

2. Material

2.1. Geräte

Brutschrank, begasbar	BB16, Heraeus (Osterode, D)
Dünnschichtchromatographiegerät	Linomat IV, Camag (MuttENZ, CH)
Dünnschichtchromatographiekammer	Desaga (Heidelberg, D)
Elektrophoresesystem, Mini Protean II und Mini Sub Cell	Biorad (München, D)
ELISA-Photometer	Model 550, Biorad (München, D)
Gefriertrocknungsanlagen	Alpha 1-4, Christ-Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode, D)
Gel-Dokumentationsvorrichtung	Polaroid (Offenbach, D)
Heizblock	QBT, Grant (Cambridge, UK)
Homogenisator	Homogenisator-Glasgefäß, 2 ml, Schütt (Berlin, D)
Magnetrührer	MR 2000 Heidolph (Kehlheim, D)
Messwaage	1. Präzisionswaage Kern 474, Gottl. Kern u. Sohn (Albstadt, D) 2. Typ 2662, Sartorius (Göttingen, D)
Mikroskop	Diavert, Leica (Bensheim, D)
Mixer	Vortex IKA VF2, Jaehnke und Kunkel (Staufen i. Br., D)
pH-Meter	pH 526 inkl. Sen Tix 97 T, WTW (Weilheim i. OB., D)
PhosphoImager	BAS 1500, Fuji (Kanagaba, Japan)
Sterilbank	BSB 4A, Gelaire Flow Laboratories (Opera, I)
Szintillationszähler	1450 Microbeta Trilux, Wallac (Turku, SF)
Thermocycler	MWG Primus, Biotech (Ebersberg, D)
Thermomixer	Comfort, Eppendorf (Hamburg, D)

Ultraschallbad	Sonorex RK52 Transistor, Bandelin Electronic (Berlin, D)
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls HD 2070, Bandelin Electronic (Berlin, D)
UV-Photometer	Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech (Upsala, S)
Zentrifugen	Biofuge fresco, Heraeus (Osterode, D) Biofuge pico, Heraeus (Osterode, D)

2.2. Zelllinien

Die Experimente wurden mit der immortalisierten Keratinozytenzelllinie HaCaT (Boukamp *et al.*, 1988) durchgeführt, die uns von Prof. Dr. N. E. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, D) zur Verfügung gestellt wurde. Bcl-2 überexprimierende HaCaT-Keratinozyten (HaCaT/bcl-2) und Kontrollklone (HaCaT/pIRES) wurden in unserem Labor generiert (Müller-Wieprecht *et al.*, 2000).

2.3. Phenylaminoalkohol-Derivate

Die verwendeten Ceramidase-Inhibitoren D-e-MAPP, L-e-MAPP und B13 (D-NMAPPD) wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Y. Hannun, MUSC, Charleston, SC, USA, zur Verfügung gestellt.

2.4. Radioaktivität

N-Palmitoyl-[1-¹⁴C]-D-Sphingosin (55 mmol/ mCi) wurde von der Firma Biotrend (Köln, D) bezogen. L-[³H]-Serin (1,22 Tbq/mmol) wurde von der Firma Amersham (Braunschweig, D) bezogen.

2.5. PCR-Reagenzien

Folgende Oligonukleotide wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin, D) bezogen:

Name des Primers	Sequenz	T (annealing)	erwartete Produktlänge
3`Primer aCeramidase	TAG AAT AAC CAG ATA ACC AC	52 °C	557 bp
5`Primer aCeramidase	TAA ATC TTG ACT TAC CAC CC	52 °C	557 bp

Taq-Polymerase, PCR-Puffer und Magnesiumlösung lieferte die Firma Fermentas (St. Leon-Rot, D), dNTP's wurden von der Firma Perkin Elmer (Heidelberg, D) bezogen. Die Gesamt-RNA wurde nach der Vorschrift des käuflichen Kit's der Firma Quiagen (Hilden, D) isoliert. Die cDNA stellten mir freundlicherweise meine Kollegen des Labors zur Verfügung. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des käuflichen Kit „SuperScript Preamplifikation System“ der Firma Gibco BRL (Eggenstein, D).

2.6. Chemikalien

Puffersubstanzen, Salze, Lipide und Detergenzien wurden von den Firmen Sigma (München, D), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) und ICN (Eschwege, D) bezogen. Lösungen und Lösungsmittel wurden in analytischer Qualität von den Firmen J. T. Baker (Deventer, NL), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) und Sigma (München, D) bezogen. Gase lieferte die Firma Linde (Berlin, D).

Folgende weitere Verbrauchsmaterialien kamen zum Einsatz:

- Kieselgel-60-Platten, Fa. E. Merck (Darmstadt, D)
- Szintillationsflüssigkeit OptiPhase `Supermix`, Wallac (Turku, SF)

Spezielle Substanzen wurden von nachfolgend aufgelisteten Firmen bezogen:

Agarose	Roth (Karlsruhe, D)
DNA-Marker (X174 /HaeIII-Fragmente)	Gibco BRL (Karlsruhe, D)
Ethidiumbromid	Amresco (Solon, OH, USA)
Glutardialdehyd	Roth (Karlsruhe, D)
Kristallviolett	ICN (Eschwege, D)
D-Saccharose	Roth (Karlsruhe, D)

2.7. Zellkulturmaterialien

Sterile Artikel stammten von folgenden Firmen:

