

2 MATERIAL UND METHODEN

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav	Guwina-Hofmann, Berlin
Agagel Standard	Biometra, Göttingen
Agarosegeldetektionssystem Bio Doc	Biometra, Göttingen
Brutschrank BB 6220	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern	Biometra, Göttingen
ELISA-Reader	Merlin, Bornheim
Entwicklungskassette	Kodak, München
FACS-Calibur	Becton & Dickinson, Heidelberg
Konfokales Mikroskop LSM-510 Meta	Zeiss, Jena
Lamin Air–Sterilarbeitsbank	Heraeus, Hanau
Magnetrührer IKAMAG® RCT	Janke & Kunkel, Staufen
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Neubauer-Zählkammer (0,0025mm ² /0,1mm)	Zeiss, Jena
pH-Meter	Knick, Nürnberg
Phasenkontrast-Mikroskop	Carl-Zeiss, Jena
Photometer Uvicon 922	Kontron Instruments, Mailand, Italien
Pipetten Eppendorf Reference®	Integra Biosciences, Fernwald
Pipettierhilfe Pipetboy®	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttelmaschine LS10	Gerhardt, Bonn
Schüttler IKA® MT-2	Karow, Berlin
Spektralphotometer, Gene-Ray	Biometra, Göttingen
Standard Power Pack	Biometra, Göttingen
Tank–Blot	Biometra, Göttingen
Thermoblock TB 1	Biometra, Göttingen
Thermocycler TGradient	Biometra, Göttingen
Trockenschrank UT5042EK	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Sonorex® RK 100	Bandelin, Berlin
Ultraschallsonotrode Sonoplus GM 70	Bandelin, Berlin
Ultra-Turrax IKA® T25	Janke & Kunkel, Staufen
UV-Strahler Sol 2	Hönle, Martinsried
Vakuumgerät Vacuboy®	Integra Biosciences, Fernwald
Variipetten	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Heidolph, Kellheim
Wasserbad DC3/W26	Haake, Karlsruhe
Wasser Deionierungsanlage MilliQ	Millipore-Waters, Eschborn
X-Omat Film-Entwicklungsgerät	Kodak, München
Zentrifuge Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1,0R	Heraeus, Hamburg

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid/Bisacrylamid 40 %, 29:1	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Agarose (Elektrophorese-Grad)	Life Technologies, Paisley
Agarosegelmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Ammoniumpersulfat	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Borsäure	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Bradford Reagenz	Biometra, Göttingen
Bromphenolblau	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Calciumchlorid	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Deckgläschen, Durchmesser: 18 mm	Roth, Karlsruhe
Deoxycholinsäure	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
D-erythro-Sphingosin-1-phosphat, S1P	Calbiochem, Bad Soden/Ts.
Diethylpyrocarbonat, DEPC	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid, DMSO	Merck, Darmstadt
Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Dithiothreitol, DTT	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
DNTP Set (10mM pH 7,0)	Advanced Biotechnologies Ltd, Epsom, Surrey, U.K.
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium, DMEM	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Einmalküvetten, reduziert	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, EtBr	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Eppendorf Reaktionsgefäße, Safe-Lock	Merck/Eurolab, Berlin
Ethanol (HPLC-rein)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen, Falcon	Merck/Eurolab, Berlin
Fetales Kälberserum, FKS	Biochrom, Berlin
Filme, Kodak X-OMAT, XAR-5	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Filmentwickler	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Filmfixierer	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Filtermembranen, Nylon, 0,22µm, Ø 47mm	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
FITC-gekoppelter Anti-HA-IgG-Antikörper	Roche, Penzberg
Glycerolphosphat	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Glycin	ICN, Eschwege
Glycogen	Amersham, Buckinghamshire, U.K.
Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF)	Strathman, Hamburg
HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
HRP-gekoppelter Anti-Mäuse-IgG-Antikörper	New England Biolabs, Frankfurt
HRP-gekoppelter Anti-Ziegen-IgG-Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Kaliumacetat	Amersham, Buckinghamshire, U.K.
Kaliumchlorid, KCl	Sigma/Aldrich, Deisenhofen

2 MATERIAL UND METHODEN

Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Laemmli-SDS-Probenpuffer (Gelelektrophorese)	New England Biolabs, Beverly, MA
Leupeptin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
L-Glutamin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Luria broth	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
LumiGlo Chemilumineszenz Reagenz	New England Biolabs, Frankfurt
Lysophosphatidsäure	Calbiochem, Bad Soden/Ts
Makrophagenentzündungsprotein-3 α (MIP-3 α)	R&D Systems, Wiesbaden
Mercaptoethanol	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Methanol, LiChrosolv®, gradient grade	Merck, Darmstadt
Molekularbiologisches reines Wasser	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Monoklonaler β -Aktin-Antikörper (IgG Maus)	Santa Cruz, Heidelberg
Monoklonaler Smad1,2,3-Antikörper (IgG Maus)	Santa Cruz, Heidelberg
Monoklonaler Smad4-Antikörper (IgG Maus)	Santa Cruz, Heidelberg
Mowiol	Calbiochem, Bad Soden/Ts
Multititer-Platten TPP (6-, 12, 24,-96-Loch)	Biochrom, Berlin
Natriumchlorid, NaCl	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat, SDS	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumorthovanadat, Na ₃ VO ₄	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Oligodesoxynucleotide, ODN	tib Molbiol, Berlin
Oligo(dT) 25-30 Primer	Invitrogen, Karlsruhe
PD 098059	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Penicillin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Pepstatin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Pertussis-Toxin, PTX	Calbiochem, Bad Soden/Ts.
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Phosphat-gepufferte Salzlösung, calcium- und magnesium-frei	Gibco, Eggenstein
PolydI-dC	Boehringer Mannheim
Polyklonaler S1P ₁ -Antikörper (IgG Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler S1P ₂ -Antikörper (IgG Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler S1P ₃ -Antikörper (IgG Ziege)	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler S1P ₄ -Antikörper (IgG Kaninchen)	Acris, Hiddenhausen
Polyklonaler Phosphosmad2-Antikörper (IgG Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
Polyvinyliden-difluorid (PVDF)-Transfermembran	Millipore, Eschborn
Probenpuffer Agarosegelelektrophorese	New England Biolabs, Schwalbach
Protein-G-plus-Agarose	Calbiochem, Bad Soden/Ts.
Proteinmarker	Calbiochem, Bad Soden/Ts.
QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit	Amersham, Buckinghamshire, U.K.
Reagenzgläser, Pyrex ,16 x 100mm mit Deckel	Dunn Labortechnik, Asbach
Ribonuklease-Inhibitor	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
SB 431542	Sigma/Aldrich, Deisenhofen

