

2. Material

2.1 Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Lösungsmittel von der Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe bezogen. In der Regel wurden Chemikalien höchsten Reinheitsgrades verwendet.

| | |
|---|--|
| Acrylamid | Biorad, München |
| Agarose | Biozym, Hessisch Oldendorf |
| APS (Ammoniumperoxodisulfat) | Sigma, Deisenhofen |
| Ampicillin | Sigma, München |
| Annexin-V-FITC | PharMingen, Heidelberg |
| Bacto-Agar | Becton Dickenson, Heidelberg |
| Bacto-Trypton | Becton Dickenson, Heidelberg |
| Bacto-Yeast Extract | Becton Dickenson, Heidelberg |
| Caspase Inhibitor VI (z-VAD-fmk) | Calbiochem, Bad Soden |
| Caspase-3 Inhibitor (z-DEVD-fmk) | Calbiochem, Bad Soden |
| Caspase-9 Inhibitor (z-LEHD-fmk) | Calbiochem, Bad Soden |
| Complete (Protease Inhibitor Cocktail Tabletten) | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Digitonin | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| DMEM / high Glucose (4.5 g/l) Medium | GIBCO Life Technologies GmbH, Karlsruhe |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| DNase freie RNaseA | Roche Diagnostics, Mannheim |
| dNTP's | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Epirubicin | Pharmacia Upjohn, Erlangen |
| Ethidiumbromid | Sigma, Deisenhofen |
| Etoposid (VEPESID) | Bristol Arzneimittelfabrik GmbH, München |
| FCS („Fetal Calf Serum“) | GIBCO Life Technologies GmbH, Karlsruhe |
| Fluo-3/AM | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| Fluorescent Mounting Medium | DAKO Corporation, Carpinteria, CA USA |
| JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethyl-Benzimidazolyl-Carbocyaninjodid) | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| McCoy's 5A Medium | GIBCO Life Technologies GmbH, Karlsruhe |
| PBS-Puffer (10x) (pH 7,2) | GIBCO Life Technologies GmbH, Karlsruhe |
| Penicillin / Streptomycin | GIBCO Life Technologies GmbH, Karlsruhe |
| PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) | Sigma, München, Deutschland |
| Polybren | GIBCO Life Technologies GmbH, Karlsruhe |
| Ponceau-Rot | Sigma, Deisenhofen |
| Propidiumjodid | Sigma, Deisenhofen |
| Puromycin | Sigma, Deisenhofen |

| | |
|--|--|
| RPMI 1640 Medium | GIBCO Life Technologies GmbH, Karlsruhe |
| RPN 800V (“Full Range Rainbow recombinant protein molecular marker”) | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Tetracyclin | Clontech, Heidelberg |
| Thapsigargin | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| Triton X-100 | Sigma, Deisenhofen |
| Trypsin-EDTA (1x) | GIBCO Life Technologies GmbH, Karlsruhe |
| X-Gal (V394A; 50 mg/ml) | Promega GmbH, Mannheim |

2.2 Materialien zur DNA-Präparation und Modifikation

Alle Enzyme und Puffer wurden, sofern nicht anders angegeben, von der NEB GmbH, Frankfurt/M bezogen.

- „AmpliTaq[®] ABI PRISM[®] Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Version 2.0”: PE Biosystems, Weiterstadt
- „Concert[™]-Rapid Plasmid Purification System“: GIBCO Life Technologies GmbH, Karlsruhe
- „DNA-Agarose-Extraktion II“: Qiagen GmbH, Hilden
- DNA-Polymerase „AmpliTaqaGold“: PE Biosystems, Weiterstadt
- „Hi Di Formamid“: PE Biosystems, Weiterstadt
- I-SceI Restriktionsenzym: Boehringer, Mannheim
- 1kb Plus DNA Ladder: GIBCO Life Technologies GmbH, Karlsruhe

2.2.1 Verwendete Bakterienstämme

- *E. coli DH5 α* Zellen für die Amplifikation von rekombinanten Plasmiden
Genotyp: F⁻, dcoR, recA1, endA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44 1⁻, thi-1, gyr A96, relA1
- *E. coli BJ5183* Zellen für die homologe Rekombination
Genotyp: endA, scbBC, recBC, galK, met, thi-1, bioT, hsdR (Str)

2.2.2 Verwendete Oligonucleotide

Alle verwendeten Primer wurden von der BioTez GmbH, Berlin bezogen.

- Primersequenzen zur Klonierung von C-terminal Flag-markierter humaner Smac cDNA (eingefügte Schnittstellen sind unterstrichen):
Smac-Hind for: 5' - CCC AAG CTT ATG GCG GCT CTG AAG AG - 3'
Smac-Xba rev: 5' - GCT CTA GAT TAC TTG TCG TCG TCG TCC - 3'
- Primersequenzen zur Amplifikation von E1A-Fragmenten von Adenovirus Typ 5 (Adesanya *et al.*, 1996):
E1A-Forward: 5' - GAG ACA TAT TAT CTG CCA CGG AGG - 3'

E1A-Reverse: 5` - TTG GCA TAG AAA CCG GAC CCA AGG - 3`

- Primersequenzen zur Amplifikation von E4-Fragmenten von Adenovirus Typ 5 (Adesanya *et al.*, 1996):

E4-Forward: 5` - GTA GAG TCA TAA TCG TGC ATC AGG - 3`

E4-Reverse: 5` - TTT ATA TGG TAC CGG GAG GTG GTG - 3`

2.3 Materialien für SDS-PAGE und Western Blot Analyse

- „Bicinchoninic Assay Kit“ (Pierce): KMF Laborchemie Handels GmbH, St. Augustin
- „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL und Hyperfilm ECL-Filme): Amersham Buchler, Braunschweig
- Nitrozellulosemembran BA 85, 0.2 µm: Schleicher&Schüll, Dassel
- Whatman Filterpapier (2 mm): Schleicher & Schüll, Dassel

2.3.1 Primäre Antikörper für die Western Blot-Analyse

| Zielprotein | Art | Organismus | Verdünnung | Bezugsquelle |
|-------------------------|------------------|------------|------------|--|
| β-Actin | polyklonal | Kaninchen | 1:500 | Sigma, München |
| Bax | Klon YTH-2D2 | Maus | 1:10000 | Trevigen, Gaithersburg, MD, USA |
| Bcl-x _L | polyklonal | Kaninchen | 1:1000 | Transduction Laboratories, Los Angeles, CA, USA |
| Bid | polyklonal | Kaninchen | 1:1000 | Cell Signaling, Beverly, MA, USA |
| Caspase-3 | polyklonal | Ziege | 1:1000 | R&D Systems, Wiesbaden |
| Caspase-8 | monoklonal | Maus | 1:1000 | Cell Signaling Technology Beverly, MA, USA |
| Caspase-9 | polyklonal | Ziege | 1:1000 | R&D Systems, Wiesbaden |
| Cytochrom c | Klon 7H8.2C12 | Maus | 1:500 | PharMingen, Heidelberg |
| Flag- HRP konjugiert | monoklonal | Maus | 1:1000 | Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA |
| PARP | polyklonal | Kaninchen | 1:1000 | Cell Signaling Technology Beverly, MA, USA |
| XIAP / hILP | Klon 48 | Maus | 1:500 | Transduction Laboratories, Los Angeles, CA, USA |