Gewebekulturschalen,	
Zentrifugationsröhrchen,	
serologische Pipetten	Nunc (Wiesbaden, D)
Spritzen, Spritzenvorsatzfilter,	
Kanülen	B. Braun (Melsungen, D)
Sterilfilter	Schleicher und Schuell (Dassel, D)
Zellschaber	Costar (Cambridge, MA, USA)

Fötale Kälberserum (FCS),

L-Glutamin,

Penicillin/Streptomycin,

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
(PBS),

Rosewell Park Memorial Institut

1640-Grundmedium (RPMI 1640),

Trypsin

Biochrom Seromed KG (Berlin, D)

Keratinocyte Basal Medium (KBM)

und Zusätze für Keratinocyte Growth

Medium (KGM)

Clonetics (St. Katharinen, D)

Modification of Eagles Medium (MEM)

Biochrom Seromed KG (Berlin, D)

mit Earle`s Salzen

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Zellkulturmedien

-Trypsin-Lösung	0,3 g Trypsin in 100 ml PBS (0,3 %, v/v)
-RPMI-Medium	500 ml RPMI 1640 50 ml FCS (10 %, v/v) 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (50000 IE.Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin) 5 ml 200 mM L-Glutamin
-KGM-Medium	500 ml KBM 0,5 ml 100 µg/ml hEGF 0,5 ml 5 mg/ml Insulin 2,0 ml 7,5 mg/ml Rinderhypophysenextrakt 0,5 ml 0,5 mg/ml Hydrocortison 0,5 ml 50 mg/ml Gentamycinsulfat und 50 µg/ml Amphothericin B
-MEM-Medium	500 ml MEM mit Earle`s Salzen mit 2,2 g/l Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin und Serin 25 ml FCS (5 %, v/v) 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung

Die Medien wurden bei 4 °C und die Trypsinlösung wurde in aliquotierter Form bei -20°C aufbewahrt.

3.1.2. Kultivierung der Zellen

HaCaT-Keratinocyten wurden als adhären wachsende Zellen in Gewebekulturflaschen in 12 ml RPMI-Medium herangezogen. Der Brutschrank wies eine Wasserdampf-gesättigte, 5 % CO₂ und 95 % Luft enthaltende Atmosphäre auf, die Temperatur betrug 37 °C. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde nach einmaligem Spülen mit sterilem PBS das Medium gewechselt. Dies diente der Neuversorgung mit Nährstoffen sowie dem Entfernen toter Zellen. Die Zellen wurden passagiert, wenn die Zellen maximal 60 %-70 % Konfluenz zeigten. Nach Spülen mit 6 ml sterilem PBS wurden die Zellen für 5-10 min mit 5 ml Trypsin bei 37 °C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen durch den Verlust der Zelladhäsion wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von 10 ml RPMI-Medium gestoppt. Die Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, für 3 min bei 100 x g pelletiert und anschließend in RPMI-Medium resuspendiert. Um für einen Versuchsansatz eine definierte Zellzahl pro Kulturschale zu erhalten, wurden die Zellen mit Hilfe eines Hämatocytopeters (Neubauer-Zählkammer) gezählt und entsprechend auf Kulturflaschen oder Schalen verteilt. Dabei mußte bei der Kultivierung in 6- oder 24-Loch Schalen beachtet werden, daß vor dem Aussäen eine gute Durchmischung mittels mehrmaligem Aufziehen und Auslassen in der Pipette erfolgte. Somit wurde die Zellsuspension gleichmäßig und mit der gleichen Zelldichte auf die einzelnen Löcher verteilt. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Zellen einmal mit PBS gespült.

Bcl-2 überexprimierenden HaCaT-Keratinocyten (HaCaT/bcl-2) und Kontrollklonen (HaCaT/pIRES) wurde während der Kultivierung Geniticin (0,6 mg /ml) zur Selektionierung hinzugegeben.

3.1.3. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Konfluente HaCaT-Keratinocyten wurden trypsiniert, in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), welches die Kristallbildung innerhalb der Zellen verhindert, aufgenommen und in 1 ml-Gefriereröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden zunächst mit Zellstoff umwickelt und

für 2 Tage bei - 80 °C gelagert. Danach wurden sie zur weiteren Lagerung in flüssigen Stickstoff gegeben. Das langsame Einfrieren soll die für Zellen schädlichen Kristallisationsprozesse vermeiden.

Im Gegensatz dazu erfolgte das Auftauen der Zellen schnell, indem die Röhrchen direkt aus dem Stickstoff in lauwarmes Wasser gehalten wurden. Der Inhalt jedes Röhrchens wurde in 10 ml 37 °C warmes Medium gegeben und 3 min bei 100 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml 37 °C warmem Medium aufgenommen und auf zwei Kulturflaschen mit je 75 cm² Bodenfläche aufgeteilt. Am nächsten Tag erfolgte einmaliges Spülen mit PBS, um die nicht angewachsenen Zellen zu entfernen, danach wurde frisches Medium zugegeben.

3.2. Behandlung der Zellen mit den Phenylaminoalkohol-Derivaten

Die Behandlung der Zellen bei der gewünschten Konfluenzrate (ca. 80 % Konfluenz bei den Apoptose-Tests; ca. 40 % Konfluenz bei der Proliferationstestung) erfolgte mittels einer 100 µM Stammlösung der Substanzen in KGM. Durch deren Verdünnung wurden die unterschiedlichen Konzentrationen erhalten. Die Verdünnungslösungen enthielten jeweils die gleichen Konzentrationen an Lösemittel (Ethanol) wie die Stammlösung. Als Kontrolle dienten nur mit Lösungsmittel behandelte HaCaT-Keratinozyten. Somit sind die beobachteten Effekte nicht auf den Einfluß des Ethanols zurückzuführen, sondern eine Folge der getesteten Substanzen.

