubation mit Antikörpern zugänglich wird. Die verwendeten Methoden sind einer Anleitung der Fa. Schleicher & Schuell (Dassel, D) entnommen.

- Die Blotmembran wird für 2 - 5 min in 0,2 M Glycin (pH 2,8) / 0,5 M NaCl geschwenkt und die Lösung anschließend durch NaOH neutralisiert.

- Die Blotmembran wird für 2 - 5 min in 0,5 M Essigsäure (pH 2,5) / 0,5 M NaCl geschwenkt und die Lösung danach durch Base neutralisiert.

4.2.7 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung ist eine sehr einfache Methode, Polyacrylamid-Gele zu färben. Diese Art der Färbung beruht auf reversibler Anlagerung des Farbstoffs an Amino-Gruppen der Proteine. Das Gel wird zum Zwecke der Anfärbung für 1 h in der Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wird überschüssige Farbe durch Schütteln in Entfärbelösung entfernt, wobei diese des öfteren gewechselt wird.

Diese Methode ist einfach, macht wenig Arbeit, ist aber nur mäßig empfindlich, wobei die untere Nachweisgrenze bei 200 - 400 ng / Proteinbande liegt.

Lösungen

- Coomassie-Blau-Lösung:

Methanol 500 ml (50 % (v/v)); Eisessig 90 ml (9 % (v/v)); Coomassie-brilliant-blue R 250 2,5 g (0,25 % (w/v)) ad 1000 ml H₂O

- Coomassie-Entfärbelösung:

Methanol 100 ml (10 % (v/v)); Eisessig 100 ml (10 % (v/v)) ad 1000 ml H₂O

4.3 Immunhistochemische Methoden

4.3.1 Zytozentrifugation von Zellen

Zellen lassen sich durch Zentrifugation auf Objektträger bringen und sind anschließend immunhistochemischen Färbungen zugänglich. Die für die Zytozentrifugation verwendeten Zellen wurden gespült und von ihrer Unterlage abtrypsiniert, wie unter den Zellkultur-Methoden beschrieben. Nach Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation wurden diese gezählt und anschließend auf eine Konzentration von $3 - 4 \times 10^5$ Zellen /ml PBS verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl verwendet, so dass auf dem Objektträger $3 - 4 \times 10^4$ Zellen punktförmig aufgetragen werden konnten. Die Zellen wurden, wie beschrieben, in kaltem Aceton fixiert und für nachfolgende Untersuchungen entweder sofort verwendet oder eingefroren (- 25 °C).

4.3.2 Herstellung von Gewebeschnitten

Histologische Schnitte von Haarfollikeln wurden mit dem Cryostaten „Frigocut 2800 N“ (Jung, Nussloch, D) bei einer Temperatur von - 30 °C mit einer Dicke von 5 - 7 µm produziert und bei - 25 °C bis zur immunhistochemischen Färbung gelagert.

4.3.3 Fixierung von Gewebeschnitten und Zellen

Die Cryostat-Schnitte von Haarfollikeln und die zytozentrifugierten Zellen wurden vor der Färbung auf den Objektträgern fixiert. Diese Fixierung diente dem Zweck, den postmortalen Vorgängen vorzubeugen und die Struktur der Gewebeschnitte möglichst unverändert zu bewahren. Die Fixierungen wurden grundsätzlich in eisgekühltem Aceton (100 %) für 10 min durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger luftgetrocknet und entweder für die immunhistochemische Färbung (APAAP) vorbereitet oder bei - 25 °C gelagert.

4.3.4 Immunhistochemie (APAAP)

Die Immunhistochemie wurde ursprünglich in den 80er Jahren in die Routinediagnostik zur Charakterisierung und Identifizierung von Tumoren eingeführt. Das Ziel bestand darin, Aussagen über die Genexpression verschiedenartiger Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien zu treffen. Für einen erfolgreichen immunhistochemischen Nachweis eines Antigens ist es wichtig, dass während der Fixierung das Antigen erhalten bleibt, die optimale Nachweismethode gewählt und ein geeigneter Antikörper verwendet wird.

Die Methode der alkalischen Phosphatase/anti-alkalischen Phosphatase (APAAP) wurde erstmals 1984 von Cordell et al. beschrieben. Das Prinzip dieser Färbemethode beruht auf der Bindung eines Primärantikörpers an das nachzuweisende Antigen. Nachdem diese Bindung stattgefunden hat, wird der Brückenantikörper im Überschuss hinzugegeben, um anschließend genügend Fab-Fragmente zur Bindung an den Antikörper des APAAP-Komplexes zu haben. Durch Zugabe des APAAP-Komplexes, der aus 2 Molekülen alkalischer Phosphatase und einem gegen dieses Enzym gerichteten Antikörper besteht, wird die Nachweismethode komplettiert. Der primäre Antikörper und der im APAAP-Komplex enthaltene Antikörper müssen derselben Spezies entstammen. Um die finale Farbreaktion zu verstärken, können die Zellen bzw. die Gewebeschnitte wiederholt mit dem Sekundärantikörper und dem APAAP-Komplex inkubiert werden. Zur Verhinderung einer unspezifischen Bindung des Antikörpers an andere Strukturen der Gewebeschnitte oder Zellen wird dem Verdünnungsmedium des Antikörpers FCS beigefügt.

Die Detektion der Antikörperbindung erfolgt durch Inkubation der Ansätze in Neufuchsin-Lösung. Zur Blockade eventuell vorhandener endogener alkalischer Phosphatase wird der Astraneufuchsin-Lösung Levamisol zugegeben. Um die normalen histologischen Strukturen nach dieser Färbung stärker hervorzuheben, werden die Schnitte in Mayers saurem Hämalaun gegengefärbt. Anschließend werden die Färbungen mit Glyceringelatine unter Deckgläschen eingedeckt und im Dunkeln bei RT verwahrt.

Durchführung der APAAP-Methode

Die zytozentrifugierten Zellen bzw. die Gewebeschnitte wurden zwecks Fixierung auf den Objektträgern für 15 min in 4 °C kaltem Aceton inkubiert und anschließend luftgetrocknet. Danach wurden die Zellen mit einem PAP-Pen eingekreist und in eine feuchte Kammer gelegt. Es folgte das sequentielle Inkubieren mit dem Primärantikörper, dem Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex. Alle Antikörper wurden in ihren entsprechenden Medien (s. u.) verdünnt. Die Verdünnung des Primärantikörpers musste durch Titration ermittelt werden. Die Brücken-AK und der APAAP-Komplex wurden dagegen generell 1:40 verdünnt. Diese drei Inkubationsschritte dauerten je 30 min. Nach jeder Inkubation wurden die Schnitte/Zellen generell mit Tris-Puffer kurz gespült. Die Wiederholungsininkubationen mit dem Brücken-AK und dem APAAP-Komplex dauerten je 10 min. Alle Inkubationen der APAAP-Methode wurden bei RT in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Lösungen

Verdünnungsmedium für Primär-AK:

RPMI 1640 2,5 ml (10 % (v/v)); fötales Kälberserum 2,5 ml (10 % (v/v), hitze-inaktiviert) ad 25 ml H₂O; auf pH 7,4 - 7,6 eingestellt