3*SDS-Probenpuffer	New England Biolabs, Frankfurt
Serumalbumin vom Rind, Fettsäure-frei (BSA)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Silikonlösung in Isopropanol	Serva, Heidelberg
Spezifische Primer	TIB Molbiol, Berlin
Sterilfilter Minisart (0,22µM)	Sartorius, Göttingen
Streptomycin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin, TEMED	Biometra, Göttingen
Thermus "islandicus" (Thermoprime+) DNA-Polymerase	Advance Biotechnologies Ltd, Epsom, Surrey, U.K.
Transformierender Wachstumsfaktor-β1, TGF-β1	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Trichloressigsäure	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Tris Base	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	ICN, Eschwege
Zellkultureinsätze, Polycarbonat, 8 µM	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 75 cm ²)	Renner, Dannstadt
Zellkulturschalen TPP, 10 cm	Biochrom, Berlin
Zellschaber	Renner, Dannstadt
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	Biochrom, Berlin

2.1.3 Lösungen zur Zellkultivierung

XS52-Medium

Die Kultivierung der XS52 Zellen erfolgte in IMDM unter Zugabe von:

2,5 %	hitzeinaktiviertes FKS
2 mM	L-Glutamin
100 Einheiten/ml	Penicillin
50 µg/ml	Streptomycin
5 ng/ml	GM-CSF

Einfriermedium

10 %	DMSO
10 %	FKS
in	DMEM

Stop-Medium

10 %	hitzeinaktiviertes FKS
in	IMDM

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

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

Trypsin-EDTA-Lösung:

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

2.1.4 Oligonukleotide

DEPC-behandeltes Wasser

1/1000 Volumen (0,1 %) DEPC wurde deionisiertem Wasser über Nacht beigelegt, anschließend erfolgte eine Autoklavierung. DEPC-behandeltes Wasser diente zur Lösung der Oligonukleotide und zur Herstellung der Puffer, in denen diese eingesetzt wurden.

TE-Puffer (pH 7.6)

10 mM	Tris
1 mM	EDTA

ODN

Für die Antisense-Untersuchungen wurden die in Tab. 2.1.4A angegebenen Thioatgeschützte ODN der Firma TIB Molbiol verwendet:

Tab. 2.1.4A: Liste der verwendeten ODN

Protein	Kontroll-ODN	ASO-ODN
Smad3	5'-gtggacagctagagac-3'	5'-gcaggatggacgacat-3'
S1P ₁	5'-ttagcagctatggtgtccact-3'	5'-agtggacaccatagctgctaa-3'
S1P ₂	5'-tggtcaagcttaaccagcaggcc-3'	5'-ggttcagacaattccagcccagg-3'
S1P ₃	5'-gaagccatggcaaccacgcat-3'	5'-atgctggttgccatggcttc-3'
S1P ₄	5'-ccacagacccacaccaggccaa-3'	5'-accccagcacaccacaaaggcc-3'

Die Oligonukleotide (Synthesemaßstab 500 nM, OD 90) wurden in DEPC-behandeltem Wasser zu einer Endkonzentration von 500 µM gelöst.

Primer

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurden Primer der Firma TIB Molbiol (Synthesemaßstab 5 nM, OD 1) mit DEPC-behandeltem Wasser zu einer Konzentration von 100 µM gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser 10 µM Gebrauchslösungen hergestellt (Tab. 2.1.4B).

Tab. 2.1.4B: Primer für die semiquantitative PCR

Produkt	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
Smad2	5'-GCCGTCTTCAGGTTTCACA-3'	5'-TAGTATGCGATTGAACACC-3'
Smad3	5'-CGCCAGTTCTACCTCCAGTG-3'	5'-AAAGACCTCCCCTCCGATGT-3'
Smad4	5'-AGCCGTCCTTACCCACTGA-3'	5'-CTCAATCGCTTCTGTCCTG-3'

Für die Herstellung sämtlicher Primerlösungen für die Real-Time PCR wurde molekularbiologisches reines Wasser verwendet (Tab. 2.1.4C).

Tab. 2.1.4C: Primer für die Real-Time PCR

Produkt	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
S1P ₁	5'-TGGGAGCCTGAGAGAGGGA-3'	5'-TCATGGTATCACCAGGCCG-3'
S1P ₂	5'-ACCTGGAGCTCACAGCAGTCTATC-3'	5'-ACCCAACCCTCAGAACACAGA-3'
S1P ₃	5'-GTGGGCACGCTCTTTCATG-3'	5'-GACCTAGACCCACGGCCTC-3'
S1P ₄	5'-CCTGGCTGACATCTTTGGTTC-3'	5'-CATGCCACGCAGGTACTION-3'
S1P ₅	5'-TGACGCTTCCCAACCCTTT-3'	5'-TGCGCTTATTTGGCGAGTC-3'
LPA ₁	5'-AACAGTCTGAGGCAGCCCAA-3'	5'-GGAACCAGTATCTGAGCTAAAGGAAC-3'
LPA ₂	5'-CCATGTTGAATCAAGAACTGCG-3'	5'-CCAAACTTGTGAGGTCATGCAT-3'
LPA ₃	5'-TTAGTAAAAGCGCACAGGAAAGG-3'	5'-ACAAGCCGGAACCCACTG-3'
TβR-I	5'-GAAGCTCAGCCTGTAATCCTGCTA-3'	5'-TCTTGATGGCCACAGCCC-3'
TβR-II	5'-GCCGAAATTCCCAGCTT-3'	5'-CACACGATCTGGATGCCCT-3'

Oligonukleotide zur Fällung von aktiviertem Smad3

Zur Fällung des phosphorylierten Smad3-Proteins diente ein doppelsträngiges Segment des Promoters Smad-responsiver Gene, das durch die Zusammenlagerung folgender Oligonukleotide der Firma TIB Molbiol (Synthesemaßstab 5 nM, OD 1,2, zu 50 µM in DEPC-Wasser gelöst) vor Versuchsbeginn hergestellt wurde:

CAGA-Sense:

5`-TCGAGAGCCAGACAAGGAGCCAGACAAGGAGCCAGACACTCCAG-3`

Das Produkt liegt am 5`-Ende biotinyliert vor.