2.3.2 Sekundäre Antikörper für Western Blot Analyse

- HRP-konjugiert anti-Maus IgG: Promega, Mannheim
- HRP-konjugiert anti-Kaninchen IgG: Promega, Mannheim
- HRP-konjugiert anti-Ziege IgG: Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg

2.4 Antikörper und Reagenzien für die Immunfluoreszenz

| | | | | |
|------|-----------|-------|--------|---------------------------------------|
| Smac | Klon 10G7 | Ratte | 1:2000 | Alexis Biochemicals GmbH, Grünberg |
|------|-----------|-------|--------|---------------------------------------|

- Alexa Fluor 594 anti-Ratte IgG: Molecular Probes, Leiden, Niederlande
- MitoTracker Green FM: Molecular Probes, Leiden, Niederlande

2.5 Zelllinien und Medien

Sofern nicht anders angegeben wurden die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien von der American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, USA: www.atcc.org) oder der Deutschen Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Braunschweig, Deutschland: www.dsmz.de) bezogen. Eingesetzte Transfektanten wurden wie beschrieben innerhalb der Arbeitsgruppe generiert.

Bei **DU145** handelt es sich um eine „mismatch repair-defiziente“ und in p53 mutierte humane Prostata-Karzinomlinie, welche 1978 (Stone *et al.*) aus einem metastasierenden Gehirntumor generiert wurde. Diese Zelllinie ist für Bax mutiert und eignet sich daher für die Untersuchung mitochondrialer Apoptosesignalwege.

Die stabil durch retrovirale Infektion Bax reexprimierende Zelllinie **DU145 Bax** wurde in der Arbeitsgruppe durch Transduktion mit dem retroviralen Vektor HyTK-Bax, welcher humane Bax- α cDNA unter der Kontrolle des CMV-Promoters enthält (Weinmann *et al.*, 1997), erzeugt. Als isogene Positivkontrolle wurde durch die Infektion mit dem korrespondierenden leeren retroviralen Vektor die Zelllinie **DU145 mock** generiert.

Zellkulturmedium: DMEM supplementiert mit 10% FCS (hitzeinaktiviert, 30 min 56°C), 100 U/ml Penicillin, 0,1 μ g/ml Streptomycin

Bei **HCT116** handelt es sich um eine „mismatch repair-defiziente“ Colon-Karzinomzelllinie, von der sowohl biallelische als auch monoallelische Klone für das proapoptotische Protein Bax existieren (Zhang *et al.*, 2000). Auf dieser Basis generierten Zhang *et al.* durch homologe Rekombination aus HCT116 Bax^{+/-} Klonen HCT116 Bax^{-/-} Zelllinien. Das isogene Pärchen HCT116 Bax^{+/-} und Bax^{-/-} wurde freundlicherweise von Dr. Bert Vogelstein (Johns Hopkins Cancer Center, Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt.

Zellkulturmedium: McCoy's 5A supplementiert mit 10% FCS (hitzeinaktiviert, 30 min 56°C), 100 U/ml Penicillin, 0,1 μ g/ml Streptomycin

Die humane Brustkrebs-Adenokarzinomlinie **MCF-7** hat ihren Ursprung 1970 aus einem metastasierendem Mammakarzinom nach Radio- und Hormontherapie (Soul *et al.* 1973). Aufgrund einer Deletion im Exon 3 des *CASP-3* Gens exprimieren MCF-7 Zellen keine Caspase-3 (Jänicke *et al.*, 1998). Jänicke *et al.* generierten Klone, die nach Transfektion mit pcDNA3-*CASP-3* stabil Pro-Capase3 (**MCF-7 C3**) exprimieren oder mit leerem Vektor „mock-transfiziert“ (**MCF-7 mock**) wurden.

Zellkulturmedium: RPMI 1640 supplementiert mit 10% FCS (hitzeinaktiviert, 30 min 56°C), 100 U/ml Penicillin, 0,1 µg/ml Streptomycin

Die primäre embryonale humane Nierenzelllinie **HEK293** wurde stabil mit gescherten DNA-Fragmenten des humanen Adenovirus Typ 5 (Ad5) transformiert (Graham *et al.*, 1977; Louis *et al.*, 1997). Als Folge dieser Transformation exprimiert sie konstitutiv Ad5 spezifische E1-Proteine, die sie als Linie zur Vermehrung und Titration humaner Adenoviren einsetzbar machen.

Zellkulturmedium: DMEM supplementiert mit 10% FCS (hitzeinaktiviert, 30 min 56°C), 100 U/ml Penicillin, 0,1 µg/ml Streptomycin

Die von Cosset *et al.* (1995) generierten Zelllinien **FLYRD-18** und **FLYA-13** dienen der Produktion von hochtitrigen, rekombinanten Retroviren, die gegen humanes Serum resistent sind.

Zellkulturmedium: DMEM supplementiert mit 10% FCS (hitzeinaktiviert, 30 min 56°C), 100 U/ml Penicillin, 0,1 µg/ml Streptomycin

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Restriktion und Fällung von DNA

Die zur Restriktion eingesetzten Enzyme wurden mit den von den Herstellern empfohlenen Puffern verwendet. Die Fällung von DNA erfolgte durch Zugabe von 1/10 Vol. Natriumacetat (3,5 M) und 2 Vol. 100% Ethanol (EtOH) für 15 min bei -20°C. Anschließend wurde die gefällte DNA für 30 min bei 14000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in kurzen Zentrifugationsschritten mehrfach mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und anschließend in A. bidest aufgenommen.

3.1.2 Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA

Die Auftrennung von DNA erfolgte in 0,8-1%igen Agarosegelen bei 120 V mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr). Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) verwendet. Vor dem Auftragen wurde die Proben-DNA je nach Volumen mit 3-10 µl DNA-Auftragspuffer gemischt. Als Größenstandard diente der „1kb Plus DNA Ladder“ von GIBCO. Die Auswertung und Photographie des Gels erfolgte mit einer Gel-Dokumentationsanlage von BioRad (München) und der dazugehörigen Software „QuantityOne“. Zur Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit II“ nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Prinzipiell werden bei der Gelextraktion die Wasserstoffbrückenbindungen der Agarose-Polymere durch Erwärmen und unter dem Einfluß chaotroper Salzen gelöst, wobei die DNA aus der Lösung verdrängt wird. Dadurch wird die Bindung der DNA an zuvor zugesetzte Silica-Gel-Partikel ermöglicht. Die Elution der DNA von den Silica-Gel-Partikeln erfolgte durch Wasser.

3.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen H₂O in einer Quarzküvette. Eine OD₂₆₀=1 entspricht einer Konzentration von 50 mg/ml doppelsträngiger DNA.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR (Saiki *et al.*, 1988) wurden ca. 10ng an Matrizen-DNA, jeweils 1 pmol der beiden Primer, je 200 µM dNTP's und 2,5 U „AmpliTaqGold“ in 1x Taqs-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Das Standardprogramm für die PCR bestand aus folgenden Schritten: 95°C / 10 min zur Hitzeaktivierung der Taq-Polymerase, Denaturierung 94°C / 60 s, „Annealing“ 58°C / 60 s, Elongation 72°C / 90 s über 35 Amplifikationszyklen.