3.3. Messung der Zytotoxizität

Nach der Zellyse durch Verlust der Membranintegrität während der Nekrose lassen sich im Kulturüberstand verschiedene zytoplasmatische Enzyme nachweisen. So kann man z.B. die alkalische Phosphatase (eine unspezifische, in fast allen Zellen vorkommende Phosphatase) nachweisen oder die in größeren Mengen vorkommende Laktatdehydrogenase (LDH).

Im nachfolgenden soll die von uns durchgeführte Zytotoxizitätsmessung mittels des käuflichen Kits „Cytotoxicity Detection Kit (LDH)“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, D) zur Quantifizierung der Laktatdehydrogenase beschrieben werden. Es handelt sich dabei um eine zweistufige enzymatische Reaktion (Abb. 7.).

Benötigte Reagenzien (keine näheren Angaben des Herstellers):

Lösung 1: Katalysator (Diaphorase)

Lösung 2: Farbstoff (Tetrazoliumsalz)

Arbeitslösung für 30 Proben:

Lösung 1: 75 μ l

Lösung 2: 3450 μ l

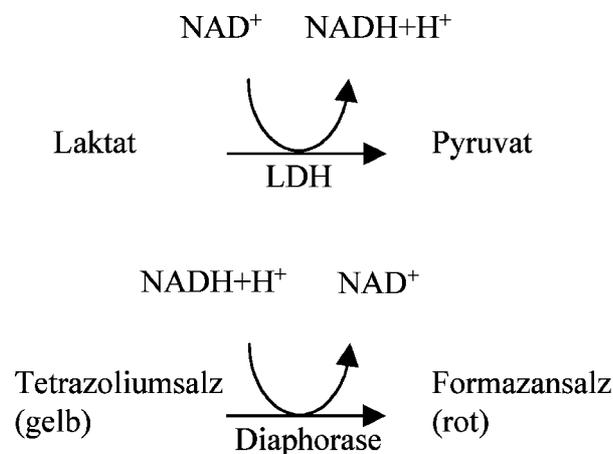


Abb.7. Nachweis der Zytotoxizität mittels LDH-Aktivitätsmessung.

1. In dem ersten enzymatischen Schritt wird Laktat durch die Laktatdehydrogenase zu Pyruvat oxidiert, NAD⁺ wird dabei zu NADH+H⁺ reduziert.
2. In der nachfolgenden Reaktion wird das Tetrazoliumsalz „INT“ durch das Enzym Diaphorase zu einem Formazansalz reduziert. Der dabei auftretende Farbumschlag von Gelb nach Rot kann dann im ELISA-Photometer bei 490 nm nachgewiesen werden.

Durchführung:

HaCaT-Keratinocyten wurden in 24-Loch Kulturschalen mit einer Dichte von 60000 Zellen/ml ausgesät und über Nacht in RPMI-Medium kultiviert. Nach einmaligem Spülen mit PBS am nächsten Tag wurde für weitere 24 h frisches Medium zugegeben. Bei einer Konfluenzrate von ca. 70-80 % wurden die Zellen für 24 h in KGM kultiviert, ehe sie mit den gewünschten Substanzen in KGM inkubiert wurden. Zu verschiedenen Untersuchungszeiten wurden je 100 µl des Kulturüberstandes der Zellkulturschalen abgenommen und 400 µl PBS zugegeben. 100 µl dieser Verdünnung wurden in eine Mikrotiterplatte gegeben und mit 100 µl Arbeitslösung versetzt. Die Platte wurde abgedunkelt für 5-10 min unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte die Absorption bei 490 nm im ELISA-Photometer gemessen werden.

Die Menge an vorhandener LDH korreliert mit der gemessenen Farbintensität und läßt quantitative Aussagen hinsichtlich der Zytotoxizität einer Substanz zu. Die erhaltenen Werte werden in Prozent der Kontrolle angegeben und sind somit relative Werte.

3.4. Messung der Apoptose

Um den in der Zelle eingeleiteten Prozeß der Apoptose zu detektieren, bedient man sich verschiedener Methoden, wie z.B eines TUNEL-Assays (*terminal dUTP nick end labeling*), eines DNA-Leiter-Assays, einer Durchflußzytometrie nach Annexin V-Färbung u.a. Der TUNEL-Assay ist unspezifisch in seiner Aussagefähigkeit, weil neben den zu messenden Apoptose-Signalen auch nekrotische Veränderungen detektiert werden und somit eine sichere Unterscheidung erschwert ist. Andererseits ermöglicht diese Methode, wie auch die Darstellung der DNA-Leiter keine quantitativen, sondern nur qualitative Aussagen. Eine die Apoptose quantifizierende Methode stellt die Detektion von Histon-gekoppelten DNA-Fragmenten (200 bp) mittels eines sog. „Sandwich-Elisas“ dar, welcher nachfolgend beschrieben wird.

Es wurde für die Messung der Apoptose der käufliche Kit „Cell Death Detection Elisa^{Plus}“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, D) verwendet. Dieser detektiert Nukleosomen, die durch die in der letzten Phase der Apoptose aktive Endonuklease entstanden sind.