Verdünnungsmedium für Brücken-AK und APAAP-Komplex:

RPMI 1640 25 ml (83 % (v/v)); humanes AB-Serum 5 ml (17 % (v/v)); auf pH 7,4 - 7,6 eingestellt

Astraneufuchsin-Entwicklungslösung:

Lösung A: Propandiol 26 g (26 % (w/v)) ad 100 ml H₂O

Tris-Puffer: Tris 0,98 g (40 mM); Tris-HCl 0,30 g (9,5 mM); NaCl 1,74 g (150 mM) ad 200 ml H₂O; hiervon wurden 175 ml abgemessen

Levamisol: 100 mg (1,75 mM)

Lösung B: Naphthol-As-bisphosphat 125 mg (170 mM) in 1,5 ml DMF gelöst

Lösung C: Natriumnitrit 50 mg (415 mM) ad 1,25 ml H₂O; Zugabe von 500 µl Neufuchsin innerhalb von 60 s

Zuerst wurde Lösung C zur Lösung A gegeben und gerührt. Dann erfolgte die Zugabe der Lösung B. Der pH-Wert wurde mit HCl (2 M) auf pH 8,8 eingestellt und die Lösung anschließend durch Filtration von Schwebeteilchen gereinigt. Die Lösung wurde sofort in eine Küvette gegeben, und die zu färbenden Schnitte bzw. Zellen wurden darin auf einem Schüttler für 30 min gefärbt. Die anschließende Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun dauerte 10 min. Alle Lösungen wurden unter einem Abzug angesetzt und dabei Handschuhe getragen.

4.3.5 Fotodokumentation von immunhistochemischen Färbungen

Zur photographischen Dokumentation der APAAP-gefärbten Zellen oder Cryostatschnitte der WOC, wurde ein Ektachrom Epy 64 T Diafilm (Kodak, Stuttgart, D) mit 64 ASA verwendet, und die entwickelten Bilder wurden anschließend bei maximaler Auflösung (1200 dpi) eingescannt.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Steriles Arbeiten

Die Arbeiten mit Zellen, Medien und RNA wurden grundsätzlich unter einer sterilen Laminar-Flow-Arbeitsbank (HeraSafe, Heraeus, Hanau, D) durchgeführt. Beim Umgang mit RNA wurden sterile Depc-behandelte Lösungen und Geräte verwendet. Hitze-stabile Geräte und Glasgeräte wurden vor der Verwendung durch 30-minütiges Autoklavieren in feuchter Hitze bei 121 °C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Hitze-stabile Lösungen wurden ebenso durch Autoklavieren sterilisiert, Hitze-labile Lösungen dagegen durch Filtration durch Milliporefilter (Porendurchmesser 0,45 µm) mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe. Arbeiten mit Zellkulturen wurden grundsätzlich mit Ethanol (70 %)-gereinigten Händen ausgeführt, bei Arbeiten mit RNA wurden zusätzlich Handschuhe verwendet, um Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden.

4.4.2 Isolation von Gesamt-RNA

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen wurde das "RNeasy-Kit" der Firma Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode beruht auf dem Prinzip des Austausches von Anionen, d.h. die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA binden an die positiv geladenen DEAE-Gruppen des Anionenaustauschers der Säule. Dadurch können unerwünschte RNA und Proteine von der Säule gewaschen, und die erwünschte DNA kann unter Hochsalzbedingungen eluiert werden. Die DNA-Ausbeute ist in der Regel sehr hoch (90 %), der manuelle Aufwand dagegen gering.

Die verwendeten Zellen ($\leq 1 \times 10^7$) wurden zunächst mit PBS gewaschen und dann unter denaturierenden Bedingungen lysiert (Puffer RLT), um vorhandene RNAsen zu inaktivieren. Im Folgenden wurden die mit 70 %igem EtOH (1:1 (v/v)) verdünnten Proben auf eine Silicagel-Säule gegeben und zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit dem Puffer RW1 und zweimaligem Waschen mit Puffer RPE wurde die RNA mit 2 x 100µl Depc-behandeltem Wasser eluiert und nach spektrometrischer Konzentrationsbestimmung für nachfolgende Untersuchungen eingefroren.

Lösungen

- RNeasy-Kit mit Puffern RLT, RW1 und RPE (alle ready-to-use)
- Depc-behandeltes H₂O
- 70 % Ethanol
- β-Mercaptoethanol (0,01 % (v/v) in Lysispuffer RLT)

4.4.3 Isolation von mRNA

Für die Isolation von mRNA aus eukaryontischen Zellen wurde das "Oligotex-Kit" der Firma Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip dieser Isolationsmethode beruht auf der Tatsache, dass die meisten eukaryontischen mRNA einen Poly-A-Schwanz aus unterschiedlich vielen Adenosin-Nucleotiden (20 - 250 Stck.) an ihrem 3'-Ende besitzen, der die selektive Bindung an dT-Oligomere erlaubt, welche an feste Matrices gebunden sind. Somit können die mRNA-Spezies, durch Einstellen bestimmter Bedingungen, an diese Matrix gebunden, aus der Probe herauszentrifugiert und in einen bestimmten Puffer eluiert werden. Da der mRNA-Pool den kleinsten Anteil an der gesamten RNA ausmacht, ist es vorteilhafter, im 1. Schritt die gesamte RNA zu extrahieren und aus dieser im 2. Schritt den mRNA-Anteil zu isolieren, um eine Reduzierung der Bindungskapazität der Oligotex-Säulen durch andere RNA-Spezies zu vermeiden. Die Konzentration der mRNA wurde spektrometrisch bestimmt und anschließend für nachfolgende Untersuchungen eingefroren.

Lösungen

- Oligotex-Kit mit Puffern OBB, Oligotex Suspension, OW2, OEB (alle ready-to-use)
- Depc-behandeltes H₂O

4.4.4 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration gelöster RNA wurde mit dem UV-Spektrophotometer Ultrospec 1000 (Pharmacia, Freiburg, D) photometrisch durch die Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 260$ nm bestimmt. Die Konzentration der RNA ergab sich dann aus dem Absorptionswert, multipliziert mit dem Faktor 40 (Glasel, 1995). Die Reinheit von Nukleinsäuren wurde durch den Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm bestimmt, wobei Werte $\geq 1,8$ einen akzeptablen Reinheitsgrad anzeigten.

4.4.5 Fällung von Nukleinsäuren

Gelöste Nukleinsäuren wurden zur Fällung mit 1/10 Vol. 3 M NaOAc (pH 4,5) und 2,5 Vol. EtOH (95 %) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 13 000 g (4 °C) für 30 min zentrifugiert, wobei die Nukleinsäuren pelletierten. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert und das Pellet durch Zugabe von EtOH (80 %) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde der Überstand quantitativ entfernt, das Pellet getrocknet und danach in einem adäquaten Volumen H₂O aufgenommen.

4.4.6 Vorbereitung von RNA-Proben

Von den RNA-Proben, deren Qualität in denaturierenden Agarose-Gelelektrophoresen zu überprüfen war, wurde ein Aliquot entnommen, welches einer totalen RNA-Menge von 2 - 5 µg entsprach. Dieses wurde in einer Vakuumentrifuge SpeedVac[®] Plus RC 110B (ThermoSavant, Holbrook, USA) bis zur kompletten Trocknung eingeengt und anschließend in einem für die Probentasche geeigneten Volumen mit RNA-Ladepuffer (Sigma) aufgenommen. Vor dem Auftragen der Proben wurde die RNA für 5 min bei 65 °C denaturiert.

