

5. Material

5.1. Geräte

Begasbarer Brutschrank	BB16, Heraeus (Osterode)
Elektrophorese-Apparatur	-GNA 200, Pharmacia Biotech (Cambridge, England) -Miniprotean® II, Bio-Rad (München)
Elektrophorese-Power-Supply	-EPS 300, Pharmacia Biotech (Cambridge, England) -Modell 1000/500, Bio-Rad (München)
ELISA-Reader	Modell 550 Bio-Rad (München)
Gefriertrocknungsmaschine	Alpha 1-4, Christ (Osterode)
Meßwaagen	-Präzisionswaage Kern 474, Gottl. Kern & Sohn, (Albstadt) -Typ 2662, Sartorius (Göttingen)
Mikroskop	Leica (Bensheim)
pH-Meter	-Knick (Berlin) -pH 526, WTW (Weilheim)
PhosphoImager	BAS 1500 Fuji (Kanagaba, Japan)
Sterilbank	BSB 4A Gelaire Flow Laboratories (Opera, Italien)
Scintillationszähler	Tri-Carb 1900 CA, Packard (Downers Grove, IL, USA)
Thermocycler	Mastercycler 5330, Eppendorf, (Hamburg)
Thermomixer	comfort, Eppendorf, (Hamburg)
Ultraschallbad	Bandelin, Sonorex TK 52 Transistor (Berlin)
UV-Photometer	Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech (Cambridge, England)
Zentrifugen	Tischzentrifuge: Biofuge fresco und pico, Heraeus (Osterode)

5.2. Zelllinie

Die Experimente wurden größtenteils mit der immortalisierten Keratinozytenzelllinie HaCaT (Boukamp et al., 1988) durchgeführt, die uns von Prof. Dr. N. E. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde.

5.3.1. Chemikalien

Salze und Puffersubstanzen wurden von Merck (Darmstadt), Sigma (München) oder Roth (Karlsruhe) bestellt. Lösungsmittel und Lösungen wurden in analytischer Qualität von den Firmen J.T.Baker (Deventer, NL), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen. Spezielle Substanzen wurden von nachfolgend aufgelisteten Firmen bezogen:

1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃	Leo Pharmaceutical Products (Kopenhagen, Dänemark)
25-Hydroxycholecalciferol	Sigma (München)
7-Dehydrocholesterol	Sigma (München)
Agarose	Roth (Karlsruhe); Gibco BRL (Bethesda, USA)
Aprotinin	Merck (Darmstadt)
Calcipotriol	Leo Pharmaceutical Products (Kopenhagen, Dänemark)
Diethylpyrocarbonat	Sigma (München)
DNA-Marker (ϕ x174 / HaeIII-Fragmente)	Gibco BRL (Eggenstein)
EB 1213	Leo Pharmaceutical Products (Kopenhagen, Dänemark)
Ethidiumbromid	Amresco (Solon, Ohio, USA)
Fumonisin B1	Alexis (Grünberg)
GS 1500	Leo Pharmaceutical Products (Kopenhagen, Dänemark)
Kieselgel 60 HPTLC	Merck (Darmstadt)
Kristallviolett	ICN (Eschwege)
Leupeptin	Sigma (München)
N-Acetylsphingosin (C ₂ -Cer=O)	Alexis (Grünberg)
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad (München)
Nylon-Membran Gene Screen Plus	Biotechnology System (Boston, MA, USA)
Pepstatin	Sigma (München)
Protein A-Sepharose	Sigma (München)
RNA-Marker	Gibco BRL (Eggenstein)
Röntgen-Filme	Kodak XR (Rochester, NY, USA)
Seelachs-DNA	Gibco BRL (Eggenstein)
Sephadex [®] G 50	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Sphingomyelinase aus streptomyces species	Sigma (München)
Szintillationsflüssigkeit	Ultima Gold XR (Groningen, NL)
TNF α	IC Chemikalien
Turbo-Blotter	Schleicher & Schuell (Dassel)
Vitamin D ₃	Merck (Darmstadt)

5.3.2. Antikörper:

Anti-Kaninchen IgG Antikörper gekoppelt mit Meerrettichperoxidase	Dako (Hamburg)
Anti-PARP-Antikörper	Upstate Biotechnology vertrieben von Biozol (Hamburg)
Anti-TNF α -Antikörper	Pepro Tech, Inc. (London, England)
Anti-TNF α -Rezeptor I- Antikörper	Bender Med System (Wien, Österreich)

Die Ceramid-Analoga C₂-Cer=S und FS-5 wurden in der Arbeitsgruppe von Professor Sandhoff (Heidelberg) synthetisiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

5.3.3. Radioaktivität:

[Methyl- ³ H]-Cholinchlorid	NEN Dupont (Boston, MA, USA)
α P ³² -dCTP (3000 μ Ci/mmol)	NEN Dupont (Boston, MA, USA)

5.3.4. Primer:

Folgende aufgelistete Primer wurden von der Firma Tib Molbiol (Berlin) bezogen:

Name des Primers	Sequenz	T _{annealing}	erwartete Produktlänge
3'-Primer n-SMase	GCA TTC CGT ACT TGA GCA AG	55°C	679 bp
5'-Primer n-SMase	GCC TTG TAA AGC ACG TAG TC		
3'-Primer s-SMase	CGA ATA CAG CAA GTG TGA CC	58°C	605 bp
5'-Primer s-SMase	CAT ACC TGG CTA CAA TTC GG		
3'-Primer TNF α	CCT CCC AGA TAG ATG GGCTCA T	60°C	670 bp
5'-Primer TNF α	TGA CAA GCT GCC AGG CAG GT		
3'-Primer RiboS9	GAT GAG AAG GAC CCA CGG CGT CTG	55°C	431 bp
	TTC		
5'-Primer RiboS9	GAG ACA ATC CAG CAG CCC AGG AGG GAC A		

5.4. Materialien für die Zellkultur

In der Zellkultur wurden sterile Einwegmaterialien verwendet, die von folgenden Firmen bezogen worden sind:

- Gewebekulturschalen, Zentrifugenröhrchen: Nunc (Wiesbaden), Becton Dickinson (Plymouth, England).
- Spritzen, Kanülen: B. Braun (Melsungen).
- Sterilfilter: Schleicher und Schuell (Dassel)
- Zellschaber: Costar (Cambridge, MA, USA)

Medien und Chemikalien für die Zellkultur wurden von nachfolgend aufgelisteten Unternehmen bezogen:

- KBM (Keratinocyte Basal Medium)-Flüssigmedium, Zusätze für KGM (Keratinocyte Growth Medium): Clonetics (San Diego, CA, USA).
- RPMI (Roswell Park Memorial Institute)- Flüssigmedium: Seromed, Biochrom (Berlin)
- PBS (Phosphat Buffered Saline): Seromed, Biochrom (Berlin).
- Trypsin: Sigma (München)
- FCS (Fetal Calf Serum): Seromed, Biochrom (Berlin)
- Penicillin/Streptomycin: Seromed, Biochrom (Berlin).
- L-Glutamin: Seromed, Biochrom (Berlin).