Prinzip des „Cell Death Detection Elisa^{Plus}“:

Zu der im Kit enthaltenen Mikrotiter-Platte, die mit Streptavidin beschichtet ist, wird Zellysat gegeben. Der anschließend zugegebene Anti-Histon-Biotin-Antikörper bindet einerseits mittels Biotin an die Streptavidin-Beschichtung, andererseits an das Histon. Der zweite Antikörper, welcher Peroxidase-gekoppelt ist, detektiert die um das Histon gewickelte DNA, wobei die nun beidseitig durch Antikörper fixierten Nukleosomen in dem sogenannten „Sandwich-Komplex“ gehalten werden. Das zuletzt zugegebene Substrat wird durch die Antikörper-gekoppelte Peroxidase umgesetzt, was durch Farbumschlag von farblos nach grün angezeigt wird und in einem ELISA-Photometer bei 405 nm gemessen werden kann.

Benötigte Reagenzien (keine näheren Angaben des Herstellers):

1. Inkubationspuffer
 2. Lysispuffer
 3. Substratpuffer
 4. Substrat, 2,2 Azino-di (3-ethylbenzathiazolin-sulfonat)
 5. Konjugatlösung für 30 Proben
- | | |
|------------------------|---------|
| anti-DNA-Antikörper | 120 µl |
| anti-Histon-Antikörper | 120 µl |
| Inkubationspuffer | 2160 µl |

Durchführung:

HaCaT-Zellen wurden in 24-Loch Zellkulturplatten mit einer Dichte von 60000 Zellen/ml ausgesät und über Nacht in RPMI-Medium kultiviert. Nach einmaligem Spülen mit PBS am nächsten Tag wurde für weitere 24 h frisches RPMI-Medium zugegeben, ehe die Zellen für 24 h in KGM inkubiert wurden. Bei ca.70-80 % Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit der zu untersuchenden Substanz behandelt. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde die Kulturschale für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Je 100 µl des

Überstandes wurden vorsichtig mit der Pipette abgenommen und für die Messung der Zytotoxizität (3.3. Messung der Zytotoxizität) maximal für 72 h bei 4 °C aufbewahrt. Der Rest des Überstandes wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen vorsichtig einmal mit PBS gespült. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 500 µl Lysispuffer pro Loch eine Solubilisierung der Zellen. Innerhalb der 30-minütigen Einwirkzeit wurden Zellmembranen aufgebrochen, die Nukleosomen und anderer Zellinhalt gelangten in den Überstand. Nach anschließender Zentrifugation bei 200 x g für 10 min wurde jeweils 20 µl Lysat in ein Loch der Mikrotiterplatte (MTP) gegeben und je 80 µl Konjugatlösung zugesetzt. Die Platte wurde 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Überstände wurden verworfen und die MTP-Löcher dreimal mit je 200 µl Inkubationspuffer gewaschen, um nicht gebundenes Immunreagenz zu entfernen. Nachfolgend wurden je 100 µl Substratlösung in die Löcher gegeben und die Platte 10-20 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Dabei mußte die Lichtempfindlichkeit der Substratlösung beachtet werden und die Platte abgedunkelt werden, da dies sonst zu falsch positiven Werten führen kann. Die grüne Farbreaktion, die umso stärker ist, je mehr gebundene Histonkomplexe im Zellysate vorhanden sind, wurde anschließend im ELISA-Photometer bei 405 nm gemessen. Somit kann direkt proportional zum Farbumschlag eine Quantifizierung der Apoptose erfolgen, wobei die Extinktionswerte der behandelten Proben in Prozent der Kontrolle berechnet werden.

3.5. Messung der Proliferation

Eine Methode ist die Messung der DNA-Synthese mittels [³H]-Thymidin-Einbaus, eine andere sind FACS-Analysen zur Bestimmung des Zellzyklusstadiums. In dieser Arbeit wurde die Kristallviolettmethod nach Gillies zur quantitativen Bestimmung der Zellzahl verwendet (Gillies *et al.*, 1986). Bei adhären wachsenden Zellen wie Keratinozyten lösen sich tote Zellen vom Boden der Gewebekulturschale ab und werden mit dem Kulturüberstand abgesaugt. Färbt man die Zellen mit Kristallviolett an, werden daher nur die vitalen, adhären Zellen mittels anschließender photometrischer Messung detektiert.

Durchführung:

HaCaT-Keratinocyten wurden in 24-Loch-Platten mit einer Dichte von 30000 Zellen/ml ausgesät und über Nacht in RPMI-Medium kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte einmaliges Waschen mit PBS und weitere Kultivierung über 24 h in RPMI-Medium. Bei einer Zelldichte von ca. 30-40 % wurden die Zellen für 24 h auf KGM gesetzt und dann mit den gewünschten Substanzen bei einer maximalen Zelldichte von 50 % über verschiedene Zeiträume behandelt. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde je 250 µl 1 % Glutardialdehyd zu den Zellen gegeben, welches über 30 min unter leichtem Schwenken die Zellen an die Unterlage fixiert. Die Glutardialdehyd-Lösung wurde abgesaugt und die Löcher mit je 500 µl PBS gewaschen. Die Färbung der Zellen erfolgte mittels 250 µl 0,01 % Kristallviolett für 30 min unter Schwenken. Um unspezifische Färbungen bzw. nicht gebundene Farbe auszuwaschen, wurde die Platte für 15 min in deionisiertes Wasser getaucht. Nach anschließendem Ausklopfen der Platte auf einem Zellstofftuch wurde je 250 µl 0,2 % Triton X-100 zu den Zellen gegeben. Dies bewirkt die Lyse der Zellmembranen sowie das Freigeben des an die DNA gebundenen Farbstoffs in den Überstand. Nach ca. 1-2 h ist dieser Prozeß abgeschlossen (Sichtkontrolle des nun farbigen Überstandes und der entfärbten Zellen durch vorsichtiges Schwenken !). Je 100 µl der Lösung wurden in eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei 570 nm gemessen. Die Wachstumshemmung oder -stimulation der Zellen nach Behandlung werden als relative Werte in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben.

