

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Gerät	Bezugsnachweis
Brutschrank UT 6	Heraeus, Langenselbold
CCD Kamera DIANA	Raytest, Straubenhardt
Eismaschine Scotsman AF-20	COTECH, England
Elektronen Mikroskop EM 10 C/CR	Zeiss, Göttingen
Färbekammer „feucht“	Eigenbau
FACSAN	Becton Dickenson, Heidelberg
Gefrierschrank (-20°C)	Linde, Bad Hersfeld
Gefrierschrank Thermo Forma(-80 °C) ULT	Klatt, Berlin
Gefriermikrotom JUNG FRIGOCUT 2800N	Leica, Solms
Gel-Blotting-Paper	Schleicher & Schüll, Dassel
Klinostat	Focker Aerospace (Dutch Space), Leyden
Kühlschrank Küleg 0-15 °C	Münchhoff, Berlin
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Küvetten Typ.-Nr. 105.202-QS	Hellma, Müllheim
Lichtmikroskop Olympus CK“	Olympus, Hamburg
Mikrowelle MICROMAT	AEG, Zürich
Minikammer Biometra Mini Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Mini Trans Blot™	Bio-Rad, München
PH-Meter	Knick, Berlin
Polytronschaft PT-DA 3007/2	Polytron, Bad Wildbach
Protan Nitrocellulose Transfermembran	Schleicher & Schüll, Dassel
Schneidemaschine Ultracut	Reichert-Jung, Solms
Schüttler Promax 1020	Heidolph, Schwabach
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischwaage	Sartorius, Göttingen
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Langenselbold
UV-Licht Transilluminator	Stratagene, Heidelberg

Verpackungsfolie

Saran, VA, USA

Wasserbad Unitherm WA15

Unitherm, Würzburg

Westernblotkammer

Biometra, Göttingen

Zentrifuge 5415 C

Eppendorf, Hamburg

Zellkulturbank „Hera Safe“

Heraeus, Langenselbold

4.1.1.1 Klinostat

Der dreidimensionale Klinostat steht im Technopark Zürich und wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Augusto Cogoli (Gruppe Weltraumbiologie, ETH Zürich) für die Experimente zur Verfügung gestellt. Die Abb. 5 zeigt den Versuchsaufbau in Zürich. Es sind die beiden rotierenden Rahmen mit ihren orthogonal zueinander stehenden Rotationsachsen zu sehen. In der Mitte befindet sich die Platte, auf die später die Probengefäße mit den Zellen gespannt werden. Am Rande des Bildes sieht man den Computerbildschirm, auf dem sich die Schwerkraftvektoren in alle drei Dimensionen ablesen lassen und der zusätzlich deren Summe angibt, die im Idealfall 0 sein sollte.

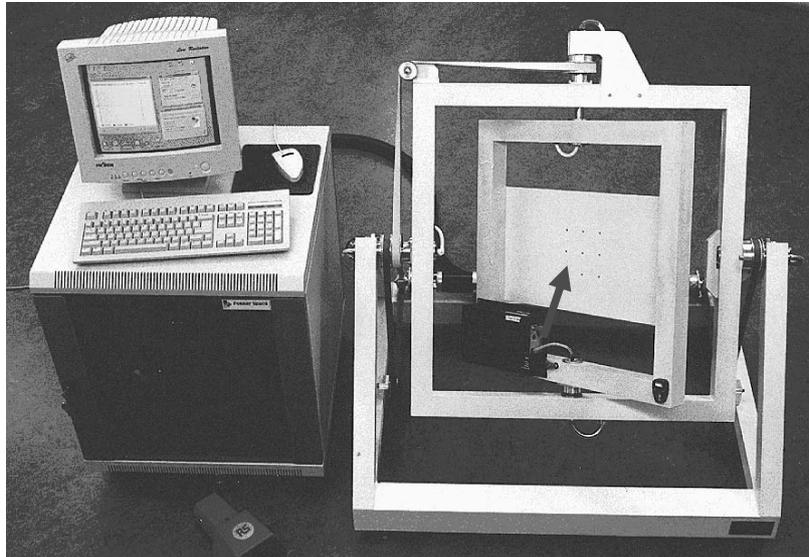


Abb. 5: Dieses Bild zeigt den Klinostat (Random Positioning Machine) in Zürich. Auf dem Brett im inneren Rahmen können die Proben beidseitig angebracht werden (Pfeil).

Als Probenmaterial wurden subkonfluente Monolayer Kulturen in T 25 (BD, Heidelberg) Kulturflaschen vollständig mit Medium gefüllt. Parallel wurden jeweils Brutschrankkontrollen, Bodenkontrollen und Klinostatkulturen auf diese Weise angelegt.



Abb. 6: Kulturflaschen für das Experiment 1: Hier sind die für den Versuch vorbereiteten Proben zu sehen. Die Kulturflaschen sind bis zum Rand mit Medium gefüllt, um die Scherkräfte so gering wie möglich zu halten.

4.1.1.2 Das Durchflusszytometer

Das FACScan-Durchflusszytometer lässt sich in drei Systeme unterteilen: Das Flüssigkeitssystem, das optische System und das elektronische System.



Abb. 7: FACS-Gerät der Firma BD, Heidelberg, Deutschland

4.1.1.2.1 Das Flüssigkeitssystem

Die Zellsuspension gelangt über eine Injektionskapillare in das Durchflusszytometer. Um eine einwandfreie Analyse zu gewährleisten, müssen Einzelzellen in der durch die Injektionskapillare erzeugten Flüssigkeitssäule vorhanden sein, die im Idealfall den Laser in einer Reihe passieren. Die Durchflussgeschwindigkeit beträgt 6 Meter/Sekunde, was im Extremfall eine Messung von 50.000 Ereignissen/Sekunde zulässt. Nach der Messung gelangen die Zellen in einen Abfallbehälter.