3.2 Klonierung

3.2.1 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch Restriktion oder PCR gewonnene DNA-Fragmente wurden in Plasmidvektoren ligiert. Zum Einsatz kamen dabei ca. 100-200 ng DNA und 50 ng des Vektors, die ü.N. bei 14°C mit 1 U T4 DNA-Ligase in 1x Ligasepuffer inkubiert werden.

3.2.2 Herstellung und Transformation von Hitzeschock-kompetenten *E. coli DH5α* und *E. coli BJ5183*

Die Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien wurde nach der Calcium Chlorid-Methode nach Cohen *et al.* (1972) durchgeführt. Dazu wurden 2 ml einer ü.N.-Kultur von *E. coli DH5α* bzw. *E. coli BJ5183* in 500 ml LB-Medium überführt und bis zu einer $OD_{600} = 0,6-0,8$ bei 37°C geschüttelt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 4°C pelletiert und in 10 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erfolgte die Resuspension in 2 ml 0,1 M $CaCl_2$ / 10% Glycerin. Diese Suspension wurde ad 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden 50 µg des Ligationsansatzes zu einem Aliquot kompetenter Zellen gegeben, kurz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Inkubation bei 42°C für 90 s und einer anschließenden dreißigminütigen Inkubation auf Eis, erfolgte die Zugabe von 500 µl LB-Medium ohne Selektionsmedium und die Kultivierung für 30 min bei 37°C. Je 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und ü.N. bei 37°C bebrütet.

LB-Medium:

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- ad 1 l A. bidest
- supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin

Agarplatten: 15 g Agar Agar
ad 1 l LB-Medium
supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin

3.2.3 Herstellung und Transformation von elektrokompetenten *E. coli DH5α*

Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden 2 ml einer ü.N.-Kultur von *E. coli DH5α* in 500 ml L-Medium überführt und bis zu einer $OD_{600} = 0,6-0,8$ bei 37°C geschüttelt und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch fünfzehnminütiges Zentrifugieren bei 4°C pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 100 ml eiskaltem A. bidest erfolgte das Resuspendieren in 2 ml eiskaltem A. bidest / 10% Glycerin. Die Zellen wurden in Volumina von je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Bei der Elektroporation wird durch das Anlegen von elektrischen Impulsen die Permeabilität der Zellmembran kurzfristig so erhöht, daß DNA-Moleküle in die Zellen eindringen können.

Die Elektroporation erfolgte bei 1500-2000 V und einer Impulsdauer von 5 ms mit einem Gerät des Typs 2510 (Eppendorf GmbH, Hamburg). Zur Transformation wurden 50 µg des Ligationsansatzes zu einem Aliquot kompetenter Zellen gegeben, kurz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die transformierten Zellen wurden in 500 µl LB-Medium ohne Selektionsmedium aufgenommen und davon 200 µl auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und ü.N. bei 37°C bebrütet.

3.2.4 DNA-Präparation

Zur Gewinnung von klonaler Plasmid-DNA wurde das „Concert™-Rapid Plasmid Purification System“ basierend auf dem Prinzip der „alkalischen Lyse“ (Birnboim und Doly, 1979) nach Angaben des Herstellers verwendet. Eingesetzt wurden jeweils 3 ml einer dicht gewachsenen ü.N.-Kultur, die nach Pelletieren in Anwesenheit von RNaseA durch NaOH-SDS-haltigen Puffer lysiert und deren DNA und Proteine denaturiert wurden. Das anschließende Neutralisieren mit Na-Acetat bewirkt die Präzipitation von SDS, Proteinen und chromosomaler DNA. Die im Überstand verbleibende Plasmid-DNA wurde durch das Prinzip der Festphasen-Anionenaustausch Chromatographie wiedergewonnen. Eingesetzt wurde eine DEAE-Anionenaustauschersäule (Diethylaminoethanol), von der die unter Hochsalzbedingungen gebundene DNA mit Wasser eluiert und nach Standardmethoden gefällt wurde (s. 3.1.1).

3.2.5 DNA-Sequenzierung und Sequenzauswertung

Die Sequenzierungsreaktion basiert auf der Kettenabbruchsynthese nach Sanger *et al.* (1977) (Carothers *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1992; Prober *et al.*, 1987; Sanger *et al.*, 1977). Als Matrize dienten bei Plasmid-DNA 200-500 ng, bei aufgereinigten PCR-Produkten 50-300 ng und je 10 pmol des spezifischen Primers. Ferner wurden pro Sequenzieransatz 2 µl „Reaction Mix“ aus dem „ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Version 2.0“ in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Reaktion verläuft auf der Basis des sogenannten „cycle sequencing“, bei dem die Matrize aufgrund von Denaturierungsschritten mehrfach für die Sequenzierung verwendet wird und eine „lineare“ Amplifikation der Sequenzierprodukte erfolgt. Das Programm für die Sequenzierung setzt sich aus zwei Schritten zusammen: Denaturierung (15 s, 96°C) und „Annealing / Extension“ (4 min, 55°C) über 35 Zyklen in einem T-Gradient Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen). Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit 2 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 55 µl EtOH abs. nach Standardbedingungen gefällt (s. 3.1.1), gewaschen und getrocknet. Resuspendiert wurde in 20 µl „Hi Di Formamid“ (PE Biosystems, Weiterstadt). Die Sequenzdetektion erfolgte auf einem „ABI Prism 310 Genetic Analyzer“ (PE Biosystems, Weiterstadt) und die Auswertung wurde mit Hilfe des „Sequencher-Software-Pakets“ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan, USA) durchgeführt.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in dem jeweiligen Medium in Brutschränken bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Kulturflaschen mit Gas-permeablen Verschlüssen gewährleisteten den Gasaustausch. Da es sich in allen Fällen um adhärenente Zellen handelt, mußten diese, nach kurzem Waschen mit PBS, durch dreiminütige Inkubation bei 37°C mit 0,1 %iger Trypsin / EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Für die Versuche wurden jeweils nur Zellen verwendet, die sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden.

3.3.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels eines Neubauer-Hämozytometers. Dazu wurden die Zellen mit Trypanblau versetzt. Während intakte vitale Zellen keinen Farbstoff aufnehmen können, erscheinen Zellen mit permeabler Membran blau.

3.3.3 Aufbewahrung vitaler Zellen

Die dauerhafte Aufbewahrung vitaler eukaryotischer Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Für die Konservierung wurden 1×10^7 Zellen nach dem Waschen mit PBS und Trypsinieren pelletiert, in je 1 ml Kulturmedium ohne weitere Zusätze resuspendiert und mit dem je gleichen Volumen Einfriermedium in Kryoröhrchen gegeben. Nach Einfrieren bei -80°C wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen zweimal mit Kulturmedium gewaschen, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Anschließend wurden sie nach Standardmethoden kultiviert. Um gleichbleibende Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Zellen vor ihrer Verwendung zunächst zweimal passagiert.