CAGA-Antisense:

5`-CTCGAGTGTCTGGCTCCTTGTCTGGCTCCTTGTCTGGCTCTCGA-3`

2.1.5 Plasmide

HA-Epitop markierter humaner TβR-I Rezeptor im pCMV5-Vektor, Ampicillinresistenz, freundlicherweise bereitgestellt durch Dr. Attisano und Dr. Wrana (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York)

HA-Epitop markierter humaner S1P₁-Rezeptor im pcDNA3.1(+)-Vektor, Ampicillinresistenz, freundlicherweise bereitgestellt durch Dr. Graeler (Medizinische Hochschule Hannover, Hannover)

GFP-Epitop markierter humaner S1P₁-Rezeptor im pcDNA3.1(-)-Vektor, Ampicillinresistenz, freundlicherweise bereitgestellt durch Prof. Dr. Hla (University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut)

2.1.6 Lösungen zur Zell-Lyse

RIPA-Puffer:

50 mM	Tris/HCL, pH 7.5
150 mM	NaCl
1 %	Nonidet P-40
0,5 %	Desoxycholinsäure
0,1 %	SDS
1 mM	EDTA

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

Oligonukleotid-Lysepuffer:

supplementiert mit	20 mM	Tris/HCl, pH 7.5
	150 mM	NaCl
	1 %	Nonidet P-40
	5 mM	EDTA
	1 mM	PMSF
	1 µg/ml	Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin

2.1.7 Lösungen für die Western-Blot-Analyse und die Elektrophorese von Agarose-Gelen

Agarosegel:

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

Blockpuffer:

5 % Magermilchpulver in TBST
3 % BSA (Fraktion V, fettsäurefrei) in TBST

Transferpuffer:

14,4 mg/ml Glycin
3,02 mg/ml Tris
in Aqua bidest

Laufpuffer (pH 8,3):

14,4 mg/ml Glycin
3,02 mg/ml Tris
1 mg/ml Natriumdodecylsulfat (SDS)
in Aqua bidest

Polyacrylamidgel (10 %):

10 µl Temed
60 µl Ammoniumpersulfat
3,0 ml Acrylamid/Bisacrylamid 40 %
2,4 ml Trenngelpuffer
1,2 ml SDS-Lösung (1 %)
5,4 ml Aqua bidest

Sammelgelpuffer (pH 6,8):

0,5 M	Tris
48%	1 M-HCl
in	Aqua bidest

TBE-Puffer (pH 8)

445 mM	Tris
445 mM	Borsäure
10 mM	EDTA

TBST-Puffer:

2 mM	Tris (pH 7,4)
15 mM	NaCl
0,05 %	Tween 20
in	Aqua bidest

Trenngelpuffer (pH 8,8):

1,88 M	Tris
30 %	1 M-HCl
in	Aqua bidest

2.1.8 Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie

Mowiol-Lösung (pH 7,4):

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

2.2 Methoden

2.2.1 Lösungen der Testsubstanzen

S1P wurde in Methanol zu 5×10^{-4} M gelöst und bei -80 °C gelagert. Für Zellkulturexperimente mit S1P wurde das Methanol der Stammlösung unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand mit 0,4 % BSA in PBS (sterilfiltriert) gelöst. Zur vollständigen Lösung des Rückstands wurde die S1P-BSA-Suspension für 3 min unter Eiskühlung in einem Ultraschallbad behandelt. Die eingesetzte Verdünnung betrug 1×10^{-4} M, aus dieser wurden weitere Verdünnungen mit 0,4 %iger BSA-Lösung hergestellt.

TGF- β wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,1 % BSA in 4 mM HCl/PBS gelöst und wie die Stammlösungen von MIP-3 α (25 μ g/ml in 0,1 % BSA in PBS) und LPA (5×10^{-4} M in Aqua bidest) bei -80 °C gelagert.

PD 098058 wurde mit einer Stammkonzentration von 50 μ M in DMSO gelöst und wie die Stammlösung von SB 431542 (10 μ g/ml in DMSO) in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. Gefriergetrocknetes PTX wurde in Aqua bidest zu 100 μ g/ml gelöst und bei 4 °C gelagert.

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

2.2.2 Kultur von Säugetierzellen

2.2.2.1 Kultivierung von XS52 Zellen

XS52 Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ gehalten. Die Kultivierung von XS52 Zellen erfolgte in IMDM. FKS wurde grundsätzlich durch Erhitzen auf 56 °C für 30 min inaktiviert. Als Wachstumsfaktor für XS52 Zellen diente GM-CSF (5 ng/ml). XS52 Zellen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Takashima (Dallas, Texas) bereitgestellt.

2.2.2.2 Passagierung von XS52 Zellen

Nachdem die Zellen einen Konfluenzgrad von 80 - 90 % erreichten (üblicherweise nach 3 - 4 d), wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch Zusatz von 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung bis zum Ablösen im Brutschrank inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml Stop-Medium beendet. Die Zellen wurden mit einer Pipette homogenisiert und in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C). Nach einem Waschvorgang mit 10 ml PBS wurden die Zellen in Wachstumsmedium aufgenommen und mit einer Zellzahl von 2 - 2,5 x 10⁶ Zellen in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 13 ml vorgelegtem Wachstumsmedium ausgesät.

2.2.2.3 Lagerung und Reaktivierung von XS52 Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden Zellen mit einem Konfluenzgrad von 80 - 90 % durch die Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung/Stop-Medium zunächst aus der Kulturflasche gewonnen und nach der Zentrifugation bei 300 g, 4 °C für 5 min mit einer Zelldichte von 2 x 10⁶ Zellen/ml in Einfriermedium resuspendiert. 1,5 ml dieser Zellsuspension wurde in Cryoröhrchen überführt und in einer speziellen Einfrierbox für mindestens 2 Wochen bei -80 °C gelagert, bevor sie in -196 °C kalten flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Die Reaktivierung der Zellen erfolgte durch schnelles Auftauen bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 13 ml vorgelegtem Wachstumsmedium überführt. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und 13 ml frisches Wachstumsmedium in die Zellkulturflasche gegeben.