4.1.1.2.2 Das optische System

Der Laserstrahl wird so fokussiert, dass er beim Erreichen der Zelloberfläche die maximale Energie gesammelt hat. An dieser Stelle ist der Strahl etwa so groß wie eine Zelle. Dies macht ersichtlich, wie wichtig die korrekte Ausrichtung des Lasers bzw. des Zellstroms ist, da schon geringe Abweichungen zu falschen Ergebnissen führen können.

Kreuzt eine Zelle den Laserstrahl, so wird das Laserlicht in 360 Grad reflektiert. Dabei ist die Menge an Licht, die entlang der Achse des Laserstrahls gestreut wird, in etwa proportional zur Größe der Zelle. Dieses Reflektionslicht entlang des Laserstrahls nennt man „forward angle light scatter“ oder kurz FSC. Lichtstrahlen, die von der Zelle in einem Winkel von 90 Grad abgelenkt werden, resultieren nicht nur von der unregelmäßigen Oberfläche, sondern besonders von inneren Strukturen der Zelle. Die Intensität dieser Reflektionen ist daher proportional zur so genannten Granularität der Zelle, auch „side scatter“, kurz SSC, genannt. Diese beiden Merkmale einer Zelle, Größe und Granularität, bzw. FSC und SSC einer Zelle, lassen sich bereits ohne Zusatz markierter Antikörper oder fluoreszierender Vitalfarbstoffe messen.

Setzt man Antikörper und mit Fluorochromen konjugierte Antikörper zu, so kann man nähere Informationen über bestimmte Epitope der Zelle erhalten. Die Fluorochrome, in unserem Fall Fluoresceinisothiocyanat (FITC), absorbieren das Laserlicht und reemittieren ein Licht niedrigerer Energie und Wellenlänge. Dieses Licht wird ebenfalls in alle Richtungen emittiert. Es wird mit dem gleichen optischen System wie das Licht des Side scatter aufgefangen, allerdings werden deren Wege durch Spiegel und Filter voneinander getrennt und zu verschiedenen Detektoren geleitet. Voraussetzungen für Fluorochrome sind die Anregbarkeit durch den Laser und die Reemission von Licht mit einer größeren Wellenlänge als die des Lasers, da nur dann die Auftrennung von Anregungs- und Emissionsstrahlen gelingen kann. Die emittierte Lichtmenge ist proportional zur Anzahl der markierten Epitope. Je mehr Zielproteine sich auf oder in der Zelle befinden, desto mehr Licht wird ausgesendet.

4.1.1.2.3 Das elektrische System

Das elektrische System des Gerätes besteht aus Verstärker, PMT-Spannungsregulator, Kompensationselektronik für die Restinterferenz zwischen FL1, FL2 und FL3 und dem Datenspeichersystem.

Die Verstärkerwerte für FSC und SSC werden so eingestellt, dass die Zellen in der zweidimensionalen Darstellung möglichst in der Mitte des Diagramms gehalten werden. Die Verstärker für FCS und SSC werden linear geschaltet, die für FL1, FL2 und FL3 logarithmisch.

Das von den Zellen reflektierte Licht wird durch das optische System aufgefangen und entsprechend der Wellenlängen aufgetrennt. Die jeweiligen Detektoren wandeln die Energie der Photonen in elektrische Impulse um, deren Stärke wiederum proportional zur Anzahl der Photonen sind. Nun folgt eine Umwandlung der analogen in digitale Signale, welche in eindimensionalen Histogrammen oder in zweidimensionalen Dot Plots dargestellt werden.

4.1.2 Gebrauchsfertige Kits

Kit

ApopTag[®] in situ Apoptosis Detection Kit S7100

Bezugsnachweis

Qbiogene (Oncor), USA

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material

14 ml Röhren (sterile)

50 ml Röhren (sterile)

DAKO PEN S2002

Objekträger Elka

Optical Adhesive Covers

Supercells

Zellkulturflaschen T25

Zellkulturflaschen T75

Zellkulturflaschen T175

Bezugsnachweis

Greiner Bio-One,

Frickenhausen

Sarstedt, Nürnberg

DAKO, Dänemark

Roth, Karlsruhe

Applied Biosystems, USA

Becton Dickinson, Heidelberg

Becton Dickinson, Heidelberg

Becton Dickinson, Heidelberg

Becton Dickinson, Heidelberg

4.1.4 Chemikalien

Substanz	Bezugsnachweis
Acetatbuffer	Sigma, München
Acridinorange	Molecular Probes,
Agarose	Sigma, München
Azeton	J.T. Baker, England
Bovines Serum Albumin	Sigma, München
Bovines Transferrin	Gibco, Eggenstein
Blotting Grade Blocker (Non-Fat Dry Milk)	Bio-Rad, München
5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat (BCIP)	Sigma, München
Citronensäure Monohydrat 99,5 % p. a. ACS, M210,14	Roth, Karlsruhe
Chloroform, p.a.	Merck, Darmstadt
DAB	Sigma, München
4', 6-Diaminidino-2-Phenylindol (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe
DEPC, Diethylpyrocarbonat	SERVA, Heidelberg
Diaminobenzidin	Sigma, München
Dimethylaminomethylphenol (DMP)	SERVA, Heidelberg
Dodeceny succinatsäureanhydrid (DDSA)	SERVA, Heidelberg
Ethanol (verschiedene Konz.)	J.T. Baker, England
Ethidiumbromid (MG = 420,3)	Sigma, München
Fetales Kälberserum	Gibco, Eggenstein
Glycine (MG = 75.07)	Sigma, München
Goatserum (1: 10)	DAKO, Dänemark
3 % Hydrogenperoxidase	Sigma, München
Hydrocortison	Sigma, München
Isopropanol	Sigma, München
Kulturmedium DMEM	PanSystems, Nürnberg
Kulturmedium RPMI 1640	Gibco, Eggenstein
Kulturmedium mF-12	Irvine Scientific, USA
Kaisers Glyceringelantine Microscopy	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (1,5 mM)	Rapidozym, Berlin
Mayer's Hematoxylin Solution 0,1 %	Sigma, München
2-Mercaptoethanol (5 %)	BASF, Ludwigshafen
Methanol	Merck, Darmstadt
Methyladenicanhydrid (MNA)	SERVA, Heidelberg
Natriumchlorid (0,9 %)	Berlin-Chemie, Berlin