Einfriermedium: 80% FCS (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert),
20% DMSO

3.4 Gentransfer in eukaryotische Zellen

3.4.1 Calcium-Phosphat-Transfektion

Eine der ältesten und weitverbreitetsten Methoden zum Gentransfer ist die phagozytotische Aufnahme eines Copräzipitats aus DNA und Calciumphosphat (Graham *et al.*, 1973). Hierbei werden DNA, Calcium und Phosphatpuffer gemischt. Dabei bildet sich ein feinkörniger Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA, der auf die Zellen pipettiert und von den Zellen durch Endozytose aufgenommen wird. Obwohl die DNA in der Zelle in phagozytotischen Vesikeln vorliegt, gelangt ein Teil der DNA-Moleküle in den Zellkern, um dort transkribiert bzw. stabil in die DNA integriert zu werden.

3.4.2 Transduktion von eukaryotischen Zellen mit Adenoviren

Die Zellen wurden 24 h nach dem Ausplattieren bei einer Konfluenz von ca. 70% mit den rekombinanten Adenoviren infiziert. Dazu wurde der Virus in den angegebenen MOI's im entsprechenden Zellkulturmedium ohne FCS verdünnt. Dieses Infektionsmedium wurde auf die Zellen gegeben und die Zellen wurden 1,5 h bei 37°C inkubiert. Kontrollen wurden nur mit Serum-freiem Medium behandelt. Nach der Inkubation wurde die gleiche Menge an Medium mit 20% FCS, 200 U/ml Penicillin und $0.2 \mu\text{g/ml}$ Streptomycin zugegeben.

3.4.3 Herstellung stabiler Bcl-x_L HCT116 Transfektanten durch retrovirale Infektion

Zur Herstellung stabiler Transfektanten kam der retrovirale Vektor pBabePuro.Bcl-x_L (Abb. 10B), sowie der Vektor ohne Transgen (Abb. 10A) zur Erzeugung von mock-Transfektanten

(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Schuler, III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Deutschland) zum Einsatz.

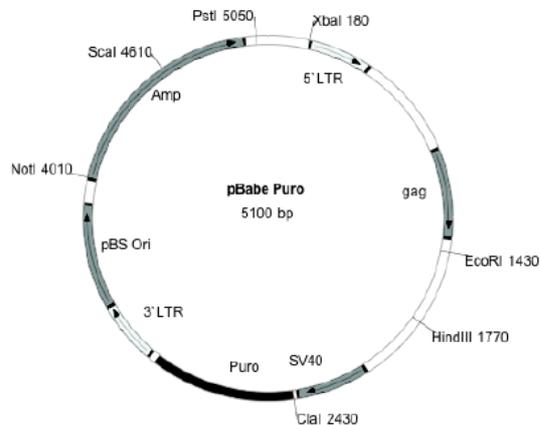
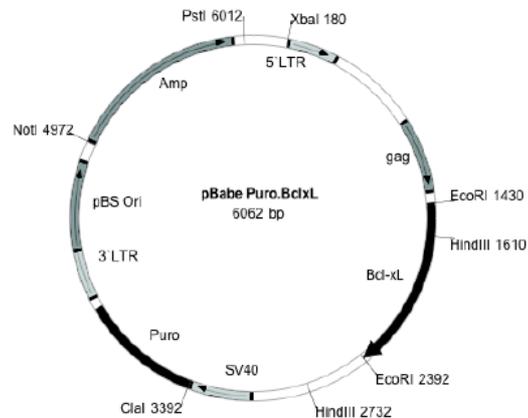
A**B**

ABB. 10: Karte des retroviralen Vektors pBabePuro (A) und pBabePuro.Bcl-x_L (B)

Die cDNA von Bcl-x_L wurde in die EcoRI Schnittstelle des Vektors pBabe Puro kloniert (nach Dr. M. Schuler III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz).

HCT116 Bax^{+/-} Zellen wurden mit Überstand der virusproduzierenden Packzelllinie FLYRD-18 (Cosset *et al.*, 1995) in Anwesenheit von 8 µg/ml Polybren infiziert. Das Selektionsmedium mit Puromycin (1 µg/ml) wurde 48 h nach Infektion zugegeben. Die sich bildenden Klone wurden drei Wochen unter Selektion kultiviert und anschließend der Expressionsstatus einzelner Klone bezüglich des Bcl-x_L Proteins mittels Western Blot-Analyse überprüft.

3.4.4 Nachweis der Transduktionseffizienz eukaryotischer Zellen (β-Galaktosidase Färbung)

Zur Überprüfung der Effizienz der adenoviralen Transduktion der verwendeten Zellsysteme wurde eine β-Galaktosidase Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür mit einem Adenovirus (Ad-LacZ, Theragen AG, Berlin) infiziert, der das bakterielle LacZ-Gen unter der Kontrolle des konstitutiven CMV-Promoter exprimiert. Das LacZ-Genprodukt, β-Galaktosidase, katalysiert die Hydrolyse von X-Gal, wodurch ein blaues Präzipitat entsteht.

Die Zellen wurden zu 70% Konfluenz in 6 Loch-Kulturschalen ausgesät und am Folgetag mit 25 MOI Ad-LacZ in Serum-freien Medium inkubiert und nach 1 h mit dem gleichen Volumen 20% FCS-haltigem Medium aufgefüllt. 48 h nach Infektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 0,5 ml Fixierlösung überschichtet und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde 1 ml Färbelösung zugegeben und die Zellen bei 37°C

für 24 h inkubiert, bis ein deutliches Auftreten des blauen Präzipitats zu beobachten war. Die Zellen wurden im Anschluß zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml 100% EtOH behandelt, um restliches Wasser zu entfernen. Der Prozentsatz blau gefärbter Zellen wurde unter dem Mikroskop bestimmt und als Transduktionseffizienz angegeben.

Fixierlösung: 46,8 ml PBS
2,8 ml Formaldehyd (37%)
0,4 ml Glutaraldehyd (25%)

Färbelösung: 8,8 ml Hepes (0,5 M, pH 7,4)
0,3 ml NaCl (5 M)
0,13 ml MgCl₂ (1 M)
6,0 ml K₃(Fe(CN)₆) (30 mM)
6,0 ml K₄(Fe(CN)₆) (30 mM)
ad 100 ml A. bidest
bei RT im Dunkeln lagern,
vor Gebrauch 10 µl X-Gal (50 mg/ml) zusetzen

3.5 Adenoviren

Die Methode zur Konstruktion rekombinanter, replikationsdefizienter adenoviraler Vektoren wurde nach dem von Chartier *et al.* (1996) publizierten Protokoll modifiziert durchgeführt. Die adenoviralen Plasmide wurden von der HepaVec AG (Berlin) bezogen. Die C-terminal Flag-markierte humane Smac cDNA wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Schuler (III. Abteilung für Innere Medizin, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz; cDNA Sequenz unter www.ncbi.nlm.nih.gov, Nucleotide Accession No. AF262240).

3.5.1 Klonierung des Shuttle-Plasmids

Zur Ligation des PCR-Produktes, einer C-terminal Flag-markierten humanen Smac cDNA, in den adenoviralen Shuttle-Vektor pHVAd2-TRE, wurden die Schnittstellen der Enzyme HindIII und XbaI verwendet, die über Primer an das PCR-Produkt eingefügt wurden.