4.4.7 Qualitätsüberprüfung von RNA

Um die Qualität der in Genexpression-Arrays eingesetzten RNA zu überprüfen oder diese später auf immobilisierende Membranen zu blotten, wurde eine denaturierende Gelelektrophorese durchgeführt. Die Herstellung eines solchen denaturierenden Gels zur Auftrennung von RNA ist etwas aufwändiger, da RNA zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigt. Diese würden in einem nicht denaturierenden Gel dazu führen, dass man keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Größe einer RNA-Bande ziehen könnte. Aus diesem Grund wurde die RNA vor und während der Elektrophorese durch Denaturierung linearisiert.

Das Gel wurde durch Aufkochen von 3 g Agarose mit 255 ml H₂O bis zur schlierenfreien Auflösung der Agarose hergestellt. Eventuell verdampfte Volumina wurden entsprechend ergänzt. Dann wurden 16,2 ml Formaldehyd (37 %, säurefrei) sowie 30 ml MOPS-Puffer (10 x) hinzugegeben und in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Erkalten des Gels wurde der Kamm gezogen. Der Lauf der Proben in MOPS-Puffer (1 x) erfolgte bei 60 V.

Lösungen

MOPS-Puffer (10 x):

MOPS 41,86 g (0,2 M); NaAc 4,1 g (0,05 M); EDTA 3,72 g (0,1 M) ad 1 l H₂O

Die Lösung wurde auf pH 7,0 eingestellt, sterilfiltriert und dunkel aufbewahrt.

4.4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophoresen dienen der elektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren nach der Größe. Die Agarose-Gele wurden angesetzt, indem man die entsprechende Menge an Agarose (Gibco Life Technologies) einwiegt und mit 1x TAE-Lsg. (BioRad) + 0,25 µg/ml EtBr (Sigma) in der Mikrowelle zum Kochen bringt. Durch das Kochen verdampfte Volumina wurden entsprechend mit destilliertem H₂O ersetzt. Die Lösung wurde in horizontale Mini-Gelelektrophoresekammern (Eurogentec, Seraing, B) gegossen. Nach dem Erkalten des Gels wurde der Kamm gezogen, die Gelkammer mit 1x TAE-Laufpuffer gefüllt und mit Proben und Standards beladen. Die anzulegende Spannung richtete sich nach der Geduld des Experimentators und lag meist bei 100 V (10 V pro cm Laufstrecke des Gels). Die Dauer einer typischen Elektrophorese lag bei 20 - 30 min. Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel auf einem UV-Leuchttisch dokumentiert.

4.4.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

Die DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Tisch mittels eines scharfen sterilen Skalpells aus dem Gel bei minimaler UV-Exposition ausgeschnitten und mit dem „QIAquick-Gel-Extraktion-Kit“ (Qiagen) isoliert. Zu diesem Zweck wurde das Fragment mit 3 Volumenteilen (w/v) QG versetzt und bei 50 °C vollständig aufgelöst. Nach Zugabe von 1 Volumenteil Isopropanol wurde die Probe auf eine QIAquick-Säule geladen und für 1 min bei 13 000 g zentrifugiert, 2 mal mit je 0,5 ml QG und 1 mal mit 0,75 ml PE gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 50 µl H₂O eluiert.

4.4.10 RT-PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist eine *in-vitro*-Technik und wird zur sensitiven und schnellen Amplifikation eines spezifischen Genomfragments aus Desoxyribonukleinsäure (DNA) eingesetzt. Für den Nachweis der Expression von Genen müssen deren Transkripte zunächst mittels reverser Transkription (RT-PCR) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Für die cDNA-Synthese kamen zwei verschiedene kommerzielle Kits zum Einsatz:

1. „Ready-To-Go T-primed First Strand“-Kit von der Fa. Pharmacia
2. „cDNA-Cycle[®]“-Kit“ von der Fa. Invitrogen

Das erste Kit benutzt Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (MMLV-RT) und Oligo(dT)-Primer zur cDNA-Synthese. Die zu transkribierende RNA-Probe (2 - 3 µg) wird mit Depc-Wasser auf ein Volumen von 33 µl gebracht und für 5 min auf 65 °C im PCR-Cycler erwärmt. Anschließend werden die RNA-Proben und ein Tube des Kits (pro Probe) für 5 min bei 37 °C inkubiert. Danach werden die RNA-Proben zu den RT-Ansätzen gegeben und für weitere 5 min bei 37 °C inkubiert. Mit der Pipette werden die Proben durchmischt und für 1 h bei 60 °C inkubiert. Nach spektralphotometrischer Konzentrationsbestimmung werden die fertigen cDNA-Proben für folgende Untersuchungen eingefroren.

Das zweite Kit von Invitrogen erlaubt den Einsatz eines selbstgewählten Primers zur reversen Transkription und bringt somit eine höhere Spezifität. Die zu transkribierende Probe wird auf ein Volumen von 11,5 µl gebracht und nach einer 10minütigen Inkubation bei 65 °C für 2 min bei RT stehen gelassen. Nach Zusatz aller weiteren Komponenten, Rnase-Inhibitor, Puffer, dNTP, Natriumpyrophosphat und der AMV-Reversen Transkriptase, wird für 1 h bei 42 °C inkubiert. Die Proben stehen danach einer weiteren Untersuchung zur Verfügung.

4.4.11 Ligation

Zur Amplifikation von PCR-Produkten wurden diese mit dem pT-Adv-Vektor (Clontech Laboratories) ligiert (siehe Abb. 9). Die Ligation in den dephosphorylierten Vektor erfolgte unter Verwendung der T4-Ligase (Boehringer, Mannheim, D). Das eingefügte Fragment war nach der Ligation auf beiden Seiten durch *EcoR* I-Schnittstellen flankiert.

Der Ligationsansatz beinhaltet die folgenden Komponenten:

1. 2,5 µl PCR-Produkt
2. 2,0 µl Vektor-DNA
3. 1,0 µl Ligase-Puffer (10 x)
4. 1,0 µl T4-Ligase (4 U/µl)
5. 3,5 µl H₂O

Die Ligation wurde üN bei 8 °C im Kühlschrank durchgeführt. Von diesem Ansatz wurden 2,5 µl direkt zur Transformation der DH5α-Zellen (*E. coli*) verwendet. Die Selektion der Klone war eine klassische Blau/Weiß-Selektion. Blau gefärbte Klone zeigten negative Klone an (kein Insert), weiß gefärbte enthielten dagegen das Insert (positiv).