Natrium-Insulin	Merck, Darmstadt
Nitroblautetrazolium (NBT)	Th Geyer, Berlin
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Orthovanadat	Sigma, München
Osmiumtetroxid	Plano, Wetzlar
Penicillin	Gibco, Eggenstein
Peroxidase-Conjugate ExtrAvidin® (1:750)	Sigma, München
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	GIBCO™ Invitrogen, UK
Propanol	J.T. Baker, England
Propidiumjodid	Invitrogen, Karlsruhe
Rotiphorese (40% Acrylamid 2% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Selensäure	Sigma, München
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) 20 %	ICN Biomedicals, CA, USA
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) MG=288,38	Sigma, München
Temed (N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamid)	Sigma, München
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura, München
Trijodthyronin	Sigma, München
Trizma Base (MG = 121,1)	Sigma, München
TRIZOL™-Reagenz	Invitrogen, UK
Trypsin-EDTA (1x) in HBSS W/O	GIBCO™ Invitrogen, UK
Tween 20	Roth, Karlsruhe
RNase Erase	ICN Biomedicals, CA, USA
Streptomycin	PanSystem, Nürnberg
Styrol	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	SIGMA, München
Xylol	J.T. Baker, England

4.1.5 Antikörper

Antikörper

Westernblot- primär AK: Caspase 3, p53
 Westernblot- primär AK: Bax, bcl-2, Fas, PARP

Anti-mouse IgG Biotinconjungate (1:10.000) (in goat)
 Caspase-3-AK (1:300) MAB 4703 (mouse)
 Bax-AK (1:50) MAB 4601Z (mouse)
 Bcl-2-AK (1:100) MAB 8850 (mouse)

Bezugsnachweis

R & D-Systems, Wiesbaden
 BD Transduction Laboratories, USA
 Sigma, München
 Chemicon, Chandlers Ford, UK
 Chemicon, Chandlers Ford, UK
 Chemicon, Chandlers Ford, UK

P53-AK (1:100) (mouse)	Cymbus Biotechnology, UK
Rabbit-Anti-Mouse FITC F0261	DAKO, Hamburg
Zweitantikörper Antirabbit	DAKO, Hamburg
Thyreoglobulin-AK (1:50)	DAKO, Hamburg
Collagen I –AK (1:20)	Sigma, München
Collagen III –AK (1:100)	Monosan, Beutelsbach
Chondroitin-Sulfat-AK	Sigma, München
Bcl-2-AK (1-2 Tropfen)	Sigma, München
Fibronectin-AK (1:20)	Sigma, München
P53-AK (1-2 Tropfen)	Coulter Immunotech, Krefeld
Bax-AK (1-2 Tropfen)	Coulter Immunotech, Krefeld
Fas-AK (FITC-gekoppelt, 1:10)	Coulter Immunotech, Krefeld
Vimentin-AK (1-2 Tropfen)	Sigma, München
Osteopontin-AK (1:100)	Hybridoma bank University of Iowa, USA
Laminin-AK (1-2 Tropfen)	SIGMA, München
Caspase III-AK (1-2 Tropfen)	Coulter Immunotech, Krefeld

4.1.6 Elektronenmikroskopie

Karnowski-Lösung

- 15 % 25 % Glutaraldehyd
- 45 % 0,2 M Phosphatpuffer
- 40 % Paraformaldehyd (Sigma, München)

4.1.7 TUNEL-Färbung:

- 1 x PBS-Puffer
- 1 x PB-Puffer, ohne Salz
- Equilibrierungspuffer gebrauchsfertig
- Reaktionspuffer gebrauchsfertig
- Stop-Wasch-Puffer
- 5 ml S-W-Puffer ad 68 ml A. D.

Methylengrün-Lösung:

2 g Methylengrün ad 100 ml A. D.
25 ml 100 % Ethanol
DAB-Lösung:
100 mg DAB in 100 ml A. D. gelöst
100 ml 0,1 M PB-Puffer

4.1.8 Vitalfärbung**Acridinorange-Ethidiumbromid**

50 mg Ethidiumbromid
15 mg Acridinorange
1 ml Alkohol (95 %)
49 ml Aquadest

4.1.9 Westernblot-Analyse**Lysis-Puffer**

50 mM Tris-HCl, pH 7,2
150 mM NaCl
1 % Triton X-100
1 mM Natriumorthovanadat
50 mM Natriumpyrophosphat
100 mM Natriumfluorid
0,01 % Aprotinin
4 µg/ml Pepstatin A
10 µg/ml Leupeptin
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid

Block-Reagenz:

Non Fat Dry Milk (2 %)

Tween (0,05 %)

Laufpuffer:

25 mM Trizma Base

192 mM Glycine

2,5 % (v/v)SDS

Transfer-Puffer:

48 mM Trizma Base

39 mM Glycine

0,037 % (v/v)SDS

Methanol 20 %

Trenngel:

13 % Rotiphorese (38% Acrylamid 2% Bisacrylamid)