2.2.3 Kultivierung von Escherichia coli Bakterien

2.2.3.1 Plattenkultur

Agar-Agar wurde in einer Konzentration von 15 g/l in LB-Medium (25 g Luria broth in 1 l Aqua bidest) gelöst und anschließend im Autoklaven sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf 55 °C wurde für die Selektion von transformierten Escherichia colis (E.

colis) Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml in die Agar-Agar-Lösung zugegeben. Da sämtliche unter Punkt 2.1.5 aufgelisteten Plasmide eine Ampicillinresistenz aufweisen, war auf dem Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) Medium die Gewinnung der transformierten E. coli möglich, während das Wachstum von nicht transformierten E. coli durch das Antibiotikum unterbunden wurde. Das warme Medium, welches gegebenenfalls für die Selektion von Transformanten mit Ampicillin (100 µg/ml) supplementiert war, wurde in sterilen Petrischalen ausgegossen. Nach dem Erkalten des Mediums wurden die Petrischalen bei 4 °C über mehrere Wochen unter Lichtausschluss gelagert.

Das Animpfen einer Plattenkultur erfolgte durch Ausstreichen einer Glycerol- oder Flüssigkultur in Form eines Gittermusters mit Hilfe einer sterilen Impföse. Nach dem Ausplattieren wurden die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Bis zur eigentlichen Verwendung wurden die mit E. coli kultivierten Platten bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

2.2.3.2 Flüssigkultur

Eine Einzelkolonie wurde mit einer sterilen Impföse aus einer Plattenkolonie abgenommen und in 3 ml steriles LB-Medium, welches gegebenenfalls für die Selektion von Transformanten mit Ampicillin (100 µg/ml) supplementiert war, okuliert. Die Kulturen wurden über Nacht in einem Schüttler bei 37 °C inkubiert.

Diese Vorkultur wurde zum Animpfen von größeren Kulturen im Verhältnis von 1:100 bis 1:1000 genutzt.

2.2.3.3 Lagerung und Reaktivierung von E. coli

1 ml einer Übernacht-Flüssigkultur wurde mit 1 ml einer 70 %igen Glycerol-Lösung vermischt und zunächst bei -80 °C in einem Cryoröhrchen eingefroren. Nach 14 d erfolgte die Überführung der Bakterien in -196 °C kalten flüssigen Stickstoff.

Für die Reaktivierung dieser Glycerolkultur wurden die bei Raumtemperatur aufgetauten Bakterien mit einer Impföse in eine Plattenkultur oder eine Flüssigkultur übertragen.

2.2.4 Transformation und Expression in *E. coli*

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden 50 µl kompetente *E. coli* Zellen aufgetaut und mit 1 µg plasmidischer DNA auf Eis versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte die Plasmidaufnahme der Bakterien durch einen Hitzeschock für 30 s bei 42 °C auf dem Heizblock. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium und Inkubation für 30 min bei 37 °C wurden die Zellen zur Selektion von Transformanten auf Ampicillin-haltigen Agarplatten (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine transformierte Kolonie wurde mit einer Impföse von der Agarplatte geerntet und zunächst in einer 3 ml Ampicillin-haltigen Flüssigkultur (100 µg/ml) über Nacht vermehrt. Diese Vorkultur wurde dann für das Animpfen einer 200 - 250 ml Flüssigkultur im Verhältnis von 1:100 bis 1:1000 verwendet. Die transformierten Bakterien wurden bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von OD = 0,6 inkubiert und anschließend für 60 min bei 6000 g abzentrifugiert. Für die Präparation der Plasmid-DNA wurde das QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dieses Kit beinhaltet: Puffer P1 (Resuspensionspuffer; 50 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A), Puffer P2 (Lysepuffer; 200 mM NaOH, 1 % SDS), Puffer P3 (Neutralisationspuffer, 3,0 M Kalium-acetat pH 5,0), Puffer QBT (Equilibrierungspuffer; 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Isopropanol, 0,15 % Triton® X-100), Puffer QC (Waschpuffer; 1,0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Isopropanol), Puffer QF (Elutionspuffer; 1,25 M NaCl, 50 mM Tris pH 8,5, 15 % Isopropanol), QIAGEN-tip 100 Säule, QIAfilter Cartridge. Die Plasmid-DNA wurde wie folgt gewonnen: nachdem die Zellen unter alkalischen Bedingungen in Puffer P1 für 5 min lysiert wurden, erfolgte die Neutralisation der Lysereaktion durch Zugabe von Puffer P3, der zusätzlich die Komplexierung von denaturierten Proteinen, chromosomaler DNA und Zelltrümmern bewirkte. Dieser Komplex wurde durch Filtration von der in Lösung befindenden plasmidischen DNA über die QIAfilter Cartridge getrennt. Eine weitere Aufreinigung erfolgte durch Filtration über eine mit Puffer QBT equilibrierte Quiagen-tip 100 Säule, in der Plasmid-DNA auf dem Anionen-Austauscher Harz zurückgehalten wurde und Verunreinigungen mit dem Filtrat entfernt wurden. Das mit dem Puffer QF eluierte Plasmid wurde mit Isopropanol ausgefällt, abzentrifugiert und nochmals mit 70-prozentigem Ethanol zum Entsalzen gewaschen. Nach Entfernen des Ethanols wurde das Plasmid in 100

μl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst, photometrisch bei 260 nm vermessen und für die langfristige Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.5 Transfektion von Plasmiden in XS52 Zellen

Für die Transfektion wurden $10.000 - 15.000$ Zellen/ cm^2 im Wachstumsmedium ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten d wurde das gewünschte Plasmid (mit einer Endkonzentration von $0,75\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ in der Zellkultur) zu einem Volumen von $100\text{ }\mu\text{l}$ OptiMEM (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und mit Fugene 6[®]-Transfektionsreagenz (Roche, Penzberg) im Verhältnis 1:2,5 ($1\text{ }\mu\text{g}$ DNA entspricht $2,5\text{ }\mu\text{l}$ Fugene 6[®]-Transfektionsreagenz) versehen. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden pro Zellansatz $100\text{ }\mu\text{l}$ des Transfektionsgemisches zupipettiert und die behandelten Zellen für 3 d im Brutschrank inkubiert.