Benötigte Reagenzien:1 % Glutardialdehyd :

50 % Glutardialdehyd	150 µl	1 %
PBS	ad 7,5 ml	

Die Menge der angesetzten Lösung reicht für eine 24-Loch Platte. Sie wurde immer aus der bei 4 °C gelagerten Glutardialdehyd-Stammlösung frisch angesetzt.

0,1 % Kristallviolett:

Kristallviolett	15 mg	0,1 %
PBS	ad 15 ml	

Diese Stammlösung ist bei Raumtemperatur etwa 2 Monate stabil.

0,01 % Kristallviolett:

0,1 % Kristallviolett	1,5 ml	0,01 %
PBS	ad 15 ml	

Die angesetzte Lösung reicht für zwei 24-Loch-Platten und wird unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt und filtriert, um größere Farbpartikel zu entfernen.

1 % Triton X-100:

Triton X-100	1 ml	1 %
PBS	ad 100 ml	

Diese Stammlösung ist bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar.

0,2 % Triton X-100:

1 % Triton X-100:	3 ml	0,2 %
PBS	ad 15 ml	

Diese Lösung wird frisch angesetzt und reicht für zwei 24-Loch Platten.

3.6. Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure

Um davon ausgehen zu können, daß in Experimenten mit Verwendung von Zellsolubilisaten in allen Proben die gleiche Menge an Protein vorhanden ist, kann dieses mittels verschiedener

proteinchemischer Methoden quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde der Proteingehalt nach der Methode von Smith bestimmt (Smith *et al.*, 1985): Zuerst bilden die nachzuweisenden Proteine und Kupfer(II)-Ionen einen Komplex rotblauvioletter Farbe. Durch die Biuretreaktion werden innerhalb dieses Komplexes im alkalischen pH-Bereich Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen reduziert. Nachfolgend wird das Kupfer(I)-Ion in einem stabileren Komplex violetter Farbe von zwei Molekülen Bicinchoninsäure gebunden, welcher photometrisch bei 562 nm gemessen wird. Dabei werden in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur Proteine mit unterschiedlicher Sensitivität erfaßt. Der Nachweisbereich der von uns angewandten Inkubationstemperatur von 37 °C liegt bei Proteinkonzentrationen von 20 bis 1200 µg/ml, während bei Inkubationstemperaturen von 60 °C Proteine von 5 bis 250 µg/ml nachgewiesen werden können.

Benötigte Lösungen: Sie wurden von der Firma Pierce (Weiskirchen, D) bezogen.

Lösung A:

Dinatriumbicinchoninat	10 g	26 mM (f.c.)
Natriumcarbonat-Monohydrat	20 g	161 mM
Natriumhydrogencarbonat	9,5 g	113 mM
Natriumhydroxid	4 g	100 mM
<i>di</i> -Natriumtartrat-Dihydrat	1,6 g	7 mM
destilliertes Wasser	ad 1000 ml	

Lösung B:

Kupfersulfat-Pentahydrat	1 g	160 mM
destilliertes Wasser	ad 25 ml	

Arbeitslösung: (Gemisch aus 50 Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B)

Durchführung:

Zuerst wurde eine Proteinstandardreihe aus einer 2 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA)-Stammlösung hergestellt. Für die Verdünnungen wurde der Puffer verwendet, in dem auch die

Proben gelöst waren. Je 10 µl der Standardreihe und der Proben wurden in eine Mikrotiterplatte überführt. Je 200 µl der frisch angesetzten Arbeitslösung wurden hinzugegeben. Obwohl die Arbeitslösung ungefähr eine Woche haltbar ist, wurde sie vor jedem Versuch frisch angesetzt. Nach einer halbstündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Proben bei 570 nm im ELISA-Photometer vermessen. Mit Hilfe der Standardreihe kann die Proteinkonzentration der untersuchten Proben errechnet werden.

3.7. Lipidchemische Methoden

3.7.1. Lipid-Extraktion

Um Lipide von anderen Bestandteilen der Zellen, wie z.B. Proteinen oder Zellkernanteilen zu trennen, wurde eine modifizierte Lipidextraktion nach Bligh und Dyer angewandt (Bligh und Dyer, 1959).

Die in 6-Loch Platten kultivierten Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber in 600 µl PBS geerntet. Anschließend wurden sie bei 4 °C mit 13000 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet über Nacht gefriergetrocknet. Das erhaltene Pellet wurde in 95 µl einer 10:5:4-Mischung aus Methanol/Chloroform/Wasser (v/v/v) aufgenommen. Die Proben wurden gut gemischt, 10 min mit Ultraschall behandelt und für 5 min bei 13000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand war ohne die pelletierten Zelltrümmer in ein neues Reaktionsgefäß zu überführen. Durch Zugabe von 25 µl Chloroform und 25 µl Wasser wurde nach dem Mischen die Phasentrennung erreicht. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 13000 x g und Raumtemperatur konnte die obere wässrige Phase vorsichtig abpipettiert werden, die untere (lipophile) Chloroform-Phase wurde eingedampft.