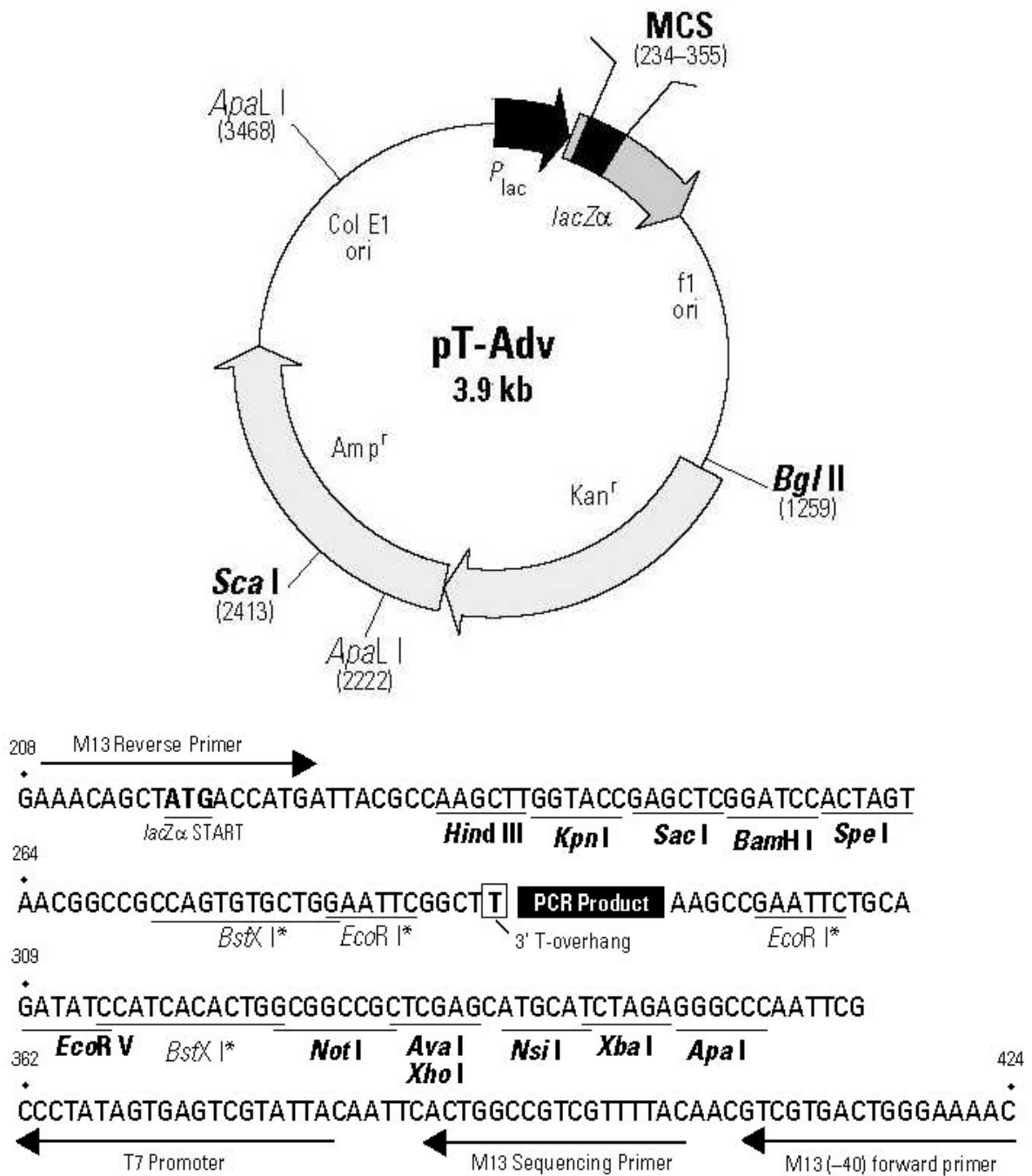


Abb. 11: Restriktions-Karte mit MCS-Region des pT-Adv-Vektors (Fa. Clontech)

4.4.12 Kultivierung von *E. coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* zwecks Plasmidvermehrung wurde Luria-Bertani-(LB)-Medium (Sigma) verwendet, welches in H₂O gelöst und sterilfiltriert bzw. autoklaviert wurde. Die generelle Kultur erfolgte in Glasgefäßen bei 37 °C üN in einem Rotationsschüttler bei 250 UpM. Bei dem verwendeten *E. coli*-Stamm handelte es sich um DH5αTM-Zellen, die sich auch zur effizienten Transfektion mit größeren Plasmiden eignen.

Wurden die *E. coli*-Zellen auf Platten kultiviert, so wurden stets ImMediaTM mit Kanamycin (50 µg/ml) und IPTG/X-gal (Invitrogen) nach Vorschrift des Herstellers gekocht und in die Platten gegossen.

4.4.13 Transformation von Bakterien

Zur Transformation wurde *E. coli* vom Stamm DH5α (Gibco Life Technologies) verwendet. Diese wurden durch Zugabe von 2,5 µl des jeweiligen Ligations-Ansatzes zu den frisch auf Eis aufgetauten Zellen (100 µl) transfiziert. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem kleinen Hitzeschock bei 42 °C für 20 s wurde der Ansatz erneut auf Eis für 2 min inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml LB-Medium. Zur Ausprägung der Kanamycin-Resistenz wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Es folgten das Ausstreichen von 100 µl der Zellsuspension auf entsprechende Platten (mit Kanamycin und IPTG/X-gal) und eine Inkubation üN bei 37 °C. Anderntags wurden die positiven Klone per Blau/Weiß-Selektion identifiziert und gepickt.

4.4.14 Reinigung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen (Minipräparation)

Zur Isolation kleinerer Plasmidmengen (< 20 µg) wurde das „Qiagen-Plasmid-Mini-Kit“ (Qiagen) verwendet. Hierzu wurden Einzelklone von Agarplatten gepickt, für 14 - 16 h üN bei 37 °C in 2 ml LB-Medium geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation bei 3 000 g (5 min) pelletiert.

Danach wurde das Sediment in 0,3 ml P1 suspendiert, mit 0,3 ml P2 versetzt und nach vorsichtigem mehrmaligem Invertieren des Ansatzes für 5 min bei RT inkubiert. Nach dem Zusatz von 0,3 ml P3 bei 4 °C wurde der Ansatz erneut mehrmals invertiert und für weitere 5 min auf Eis gelagert. Danach wurde der Ansatz für 10 min bei höchster Drehzahl in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde auf eine mit 1 ml QBT äquilibrierte Qiagen-Tip-20-Säule gegeben. Nach dem Durchfluss der Probe durch die Säule wurde diese 4 mal mit 1 ml QC gewaschen und die DNA mit 0,8 ml QF eluiert. Das Eluat wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt und für 30 min bei höchster Drehzahl der

Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, erneut 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment im Brutschrank getrocknet. Die DNA wurde in 30 µl H₂O aufgenommen.