375 mM Trizma Base

0,01 % (w/v) SDS

0,1 % (w/v)APS

0,0001 % (v/v)TEMED

Tris-Puffer**Sammelgel:**

7 % Rotiphorese (38% Acrylamid 2% Bisacrylamid)

125 mM Trizma Base

0,01 % (w/v) SDS

0,1 % (w/v)APS

0,0001 % (v/v)TEMED

4.1.10 Die Zelllinien

4.1.10.1 ML-1 Zelllinie

Die humane Zelllinie ML-1 wurde aus einem dedifferenzierten follikulären Schilddrüsenkarzinom einer 50-jährigen Frau gewonnen. Mehr als 90 % der Zellen exprimieren Thyreoglobulin, Chondroitinsulfat und Vimentin, etwa 70 % produzieren Zytokeratin. Interessant an dieser Zelllinie ist ihre Fähigkeit, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Iodid und Glukose aufzunehmen und Thyreoglobulin, Chondroitinsulfat und Fibronectin ins Zellinterstitium zu sezernieren. Weiterhin sezernieren die Zellen *in vitro* fT3 und fT4 ins Medium. Mit der Liquid-Overlay-Technik und der Spinner-Flask-Technik lassen sich MCTS züchten. Gerade letztere Eigenschaften machen diese Zelllinie interessant für die vorliegende Studie, die unter anderem versucht, eine Erklärung für die Hypothyreose nach langen Aufenthalten im Weltraum zu finden. Für dieses Experiment wurde Passage 9 verwendet. Für die Zellkultur wurde Dulbecco's modified Eagle's medium (PanSystems, Nürnberg, Deutschland) verwendet. Dieses enthält 100 µM Natriumpyruvat, 2mM L-Glutamin, 1mg/l Glukose und 3,7 g/l Natriumhydrogencarbonat. Außerdem wurden 10 % fetales Kälberserum (FKS) (Gibco, Eggenstein, Deutschland), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (PanSystems) zugesetzt (Schönberger et al., 2000).

4.1.10.2 ONCO-DG1-Zelllinie

Hierbei handelt es sich um Zellen, die aus einem oxyphilen papillären Schilddrüsenkarzinom (Klassifizierung nach WHO T2) gewonnen wurden. Im Unterschied zu ML-1 ist ONCO-DG1 Thyreoglobulin-negativ und sezerniert keine Hormone. Zytokeratin und Vimentin-Färbungen ergaben positive Ergebnisse. Wie ML-1 formt auch ONCO-DG1 sowohl bei der Kultivierung mit der Liquid-Overlay-Methode als auch mit der Spinner-Flask-Technik Sphäroide. In vorliegender Studie wurde Passage 40 verwendet (Grimm et al., 1992). Die Zellen wurden mit RPMI 1640 Medium kultiviert, das 100 µM Natriumpyruvat, 2mM L-Glutamin, 1mg/l Glukose und 3,7 g/l Natriumhydrogencarbonat enthält und wiederum mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS)(Gibco, Eggenstein, Deutschland), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (PanSystems) ergänzt wurde.

4.1.10.3 HTU-5 Zelllinie

Diese Zelllinie wurde als eine Reihe von vielen aus normalem humanen Schilddrüsengewebe gewonnen und stellte in gewisser Weise an sich einen Durchbruch dar, da es bis dahin nicht gelungen war, aus normalem humanen Schilddrüsengewebe stabile Zelllinien zu züchten. Erst grundlegende Veränderungen in der Zusammensetzung des Mediums brachten den Erfolg. Sie wurde von Prof. Francesco Curcio publiziert, der auch für diese Arbeit die Passage 9 dieser Zelllinie zur Verfügung gestellt hat (Curcio et al., 1994). Das Kulturmedium ist in diesem Fall etwas komplizierter zusammengesetzt. Als Grundlage dient mF-12 Medium. Der Magnesiumchloridgehalt wurde auf 0,48 mM eingestellt, der Kaliumchloridgehalt auf 3 mM. Es wurden 5 % FKS (GIBCO) zugesetzt. Weiterhin wurden zugegeben: 1 µg/ml Natrium-Insulin (Elanco, Indianapolis), 5 µg/ml bovines Transferrin (GIBCO), 10 mM Hydrocortison (Sigma, München), 2 ng/ml Selensäure (Sigma, München), 3 pg/ml Trijodthyronin (Sigma, München) und 10 ng/ml Somatostatin.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkulturtechnik

Die Zellen, die für das Experiment nötig waren, wurden zuvor in Berlin im Institut für Toxikologie und Pharmakologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, CBF, gezüchtet. Hierzu wurden in Stickstoff gelagerte Zellen (RPMI Medium mit 20 % FKS und DMSO) aufgetaut, zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Zellen in dem für sie üblichen Kulturmedium resuspendiert, in Kulturschalen überführt und bei Standardzellkulturbedingungen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle zwei Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums. Waren die Zellen subkonfluent bis konfluent, so wurden sie passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen, dieses wieder abgesaugt und der Zellrasen daraufhin mit Trypsin/EDTA überschichtet. Nach ungefähr fünf Minuten wurde der Grad der Ablösung der Zellen geprüft. War dieser nicht vollständig, so wurde die Einwirkzeit des Trypsins verlängert. Nach vollständiger Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurde die Trypsinreaktion mit Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in 50 ml Röhrchen überführt, zentrifugiert (2000 U/min), der Überstand dekantiert und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf neue Kulturflaschen verteilt.