2.2.6 Antisense Untersuchungen

Um die Eigenschaften von Signalproteinen und Rezeptoren hinsichtlich zellulärer Prozesse näher zu untersuchen, wurden Antisense-ODN eingesetzt, die durch Hemmung der Translation die Expression des gewünschten Proteins reduzieren. Antisense-ODN wurden so konstruiert, dass sie komplementär mRNA im Bereich der Initiationsstelle binden, da auf diese Weise eine effektive Hemmung der Translation erzielt wird. Oligonukleotide, bestehend aus identischen Nukleotiden in zufälliger Sequenz, wurden als Kontrollen eingesetzt. Durch Einbau von Phosphothioat-Gruppen konnte die Halbwertszeit der ODN wesentlich verlängert werden, da nicht geschützte ODN aufgrund der im Medium enthaltenen Nukleasen sehr schnell abgebaut werden. Für Antisense Untersuchungen wurden XS52 Zellen mit einer Zelldichte von $10.000 - 15.000$ Zellen/ cm^2 im Wachstumsmedium ausgesät. Am nächsten d erfolgte die Transfektion der Zellen. Die ODN (mit einer Endkonzentration von $100 - 250\text{ nM}$ in der Zellkultur) wurden zu einem Volumen von $100\text{ }\mu\text{l}$ OptiMEM zugegeben und mit Fugene 6[®]-Transfektionsreagenz im Verhältnis 1:2 ($1\text{ }\mu\text{g}$ DNA entspricht $2\text{ }\mu\text{l}$ Fugene 6[®]-Transfektionsreagenz) versehen. Nach 15 min Inkubation

wurden pro Zellansatz 100 µl des Transfektionsmix zupipettiert und die behandelten Zellen für 3 d im Brutschrank inkubiert.

Die Reduktion der Proteinexpression nach Antisense-ODN Behandlung wurde über eine Westernblot-Analyse bestimmt.

2.2.7 Untersuchung der mRNA-Transkription

2.2.7.1 Isolierung der mRNA

Zur Isolierung von mRNA aus XS52 Zellen wurde das Quick-Prep™ Micro mRNA Aufreinigungskit der Firma Amersham (Freiburg) verwendet. Dieses Kit beinhaltete: Oligo(dT)-Zellulose (25 mg/ml), Extraktionspuffer (enthält Guanidium-Thiocyanat und N-Lauryl-Sarkosin), „High salt“ Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl), „Low salt“ Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl), Elutionspuffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA), Glucogen-Lösung (5 - 10 mg/ml in DEPC-Wasser), Kalium-acetat-Lösung (2,5 M pH 5,0), MicroSpin Säulen. Zunächst wurden die Zellen gesplittet und 1ml einer PBS-haltigen Zellsuspension (10^6 Zellen/ml) in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 10.000 g erfolgte die Lyse des Zellpellets in 400 µl Extraktionspuffer, dessen Zusatz gleichzeitig endogene RNAsen inhibierte. Durch Verdünnung des homogenisierten Extrakts mit 800 µl Elutionspuffer wurde eine erste Aufreinigung durch Präzipitation enthaltener Proteine erreicht. Nach Zentrifugation bei 10.000 g wurde 1 ml des Überstandes auf Oligo(dT) Cellulose pipettiert, an der die polyA-haltige mRNA adsorbieren konnte. Die an Oligo(dT) Cellulose gebundene mRNA wurde in eine MicroSpin Säule überführt und 5 mal mit 1 ml „High salt“ Puffer und 3 mal mit 1 ml „Low salt“ Puffer gewaschen, bevor die mRNA mit 400 µl 70 °C warmen Elutionspuffer eluiert wurde. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Aus der UV-Absorption konnte die mRNA-Konzentration wie folgt berechnet werden:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times 40 \text{ µg/ml}$$

Nach der Gehaltsbestimmung wurde die mRNA durch Zugabe von 10 µl Glucogen-Lösung, 40 µl Kalium-acetat-Lösung und 1 ml eiskaltem 96 %igem Ethanol durch einstündige Lagerung bei -20 °C präzipitiert.

Nach der Zentrifugation (4 °C, 30 min, 10.000 g) wurde die mRNA für den weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.2.7.2 Synthese von cDNA

Für die Gewinnung einzelsträngiger cDNA wurden zunächst 500 ng mRNA in 10 µl DEPC-Wasser gelöst und mit 1 µl Oligo(dT)-Primer (1 pmol) versetzt. Dieser Ansatz wurde zur Auflösung von Sekundärstrukturen für 3 min bei 80 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 37 °C abgekühlt. Daraufhin wurden 9 µl des folgenden Reaktionsgemisches zugegeben: 4 µl 5-fach konzentrierter Reaktionspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µl RNAsin™ Ribonuklease-Inhibitor (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) und 1 µl (200 U) Superscript™ Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe). Die Negativkontrollen enthielten anstatt der Superscript™ Reverse Transkriptase 1 µl DEPC-Wasser. Dieser Ansatz wurde zur reversen Transkription der mRNA für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die noch enthaltene mRNA durch Zugabe von 20 µl NaOH-Lösung (0,4 M) durch 10 min Inkubation bei 37 °C inaktiviert. Nach Neutralisation mit 20 µl Tris/HCl-Lösung (1 M, pH 7,5) wurde die cDNA direkt für die PCR-Analyse verwendet oder für den späteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.2.7.3 Amplifizierung von DNA mittels PCR

Für die Amplifizierung von DNA wurde die thermostabile *Thermus "islandicus"* (Thermoprime+) DNA-Polymerase plus (Advance Biotechnologies Ltd, Epsom, Surrey, U.K.) verwendet. 1 µl cDNA Lösung (äquivalent zu 8 ng umgeschriebene mRNA) wurde mit folgenden Reagenzien versetzt: 5 µl 10-fach konzentrierter Reaktionspuffer (200 mM (NH₄)₂SO₄, 750 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% V/V Tween 20), 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 3 µl MgCl₂-Lösung (25 mM), 0,25 µl *Thermus „islandicus“* DNA-Polymerase plus (1,25 U), je 2,5 µl der 3'- und 5'-Primer (5 µM), 34,75 µl DEPC-Wasser. Die Amplifizierung der gewünschten DNA Sequenz erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem Reaktionsablauf:

- Denaturierung der doppelsträngigen cDNA durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 94 °C für 1 min
- Anlagerung der Primer bei 55 °C für 1 min
- Polymerisation der komplementären DNA-Stränge bei 72 °C für 2 min

Je nach mRNA Transkript wurden 28 - 35 Zyklen durchlaufen. Die PCR-Amplikons wurden elektrophoretisch in 2 %igen Agarosegelen getrennt und anschließend nach Ethiumbromid-Färbung im UV-Licht bei 254 nm bzw. 364 nm detektiert.