Bei dem Shuttle-Plasmid pAd2-TRE handelt es sich um ein „left end shuttle-Plasmid“, das zur Insertion von Genen in die E1-Region des Genoms von Adenoviren des Typs 5 dient. Es enthält 2,6 kb des linken Ende des Adenovirus 5 mit einer 3,2 kb großen Deletion in der E1-Region. Diese größt mögliche E1-Deletion und die an ihrer Stelle eingesetzte „multiple cloning site“ entsprechen der von Bett *et al.* (1994) für pΔE1sp1 beschriebenen Deletion. Durch Modifikationen von Gillissen *et al.* (2003) enthält es ein TRE-Element (bestehend aus einem P_{miniCMV}-Promoter, der sieben repetitive Bindungsdomänen (Tet-O(7)) für die Bindung des Transaktivators tTA enthält) und ein BGH-Polyadenylierungssignal.

3.5.2 Homologe Rekombination und Amplifikation des adenoviralen Plasmids

Das Plasmid pAd1-DelE1/E3 enthält das adenovirale Genom des Adenovirus Serotyp 5, und wurde so weit modifiziert, daß die E3-Region durch eine Expressionskassette für den unter der Kontrolle eines CMV-Promoters stehenden tTA-Tet-Off-Transaktivator ersetzt worden ist. Dadurch entstand das für die spätere homologe Rekombination eingesetzte Plasmid pAd1-DelE1/E3-tTA. Die inserierte tTA-Tet-Off-Expressionskassette setzt sich aus dem P_{CMV} Promoter, tTA („Tetracycline-controlled Transactivator“) und dem Polyadenylierungssignal SV40polyA zusammen (Gillissen *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu normalen Klonierungen, für die Bakterienstämme ohne die Fähigkeit zur Rekombination verwendet werden, kommen bei der Erzeugung des rekombinanten vollständigen Adenovirus Bakterien (*E. coli BJ5183*) mit dieser Eigenschaft zum Einsatz. Die Transformation der Bakterien erfolgte durch Elektroporation. Am folgenden Tag wurden Einzelkolonien gepickt, in LB-Medium mit Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und zur Kontrolle mit Restriktionsenzymen gespalten. Das rekombinante Plasmid wurde in einem nachfolgenden Schritt in elektrokompetente *E. coli DH5α* Zellen retransformiert und die daraus extrahierte Plasmid-DNA zur Transfektion eingesetzt.

3.5.3 Transfektion von HEK293 Zellen zur Produktion der rekombinanten Adenoviren

Der hier verwendete adenovirale Vektor ist nach der homologen Rekombination in der E1 Region deletiert. Die E1 Region des adenoviralen Genoms kodiert für Gene zur Initiation der Replikation und deren Kontrolle, sowie dem Schutz der viraler und zellulärer DNA vor einem enzymatischen Abbau nach der Infektion, so daß zur Produktion von Viren eine Komplementierung dieser Region erfolgen muß. Dies erfolgt *in trans* durch die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293.

Das nach der Rekombination entstandene Plasmid mit dem adenoviralen Genom enthält noch einen ca. 2000 bp großen Anteil bakterieller Plasmid-DNA, der die Resistenz gegenüber des Selektionsmarkers beinhaltet. Um diesen zu entfernen, wurde das adenovirale Plasmid mit dem Enzym PacI verdaut und somit für die nachfolgende Transfektion linearisiert.

Die Transfektion der virusproduzierenden Zelllinie mit der adenoviralen DNA erfolgte durch Calcium-Phosphat-Copräzipitation. Eingesetzt wurden ca. 10 µg des PacI verdauten adenoviralen Vektors pAd-Smac/Flag, die mit 25 µl CaCl₂ (2,5 M) gemischt und ad 250 µl mit sterilem A. bidest aufgefüllt wurden. Unter ständigem Schütteln wurde das gleiche Volumen Transfektionspuffer zugegeben. Dabei bilden sich Calcium-Phosphat-Kristalle, an

denen die DNA gebunden wird. Diese Mischung wird in unterschiedlichen Mengen auf am Vortag zu 70% konfluent ausplattierte HEK293 Zellen gegeben. Nach Auftreten der ersten Plaques wurden die Zellen geerntet, pelletiert und das „Crude Virus Lysate“ (CVL) bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Transfektionspuffer: 274 mM NaCl
 10 mM KCl
 3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 10 g/l Hepes
 pH 6,75
 sterilfiltrieren

3.5.4 Virusamplifikation

Für die Expansion des Virus wurden HEK293 Zellen in $36\ 150\ \text{cm}^2$ Kulturflaschen zu 70% Konfluenz ausgesät. Nach 24 h wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml Infektionsmedium überschichtet. Das Infektionsmedium setzt sich aus dem Überstand der transfizierten HEK293-Zellen und dem jeweiligen Kulturmedium ohne den Zusatz von FCS oder Antibiotika zusammen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde den Zellen das gleiche Volumen an Kulturmedium mit 20% FCS und 200 U/ml Penicillin und $0,2\ \mu\text{g/ml}$ Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wurden geerntet und pelletiert, als sich erste zytopathische Effekte abzeichneten. Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 20 ml abgesaugt und der verbleibende Rest bei -20°C bis zur Aufreinigung gelagert.

3.5.5 Virusaufreinigung

3.5.5.1 Ultrazentrifugation

Um aus dem CVL reinen Virus zu gewinnen, muß dieser von Zellbestandteilen und anderen Proteinen mit Hilfe der Ultrazentrifugation gereinigt werden. Dazu werden zwei Zentrifugationsschritte mit unterschiedlichen CsCl-Stufengradienten durchgeführt. Zur Freisetzung der Viruspartikel aus den geernteten Zellen wird das Lysat zwei Frier-Tauzyklen unterzogen und anschließend zur Beseitigung grober Zellfragmente für 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die Ultrazentrifugation eingesetzt.

Für den ersten CsCl-Stufengradienten wurden je $2,5\ \text{ml}$ leichtes CsCl ($1,25\ \text{g/cm}^3$) in zwei Ultra-Clear-Zentrifugenröhrchen (Beckman Instruments GmbH, München) gegeben und mit $2,5\ \text{ml}$ schwerem CsCl ($1,5\ \text{g/cm}^3$) unterschichtet. Auf diesen Gradienten wurden maximal $7\ \text{ml}$ des Lysats pro Röhrchen aufgetragen. Der erste Zentrifugationsschritt wurde bei 30000 rpm in einer Beckmann Optima LE 80-K Ultrazentrifuge für 2 h bei 21°C durchgeführt. Die Virusbanden der beiden Zentrifugenröhrchen wurden je mit einer $1\ \text{ml}$ Spritze und Kanüle aus

dem Gradienten abgezogen und vereinigt. Für den zweiten Zentrifugationsschritt, zur Abtrennung unfertiger und leerer Viruspartikel, wurde das aufgefangene Virus mit CsCl der Dichte $1,35 \text{ g/cm}^3$ ad 3 ml aufgefüllt, mit 3 ml CsCl der Dichte $1,5 \text{ g/cm}^3$ gemischt und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Dieses wurde anschließend mit 3 ml leichtem CsCl ($1,25 \text{ g/cm}^3$) überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte dann bei 30000 rpm in einer Beckmann Optima LE 80-K Ultrazentrifuge ü.N. bei 21°C . Die Virusbande wurde wie im ersten Zentrifugationsschritt beschrieben, abgezogen.