Anzahl der im jeweiligen Experiment eingesetzten Zellkulturflaschen:

Tabelle 1: Experiment 1: ML-1, 3 Tage (72 h)

IK	BK 24 h	BK 48 h	BK 72 h
5	6	6	6
	MG 24 h	MG 48 h	MG 72 h
	6	6	6

Tabelle 2: Experiment 2: ML-1, 5 Tage (Langzeitversuch)

IK	BK 120 h	MG 120 h
6	6	6

Tabelle 3: Experiment 3: ONCO-DG1, 30 Minuten (Ultrakurzzeitversuch)

IK	BK 30 min	MG 30 min
6	6	6

Tabelle 4: Experiment 4: ONCO-DG1, 1 Tag (Kurzzeitversuch)

IK	BK 24 h	MG 24 h
6	6	6

Tabelle 5: Experiment 5: ONCO-DG1, 5 Tage (Langzeitversuch)

IK	BK 24 h	BK 48 h	BK 72 h	BK 120 h
6	6	6	6	6
	MG 24 h	MG 48 h	MG 72 h	MG 120 h
	6	6	6	6

Tabelle 6: Experiment 6: HTU-5, 1 Tag (Kurzzeitversuch)

IK	BK	MG 24 h
6	6	6

Tabelle 7: Experiment 7: HTU-5, 5 Tage (Langzeitversuch)

IK	BK	MG 120 h
6	6	6

BK=Bodenkontrolle, IK=Inkubatorkontrolle, MG=Mikrogravität

4.2.2 Gewinnung von Zellmaterial nach Kultivierung auf dem Klinostaten

Nach 0 h, 30 min, 24 h, 48 h, 72 h und 5 Tagen werden jeweils die entsprechenden Kulturen geerntet. Dazu werden die Überstände abpipettiert, zentrifugiert (2000 U/min), die Zellen und der getrennte Überstand zur weiteren Untersuchung aufgehoben. Die verbliebenen Einzelzellen und Sphäroide werden mit PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Boden der Kulturflaschen wird dann mit Trypsin bedeckt, um eventuell noch adhärente Zellen abzulösen. Die Trypsinreaktion wird mit Medium gestoppt, die Trypsin-Medium-Zell-Suspension aus den Kulturflaschen abpipettiert und zentrifugiert (2000 U/min). Danach folgt wiederum ein Waschvorgang mit PBS. So werden einerseits Einzelzellen, andererseits Sphäroide gewonnen, die für Westernblotanalyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren, für Immunhistochemie auf Supercellkammern ausgesät, für Durchflusszytometrie in 70 % Alkohol resuspendiert oder für Elektronenmikroskopie in Karnowski-Lösung resuspendiert werden.

4.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop soll weitere Hinweise auf Apoptose und morphologische Veränderungen aufzeigen. Hierfür werden die Zellen, nachdem sie geerntet wurden, in der Fixierlösung nach Karnowski über Nacht bei 4°C fixiert. Daraufhin werden sie mit 0.9 % Natriumchlorid-Lösung zweimal gespült und dann für eine Stunde bei 4°C in einem mit 1,5 ml Osmiumtetroxid beschichteten Reaktionsgefäß inkubiert. Nach weiterer zweimaliger Spülung mit 0.9 % Natriumchlorid-Lösung erfolgt eine Entwässerung der Proben mittels aufsteigender Alkoholreihe (jeweils 10 Minuten in 30 %, 50 % und schließlich in 70 % Alkohol). Danach können die Proben bis zur Untersuchung in 70 % Alkohol bei 4° C (Kühlschrank) gelagert werden.

Für die Standard-Epon-Einbettung werden die Proben am ersten Tag erneut in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (wieder jeweils 10 Minuten diesmal in 80 %, 90 %, 96 % und dann zwei Mal in 100 %). Darauf werden die Zellen 30 - 60 Minuten mit Styrol gespült. Zuletzt gibt man die Proben in eine Lösung aus Styrol, Glycidether, Dimethylaminomethylphenol (DPM), Methyladeninhydrid (MNA) und Dodecenylnsuccinat-säureanhydrid (DDSA) und belässt das Ganze über Nacht in einem unverschlossenen Gefäß, wodurch eine leichte Härtung durch die Verflüchtigung der Substanzen eintritt.

Am zweiten Tag fügt man nochmals eine Lösung aus Glycidether, MNA, DMP und DDSA zu, mit dem Unterschied, dass ein verschlossenes Gefäß gewählt wird, in dem die Proben für eine weitere Nacht verbleiben.

Am dritten Tag werden die Zellen samt Lösung in spezielle Formen gegossen. In diesen werden sie bei 60°C 10 Minuten lang im Brutschrank gehärtet. Anschließend werden aus den gehärteten Proben Schnitte hergestellt, von denen mit dem Elektronenmikroskop bei 5.000- und 10.000-facher Vergrößerung Aufnahmen gemacht werden.

4.2.4 TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling-Färbung

Die TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)-Färbung ist eine Standardmethode zur Darstellung von DNA-Fragmentierung, wie sie in apoptotischen Zellen vorkommt. Für diese Untersuchungen wurde das Standard-Protokoll aus dem ApopTag® in situ Apoptosis Detection Kit S7100 der Firma Qbiogene verwendet. Zentrales Instrument ist das Enzym TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase), eine DNA-Polymerase, die nur in Vertebraten vorkommt und die *in vivo* Nukleotide an das 3`-OH-Ende von Genen hängt. In der TUNEL-Färbung verknüpft TdT mit Biotin konjugiertes UTP (Uridin) mit den 3`-OH-Enden der fragmentierten DNA, was nach Zugabe eines Entwicklers und Gegenfärbung der Zelle sichtbar wird.