2.2.7.4 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR Technologie erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Die Detektion der PCR-Amplifikate erfolgte durch Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green, der nach Interkalation mit doppelsträngiger DNA stark fluoresziert, während in Gegenwart einzelsträngiger DNA nur eine schwache Fluoreszenz ausgelöst wird. Dies führt mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Für die Amplifikation wurde ein ABI PRISM 7900HT der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA) verwendet. Die Reaktionsansätze (250 nM der 3'- und 5'-Primer, 1xSYBR Green Master Mix) mit je 2 µl cDNA enthaltend (äquivalent zu 200 ng mRNA) wurden jeweils in Triplikaten im 96 Well Format mit einem Gesamtvolumen von 10 µl pro Well angesetzt. Für das Design der in Tab.2.1.4C aufgelisteten Primer wurde die Software Primer Express der Firma Applied Biosystems verwendet. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung für 10 min bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen mit 15 s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C für Hybridisierung und Amplifikation. Nach jeder Reaktion wurde abschließend eine Dissoziationskurve zur Analyse von möglichen Primerdimeren durchgeführt. Im Anschluss an die Normalisierung der einzelnen Daten gegen β -Aktin als Referenzgen wurde die relative mRNA Expression quantifiziert.

2.2.8 Proteinanalytische Methoden

2.2.8.1 Zellyse mit RIPA Puffer

Zur Gewinnung des Zelllysats wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis in einem entsprechenden Volumen RIPA-Puffer für 5 min auf einem Schaukelschüttler inkubiert. Dem Puffer wurden vor jeder Lyse frisch die Proteasehemmer Aprotinin (10 mg/ml), Leupeptin (10 mg/ml), Pepstatin (10 mg/ml), Phenylmethylsulfonylfluorid (1 mM) sowie gegebenenfalls zur Detektion von phosphorylierten Proteinen Natriumorthovanadat (1 mM) zugegeben. Nach Überführung des Zelllysats in ein Eppendorfgefäß wurden die restlichen Zellbestandteile bei 4 °C und 10.000 g für 30 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden direkt für die Westernblot-Analyse verwendet oder einer Immun- bzw. DNA-Präzipitation unterzogen.

2.2.8.2 Proteinbestimmung

Die Quantifizierung des Proteingehalts der einzelnen Zelllysate erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Bradford. An Protein gebundenes Coomassieblau bewirkt einen Farbumschlag von braunrot nach braungrün, der bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt wird. Nach Aufnahme einer Standardkurve mit verschiedenen BSA-Konzentrationen (0 - 10 µg) erfolgte die Proteinbestimmung von 5 µl Lysat, welches zuvor in 95 µl Aqua bidest verdünnt und mit 1 ml Bradford-Reagenz versehen wurde. Die Extinktionswerte der BSA-Konzentrationen wurden einer Regressionsanalyse unterzogen und der Proteingehalt der Proben anhand folgender Gleichung ermittelt:

$$\begin{array}{l} F(x) \quad = \quad a+bx^c \\ \text{wobei} \quad x \quad = \quad \mu\text{g BSA} \\ \quad \quad \quad F(x) \quad = \quad \text{Extinktion bei 595 nm} \end{array}$$

Die Proteinmenge ergibt sich wie folgt:

$$\text{Protein } [\mu\text{g}] = [(f(x)-a)/b]^{1/c}$$

2.2.8.3 Probenaufbereitung der Proteinlysate für die direkte Westernblot-Analyse

Für die Westernblot-Analyse wurden die 20 - 50 µg Lysatprotein äquivalenten Volumina im Verhältnis 2:1 mit dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer (New England Biolabs, Beverly, MA) vermischt und anschließend für 5 min auf 95 °C zur Denaturierung der Proteine erhitzt. Die aufbereiteten Proben konnten direkt für die Gelelektrophorese verwendet oder für die Analyse zu einem späteren Zeitpunkt bei -80 °C gelagert werden.

2.2.8.4 Immunpräzipitation von Proteinen

Für die Immunpräzipitation wurden 1 ml Lysat (mit einer Proteinmenge von 1 - 2 mg) mit 2 µg Antikörper pro 1 mg Protein versetzt und auf dem Schaukelschüttler über Nacht bei 4 °C inkubiert. Durch Zugabe von 25 µl Protein G-Agarose, welche an den Fc-Teil aller IgG-Antikörper bindet, wurde der Immunkomplex gebunden und anschließend bei 4 °C und 10.000 g abzentrifugiert. Die Immunpräzipitate wurden 3 mal mit RIPA gewaschen, in 60 µl zweifach konzentrierten-SDS-Probenpuffer (New England Biolabs, Beverly, MA) aufgenommen und zur Denaturierung und Eluierung der Proteine aus dem Protein G Agarose-Komplex für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die so gewonnenen Proben wurden bei -80 °C gelagert oder direkt für die Westernblot-Analyse verwendet.

2.2.8.5 DNA-Präzipitation von Proteinen

DNA-Affinitäts-Untersuchungen erlauben die gezielte Charakterisierung von Signalproteinen an Promotorregionen der DNA. Zur näheren Bestimmung der Smad3-Aktivierung wurde das Bindungsverhalten an dem Promotor des PAI1-Gens untersucht, welches ein responsives Smad3-Gen darstellt und nur von phosphoryliertem Smad3 gebunden wird. Ein doppelsträngiges DNA-Fragment bestehend aus drei aufeinander folgenden CAGA-Sequenzen simulierte die Promotor-Region des PAI1-Gens. Nach Stimulation der Zellen wurden diese einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, in autoklaviertem Oligonukleotid-Lysepuffer aufgenommen und anschließend bei 4 °C und 10.000 g für 30 min zentrifugiert. 1000