3.5.5.2 Säulenaufreinigung

Die Entfernung des CsCl aus der aufgereinigten Viruslösung erfolgte durch Gelfiltration über eine NAP-25-Säule (Amersham Buchler, Braunschweig). Nach „Öffnen“ und Leerlaufen der Säule wurde diese viermal mit je 5 ml Adenosuspensionspuffer equilibriert. Anschließend wurde der 1 ml des gereinigten Virus aufgetragen und abermals mit 1,5 ml Adenosuspensionspuffer gewaschen. Die Elution des Virus erfolgte mit 2 ml Adenosuspensionspuffer. Diese wurden auf Eis ad $50 \mu\text{l}$ aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Adenosuspensionspuffer:

- 135 mM NaCl
- 3 mM KCl
- 1 mM MgCl_2
- 100 mM Tris-HCl
- 10% (v/v) Glycerol
- sterilfiltrieren

3.5.5.3 Bestimmung der „Plaque-Forming Units“ (pfu/ μl) durch Titration

Die Titerbestimmung des aufgereinigten Adenovirus erfolgte nach der Endpunktverdünnungsmethode. Dazu wurden HEK293 Zellen mit einer Konfluenz von ca. 50% in 24 Loch-Kulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit einer Verdünnung des Virus in \log_{10} -Schritten in 0,5 ml Serum-freien Medium infiziert und nach 1 h mit dem gleichen Volumen Medium mit 20% FCS aufgefüllt. Zur Kontrolle wurde ein Virus bekannten Titers in den gleichen Verdünnungen mitgeführt. Nach 14 Tagen wurden die Plaques ausgezählt und in dem Verdünnungsbereich der letzten beobachteten Plaquebildung eine zweite Titerbestimmung in feineren Abstufungen durchgeführt. Als endgültiger Titer wurde die Verdünnungsstufe angegeben, bei der die letzte Plaquebildung zu beobachten war.

3.5.5.4 Partikelmessung

Bei der Bestimmung der Gesamtpartikelzahl im aufgereinigten Viruslysate wird der DNA-Gehalt der Lösung photometrisch bestimmt. Dabei ist im Gegensatz zur Bestimmung der

„Plaque-Forming Units“ (pfu/ μ l) durch Titration keine Aussage über die biologische Aktivität der Viruspartikel möglich. Für die Partikelmessung wurden 90 μ l Puffer zur mit 10 μ l des gereinigten Virus gemischt und für 10 min bei 56°C inkubiert. Anschließend erfolgte photometrische Messung der Lösung bei 260 nm. Aus Triplikaten wurde der Mittelwert der OD₂₆₉ bestimmt. Dabei entspricht eine OD₂₆₉ von 1000 einer Partikelzahl von 10¹²/ml.

Puffer zur Partikelmessung:

- 90 μ l 10% SDS
- 90 μ l 1M Tris-HCl
- 18 μ l 0,5M EDTA
- 1 ml Adenosuspensionspuffer
- 8,8 ml A. bidest

3.5.5.5 Test auf replikationskompetente Viren mittels E1A-PCR

Da in der hier vorliegenden Arbeit mit replikationsdefizienten Adenoviren gearbeitet wurde, muß gewährleistet sein, daß es bei der Produktion in der Verpackungslinie HEK293 zu keiner unerwünschten Rekombination der E1A-Region gekommen ist. Dies geschieht mittels PCR, wobei als Positivkontrolle Ansätze für Fragmente der E4-Region mitgeführt wurden.

Für die Gewinnung viraler DNA wurde die Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion angewandt. Eingesetzt wurde 1 μ l des aufgereinigten Virus. Durch Zugabe von 20 μ l Proteinase K-Mix und Inkubation von 60-120 min bei 55°C wurde zunächst die Virushülle enzymatisch abgebaut und anschließend wurden dem Ansatz 300 μ l Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol pH 8,0 (Verhältnisse 25 / 24 / 1) zugesetzt, gut geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm getrennt. Die obere DNA-haltige, wäßrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben, mit 300 μ l Chloroform versetzt, erneut zentrifugiert und die DNA aus dem Überstand nach Standardmethoden gefällt (s. 3.1.1). Die anschließende PCR und Gelelektrophorese wurden ebenfalls nach Standardbedingungen durchführt (s. 3.1.2 und 3.1.3).

Proteinase K-Mix:

- 5 mM EDTA
- 20 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 0,2% (v/v) SDS
- 0,25 μ g/ μ l Proteinase K

3.6 Proteinchemische Methoden

3.6.1 Gewinnung von Zellysaten

Die behandelten Zellen wurden nach den angegebenen Zeitpunkten durch Trypsinieren geerntet, zweimal mit PBS gewaschen, pelletiert und in 100 µl Lysepuffer 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (3000 rpm) für 3 min bei 4°C entfernt.

Lysepuffer für Gesamtzellysat: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
300 mM NaCl
1% Triton X 100
2 mM MgCl₂
5 µM EDTA
1 µM Pepstatin
1 µM Leupeptin
0,1 µM PMSF

3.6.2 Gewinnung von zytosolischen Extrakten

Alle Zellen wurden bei 15 rpm, 4°C für 5 min pelletiert, mit PBS gewaschen und dann in je 20 µl hypotonem Lysepuffer mit 0,1 mM PMSF und 0,75 mg/ml Digitonin resuspendiert. Bei Digitonin handelt es sich um ein mildes Detergens, welches die Zellmembran, nicht aber die Membranen der Organellen, angreift. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde die Permeabilität der Zellmembran mittels Färbung mit Trypanblau kontrolliert, Zellbruchstücke abzentrifugiert und der Überstand für die Proteinbestimmung und anschließende Western Blot-Analyse eingesetzt.

Puffer für Zellextrakte: 20 mM Hepes, pH 7,4
10 mM KCl
2 mM MgCl₂
1 mM EDTA
100 µM PMSF

3.6.3 Proteinbestimmung

Zum Einsatz kam die Methode der Proteinbestimmung mit Hilfe von BCA Reagenz (Pierce), welches die Biuret-Reaktion, d.h. die Reaktion von freien Aminogruppen in Proteinen unter Oxidation von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ in alkalischer Lösung zur Basis hat. Das Natriumsalz der Bicinchoninsäure (BCA) bildet in alkalischem Medium einen 2:1 Komplex mit Cu¹⁺-Ionen unter Bildung eines stabilen rotes Chromophors mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

In einer Mikrotiterplatte wurden 10 µl Proteinextrakt mit 200 µl Arbeitslösung (Reagenz A / Reagenz B: 50 / 1) 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 620 nm gemessen. Als Standard wurde eine BSA-Konzentrationsreihe verwendet.

Reagenz A:
1% (v/v) BCA-Na₂
2% (v/v) Na₂CO₃-H₂O
0,16% (v/v) Na₂-Tartrat
0,4% (v/v) NaOH
0,95% (v/v) NaHCO₃
pH 11,25

Reagenz B: 4% (v/v) CuSO₄ x 5 H₂O

3.6.4 Gelelektrophorese von Proteinen

Am Anfang des Nachweises eines spezifischen Proteins mittels Western Blot-Analyse, steht die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts in einem Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Zu Beginn wurden die Proteine mit dem anionischen Detergens SDS in Gegenwart von β-Mercaptoethanol als Reduktionsmittel denaturiert. Das SDS umhüllt dabei die Proteine mit negativ geladenen, sich abstoßenden Sulfatgruppen, was zu deren Dissoziation in ihre Untereinheiten und vollständigen Entfaltung führt. Dies erlaubt die Auftrennung der Polypeptidketten nach ihrem Molekulargewicht, unabhängig von der Eigenladung der enthaltenen Aminosäurereste oder der ursprünglichen räumlichen Gestalt.

