

6. Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 HL-60-Zellen

Die HL-60-Zelllinie wurde 1976 aus dem peripheren Blut einer 36jährigen Patientin mit der Diagnose Akute-Promyelozyten-Leukämie (APL), nach der French-American-British (FAB)-Klassifikation M3, etabliert (Gallagher et al., 1979). Seitdem wurde HL-60 in vielen Publikationen als Promyelozytenleukämie repräsentierende Zelllinie bezeichnet. Mittlerweile wird diese Herkunft bestritten. Denn laut Drexler et al. (1995) gibt es folgende Möglichkeiten, eine Zelllinie irrtümlicherweise einem falschen Leukämietyp zuzuordnen:

- Die Erstdiagnose stimmt nicht mit dem tatsächlichen Leukämietyp des Spenders überein.
- Die onkogene Transformation ergibt einen instabilen Klon, der sich in der Zellkultur immer mehr vom ursprünglichen Leukämietyp unterscheidet.
- Die erhöhte Mitoserate in der Zellkultur ist durch virusinduzierte Wachstumsstimulation – z.B. durch Epstein-Barr-Virus – und nicht durch onkogene Transformation verursacht.
- Die etablierte Zelllinie ändert sich durch Kontamination mit anderen Zellen.

Die Wichtigkeit der eindeutigen Zuordnung einer Zelllinie zum Primärtumor äußert sich in experimentellen Erkenntnissen über eine Zelllinie und daraus entstehenden Rückschlüssen auf den Primärtumor und Festlegung des Therapieansatzes. Die APL (FAB M3) wird im Vergleich zu den anderen akuten myeloischen Leukämien auf einzigartige Weise therapiert (Warrell, 1993): Therapiestrategie ist hier nicht allein die zytotoxische Chemotherapie, sondern eine zusätzliche Differenzierungsinduktion neoplastischer Promyeloblasten durch All-Trans-Retinoat (ATRA) und Retinoatanaloga mit einhergehendem Wachstumsstop. Durch ATRA kann eine Remission erfolgen. Diese ist jedoch nur von kurzer Zeit und geht meist in einen ATRA-refraktären Rückfall über. Wissenschaftliches Interesse besteht in der Aufklärung der neuentstandenen ATRA-Resistenz im *in vitro*-Modell. Dalton Jr. et al. postulierten (1988) eine Neuklassifikation der HL-60-Zelllinie nach FAB als M2-Typ, welcher einer akuten Myeloblasten-Leukämie (AML) mit anderem klinischen Verlauf und anderer Therapie entspricht. Die angewandten Klassifikationskriterien für APL waren Morphologie,

Klinik und besonders der Translokationsnachweis t(15;17) im Karyotyp. Diese wurden von der HL-60-Zelllinie nicht erfüllt. 1995 wurde HL-60 von Drexler als *in vitro*-Modell der APL nochmals überprüft:

- *Morphologie*: Die APL-Ableitung läßt sich weder bestätigen noch verwerfen.
- *Zytogenetik*: Das G-Bandenmuster und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zeigen keine für APL typische Translokation t(15;17).
- *Immunphänotyp*: Die APL ist durch das Immunphänotypmuster CD33 positiv, CD13 positiv, CD14 negativ, CD15 negativ, HLA-DR negativ charakterisiert, während HL-60 CD15 und HLA-DR positiv ist.
- *Zytochemie*: Der für Promyelozyten und Myelozyten typische Nachweis von Myeloperoxidase findet sich in HL-60 wieder. In HL-60 ist das für die APL typische Antikoagulationsprotein Annexin VIII nicht vorhanden.
- *Differenzierung*: HL-60-Zellen lassen sich wie bei der APL durch ATRA zu Granulozyten differenzieren. Zusätzlich können HL-60-Zellen nach TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-azetat)- oder Vitamin D3-Inkubation zu Monozyten/Makrophagen werden.

Die HL-60-Zelllinie ist demnach kein *in vitro*-Modell für eine APL-spezifische Tumorforschung, jedoch bietet es ein großes Forschungsfeld im Bereich der Leukämogenese, Differenzierung und Adhäsion.

6.1.2 Nährmedium

RPMI-Kulturmedium 1640

Gibco (Karlsruhe)

10 g RPMI-Trockenpulver

2 g NaHCO₃

ad 1 l aqua bidest., pH 7,2, mit NaHCO₃ einstellen, 300 mOsmol

Das Medium wird sterilfiltriert und bei 4°C zwischengelagert.