Lösungen:

P1: 50 mM Tris HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

P2: 200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS

P3: 3 M KAc

QBT: 50 mM NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15 % (v/v) Isopropanol; 0,15 % (v/v) Triton

QC: 1 M NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15 % (v/v) Isopropanol

QF: 1,25 M NaCl ; 50 mM Tris/HCl (pH 8,5); 15 % (v/v) Isopropanol

4.4.15 PCR mit positiven Klonen

Nach der Inkubation der *E. coli*-Zellen üN wurden die positiven Insert-enthaltenden Klone (weiß) mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, und diese wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt, welches 50 µl H₂O enthielt. Dieses wurde für 30 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurden 5 µl daraus entnommen, und eine PCR wurde durchgeführt. Folgendes Programm-Profil wurde gewählt:

1. 95 °C für 5 min Initiale Denaturierung
2. 95 °C für 45 s Denaturierung
3. 55 °C für 45 s Primer-Hybridisierung
4. 72 °C für 1 min Kettenverlängerung
5. 29 mal Wiederholung der Schritte 2. – 4.
6. 72 °C für 10 min Finale Synthese

Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

4.4.16 Restriktionsverdau der ligierten Fragmente

Nach der Schüttelkultur von *E.coli* üN wurden die Plasmide aufgereinigt, und das auf beiden Seiten von *EcoR* I-Schnittstellen flankierte Fragment wurde aus dem Vektor mittels gleichnamiger Restriktionsnuklease herausgeschnitten. Der Ansatz hierzu setzte sich wie folgt zusammen:

1. 2,0 µl Plasmid-DNA
2. 1,0 µl *EcoR* I-Puffer (10 x)
3. 0,3 µl *EcoR* I (4 U/µl)
4. 6,7 µl H₂O

Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C für mindestens 1 h.

4.4.17 Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung

Die Sequenzierungsreaktionen der gepickten Klone wurden mit dem PTC-100-Thermocycler (Biometra, Göttingen, D) durchgeführt und umfassten die folgenden Komponenten:

1. 6 µl M13-Primer (10 pmol/µl)
2. 12 µl Perkin-Elmer Ready rxn Mix TM
3. 30 µl H₂O
4. 2 µl DNA

Sequenzierungsprogramm:

1. 96 °C für 30 s Initiale Denaturierung
2. 96 °C für 10 s Denaturierung
3. 60 °C für 5 s Primer-Hybridisierung
4. 60 °C für 4 min Kettenverlängerung
5. 29 mal Wiederholung der Schritte 2. - 4.

Die Produkte der Sequenzreaktionen wurden mit Isopropanol (70 %) gefällt. Auf 30 ml Isopropanol wurden 6 ml H₂O sowie 2 ml NaAc (3 M, pH 5,2) gegeben. Dabei wurden 20 µl des Sequenzreaktion-Gemisches mit 380 µl der Fällungslösung versetzt. Es schloss sich eine 30-min-Zentrifugation an und danach ein 5-min-Waschschritt mit 70 %igem Alkohol. Beide Zentrifugationen wurden bei 13 000 UpM durchgeführt und die Ansätze anschließend in einer Vakuumzentrifuge eingengt. Vor dem Auftragen der Proben auf das Sequenzgel wurden diese aufgetaut, in 3 µl Probenpuffer aufgenommen, vorsichtig gemischt, 2 min bei 90 °C inkubiert, auf Eis gestellt und davon 1,5 µl auf das Gel aufgetragen.

4.4.18 Herstellung des Sequenziergels

Ein 36 cm langes Acrylamidgel enthielt die folgenden Komponenten:

18 g Harnstoff, enzyme grade (Gibco Life Technologies); 7,5 ml 30 %iges Acrylamid (29:1); 6 ml TBE (10 x); 23 ml H₂O.

Alle Komponenten bis auf das TBE wurden in ein Becherglas gegeben und mit einem Magnetrührer durchmischt. Zur Bindung freier Ionen wurde ein EL AG[®] 501-X8 (D) Resin 20-50 mesh (BioRad) hinzugegeben. Nachdem sich der Harnstoff gelöst hatte, wurde die Lösung sterilfiltriert und nach Zugabe des TBE entgast. Nach Zugabe von 350 µl APS und 15 µl TEMED wurde das Gel mit Hilfe einer 100-ml-Spritze gegossen.

Die Glasplatten, Spacer und Kämmen des ABI-377 wurden mit Alconox (1 %) gereinigt, mit H₂O gespült und mit Isopropanol (90 %) und Kimwipes getrocknet. Die lesbare Schrift befand sich beim Gießen außen, die Spacer wurden feucht aufgelegt. Nach der Polymerisierung wurde der Kamm mit den Zähnen voran in das Gel geschoben, das Gel in das Sequenziergerät eingespannt und der Vorlauf gestartet.

4.4.19 Vorlauf des Sequenziergels

Der Vorlauf diente zur Überwachung aller eingestellten Parameter und wurde sofort abgebrochen, wenn alle Einstellungen ordnungsgemäß waren und das Gel eine Temperatur von 40 °C hatte. In der Zwischenzeit wurden die Proben denaturiert. Rechts und links der Proben wurde zur Unterstützung der Spurlinearität eine weitere Tasche mit Laufpuffer gefüllt.

4.4.20 Sequenzierung mit dem ABI-377

Die PCR-Fragmente wurden mit dem ABI-Prism[™] -377-DNA-Sequencer (Perkin-Elmer GmbH, Weiterstadt, D) sequenziert. Die Sequenzierchemie von Perkin-Elmer bedingt das Auftragen von nur einer Spur pro Sequenz, da in der Sequenzier-PCR vier unterschiedlich markierte Didesoxyribonukleotide zur Termination der Polymerisation eingesetzt und später mit einem Laser detektiert werden.

4.4.21 Expressions-Array

Für Studien zum Expressionsverhalten apoptotischer Gene wurde der Atlas[™] cDNA Expression Array der Fa. Clontech verwendet. Das Verfahren bietet den großen Vorteil, in einem Arbeitsvorgang eine komplette cDNA-Population mit einem Nukleinsäure-Array zu hybridisieren, während beim Northern Blot lediglich eine einzelne cDNA Spezies hybridisiert werden kann und somit lediglich Aussagen über ein einzelnes Gen getroffen werden können.

Das Verfahren der cDNA Expressions Arrays beruht darauf, dass Hunderte von cDNA („Dots“) ausgesuchter Apoptose-Gene auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgetragen sind. In einem Hybridisierungsvorgang werden diese mit einer radioaktiv-markierten cDNA-Population hybridisiert. Durch Abgleich gegen „Housekeeping Genes“ kann eine Aussage über die prozentuale Regulation der Apoptose-Gene getroffen und ein Expressionsprofil erstellt werden. Zur Auswertung wurde das Computer-Programm „AtlasImage 1.5“ verwendet.

Für den Array wurde Poly-A⁺-RNA verwendet, welche vorher aus den stimulierten Zellen isoliert wurde. Um sicherzustellen, dass lediglich mRNA zum Einsatz kam, erfolgte ein Verdau mit DNase I. Des weiteren wurde die Qualität der aufgereinigten RNA auf Agarose-Gelen in der Gelelektrophorese überprüft. Für den Array wurde eine Menge von 1 µg mRNA verwendet.

Ein Reaktionsansatz umfasste die folgenden Komponenten:

Komponente	pro Reaktion
Reaktionspuffer (5x)	2,0 µl
dNTP-Mix	1,0 µl
[α- ³² P]dATP (3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl)	3,5 µl
DTT (100 mM)	0,5 µl

Diese Komponenten wurden in einem 0,5-ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. In einem anderen Reaktionsgefäß wurde 1 µg Poly-A⁺-RNA mit 1 µl CDS-Primer-Mix zusammengegeben und mit H₂O auf ein Volumen von 3 µl gebracht. Beide Gefäße wurden bei 70 °C für 2 min inkubiert, anschließend bei 50 °C für 2 min. Während dieser Reaktion wurde 1 µl MMLV Reverse Transkriptase zum Mastermix gegeben. Anschließend wurden 8 µl des Mastermix zu jeder Reaktion gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 50 °C für 25 min. Nach dieser Zeit wurde 1 µl Terminationsmix zugegeben. Die Proben waren nun fertig zur Hybridisierung mit den Membranen und wurden bis zu ihrem Einsatz auf Eis gelagert.