μg Protein wurden $1,3 \mu\text{l}$ einer Reaktionsmischung bestehend aus $0,312 \mu\text{l}$ biotinyliertem CAGA-sense ($50 \mu\text{M}$), $0,312 \mu\text{l}$ CAGA-Antisense ($50 \mu\text{M}$), $0,026 \mu\text{l}$ MgCl_2 ($0,5 \text{ M}$), $0,026 \mu\text{l}$ NaCl (5 M) und $0,624 \mu\text{l}$ DEPC-Wasser zugesetzt. Die Zusammenlagerung der Oligonukleotide erfolgte im Vorfeld durch Erhitzen der Reaktionsmischung auf $65 \text{ }^\circ\text{C}$ für 2 min . Um unspezifische Bindungen von Proteinen an dem Oligonukleotidstrang zu reduzieren, wurde jede Probe mit $3 \mu\text{l}$ einer Polydl-dC-Lösung versetzt, die durch Lösen von 10 Polydl-dC Einheiten in $220 \mu\text{l}$ 50 mM NaCl enthaltenen TE-Puffer hergestellt wurde. Zur Bindung von phosphoryliertem Smad3 an dem synthetisierten Promotorfragment wurden die Ansätze 1 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf dem Schaukelschüttler inkubiert. Die an dem biotinyliertem Oligonukleotidstrang gebundenen Proteine konnten durch halbstündige Inkubation mit $80 \mu\text{l}$ Streptavidin-Agarose und anschließender Zentrifugation (10 min , 10.000 g) präzipitiert werden. Streptavidin-Agarose bindet hochaffin an vier Stellen des an CAGA gekoppelten Biotins, so dass eine Fällung des Komplexes möglich war. Die Präzipitate wurden dreimal mit 1 ml Oligonukleotid-Lysepuffer gewaschen und in $50 \mu\text{l}$ einfach konzentriertem SDS-Probenpuffer (New England Biolabs, Beverly, MA) durch kurzzeitiges Erhitzen auf $95 \text{ }^\circ\text{C}$ für die anschließende Westernblot Analyse aufbereitet. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese erfolgte die Detektion des an das CAGA-Fragment gebundene aktivierte Smad3-Protein mit einem monoklonalen anti-Smad1,2,3 Antikörper.

2.2.8.6 SDS-Gelelektrophorese

Abhängig vom Molekulargewicht wurden die Proben unter denaturierten und reduzierenden Bedingungen in $7,5 - 15 \%$ igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Das eigentliche Trenngel wurde zu diesem Zweck mit einem 5% igem Sammelgel überschichtet. Die Elektrophorese fand bei 35 mA im Sammelgel und bei 55 mA im Trenngel in einer mit 500 ml Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer statt.

2.2.8.7 Westernblot- und Immunoblot-Analyse

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf Polyvinyliden-difluorid (PVDF)-Membranen transferriert, die zunächst zur besseren Übertragung der Proteine in Methanol hydrophobisiert wurden. Der Transfer erfolgte in einem mit 1100 ml

Blotpuffer gefüllten Tankblot bei 100 mA über Nacht. Um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern, wurden die Membranen zunächst durch 1 h Inkubation bei 37 °C in 5 % Magermilchlösung in TBST-Puffer geblockt. Nach 3 Waschschritten mit TBST-Puffer für 5 min bei Raumtemperatur erfolgte in Abhängigkeit des nachzuweisenden Proteins die Behandlung mit dem Primärantikörper (1:1000 in Aqua bidest verdünnt) entweder für 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht auf dem Schaukelschüttler. Danach wurde die Lösung des Primärantikörpers entfernt und die Membran wiederholt dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Meerrettich Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (1:1000) in der Blocklösung für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBST-Puffer wurden die Antikörper-markierten Proteine mit dem Lumiglo-Kit® (New England Biolabs, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers detektiert. Die Bereiche, in denen der sekundäre Antikörper bindet, zeigten eine Chemolumineszenz, die bei Kontakt mit einem lichtempfindlichen Film in einer Expositionskassette eine Schwarzfärbung erzeugten. Für die Detektion von weiteren Proteinen wurden die Antikörper von der Membran durch Inkubation in 50 ml Strippuffer (50 mM Tris pH 6,8, 100 mM β -Mercaptoethanol, 2 % SDS) bei 50 °C, 20 min entfernt und einem erneuten Immunoblot unterzogen.

2.2.9 Migrationsassay

Zur Bestimmung der Migration von XS52 Zellen diente eine modifizierte Boyden-Kammer.

Zellkultureinsätze mit Polycarbonatmembranen mit einer Porengröße von 8 μ M wurden für 1 h bei 37 °C mit je 75 μ l einer Fibronectin-Lösung (3 μ g/ml) beschichtet und anschließend unter der Sterilbox getrocknet. Für die weitere Verwendung konnten die beschichteten Zellkultureinsätze bei 4 °C gelagert werden.

Die zuvor in 75 cm² Flaschen über 3 d kultivierten XS52 Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsiniert, abgestoppt und im frischen Wachstumsmedium mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. 500 μ l dieser Zellsuspension wurden in die Filter pipettiert, die zuvor in 24 Lochplatten mit je 500 μ l der Testsubstanz enthaltendem Wachstumsmedium eingesetzt wurden. Um zwischen Chemokinese und Chemotaxis zu unterscheiden, wurde der Konzentrationsgradient

durch Zugabe der gleichen Konzentration an Testsubstanz in die Zellsuspension aufgehoben. Nach 5 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ wurden die Zellen für 2 min mit 96 %igem Ethanol fixiert und die sich an der Oberseite der Membran befindenden Zellen mit einem Wattestäbchen entfernt. Die migrierten Zellen wurden mit GIEMSA-Lösung für 1 h bei 37 °C angefärbt und anschließend unter einem Lichtmikroskop in 10 unterschiedlichen Feldern pro Probe ausgezählt.

2.2.10 Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenexpression von Proteinen

Die FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter)-Analyse erlaubt die Differenzierung von mehreren Zellpopulationen anhand deren Größe (Forward scatter (FSC)) und deren Granularität (sideward scatter (SSC)), die über die Veränderung der Beugung und Streuung eines monochromatischen Laserstrahles in Abhängigkeit der Zellanzahl und -beschaffenheit in einem Flüssigkeitsstrom bestimmt werden. Zusätzlich zu den zellcharakteristischen Größen ist die quantitative Analyse von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen durch Markierung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern beziehungsweise fluoreszierenden Farbstoffen möglich.

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression von Proteinen wurden die Zellen mit Zielprotein-spezifischen fluoreszenzkonjugierten Antikörpern markiert und anschließend hinsichtlich der Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch analysiert. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch den Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle und erlaubt somit eine Aussage über die Expression von Oberflächenmolekülen.

2.2.10.1 Präparation der Zellen zur Detektion der Oberflächenexpression von Proteinen über die FACS-Analyse

XS52 Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen / Loch in 6-Loch-Platten ausgesät und am darauf folgenden d mit dem gewünschten Rezeptor-Plasmid, wie in Punkt 2.2.5 beschrieben, transfiziert. Nach der Transfektion erfolgte eine 30-minütige Inkubation der XS52 Zellen mit den Testsubstanzen oder den Kontrollvehikeln. Im

Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA/Stop-Medium geerntet, in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 300 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden einem weiteren Waschvorgang mit PBS unterzogen, bevor die Immunfärbung durchgeführt wurde.