FKS (Fetales Kälberserum)

Biochrom (Berlin)

Mycoplasmenfreies FKS wurde chargenweise ausgetestet, zur Komplement-Inaktivierung für 30 min auf 56°C erwärmt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Komplettes Nährmedium für HL-60-Zellen

RPMI-1640 mit 10 % FKS

2 mM L-Glutamin

1 % Penicillin (100 MU)/Streptomycin (100 mg/l)

6.1.3 Chemikalien

Laborchemikalien wurden von den Firmen ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), Biochrom (Berlin), Serotech (Berlin), Gibco (Detroit, USA) und Sigma (München) in höchster Qualitätsstufe bezogen. Chemikalien und Reagenzien weiterer Hersteller sind bei den entsprechenden Methoden ausgewiesen. Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Falcon (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Diese waren entweder sterile Einmal-Artikel oder sie wurden durch Hitze im Labor sterilisiert.

6.1.4 Puffer und Lösungen

Zellkultur-PBS

150 mM NaCl

3 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄1 mM KH₂PO₄

mit aqua bidest. auf 1l

pH 7,2

Lösung zum Einfrieren der Zelllinie

0,9 ml eiskaltes FKS

0,1 ml DMSO (10 % v/v)

Lösungen für die Aufarbeitung von Proteinen aus HL-60-ZellenSolubilisationspuffer

150 mM NaCl

1 mM Tris

1 mM CaCl₂

1 mM MgCl₂

1 % (v/v) Triton X-100

pH 7,4

Lösungen für die SDS-PolyacrylamidgelelektrophoreseGellösungenLösung A

30 % Acrylamid (w/v)

0,8 % N,N'Methylenbisacrylamid (w/v)

Lösung B

0,2 % SDS (w/v)

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

Lösung C

0,2 % SDS (w/v)

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

Laufpuffer

25 M Tris/HCl, pH 8,8

192 M Glycin

0,1 % SDS (w/v)

7%ige Trenngellösung

2,25 ml Lösung A

2,25 ml Lösung B

4,5 ml aqua bidest.

45 µl APS (10%)

4,5 µl TEMED

5 x Probenpuffer

14,5 % SDS (w/v)

0,3 M Tris/HCl, pH 6,8

50 % Glycerin (v/v)

26 % 2-Mercaptopropandiol

0,015 % Bromphenolblau (w/v)

Lösungen für den Western-BlotTransfer-Puffer

114 mM Glycin
25 mM Tris/HCl, pH 8,3
10 % Ethanol (v/v)

Ponceau-Färbelösung

2 % Ponceau-Rot (w/v)
30 % TCA (v/v)
30 % Sulfosalicylsäure (w/v)
vor Gebrauch 1:4 mit aqua bidest verdünnen

Ponceau-Entfärbelösung

1 % Essigsäure (v/v)

WaschpufferPBS-Puffer

150 mM NaCl
3 mM KCl
8 mM Na₂HPO₄
1 mM KH₂PO₄
pH 7,8

PBS-Tween

PBS-Puffer + 0,1 % Tween 20 (v/v)

Blockierpuffer

10% Milch-PBS-Lsg.

Peroxidase-Reaktion

Luminol-Lösung a

6,8 mM p-Cumarsäure
in DMSO

Luminol-Lösung b

1,25 mM Luminol
in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5

Luminol-Lösung c

3 % H₂O₂ (v/v)

Entwickler

Kodak GBX Entwicklerkonzentrat, 1:5 zu verdünnen

Fixierer

Kodak GBX Fixiererkonzentrat, 1:5 zu verdünnen

Lösungen für die Biotin-Streptavidin-PräzipitationBiotinylierung vitaler HL-60 Zellen

EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin Pierce

4 mg gelöst in 100 µl DMSO Merck

Streptavidin-Präzipitation

Streptavidin-Agarosesuspension Sigma

Lösungen für die FACS-Analyse

Zellkultur-PBS

FACS-Flow-Puffer Becton Dickinson

Lösungen für die AdhäsionsassaysAdhäsionsplattenbeschichtung:

Fibronektin Sigma

aufbewahrt bei -20 °C,

gelöst in PBS 10h bei -4 °C

1 %ige BSA-PBS-Lsg

FarbreaktionSubstratpuffer

0,1 M NaAc

0,5 % Triton

0,05 M NaH₂PO₄

pH 4,2

10 µl H₂O₂

20 mg OPD Sigma

Stoppuffer

1 M Zitronensäure

HRP

20 mg/ml in PBS

Sigma

Adhäsionsmodulatoren

Sialinsäurevorläufer-Analoga	herkömmliche Modulatoren
10 mM ManNAc Sigma	800 nM PMA Sigma in 0,1% Ethanol gelöst in PBS verdünnt
10 mM ManNProp hergestellt von Dr. M. Mickleit	500 µM Calphostin C Biomol (UCN-1028) gelöst in DMSO
	50 mM Mn ²⁺ gelöst in aqua bidest.

Tab. 2: Konzentrationen der eingesetzten Adhäsionsmodulatoren.

6.1.5 Kits, Marker, Antikörper

Kits

BCA-Protein-Assay-Kit

Atlas Array Technologie

Clontech

MarkerProtein-Molekulargewichtsstandards

Prestained Molecular-Weight-Standard Sigma

(196 kDa, 118 kDa, 90 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 33,5 kDa)

AntikörperAntikörper im Westernblot

Mouse-Anti-Human-IgG1

Anti-β1-Integrin mAb 18

Transduction Laboratories

Goat-Anti-Mouse-IgG

(Peroxidase-Konjugat)

Dako, Hamburg

Antikörper im FACS

Mouse-Anti-Human-IgG2a

Anti- β 1-Integrin mAb K20 Immunotech

Mouse-Anti-Human-IgG1

Anti- β 1-Integrin mAb 12G10 Serotec

Goat-Anti-Mouse IgG

(Fab specific)

FITC Conjugate Sigma

Antikörper für Immunfluoreszenz

Anti-Paxillin-Mouse IgG Transduction

Anti-Mouse-IgG-Fluoreszein-

Isothiozyanat-gekoppelt Transduction

6.1.6 Geräte

In der Zellkultur verwendete nicht-sterile Glas- und Plastikmaterialien wurden in einem Autoklaven bei 120°C und 202,7 kPa für 30 min sterilisiert.

Autoklav	Integra Biosciences (Fernwald)
Brutschrank (Zellkultur)	6000 Heraeus
Cleanbench	Faster 1, Bio-Flow-Technik
Particle Counter	Coulter
Filme	Kodak X-OMAT AR
Filmentwicklungsmaschine	Curix 60, AGFA
Gelelektrophorese	Mini-Protean 2, BioRad
Heizblock	Thermomixer 5336, Eppendorf
Mikroskop	TMS, Nikon
Osmometer	Roebbling (Berlin)
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf
Plastikartikel	
Einfrierröhrchen	Nunc (Wiesbaden)
Kulturflaschen	TPP
25 cm ²	
75 cm ²	
Petrischalen	Nunc (Wiesbaden)
Röhrchen	
2 ml	Eppendorf
15 ml	TPP
50 ml	Becton Dickinson
96-Well-Mikrotiterplatten	Imunosorb
Spektralphotometer	Ultrospec 3000, Pharmacia
Spritzen, Kanülen	B. Braun (Melsungen)
Sterilfilter	Schleicher und Schuell (Dassel)
Tischzentrifuge	Biofuge Pico, Heraeus
Zellzentrifuge	Megafuge 1, Heraeus (Hanau)

6.2 Methoden

6.2.1 Zellkultur

Zellkultivierung

Die HL-60-Zellen wurden in ihrem Kulturmedium im CO₂-begasten Brutschrank bei 37°C in 75cm² Kulturflaschen kultiviert. Je nach Zelldichte wurden die Zellen alle 2 bis 3 Tage mit frischem kompletten Nährmedium verdünnt.

Mykoplasmentest

Die verwendeten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmen getestet. Der Mycoplasmentest (Mycoplasma TC Gen Probe Inc., San Diego, CA, USA) war stets negativ.

Vitalitätsbestimmung

Viele Vitalitätstests in der Zellkultur beruhen auf der Tatsache, daß bestimmte Farbstoffe nur von lebenden Zellen aufgenommen oder umgesetzt werden können, andere wiederum nur über vorgeschädigte Zellmembranen in die Zelle diffundieren oder von toten Zellen nicht umgesetzt werden können. Zur Vitalitätsbestimmung wurden in dieser Arbeit Trypanblau eingesetzt. Trypanblau färbt tote Zellen, nicht aber solche mit intakter Zellmembran an. Dieser Test wurde gleichzeitig zur Zellzahlbestimmung verwendet.