Die Zellen werden auf Objektträger ausgesät, nach einer halben Stunde (Adhäsionszeit) mit PBS gewaschen, mit 4 % Paraformaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur vorfixiert und daraufhin mit einem Gemisch aus Ethanol und Essigsäure (2:1) für 10 Minuten bei Raumtemperatur nachfixiert. Danach folgt eine Inkubation mit TdT-Enzym und Biotin-konjugiertem UTP für 60 Minuten bei 37°C. Nach der Reaktion mit dem Antidigoxigenin Konjugat wird ein Peroxidasesubstrat zur Farbentwicklung hinzugefügt. Die Zellen werden daraufhin mit Methylengrün gegengefärbt.

Auf diese Weise werden je fünf Objektträger für jeden Gravitations- und Zeitzustand gefärbt. Auf jedem Objektträger werden in zufällig gewählten Ausschnitten jeweils 300 Zellen ausgezählt und der Anteil apoptotischer Zellen ermittelt. Der Mittelwert dieser Auszählung ergibt den Gesamtprozentsatz apoptotischer Zellen für die jeweilige Gravitationsstufe und Zeit.

4.2.5 4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Färbung

4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) ist ein DNA-spezifischer Fluoreszenz-Farbstoff, der eine blaue Fluoreszenz enthält. Dieser bindet an die kleinere Furche der DNA-Helix. Durch diese Bindung wird die Fluoreszenz des Farbstoffs zwanzigfach stärker.

Die für die DAPI-Färbung vorgesehenen Zellen werden zunächst auf Supercell Kulturkammerobjektträger ausgesät und dann nach 30 Minuten (Adhäsionszeit) unfixiert mit PBS gewaschen. Diese Zellen werden mit DAPI-Lösung (1ml DAPI-Stammlösung (0,2 mg DAPI/ml Aqua dest. mit 9 ml PBS versetzt)) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung wird daraufhin sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop mit UV-Anregung untersucht. Nach DNA-Markierung erfolgt die Auswertung der Signale mit dem Fluoreszenzfiltersatz für blaue Fluoreszenz (DAPI-Filter). Eine intensivere Färbung weist auf Apoptose hin. DAPI bindet an Adeninreste der DNA. Alle Zellkerne (ca. 500) wurden nach den morphologisch-apoptotischen Kriterien wie Kernpyknose, Kernfragmentierung und Apoptosekörperchen analysiert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde ausgezählt.

4.2.6 Vitalitätstest mit Acridinorange-Ethidiumbromid-Färbung

Sowohl Acridinorange als auch Ethidiumbromid interkalieren in die DNA. Während Acridinorange in der Lage ist, die Zellmembran zu durchdringen, kann Ethidiumbromid nur in Zellen eindringen, deren Zellmembranen geschädigt sind. Durch die Kombination beider Farbstoffe ist es möglich, zwischen lebenden und toten Zellen zu differenzieren. Die Zellen werden folgendermaßen gefärbt. Zunächst wird eine Stammlösung (50 mg Ethidiumbromid, 15 mg Acridinorange, 10 % EDTA) in isotonischem PBS-Puffer hergestellt. Die gebrauchsfertige Lösung (1 ml Stammlösung + 9 ml PBS) wird als Färbelösung verwendet. Auch für diese Färbung werden Zellen zunächst für eine halbe Stunde auf Supercell Kulturkammerobjektträgern kultiviert. Daraufhin wird das Medium abgesaugt, die Objektträger mit PBS gewaschen und mit der Färbelösung kurz überschichtet. Auch diese Färbung muss sofort per Mikroskop begutachtet und dokumentiert werden.

4.2.7 Propidiumjodid

Wie Ethidiumbromid ist auch Propidiumjodid (PI) nicht in der Lage, in lebenden Zellen mit intakter Zellmembranen einzudringen. In der Zelle interkaliert Propidiumjodid in die DNA. 10

μl einer 1 mg/ml Propidiumiodid-Lösung in PBS werden auf die Zellen gegeben. Diese werden wieder UV-angeregt unter dem Mikroskop betrachtet und der Anteil toter Zellen ermittelt.

4.2.8 DNA-Leiter-Assay als elektrische Analyse von DNA-Fragmenten

Das DNA-Laddering ist eine weitere Methode, um fragmentierte DNA nachzuweisen. Das Ergebnis sieht im positiven Falle einer Leiter ähnlich, daher der Name. Man bedient sich hierbei der unterschiedlichen Wandereigenschaften der DNA-Bruchstücke im Gegensatz zu intakter DNA im elektrischen Feld.

DNA Isolation: Um die DNA zu isolieren, werden die Zellen wie beschrieben geerntet, mit PBS gewaschen und über Nacht mit Lysis Puffer (50 mmol/l Tris/HCL [pH 8,0], 100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l EDTA, 1 % Natriumdodecylsulfat, 0,35 mg/ml Proteinkinase K) bei 52°C verdaut. Danach wird dieser Ansatz eine Stunde bei 37°C mit 1 mg/ml DNase freier RNase inkubiert. Zur Extraktion der DNA wird dem Gemisch Phenol-Chloroform zugesetzt (Roth-Phenol-Chloroform) und dieser Ansatz mit 12.000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Die DNA wird aus dem wässrigen Überstand mit absolutem Alkohol bei -20°C ausgefällt. Danach wird nochmals mit 12.000 g für 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das so gewonnene Pellet wird mit 70 % Ethanol (-20°C) gewaschen, getrocknet und in 0,5 ml TE (10 mmol/l Tris/HCl [pH 8,0], 1 mmol/l EDTA) aufgelöst. Um die DNA ein weiteres Mal auszufällen, werden nacheinander 0,05 ml einer Lösung mit 3 mol/l Natriumacetat und 1,5 ml 100% Alkohol zugefügt und wiederum zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird mit 70 % Alkohol (-20°C) gewaschen und in TE aufgelöst. Ein 1 % Agarosegel mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid wird mit 5 μg so gewonnener DNA-Probe beschickt und die Elektrophorese durchgeführt. Das entstandene Ausfallmuster wird mit UV-Licht sichtbar gemacht. Es wird mit einem so genannten Advanced Image Data Analyzer Diana II (Raytest Isotopenmeß GmbH, Straubenhardt, Deutschland) ein digitales Bild erstellt.