Die Proteinlysate oder -extrakte wurden mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlung wurden 30 µg Protein pro Gel-Tasche aufgetragen. Die Trennung erfolgte in einer Mini-Protean-2-Gelkammer (BioRad, München) mittels 5 %igem Polyacrylamid-Sammel- und einem 16 %igem Trenngel bei 90, bzw. 180 V für 1,5 h in einem diskontinuierlichen System aus Trenn- und Sammelgel bezüglich Acrylamidkonzentration, Pufferzusammensetzung, -konzentration und pH-Wert. Das Molekulargewicht der Proteine wird durch Vergleich ihrer Wanderungsstrecke mit denen von Standardproteinen ermittelt.

Probenpuffer (5x):
260 mM Tris/HCl, pH6,8
400 mM DTT
40% (v/v) Glycerin
0,004% (v/v) Bromphenolblau
2% (v/v) SDS

Laufpuffer (10x):
250 mM Tris/HCl, pH 6,8
2 M Glycin
1% (v/v) SDS
pH 8,3

| | |
|----------------------|---|
| <u>Blot-Puffer:</u> | 10 mM CAPS 10% (v/v) Methanol |
| <u>Block-Puffer:</u> | 3% (v/v) Milchpulver (fettfrei) in 1x PBS (pH 7,2) |
| <u>PBST:</u> | 1x PBS, pH 7,2 0,1% (v/v) Tween 20 |

3.6.5 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Um den immunologischen Nachweis der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine zu ermöglichen, muß zunächst deren Transfer auf eine 0,2 µm Nitrozellulosemembran erfolgen, die diese aufgrund hydrophober Wechselwirkungen fixiert. Dies erfolgte nach dem Semidry-Verfahren in einer Blotting-Apparatur (BioRad München) für 1 h bei 1 mA/cm² Membran. Der Aufbau erfolgte nach dem Prinzip eines Sandwichs beginnend bei der Anode der Blotkammer: zwei Lagen „Whatman Filterpapier“ (2 mm), Nitrocellulosemembran, SDS-Gel, zwei Lagen „Whatman Filterpapier“. Sowohl das Filterpapier, die Membran als auch das Gel wurden zuvor in 1x Blotpuffer equilibriert. Nach Aufbau wurden Luftblasen und überschüssiger Puffer entfernt. Der Transfer der Proteine wurde durch Färbung mit Ponceau S überprüft.

| | |
|------------------------|---|
| <u>Ponceau-Lösung:</u> | 5 %ige Essigsäure 0,1% (v/v) Ponceau S |
|------------------------|---|

3.6.6 Antikörperdetektion

Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen und somit zur Reduktion des Hintergrundes bei der Detektion spezifischer Proteine durch Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei RT auf einem Schüttler mit Blockpuffer inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in den angegebenen Verdünnungen ü.N. bei 4°C auf der Membran belassen, nach zweimaligem Waschen mit Blockpuffer erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen sekundären Antikörper für 2 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBST erfolgte die Nachweisreaktion. Diese beruht auf Chemolumineszenz, da der sekundäre Antikörper mit „Horse Radish Peroxidase“ (HRP) gekoppelt ist. Durch Zugabe eines Substrates erfolgt die enzymatische Umsetzung von Luminol und Wasserstoffperoxid, wobei die Oxidation des Luminols eine Lichtemission bewirkt. Diese kann durch Autoradiographie detektiert werden. Dazu wurde die Membran 2 min mit den ECL-Lösungen (Mischungsverhältnis 1:1) inkubiert und die Proteinbanden durch Exposition mit Hyperfilm ECL-Filmen sichtbar gemacht.

3.7 Durchflußzytometrie

Das Durchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg) ermöglicht die simultane Messung von verschiedenen Parametern wie die relative Größe, die Granularität, sowie drei verschiedene Fluoreszenzintensitäten (FL-1 = 537 nm; FL-2 = 597 nm; FL-3 = 650 nm) einzelner Zellen, die mit spezifischen fluoreszierenden Reagenzien angefärbt wurden. Dazu werden suspendierte Einzelzellen in einem Hüllstrom in einer Quarzküvette an einem fokussierten Lichtstrahl an einem luftgekühlten Argon-Laser (488 nm, 15 mW) vorbeigeleitet. Der einfallende Lichtstrahl interagiert mit der Zelle und wird dabei gestreut. Der entlang der Achse einfallende Teil (FSC; „forward scatter“) ist ein Maß für die Zellgröße. Der im rechten Winkel einfallende Lichtanteil (SSC; „side scatter“) stellt ein proportionales Maß für die Granularität dar. Für die Darstellung der Meßwerte wurden Histogramme gewählt, die die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Fluoreszenzverteilung zeigen. Dabei ist auf der x-Achse die jeweilige Lichtintensität und auf der y-Achse die dazugehörige Zellzahl dargestellt.

3.7.1 Modifizierte Zellzyklusanalyse

Nach adenoviraler Infektion oder Zytostatikabehandlung wurden die Zellen nach den angegebenen Zeitpunkten durch Trypsinieren geerntet und in eine Mikrotiterplatte überführt. Durch Zugabe von 200 µl 2% Formaldehyd in PBS für 30 min auf Eis wurden die Zellen fixiert. Nach Zentrifugation für 3 min bei 1500 rpm wurde der Überstand entfernt, die Zellpellets in 50 µl eiskaltem PBS und 100 µl eiskaltem Ethanol resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt, 50 µl DNase freie RNase (40 µg/ml in PBS) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte die Resuspension der Zellpellets in 100 µl Propidiumjodid (50 µg/ml in PBS) und die Messung im FL-3 Kanal des FACS-Gerätes.

3.7.2 Bestimmung von Nekrose und Apoptose durch Annexin-V-FITC/Propidiumjodid-Färbung

Die morphologische Veränderung der Plasmamembran der Zelle ist ein frühes Ereignis bei der Initiation von Apoptose. Dabei kommt es zur Translokation des negativ geladenen Phosphatidylserin von der Innen- zur Außenseite und somit zur Änderung der funktionellen Asymmetrie der Plasmamembran. Damit wird im Organismus die Phagocytierung der toten Zelle eingeleitet. Bei Annexin-V handelt es sich um ein ca. 35 kDa Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für exponiertes Phosphatidylserin,

welches zu dessen Nachweis mit dem Fluorescein-isothiocyanat (FITC) gekoppelt ist (Raynal und Pollard, 1994). Durch die Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC und Propidiumjodid können somit frühapoptotische (Annexin-V-FITC positiv, PI negativ) und spätapoptotische / nekrotische Zellen, die für beide Farbstoffe positiv sind, voneinander unterschieden werden. Zur Messung wurden die Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten nach adenoviraler Infektion durch Trypsinieren geerntet, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 100µl Annexin-Bindungspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 2 µl Annexin-V-FITC und 10 µl PI (50 µg/ml) folgte eine fünfzehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend folgte die simultane Messung Annexin-V-FITC positiver Zellen im FL-1 und die der PI-positiven Zellen im FL-2 Kanal des FACS-Gerätes.