3.7.2. Dünnschichtchromatographische Trennung von Lipiden

Lipide können mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und quantifiziert werden. Dabei wird das unterschiedliche Laufverhalten der verschiedenen Lipide ausgenutzt, welches von verschiedenen Faktoren, wie Molekülgröße, Polarität, Zusammensetzung des Laufmittels o.ä. abhängig ist.

Die (wie unter 3.7.1. beschrieben) extrahierten und gefriergetrockneten Lipide wurden anschließend in 50 µl Chloroform/Methanol (9:1, v/v) gelöst. Davon wurden 20 µl mit einem Probenauftraggerät auf eine Kieselgel-60 High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)-Platte aufgetragen. Nach 10-minütigem Trocknen der Platte erfolgte die vertikale Entwicklung der Platten in der Laufmittelkammer, wobei als Laufmittel 50 ml Chloroform/Methanol (9:1, v/v) eingesetzt wurde. War das Laufmittel bis etwa 0,5 cm unterhalb der oberen Kante gelaufen, konnte die Kieselgel-Platte aus der Laufkammer entfernt und getrocknet werden.

3.7.3. Nachweis radioaktiv markierter Lipide

Der Nachweis der dünn-schichtchromatographisch aufgetrennten Lipide erfolgt bei radioaktiven Proben mittels eines PhosphoImager. Die entwickelten HPTLC-Platten wurden dazu auf eine Tritium-sensitive Platte aufgelegt und nach 5-7 Tagen in einem PhosphoImager-Gerät sichtbar gemacht. Eine Quantifizierung der den einzelnen Lipiden entsprechenden Banden erfolgte mittels einer Bearbeitung mit dem Computerprogramm „TINA 2.09 g“, raytest (Straubenhardt, D). Aus dem Verhältnis der Laufhöhe der unterschiedlichen Lipide zur Laufmittelfront ergibt sich der RF-Wert. Die Laufhöhe der radioaktiven Banden korrelierte mit der Laufhöhe nicht-radioaktiver Standard-Lipide, welche wie in Kapitel 3.7.4. beschrieben nachgewiesen werden.

3.7.4. Nachweis nichtradioaktiver Lipide

Die aufgetrennten Lipide (siehe Kapitel 3.7.2.) lassen sich mit Hilfe einer phosphorsauren Kupferlösung anfärben (Touchstone *et al.*, 1980). In dieser Arbeit diente diese Methode dem Nachweis nicht-radioaktiver Standards und Berechnung des RF-Wertes, um mit diesem die radioaktiv detektierten Proben identifizieren zu können. Die Färbung der Proben ist dabei umso stärker, je mehr Lipid in einer Bande enthalten ist. Somit ist mit dieser Methode auch eine Quantifizierung von unbekanntem Proben möglich.

Durchführung:

Nach vertikaler Entwicklung der HPTLC-Platte in der Laufmittelkammer wurde die Platte getrocknet. Sie wurde 10 min bei 180 °C auf einer Heizplatte ausgeheizt, um das Laufmittel vollständig zu entfernen, die Kieselgelschicht für nachfolgenden Tauchvorgang zu verfestigen und die Lipide zu fixieren. Die abgekühlte Platte wurde 3 sec in die Färbelösung getaucht. Nach sorgfältigem Abwischen der Rückseite und Trocknen wurde die Platte bei 120 °C auf Sicht für ca. 20-30 min auf der Heizplatte entwickelt, bis durch Verkohlung der Lipide gelbbräunliche Banden sichtbar waren.

Benötigte Färbelösung:

Kupfer (II)-sulfat Pentahydrat	15,63 g
85 %-ige ortho-Phosphorsäure	10 ml
destilliertes Wasser	ad 100 ml

3.8. Bestimmung der Ceramidase-Enzymaktivität

Um die Enzymaktivität der verschiedenen Isoformen der Ceramidase in HaCaT-Zellen nachzuweisen und den Einfluß der Testsubstanzen auf diese Isoenzyme zu untersuchen, wurde eine modifizierte Methode nach Gatt und Yavin verwendet (Gatt und Yavin, 1969).

Verwendete Lösungen:Lysis-Puffer (pH 7,4):

500 mM Saccharose	971 µl	203 mM (f.c.)
2 mM EDTA	971 µl	0,8 mM
Natriumcholat	4 mg	0,2 %
1 %ige Triton X-100	200 µl	0,1 %
100 mM Natriumvanadat	20 µl	1 mM
100 mM PMSF	20 µl	1 mM
15 mM Kalziumchlorid	133 µl	1 mM
30 mg/ml Leupeptin	1,5 µl	20 µg/ml
30 mg/ml Pepstatin	1,5 µl	20 µg/ml
30 mg/ml Aprotinin	1,5 µl	20 µg/ml

Substratlösung, pro Ansatz:

10 µCi/ml [¹⁴ C]-C ₁₆ -Ceramid-Lösung	1,5 µl	15 nCi
1 mM <i>N</i> -Stearoyl-D-Sphingosin	2,5 µl	0,046 mM
0,1 % Triton (v/v)	25 µl	0,046 %
0,2 % Natriumcholat (w/v)	25 µl	0,093 %

Die Substratlösung wurde mit Stickstoff bei 70 °C eingedampft, der Rückstand in 7,5 µl destilliertem Wasser je Ansatz aufgenommen und 3 min in das Ultraschallbad gehalten. Anschließend wurde die Lösung für 5 sec bei 80 °C erhitzt und schnell auf Eis gestellt.