Um die markierten cDNA-Spezies von nicht eingebauter Radioaktivität zu reinigen, schloss sich eine gelchromatographische Reinigung an. Nach diesem Reinigungsschritt wurden die Membranen mit Wasser befeuchtet. Gleichzeitig wurde Lachssperma-DNA (0,1 mg/ml) für 5 min auf 100 °C erhitzt, anschließend auf Eis gestellt und mit auf 68 °C temperierter ExpressHyb-Lösung vermenget. Die Membranen wurden mit dieser Lösung für 30 min bei 68 °C prähybridisiert. Anschließend wurden die markierten cDNA hinzugegeben und üN bei 68

°C inkubiert. Ungebundene Aktivität wurde anderntags in mehreren Waschschrritten entfernt, und die Membranen wurden in Plastikfolie eingewickelt. In einer Filmkassette wurde ein Film aufgelegt und bei - 80 °C im Eisschrank exponiert. Anhand des Belichtungsergebnisses wurden die Expositionszeiten weiterer Filme variiert. Die Auswertung erfolgte nach der Filmentwicklung mit der Software „AtlasImage 1.5“.

4.4.22 Strippen der Membranen

Um die Membranen nach erfolgter Belichtung des Films für weitere Hybridisierungen zu nutzen, mussten die radioaktiv-markierten Sonden von den Membranen entfernt („gestrippt“) werden. Dazu wurden die Membranen 2 x 10 min in 500 ml kochendem 0,1 x SSC / 0,1% SDS inkubiert. Um Rückstände von SDS auf den Membranen zu verhindern, wurde abschließend mit 0,1 x SSC gewaschen. Nach Trocknung der Membranen wurden diese in Klarsichtfolie eingewickelt und bei - 20 °C gelagert.

4.5 Lipidchemische-Methoden

4.5.1 Lipid-Extraktion

Die totale Lipid-Extraktion wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Yatomi et al. (1995) durchgeführt. Die behandelten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 1 ml MeOH (+ 2,5 µl HCl konz.) von der Unterlage abgelöst. Die Lipide wurden dann durch Zugabe von 1 ml CHCl₃ und 1 ml NaCl (1 M) extrahiert. Zur Alkalisierung wurden 100 µl NaOH (3 M) zugegeben und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Die wässrig-alkalische Phase, die das SPP enthielt, wurde in silikonisierte Probenfläschchen gegeben und die organische Phase durch Zugabe von 0,5 ml MeOH, 0,5 ml NaCl (1 M) und 50 µl NaOH (3 M) reextrahiert. Die wässrigen Phasen wurden durch Zugabe von 100 µl HCl (konz.) gesäuert und 2 x mit 1,5 ml CHCl₃ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden in einer Speedvac eingetrocknet und vor Versuchsbeginn in 275 µl MeOH / 0,07 M K₂HPO₄ (9:1 (v/v)) durch Vortexen und Ultraschall (auf Eis) gelöst.

4.5.2 Derivatisierung von SPP mit OPA und HPLC-Bestimmung

Die Methode erfolgte in modifizierter Weise nach Ruwisch et al. (2001).

Primäre Amine lassen sich mittels o-Phthaldialdehyd (OPA) und 2-Mercaptoethanol zu einem fluoreszierenden Isoindol-Derivat umsetzen, das in einer HPLC-Anlage mit angeschlossenem Fluoreszenz-Detektor nachgewiesen werden kann. Diese Reaktion ist sehr empfindlich und

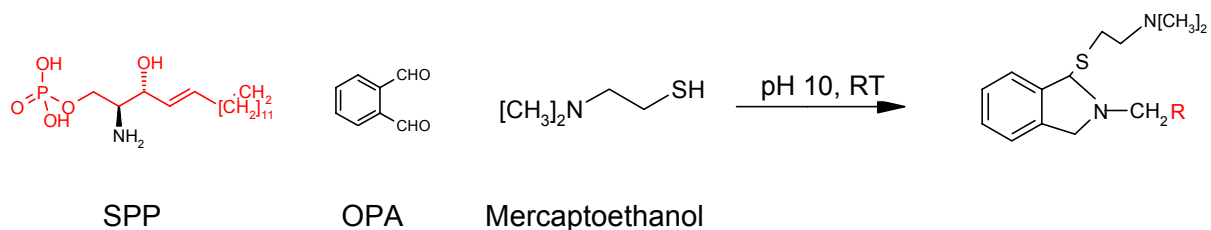
erlaubt die Bestimmung von SPP über einen weiten Konzentrationsbereich. Die Reaktion läuft gemäß dem unten abgebildeten Reaktionsschema ab.

Zur Durchführung der HPLC-Bestimmungen wurden 50 µl der Derivatisierungslösung zu den in 300 µl MeOH / 0,07 M K₂HPO₄ (9:1 (v/v)) gelösten Lipiden gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Hieraus wurden 50 µl auf eine Luna-C18-(2)-Chromatographiesäule (5 µm Porengröße und 150 mm x 4,6 mm) (Phenomenex) aufgetragen.

Für jede Bestimmung von intrazellulären SPP-Konzentrationen wurden definierte Standards chromatographisch getrennt. Das Maß ihrer Fluoreszenz diente als Grundlage zur Berechnung der SPP-Konzentrationen der Proben.

Die Anregungswellenlänge lag bei $\lambda = 340$ nm, die Emission wurde bei $\lambda = 455$ nm gemessen. Nach zahlreichen Optimierungsläufen erwies sich das unten abgebildete Elutionsprofil als das beste. Die Durchflussrate lag bei 1 ml/min.

Reaktionsschema:



Gradient:

Start:	70 % Methanol	
	70 - 90 % Methanol	0 - 20 min
	90 - 100 % Methanol	20 - 23 min
	100 % Methanol	23 - 28 min (Reinigung der Säule)
	100 % - 70 % Methanol	28 - 30 min (Stabilisierung der Parameter)
	70 % Methanol	bei 35 min erneuter Start

Laufmittel A: 0,007 M K₂HPO₄ (pH 7,0)

Laufmittel B: Methanol (Chromatography Grade)



Typische HPLC-Profile von SPP auf einer Reversed Phase Luna-C18(2)-Chromatographiesäule nach Derivatisierung mit OPA und Auftrennung mit einem Gradientenprogramm: (A) 10 pmol SPP, (B) 50 pmol SPP, (C) 100 pmol SPP und (D) Leergradient. Die Profile zeigen einen gut separierten SPP-Peak, der nach ca. 26 min von der Säule eluiert wird.