4.2.9 Mikroskopie

Ungefärbte Zellen und Sphäroide in Kulturflaschen werden mit einem Phasenkontrastmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) untersucht. Für die Untersuchung von fluoreszenzgefärbten Zellen (FITC, oder Propidium Jodid) werden entweder Fluoreszenz-Mikroskope (Zeiss Axiophot, Oberkochen) oder Konfokale Laserscanning Mikroskope (Leitz, Wetzlar, Deutschland) verwendet.

4.2.10 Immunzytochemische Färbung

Die Immunfluoreszenz bedient sich wie die Durchflusszytometrie monoklonaler Antikörper, um Proteine zu markieren und sichtbar zu machen. Hierzu werden die Zellen bzw. Sphäroide auf vierfach gekammerte Supercell Kulturkammerobjektträger ausgesät und für 30 Minuten inkubiert (Adhäsionszeit). Daraufhin wird das Medium abgesaugt, die Objektträger zwei Mal mit PBS gewaschen und entweder mit einem Gemisch aus Methanol und Ethanol (1:2) bei Raumtemperatur für 30 Minuten oder mit Azeton bei -20°C für 15 Minuten fixiert. Das Fixationsmittel wird abgesaugt und die Objektträger zum Trocknen bei Raumtemperatur ausgelegt.

Die so vorbereiteten Zellen werden für die indirekte Immunperoxidasetechnik zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (Laminin vorverdünnt, Fibronectin 1:100 beide Sigma) inkubiert, daraufhin mehrmals mit PBS gewaschen und wiederum eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (1:40), der peroxidase-konjugiert ist, inkubiert. Nachdem ein weiteres Mal mit PBS gewaschen wurde, werden die Zellen mit einer Lösung aus Diaminobenzidin und H_2O_2 für 5 min überschichtet. Die markierten Areale zeigen eine braune Färbung. Anschließend erfolgt eine Kerngegenfärbung für 2 min mit Hämalaun. Nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 96% 100 %) und Xylol werden die Präparate mit Entellan überzogen und mit Deckgläschen eingedeckelt.

Zytokeratin (1:50), α -Tubulin (1:50), Vimentin (vorverdünnt), und Laminin (vorverdünnt) werden mittels Immunfluoreszenz untersucht, für die fluoreszenz-gekoppelte Zweitantikörper (1:50) verwendet werden. Es folgt eine Kerngegenfärbung mit Propidiumjodid für eine Stunde bei 37°C . Anschließend werden die Präparate mit PBS gewaschen und mit Eindeckmedium (Vectashield) eingedeckelt. Zuletzt werden sie unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

4.2.11 Durchflusszytometrie

Zur Durchflusszytometrie werden die Zellen zunächst aus den Kulturflaschen herausgelöst. Dazu wird das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen, welches dann wiederum abgesaugt wird. Danach werden die Zellen mit Trypsin/EDTA überschichtet und so lange in den Brutschrank gestellt, bis sich alle Zellen vom Boden gelöst haben (Kontrolle unter dem Mikroskop). Die Trypsinreaktion wird nun mit Komplettmedium gestoppt und die Zellsuspension aus der Kulturflasche in 50 ml Tubes überführt und anschließend 10 min bei 1.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in PBS resuspendiert, um Mediumrückstände möglichst zu beseitigen. Nun wird nochmals

zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 70 % Alkohol für über eine Stunde fixiert. Die so gewonnene Zellsuspension wird in der Durchflusszytometrie weiterverarbeitet.

Die Suspension wird auf Eppendorfcups verteilt. Diese werden bei 5.000 U/min 10 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nun wird der restliche Alkohol mit PBS-FKS-Lösung (2 %FKS) abgewaschen und das ganze nochmals 10 min bei 5.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum verworfen und die Proben nun mit 100 µl der jeweils optimalen Konzentration oder 2 Tropfen der vorverdünnten Erstantikörper bestückt. Dieser Ansatz inkubiert für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Es folgen zwei weitere Waschvorgänge mit PBS + 2 % FKS-Lösung und das Bestücken der Proben mit 200 µl Zweitantikörper, der wiederum auf den Erstantikörper abgestimmt sein muss. Auch dieser Ansatz inkubiert nun für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach der zweiten Inkubation werden die Proben nochmals zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und danach mit 500 µl FACSTFlow-Lösung in jedes Röhrchen gegeben und die Zellen darin gelöst. Die nun gefärbten Zellen werden in die zur Messung verwendeten Röhrchen pipettiert.

Die Messung wird an einem Durchflusszytometer der Marke FACScan durchgeführt. Die passenden Einstellungen für die jeweiligen Zellen sind in Vorversuchen ermittelt worden.

Die Durchflusszytometrie ist eine Weiterführung der klassischen Immunfluoreszenz an Gewebsschnitten und Einzelzellen mit dem Vorteil der genauen Quantifizierbarkeit der Markierung. Bei der Durchflusszytometrie passieren einzelne Zellen den Lichtstrahl eines Lasers. Diese sind mit den oben erwähnten monoklonalen Antikörpern gefärbt, die wiederum mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dieser reflektiert bzw. emittiert das Laserlicht, das mit Hilfe von diversen Filtern und Spiegeln so getrennt wird, dass nur bestimmte Emissionswellenlängen die entsprechenden Detektoren erreichen. Der Lichteinfall erzeugt in diesen Detektoren einen elektrischen Impuls, dessen Intensität dem Lichtsignal proportional ist. Dieser elektrische Impuls dient als analoges Signal und wird in ein digitales umgewandelt. Alle Einzeldaten, also Einzelsignale, werden akkumuliert und als Rohdaten gespeichert, die später mit den dazu bestimmten Programmen weiterverarbeitet werden.