Puffer für die Enzymreaktion:

200 mM CHES, pH 9,0,

200 mM Natriumacetat, pH 4,5

200 mM HEPES, pH 7,0

Dole`s Lösung:

Isopropanol	40 ml	
Heptan	10 ml	
1 M Natriumhydroxid-Lösung	1 ml	19,6 mM (f.c.)

Durchführung:

HaCaT-Zellen wurden in 175 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert, wobei sich zeigte, daß erst mehr als 40 Mio. Zellen zu der gewünschten Mindestproteinkonzentration von 20 mg/ml bzw. einer Proteinmenge von 500 µg pro Ansatz führte. Geringere Proteinmengen zeigten keine Enzymaktivität im Vergleich zum Hintergrund.

Die Zellen wurden trypsiniert, 3 min bei 100 x g pelletiert und in 500 µl eiskaltem Lysis-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden sie auf Eis mit einem Dounce-Homogenisator solubilisiert und anschließend dreimal für je 10 sec, 50 W, mit dem Ultraschallstab behandelt. Danach wurden sie für 15 min bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand mit der Substratlösung versetzt, wobei die nachzuweisende Ceramidase das Ceramid in das nicht markierte Sphingosinrückgrat und die [¹⁴C]-markierte langkettige Fettsäure spaltet. Die im Reaktionsansatz eingesetzten Puffer variierten in ihrem pH-Wert von pH 4,5 über pH 7,0 bis pH 9,0. Dies entspricht den pH-Optima der verschiedenen Ceramidase-Isoformen. Der in Ethanol gelöste Inhibitor verschiedener Konzentrationen wurde direkt zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben. Zu den Kontrollzellen ist statt des Inhibitors die gleiche Menge an Ethanol zugegeben worden.

Reaktionsansatz:

50 mM Magnesiumchlorid	5 µl	5 mM (f.c.)
200 mM Puffer	12 µl	48 mM
Zellextrakt	25 µl	
Substratlösung	7,5 µl	
+/- Inhibitor in Ethanol	0,5 µl	
(f. c. Ethanol = 1 %)		

Die Reaktion wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert. Hiernach wurde die Reaktion durch die Zugabe von 0,5 ml Dole`s-Lösung, 0,3 ml Heptan und 0,25 ml Wasser gestoppt. Anschließend wurden die Proben für 5 sec gut gemischt und für 5 min bei 13000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase wurde verworfen und das verbleibende Volumen zweimal mit je 0,5 ml Heptan wie zuvor gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 0,25 ml 0,5 M Schwefelsäure und 0,5 ml Heptan, um das Reaktionsprodukt als freie Fettsäure in die Heptanphase zu überführen. Diese wurde vorsichtig abgenommen und anschließend in ein Szintillationsröhrchen überführt. Die Messung erfolgte nach Zugabe von je 2 ml Szintillationsflüssigkeit für 10 min je Probe. Als Hintergrundwert für die nicht ausgewaschene Radioaktivität wurden 500 µl Heptan eingesetzt. Die mit dem jeweiligen Ceramidase-Inhibitor versetzte Probe wird in Bezug zur unbehandelten Kontrolle als relativer Wert dargestellt.

3.9. Messung des Ceramidgehaltes

Durchführung:

Es wurden HaCaT-Keratinozyten in 6-Loch Platten mit einer Zelldichte von 200000 Zellen pro Loch ausgesät und in RPMI-Medium kultiviert, bis sie eine Zelldichte von 80 % aufwiesen. Ceramid und Sphingomyelin wurden während der Neusynthese durch das im Medium zugesetzte L-[³H]-Serin am Sphingosin-Rückgrat metabolisch markiert. Der Versuch basierte auf der von Jones und Murray beschriebenen Methode (Jones und Murray, 1995). In Vorversuchen wurde herausgefunden, daß das radioaktive Serin nur dann von den Zellen eingebaut wird, wenn Medium eingesetzt wird, welches frei von nicht-radioaktivem Serin ist. Es erfolgte eine 24-stündige Zugabe von L-[³H]-Serin-haltigem MEM-Medium (inklusive 5 % FCS und 5 ml Penicillin/Streptomycin), wobei 4 µCi pro Loch eingesetzt wurden. Nachfolgend wurde das radioaktive Medium abgesaugt und einmal mit PBS gespült. Um überflüssiges, nicht eingebautes L-[³H]-Serin zu entfernen, wurden die Zellen für 3 h mit nicht-radioaktivem Serin in KBM (5 mM) inkubiert. Anschließend erfolgte nach einmaligem

Spülen mit PBS die Zugabe der zu untersuchenden Substanzen in den gewünschten Konzentrationen.

Die Lipide wurden extrahiert (siehe Kapitel 3.7.1), dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (siehe Kapitel 3.7.2) und das Ceramid quantifiziert (siehe Kapitel 3.7.3-4).