Annexin-Bindungspuffer: 10 mM HEPES/NaOH pH 7,2
 140 mM NaCl
 2,5 mM CaCl₂

3.7.3 Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$)

Eine wesentliche Eigenschaft der Mitochondrien ist das Vorhandensein eines elektrochemischen Gradienten zwischen ihrer inneren und der äußeren Membran. Der Protonen und der pH-Gradient entstehen hauptsächlich aufgrund einer aktiven, asymmetrischen Verteilung von Protonen zwischen Intermembranraum und Matrix. Im wesentlichen ist das Membranpotential dem Protonengradienten gleichzusetzen. Dieses Potential bildet auch die Grundlage der Methode, bei der kationische lipophile Farbstoffe, wie z.B. JC-1, in der Matrix akkumulieren können. Diese JC-1 Monomere können Aggregate bilden, die einen „Shift“ in ihren Absorptions- und Fluoreszenzspektren bewirken.

Dabei besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz durch J-Aggregatbildung und der Höhe des Membranpotentials. Viele Apoptosestimuli haben einen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials zur Folge, was sich nach JC-1-Färbung in einer Abnahme der Fluoreszenzintensität im FL-2 Kanal des FACS-Gerätes bemerkbar macht.

Für die Messung wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten durch Trypsinieren geerntet, mit PBS gewaschen und mit 2,5 µg/ml JC-1 (8 µM) in 1 ml PBS versetzt. Nach Inkubation bei 37°C für 30 min wurde mit PBS gewaschen, die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert und sofort im Anschluß gemessen.

3.7.4 Bestimmung der Pan-Caspase-Aktivität

Die Aktivität von Caspasen in der Zelle läßt sich durchflußzytometrisch bestimmen. Verwendet wird dazu das zellpermeable FITC-konjugierte Peptid zVAD-fmk. Die

Peptidsequenz VAD entspricht einer Struktur, die von den aktiven Zentren aller zellulären Caspasen erkannt und gebunden wird. Die Bindung von VAD-fmk an aktivierte Caspasen führt zu einer Zunahme der Fluoreszenz der Zellen im Vergleich zur Kontrolle, kann dann im FL-1-Kanal des Durchflußzytometers gemessen werden.

Für die Messung wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten durch Trypsinieren geerntet und mit PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden in 200 µl Medium ohne Zusätze resuspendiert und mit 10 µM „CaspACETMFITC-VAD-FMK *in situ* Marker“ gemischt. Nach 20minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen zur Entfernung des nicht gebundenen Farbstoffs zweimal mit PBS gewaschen und in 200 µl PBS resuspendiert. Die Messung erfolgte sofort nach den Waschschritten im FL-1 Kanal des FACS-Gerätes.

3.7.5 Messung des Calcium-Effluxes aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER)

Bei Thapsigargin handelt es sich um ein Sesquiterpen-Lacton, welches aus der Umbellifere *Thapsia garganica* gewonnen wird (Rasmussen *et al.*, 1978). Es setzt Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, wie z.B. dem ER frei, indem es die Ca^{2+} -ATPase des ER (SERCA) spezifisch hemmt. Andere in der Plasmamembran lokalisierte Ca^{2+} -ATPasen sowie (1,4,5) IP_3 werden davon nicht beeinflusst. Somit kann Thapsigargin als Positivkontrolle für den maximalen Ca^{2+} -Efflux eingesetzt werden. Bei Fluo-3/AM handelt es sich um ein Acetoxymethyl (AM) Ester-Derivat, welches als ungeladenes Molekül zellpermeabel ist. Nach Eintritt in die Zelle werden lipophile „Blockgruppen“ durch unspezifische Esterasen abgespalten, was zur Bildung eines geladenen Moleküls und dessen intrazellulären Akkumulation führt. Nach Bindung von Ca^{2+} -Ionen erfolgt eine Zunahme der Fluoreszenzintensität, welche sich durchflußzytometrisch bestimmen läßt.

Neben den behandelten Zellen und einer unbehandelten Mediumkontrolle wurden auch Zellen mitgeführt, die zuvor für eine Stunde mit 20 µM/ml Thapsigargin bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden. Sie dienen sowohl als interne Positivkontrolle für die Färbungsreaktion, als auch für das Maß der maximalen Freisetzung von Calcium aus dem ER.

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe von Thapsigargin oder adenoviraler Infektion durch Trypsinieren geerntet, mit PBS gewaschen und in 500 µl PBS mit einer Endkonzentration von 500 nM Fluo-3/AM resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 1,5 h bei 37°C im Brutschrank. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, pelletiert und in 200 µl PBS aufgenommen. Die Messung der Proben erfolgte sofort im Anschluß im FL-1 Kanal des FACS.

3.8 Immunfluoreszenz

Für den Nachweis exogen exprimierten Smac-Proteins mittels Immunfluoreszenz wurde die Zelllinie DU145 mock verwendet. Die Zellen wurden auf runden Deckgläschen in 12 Loch-Kulturschalen kultiviert und nach 24 h mit 25 MOI Ad-Smac nach Standardbedingungen infiziert. Nach weiteren 24 h erfolgte zur Färbung der Mitochondrien die Inkubation für 1 h bei 37°C mit MitoTracker Green FM in einer Endkonzentration von 500 nM. Dieser Farbstoff ermöglicht eine spezifische Anfärbung der Mitochondrien. Ferner weist er in wässriger Umgebung keine, nach Akkumulation in der lipidhaltigen Umgebung der Mitochondrien jedoch eine Fluorescein-ähnliche Fluoreszenz auf (Keij *et al.*, 2000).

Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden diese mit 1% frischem Paraformaldehyd für 30 min auf Eis fixiert. Die Permeabilisierung erfolgt mit eiskalten 100% Methanol für 1 min. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgt das Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit 1% BSA in PBS für 1 h bei 4°C. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper gerichtet gegen Smac (in 1% BSA in PBS) ü.N. bei 4°C, dreimaliges Waschen mit PBS und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (in 1% BSA in PBS) für 1 h bei RT. Nach Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen auf Filterpapier abgetropft und mit der Zellseite nach unten in einen Tropfen „Fluorescent mounting medium“ auf Objektträger überführt und ü.N. bei 4°C getrocknet. Die mikroskopische Auswertung der Präparate wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Leica TCS SP2; Leica, Wetzlar) bei einer 400fachen Vergrößerung unter Ölimmersion, durchgeführt. Dabei wird, anders als bei der Lichtmikroskopie, sowohl das von der Laserquelle ausgehende, als auch das vom Präparat emittierte Licht in sog. „confocal pinholes“ fokussiert. Dadurch werden andere Lichtquellen seitens der Umgebung und des Präparates bei der Errechnung des endgültigen Bildes nicht berücksichtigt. Zum Erhalt eines zweidimensionalen Bildes wird das Präparat in einer Ebene gescannt. Die einzelnen Bilder für die unterschiedlich fluoreszierenden Antikörper, bzw. Mitochondrienfarbstoff, wurden am Computer zu einer zweifarbigen Darstellung zusammengeführt.