Parallel werden Inkubator- und Bodenkontrollen, 24 h, 48 h, 72 h oder 120 h klinorotierte Zellen analysiert. Eine Reihe wird nur mit Zweitantikörpern bestückt, um eventuelle unspezifische Bindungen zu eliminieren, indem die Fluoreszenz dieser Proben als Nullwert angesehen werden d.h. nur Signale oberhalb der Intensität dieser Proben werden als positiv angesehen. Die so erhaltenen Ergebnisse werden mit WinList®, einem hierfür entwickelten Programm, ausgewertet. Jede Probe wird 5 Mal gemessen.

4.2.12 Westernblotanalyse

Wie die Durchflusszytometrie und die Immunhistochemie bedient sich der Westernblot monoklonaler Antikörper, die spezifisch an das gesuchte Protein binden. Die Proteine werden dazu zunächst durch Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei man sich deren Größe, Form und Ladung zur Auftrennung zunutze macht. Daraufhin werden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen, mit Antikörpern inkubiert und die Antikörperfärbung entwickelt.

In diesem Experiment wurde die Westernblotanalyse durchgeführt, um die in der Durchflusszytometrie gefundenen Daten zu verifizieren. Im Gegensatz zur Durchflusszytometrie ist der Westernblot ein semiquantitatives Verfahren, da keine Aussagen über Gesamtmengen getroffen werden können.

Die Zellproben werden zunächst mit dem Polytron in Lysis-Puffer 30 Minuten auf Eis homogenisiert. Die Homogenate werden anschließend in der Kühlzentrifuge bei 4°C 30 Minuten lang mit 13.000 U/min zentrifugiert. Die Überstände werden in Eppendorf-Röhrchen überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei –80°C gelagert.

Im weiteren Verlauf muss die Gesamtproteinkonzentration der Proben gemessen werden. Dies geschieht mit dem BCA-Protein-Assay-Kit (Pierce Biotechnology, Rockfort, USA) per Extinktion. Je 10 µl des Proteinextrakts werden mit 20 µl Reagenz A und 20 µl Reagenz B versetzt. Zum Vergleich werden 10 µl BSA (Bovines Serum Albumin) als Standard verwendet, die wie die eigentliche Probe mit Reagenz A und B vermischt werden. Proben und Standards müssen gut vermischt und 30 Minuten bei 60°C inkubiert werden. Die Farbstoffintensitäten werden im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Aus diesen Messungen errechnet sich die Gesamtproteinkonzentration nach der Formel:

$$\text{Pro-Konz. [mg/ml]} = \frac{2 * \text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion Standard}}$$

Die Auftrennung der Proteine erfolgt mit 10 % Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)-PAGE, einem Polyacrylamidgel, dass vor jedem Versuch neu gegossen werden muss. Dazu müssen die Glasplatten der Gussform zunächst gründlich mit 80 % Ethanol gereinigt und entfettet werden. Das frisch angerührte und noch flüssige Gel wird nun eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu gewährleisten. Für die Polymerisation dieses so genannten Trenngels werden etwa 30 Minuten benötigt. Danach wird das Isopropanol vollständig entfernt und das Trenngel mit einem weiteren so genannten Sammelgel

überschichtet, in dem ein Kamm platziert wird, der nach Polymerisation entfernt wird. Dies dient zur Erzeugung von Kammern, in die später die verschiedenen Proben eingefüllt werden. Das so entstandene Gel wird nun in die Elektrophoresekammer eingebracht und diese mit Laufpuffer gefüllt. In jede der oben beschriebenen Kammern werden 20 µl der jeweiligen Probe pipettiert und daraufhin die Proteine 15 Minuten bei 80 Volt und 60 Minuten bei 120 Volt aufgetrennt.

Ist dieser Prozess abgeschlossen, wird das Gel mit den darin befindlichen aufgetrennten Proteinen aus der Apparatur herausgenommen und zwischen Filterpapier und einer Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) in die Blotkammer (Mini Trans BlotTM, BioRad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA) eingespannt, die mit Transferpuffer gefüllt ist. Nun beginnt der eigentliche Vorgang des Westernblots. Dazu werden 2 Stunden lang 160 V angelegt, um den Übergang der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran zu gewährleisten. Danach wird die Membran in Blocking Puffer (5% entfettetes Milchpulver in PBS/0,1% Tween 20 gelöst) über Nacht bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Am folgenden Tag wird die Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde in eine Lösung aus Blocking Puffer und Primär-Antikörper (Verhältnis 1:1000) gelegt und danach mit antikörperfreiem Blocking Puffer fünf Mal gewaschen. Daraufhin erfolgt wieder bei Raumtemperatur die Inkubation mit Zweitantikörper (Verhältnis 1:5.000, 30 Minuten). Zuletzt wird die Membran fünf Mal mit Blocking Puffer und drei Mal mit 0,1 M Tris-Puffer gewaschen. Spezifische Bindungen der Antikörper werden mittels der Entwickler Nitroblautetrazolium und 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat sichtbar gemacht. Dazu werden die Membranen 160 Minuten bei völliger Dunkelheit in eine mit Entwicklerlösung gefüllte Färbekammer gelegt. Danach wird die Membran zwei Mal 10 Minuten mit destilliertem Wasser gespült, getrocknet und in Saran-Film eingepackt. Zur Auswertung wird die Membran fotografiert und durch Densitometrie quantifiziert (Molecular Dynamics Personal Densitometer No. 50301, Krefeld, Deutschland, Aida-Image-Analyse 2.11-Programm).