3.10. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mittels der eine Vervielfältigung von DNA aus geringsten Mengen genetischen Materials möglich ist. Sie wurde 1985 von K. Mullis entwickelt (Saiki *et al.*, 1985). Seither wird die Polymerase-Kettenreaktion in der medizinischen Forschung, der Diagnostik z.B. von Erbkrankheiten, in humangenetischen Studien, in der Gerichtsmedizin und in der biologischen Grundlagenforschung angewendet. Als Ausgangsmaterial dient genomische DNA oder aus RNA synthetisierte cDNA. Durch Erhitzen wird der Doppelstrang denaturiert, mit zwei kurzen Oligonukleotiden als Primer der DNA-Synthese, die die gesuchte DNA-Sequenz begrenzen, hybridisiert und durch eine hitzestabile Polymerase (Taq-Polymerase) verlängert. Denaturierung, Annealing (Hybridisierung der Primer an die DNA) und Replikation laufen bei unterschiedlichen Temperaturen innerhalb eines Zyklus ab. Die Genprodukte verdoppeln sich in jedem der 20-30 Zyklen und werden anschließend mittels der Gelelektrophorese analysiert. Um Kontaminationen der verwendeten Lösungen ausschließen zu können, wird für jedes Primerpaar ein Reaktionsansatz pipettiert, der keine cDNA enthält. Unter Zuhilfenahme des Computerprogramms „Mac Molly“, SoftGene (Berlin, D) wurde die optimale Annealing-Temperatur von 52 °C bestimmt. Das replizierte Genprodukt ist 557 Basenpaare lang.

Der Reaktionsansatz für eine Probe setzt sich wie folgt zusammen:

Einfacher Probenansatz (25 µl):

25 mM Magnesiumchlorid	0,75 µl	0,75 mM (f.c.)
20 mM dNTP`s	2,5 µl	2 mM
20 µM 5`Primer	0,5 µl	0,4 µM

20 μ M 3`Primer	0,5 μ l	0,4 μ M (f.c.)
5 U/ μ l Taq-Polymerase	0,2 μ l	1 U
10 x PCR-Puffer	2,5 μ l	
cDNA	5,0 μ l	
destilliertes Wasser	13 μ l	

<i>Ablauf eines PCR- Zyklus</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Benötigte Zeit</i>
1. Denaturierung der DNA	94 °C	1 min
2. Replikation des DNA- Einzelstrangs		
a) Denaturierung	94 °C	30 sec
b) Annealing	52 °C	1 min
c) Extension	72 °C	1 min
3. End-Extension	72 °C	5 min
4. Kühlen	4 °C	

Die Phase der DNA-Replikation wurde insgesamt 35 x wiederholt, um genügend Genprodukte zu erhalten. Die End-Extension dient der Vervollständigung angefangener PCR-Produkte. Da die Polymerase bei 4 °C gestoppt wird, kann das Produkt z. B. über Nacht im Gerät verweilen. Das PCR-Produkt wird anschließend in die Taschen eines zuvor gegossenen Agarose-Gels pipettiert. In eine Tasche wird der DNA-Marker aufgetragen, welcher ein Gemisch aus mehreren bekannten Basenpaarlängen darstellt, so daß die spätere Identifizierung der Bande in den Proben möglich ist.

Ansatz für ein 1,5 %iges Agarose-Gel (10 cm x 16,5 cm):

1,5 g Agarose

10 ml 10 x TAE-Puffer, pH 7,0

5,0 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml)

ad 100 ml H₂O

10 x TAE-Puffer:

Tris	48,44 g	200 mM (f.c.)
Natriumacetat	4,1 g	25 mM
EDTA	5,85 g	10 mM
Essigsäure, ad pH 7,8		
destilliertes Wasser	ad 1000 ml	

DNA-Loading Buffer:

50% Ficoll 400	5 ml	25%
2,5 % Bromphenolblau	200 µl	0,0125 %
10 x TAE-Puffer	500 µl	
H ₂ O	ad 10 ml	

Die erforderliche Menge Agarose wurde abgewogen und mit 90 ml H₂O gmischt. Die Lösung wurde in einer Mikrowelle bei 600 W solange gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf eine Temperatur < 65°C, wurden Ethidiumbromid und 10 x TAE zugesetzt. Das Gel wurde in eine vorbereitete Gelkammer gegossen und nach Festwerden in eine Elektrophorese-Kammer gelegt. Die Kammer ist mit TAE aufgefüllt worden, bis das Gel vollständig bedeckt war. Die einzelnen Proben wurden zu 1/9 des Volumens mit Loading Buffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese lief bei 100 V, 150 mA, bis der Farbstoff (Bromphenolblau) ca. 2/3 der Gellänge erreicht hat. Zum Analysieren und Dokumentation des mit Ethidiumbromid gefärbten Gels wurde dieses mittels eines UV-Transluminators und einer CCD-Kamera (Polaroid, Offenbach, D) photographiert. Die Lauflänge der Produkt-Banden wurde mit der Lauflänge der Marker-Banden verglichen und somit die Länge des amplifizierten Produkts ermittelt.

3.11. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit werden für alle Meßwerte (im Falle von Drei- oder Mehrfachbestimmungen) der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Sowohl die Standardabweichung als auch der Vergleich von Mittelwerten zweier Messungen mittels des Student`s *t*-Test wurde mit dem Computer berechnet. Hierfür wurde die Software „Microsoft Excel-Version 5.0 a“, Microsoft (Redmont, WA, USA) verwendet.