Die Immunfärbung des HA-Epitops exogen exprimierender Fusionsproteine in XS52 Zellen erfolgte mit einem FITC-konjugierten Anti-HA Antikörper. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit 200 µl einer FITC-konjugierten Anti-HA Antikörper-Lösung einer Konzentration von 1,67 µg/ml für 1 h auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Nach der Immunfärbung wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und nach dem letzten Waschvorgang zur anschließenden FACS-Analyse in 200 µl PBS aufgenommen.

2.2.10.2 Einstellung des Durchflusszytometers und Messung

Zunächst erfolgte die Anpassung des Durchflusszytometers an die Zellpopulation bezüglich deren Größe (FSC) und Granularität (SSC) durch Änderung der Parameter FSC und SSC im Dot Plot. Anschließend wurde die Eigenfluoreszenz der Zellen an ungefärbten Zellen durch Einstellung der FL1 ($\lambda = 525 \text{ nm}$)- und FL2 ($\lambda = 575 \text{ nm}$)-Intensitäten einander abgeglichen. Die Autofluoreszenz der Zellen sollte sich bei beiden Emissionswellenlängen im linken unteren Quadranten des Dot Plots befinden. Da für die Quantifizierung der Oberflächenexpression von Proteinen mit einem FITC-konjugierten Antikörper die Messung eines Fluoreszenzsignals (FL1, 525nm) ausreichend ist, wurden die Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Zellzahl in einem Histogramm dargestellt. Nach diesen Grundeinstellungen erfolgte die Analyse der Proben. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des FITC-konjugierten Anti-HA Antikörpers wurden nicht transfizierte Zellen mit dem Antikörper im Vorfeld inkubiert und gemessen. Die Fluoreszenzintensitäten der unspezifischen Bindung des Antikörpers dienten als Kontrollwert für die Analyse der Oberflächenexpression von HA-Epitop markierten exogen exprimierten Fusionsproteinen. Transfizierte Zellen, deren exogenes Protein an der Zellmembran exprimiert wurde, konnten an einem zweiten Peak mit höheren Fluoreszenzintensitäten im Histogramm erkannt werden, so dass zusätzlich die Bestimmung der Transfektionseffizienz mit dieser Methode möglich war. Eine verringerte Oberflächenexpression von Proteinen zeigte sich an einer Verkleinerung

des zweiten Peaks im Histogramm. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Software winmdi Version 2.8.

2.2.11 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Oberflächenexpression von Proteinen am konfokalen Mikroskop

Im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie bietet die konfokale Mikroskopie die Möglichkeit, dreidimensionale Bilder von Zellen darzustellen und erlaubt somit die exakte Lokalisation von zellulären Strukturen in der Zelle. Dadurch kann die Membranständigkeit von Rezeptoren exakt detektiert werden und Internalisierungsprozesse können durch die dreidimensionale Abrasterung der Zelle eindeutig dargestellt werden. Im Folgenden diente die konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Bestimmung der S1P₁-Internalisierung an GFP-Epitop markierten S1P₁ transfizierten XS52 Zellen und der TβR-I-Internalisierung an HA-Epitop markierten TβR-I transfizierten XS52 Zellen.

2.2.11.1 Zellstimulation und –präparation für die mikroskopische Analyse

XS52 Zellen wurden mit einer Zelldichte von 25×10^4 Zellen/Loch in 12-Loch-Platten ausgesät, in denen im Vorfeld Deckgläser eingesetzt worden waren. Am Folgetag wurden die Zellen mit dem entsprechenden Plasmid wie in Punkt 2.2.5 beschrieben transfiziert. Nach der Transfektion erfolgte eine 30-minütige Inkubation der XS52 Zellen mit den Testsubstanzen oder den Kontrollvehikeln. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit -20 °C kaltem Methanol für 4 min auf Eis fixiert. Der Einsatz eines weiteren Reagenz zur Permeabilisierung der Membran war nicht notwendig, da Methanol bereits eine Membranpermeabilisierung durch das Lösen von Membranlipiden verursacht.

XS52 Zellen, die ein HA-Epitop markiertes Protein exprimierten, wurden nach dreimaligem Waschen mit 1 %iger BSA/PBS Lösung für 30 min bei Raumtemperatur geblockt und anschließend mit 200 µl einer FITC-konjugierten Anti-HA Antikörper-Lösung (1,67 µg/ml) in PBS für 1 h auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschvorgang mit PBS wurden die Deckgläschen aus der 12-Loch-Platte entfernt und zum Trocknen für 15 min an der Luft bei Raumtemperatur inkubiert. Für die weitere Verwendung wurden die Deckgläschen

mit 10 µl Mowiol-Lösung auf Objektträgern fixiert und anschließend unter Lichtausschluss gelagert. Die mikroskopische Analyse der Proben erfolgte am konfokalen Mikroskop LSM-510 Meta (Zeiss, Jena).

Für die Analyse von GFP (Green Fluorescent Protein)-Epitop markierten Proteinen war keine Immunfärbung mit fluoreszenz-markierten Antikörpern nötig, da GFP bereits ein fluoreszierendes Chromophor enthält und bei Lichtanregung ($\lambda = 488 \text{ nm}$) Licht mit einer Wellenlänge von 509 nm emittiert. Die Deckgläschen, auf denen die GFP-Epitop markierten Protein transfizierten Zellen kultiviert waren, wurden direkt nach der Stimulation mit den entsprechenden Testsubstanzen und dem Fixieren der Zellen mit Methanol für die mikroskopische Analyse mit 10 µl Mowiol-Lösung auf Objektträgern fixiert.

2.2.12 Statistik

2.2.12.1 Datenpräsentation

Sämtliche Ergebnisse sind als arithmetische Mittel (MW) angegeben. Als Maß für die Streuung wurde die Standardabweichung ($\pm \text{SD}$) berechnet.

2.2.12.2 Statische Beurteilung

Für die Prüfung auf Signifikanzen diente der *Student's t*-Test. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % festgelegt ($p \leq 0,05$).

Prüfung auf Normalverteilung: Die Prüfung auf Normalverteilung, die als Voraussetzung für die Prüfung auf Signifikanz mithilfe des *Student's t*-Test gilt, wurde mit dem *Shapiro-Wilk*-Test durchgeführt.

Testung auf Varianzhomogenität: Die Prüfung auf Varianzhomogenität von normal verteilt anzusehenden Größen wurde mithilfe des *F*-Tests nach *Fischer* durchgeführt, bevor der Vergleich auf Signifikanz zweier Stichproben durch Anwendung des *Student's t*-Test erfolgte.