4.5.3 Sphingosin-Kinase-Bestimmung (SphK-Assay)

Der Assay wurde nach einem modifizierten Protokoll von Olivera et al. (1994) durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet im SphK-Puffer resuspendiert. Das verwendete Volumen des Puffers richtete sich nach der Zellzahl und lag bei ca. 100 μl pro 10^6 Zellen. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen gegeben, und diese wurden in flüssigen Stickstoff getaucht. Die durchgefrorene Suspension wurde anschließend in handwarmem Wasser wieder aufgetaut. Dieser Zyklus („freeze-thawing“) wurde insgesamt 7 x durchgeführt.

Das resultierende Zytosol wurde durch Zentrifugation bei 13 000 g für 30 min (4 °C) von Zelltrümmern gereinigt und konnte über mehrere Monate hinweg bei -20 °C gelagert werden. Der SphK-Assay wurde grundsätzlich in silikonisierten Glasröhrchen ausgeführt. Für den SphK-Assay wurde eine definierte Menge Zytosol verwendet und mit SphK-Puffer auf ein Volumen von 180 μl gebracht. Pro Probe wurden 10 μl Sphingosin (1 mM), in BSA (4 mg/ml) komplexiert, hinzugegeben.

Jede Probe wurde mit 10 μl eines ATP-Mix versetzt, der aus 9 Teilen ATP / MgCl_2 (20 mM / 200 mM) und 1 Teil $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ [3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml] bestand. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 30 min (oder länger, je nach Fragestellung) in einem Wasserbad mit Schüttelfunktion.

Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt, und die Reaktionen wurden durch Zugabe von 20 μl HCl (1 M) gestoppt. Nach Zugabe von 800 μl CHCl_3 / MeOH / HCl (100:200:1 (v/v/v)) wurden die Proben stark gevortext, und die Phasentrennung wurde durch Zugabe von 240 μl CHCl_3 und 240 μl KCl (2 M) eingeleitet. Nach Zentrifugation bei 3000 UpM für 15 min wurden 100 μl aus der unteren organischen Phase mit dem radioaktiv-markierten Sphingosin-1-phosphat entnommen und mit einem Linomaten IV (Camag, Berlin, D) auf Silica-Gel-G60-Platten aufgetragen. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung erfolgte in einer TLC-Kammer mit 1-BuOH / MeOH / CH_3COOH / H_2O (80:20:10:20 (v/v/v/v)) als Laufmittel. Nach der Auftrennung wurde eine Imaging-Plate (Fuji-Film, BAS-MS 2040) aufgelegt und diese nach entsprechender Belichtungszeit am Phosphor-Imager (FLA-2000, Fuji-Film) ausgewertet. Die Computerauswertung erfolgte mit dem Programm „TINA 2.09g“. Die Zuordnung der Spots geschah durch Einbau von Kontrollen (z.B. Zytosol w/o Sphingosin oder ATP).

Standardisierung des SphK-Assays

Das [γ - ^{32}P]-ATP besaß eine spezifische Aktivität von 3000 Ci / mmol und eine Konzentration von 10 mCi / ml. Die Konzentration des nicht radioaktiven ATP war mit 20 mM also 6000-fach größer als die des [γ - ^{32}P]-ATP. Für die Herstellung des im SphK-Assay verwendeten ATP-Gemischs wurden 9 Teile des nicht radioaktiven ATP und 1 Teil des [γ - ^{32}P]-ATP genommen. Die Konzentration des nicht radioaktiven ATP ändert sich also faktisch kaum durch Verdünnung mit dem radioaktivem ATP. Für den SphK-Assay wurden pro Probe 10 μl dieses Gemisches verwendet. In diesen 10 μl befanden sich 180000 pmol ATP (9/10 von 20 mM). Auf die TLC-Platten wurde zwecks Standardisierung noch 1 μl des (1:1000 mit H_2O verdünnten) ATP-Gemisches in die Ecken rechts und links aufgetragen, welches nicht im Lösungsmittel mitlief. Der Wert, der am Phospho-Imager für diese „dots“ ermittelt wurde, wurde mit 10000 multipliziert (das [γ - ^{32}P]-ATP ist 1:10 mit nicht radioaktiven ATP (20 mM) und dieses Gemisch 1:1000 mit H_2O verdünnt) und dieser Wert durch 180000 pmol geteilt. Somit erhielt man pmol-Werte, die Schwärzungen auf den TLC-Platten entsprachen. Faktisch teilte man also den Wert für den „dot“ durch 18.

Lösungen

Assay-Puffer	200 mM Tris / HCl (pH 7,4); 1 mM EDTA (pH 8,0); 1 mM PMSF; 1 mM β -Mercaptoethanol; 1 mM Na_3VO_4 ; 0,5 mM 4-Deoxypyridoxin; 15 mM NaF; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin; 345,6 mg Glycerolphosphat; 50 % Glycerin (v/v); 22,94 ml H_2O
Sphingosin	(50 mM in EtOH). Vor Einsatz 1:50 in BSA (4 mg / ml) verdünnt und 2 x 15 s auf Eis im Ultraschallbad gelöst.

4.6 Sonstige Methoden

4.6.1 Proliferationsassay

Die Proliferation von Zellen wurde über die Verstoffwechslung von MTT gemessen. Das Reaktionsprinzip beruht auf der Spaltung des Tetrazoliumrings des wasserlöslichen MTT durch Dehydrogenasen, wodurch ein wasserunlösliches Formazansalz gebildet wird. Diese Reaktion wird lediglich durch vitale Zellen hervorgerufen. Das lilafarbene Formazansalz wurde durch DMF gelöst, und seine Konzentration wurde spektralphotometrisch bei der Wellenlänge $\lambda = 570$ nm gemessen. Die Hintergrundmessung erfolgte bei $\lambda = 670$ nm. Gegenüber dem sonst üblichen Verfahren des ^3H -Thymidin-Einbaus bietet der MTT-Assay den Vorteil eines nicht-radioaktiven Verfahrens. Die Zellen wurden in 96-well-Platten zu bestimmten Zeitpunkten mit 10 μl der MTT-Lösung für 4 h inkubiert und anschließend ün

durch Zugabe von 100 μ l der SDS-/DMF-Lösung lysiert. Am nächsten Tag erfolgte die spektralphotometrische Messung.

Lösungen

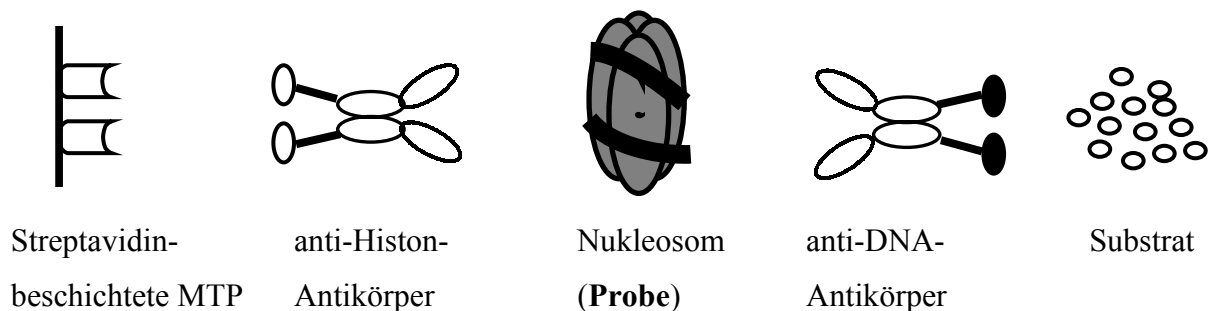
MTT (5 mg/ml) in PBS, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert

SDS-/DMF-Lösung: SDS 20 g (10 % (w/v)); DMF 100 ml (50 % (v/v)) ad 200 ml H₂O

4.6.2 Apoptose-Assay

Die Apoptose in eukaryontischen Zellen stellt einen physiologischen Prozess des Zelltods dar. Prinzipiell unterscheidet sich der gerichtete Prozess der Apoptose von dem ungerichteten Prozess der Nekrose und ist durch Aktivierung von Endonukleasen, „Membrane Blebbing“ (Löchrigwerden der Membran) und Kondensation des Zytoplasmas charakterisiert. Durch Aktivierung der Endonukleasen entstehen Histon-assoziierte DNA-Fragmente, die mit dem „Cell-Death-Detection-ELISA^{PLUS}“ von der Fa. Roche Diagnostics nachgewiesen werden können. Die Lysate von behandelten und auf apoptotische Prozesse zu untersuchenden Zellen werden in Streptavidin-beschichtete MTP gegeben und anschließend sequentiell mit anti-Histon-Biotin-Antikörpern und anti-DNA-Peroxidase-Antikörpern behandelt. Ein farbloses Substrat wird durch die Peroxidase zu einem grünlichen Farbstoff umgesetzt, dessen Menge im ELISA-Photometer bei $\lambda = 405$ nm quantifiziert werden kann. Das Ausmaß der Produktbildung ist hierbei mit der Menge der durch apoptotische Prozesse gebildeten Nukleosomen gleichzusetzen (siehe Reaktionsprinzip).

Reaktionsprinzip:

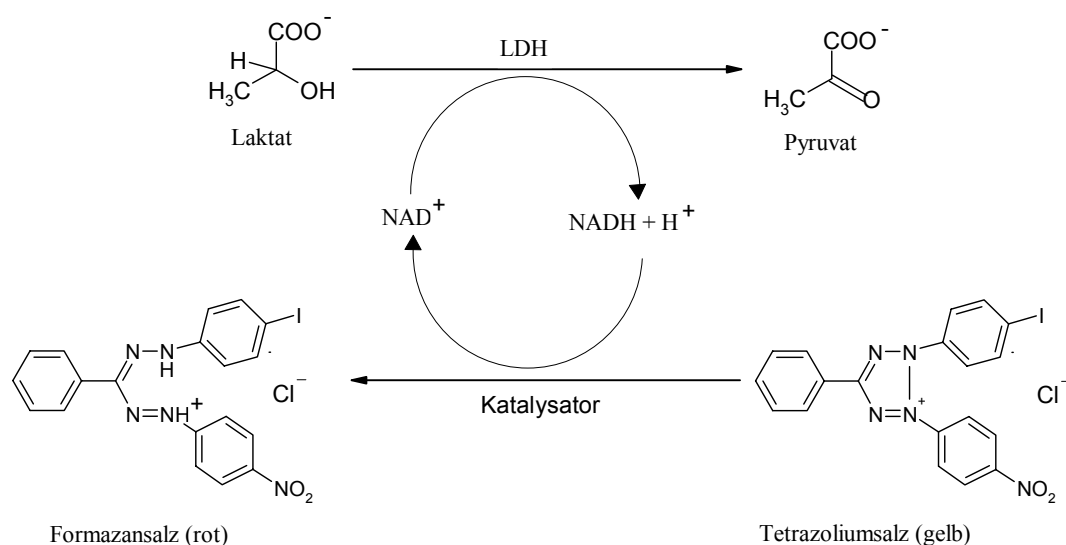


4.6.3 Zytotoxizitäts-Assay

Eukaryontische Zellen können durch Nekrose („Mord“) oder Apoptose („Selbstmord“) sterben. Für die Auslösung des unspezifischen Prozesses der Nekrose werden verschiedene äußere Einflüsse verantwortlich gemacht, z.B. Strahlung, Vergiftung oder Verbrennung. Die geschädigten Zellen schwellen an, verlieren die Integrität ihrer Membran und besitzen eine vergrößerte Permeabilität für Ionen. Im Verlauf der Nekrose werden Stoffe aus dem Inneren der Zelle freigesetzt, die zur Quantifizierung des Ausmaßes der Nekrose herangezogen werden können. Ein solcher Stoff ist die Laktatdehydrogenase (LDH), ein stabiles Enzym des Zytoplasmas, das im Verlauf der Nekrose schnell in den Überstand der Zellen abgegeben wird. Für seine Bestimmung wurde das „Cytotoxicity-Detection-Kit (LDH)“ von der Fa. Roche Diagnostic verwendet. Das Reaktionsprinzip beruht auf der Oxidation von Laktat zu Pyruvat durch die LDH. Dabei wird NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert.

Im zweiten Schritt werden diese Protonen vom Katalysator (Diaphorase) auf das Tetrazoliumsalz (gelb) übertragen, welches zu einem Formazansalz (rot) reduziert wird (siehe Schema). Das Ausmaß dieser Formazanbildung korrespondiert mit dem Ausmaß der Nekrose. Nach Behandlung der Zellen mit einem Stoff, dessen Nekrose-auslösendes Potential zu untersuchen war, wurden diese bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Dem Überstand wurden 100 μl entnommen und in einer MTP mit 100 μl des Reaktionsmix versetzt. Nach 30 min Inkubation bei RT im Dunkeln wurde die Extinktion bei $\lambda = 490 \text{ nm}$ im ELISA-Reader gemessen.

Reaktionsschema:



Reaktionsmix

2,5 μl Lösung I (Katalysator) + 112,5 μl Lösung II („Tetrazoliumlösung“) pro Reaktion

4.6.4 Aktivitätsmessung der Caspase 3

HaCaT-Keratinocyten wurden in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen/cm² in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgebracht und für 24 h mit SPP (20 µM), C₈-Ceramid (30 µM) und beidem zusammen (20 µM SPP + 30 µM C₈-Ceramid als Ko-Stimulation) behandelt. Als positive Kontrollen dienten UVB-behandelte (100 mJ/cm²), sowie mit Staurosporin (10 µM) und Cycloheximid (10 µg/ml) stimulierte Zellen. Unbehandelte Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet.

Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/50 µl Lysis-Puffer durch Inkubation auf Eis lysiert (30 min). Nach Zentrifugation wurden 50 µl des Überstandes jeder Probe in MTP-Platten gegeben. Die Aktivität der Caspase 3 wurde durch Spaltung des Substrates Z-DEVD-AMC gemessen (EnzCheck Caspase 3 Assay Kit, (Molecular Probes, Leiden, NL)).

4.6.5 Statistische Auswertung

Die Berechnungen von Mittelwerten und Standardabweichungen sowie die Varianzanalysen wurden mit dem Computerprogramm „Excel“ (Version „Excel 2000“) erstellt und graphisch dargestellt. Der statistische Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen erfolgte über den T-Test. War der ermittelte p-Wert kleiner als der Fehler erster Art ($\alpha = 0,05$), so wurden die Ergebnisse als signifikant betrachtet.