Durchführung:

Zu einer Zellsuspension (80 µl) werden 20 µl einer 0,1%igen Trypanblaulösung gegeben. Nach Mischung erfolgt die Auszählung in der Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Der Test muß innerhalb von 3 bis 5 min ausgewertet werden, da danach die Anzahl der angefärbten Zellen ansteigt (Empfindlichkeit vom Zelltyp abhängig).

Einfrieren der Zellen

Die Zellen werden nach dem Pelletieren in eiskaltem FKS resuspendiert und mit 10 % DMSO versetzt. Die Zellsuspension wird in Einfrierröhrchen überführt. Die Aufbewahrung erfolgt in flüssigem Stickstoff bei -196°C .

DMSO verhindert beim Einfrieren die Bildung von Eiskristallen, die die Zellen zerstören würden. Sowohl beim Einfrieren als auch beim Auftauen sollte schnell gearbeitet werden, da DMSO für die Zellen bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen toxisch ist.

Inkubation mit Sialinsäurevorläufer-Analoga

Zur Inkubation mit den Sialinsäurevorläufer-Analoga wurden aus einem Zellkulturpool gleiche Volumina Zellsuspension entnommen und in 25 cm^2 Kulturflaschen passagiert. Die Fraktionen wurden mit $400\text{ }\mu\text{l}$ 500 mM ManNAc bzw. ManNProp versehen, die Kontrolle mit $400\text{ }\mu\text{l}$ PBS, und ad 20 ml mit frischen komplettem Nährmedium aufgefüllt. Die 1:50 Verdünnung der Analoga führte zu der Endkonzentration 10 mM ManNAc bzw. ManNProp, mit der die Zellen 4 h , 48 h und 72 h inkubiert wurden.

Zur Untersuchung gleicher Proteinmengen aus dem Zellsolubilisat in der Westernblot-Analyse wurde die Proteinbestimmung anhand der BCA-Methode durchgeführt.

Für die Ansätze in der FACS-Analyse und im Adhäsionsassay wurden die Zellen im Particle-Counter gezählt. Pro Fraktion wurden 2×10^6 bzw. 3×10^6 bzw. 5×10^6 Zellen passagiert.

Zeitabhängige Auswertung des ManNAc- bzw. ManNProp-Einflusses im FACScan: Um die FACS-Analyse aller Fraktionen zum gleichen Zeitpunkt durchzuführen, wurden die Kulturen zeitverzögert angesetzt.

6.2.2 Proteinaufarbeitung

Zellsolubilisierung

Trennung des Zytosols und der Membran vom Zellkern

Die Zellsuspension wurde aus der Kulturflasche in 50 ml Röhrchen umgefüllt und 3 min bei 900 RPM zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte ein Waschgang mit Zellkultur-PBS. Dann wurden die Zellen mit 1 ml Solubilisationspuffer und $2\text{ }\mu\text{l}$ Proteaseinhibitor bei 4°C durch mehrmaliges Aufziehen in einer 1 ml -Insulinspritze zerrissen.

Die Suspension wurde 1 h bei 4°C gedreht. Nach 15 min Zentrifugation mit 1300 RPM wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Zellkultur PBS gelöst.

Proteinbestimmung

BCA-Methode (Smith et al., 1985)

Für die Durchführung der Proteinbestimmung wurde der BCA-Test-Kit der Firma Pierce, Rockford, USA, verwendet. Der Kit enthält die Lösung A (BCA) und Lösung B (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Proteine reduzieren im alkalischen Milieu Cu^{2+} zu Cu^+ . Die Bichinolin-4-carbonsäure reagiert mit Cu^+ , wobei zwei Bichinolinsäure-Moleküle einen intensiv purpur gefärbten Chelatkomplex mit dem Cu^+ -Ion eingehen. Die vorliegenden Proben wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit je 200 μl der Reaktionslösung, die aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil der Lösung B zusammengesetzt wurde, versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Anhand einer Eichreihe aus Rinder-Serum-Albumin (BSA) bekannter Konzentrationen konnte die unbekannte Proteinkonzentration der zu testenden Probe bestimmt werden.

6.2.3 Westernblot-Analyse

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) (Laemmli, 1970)

Für die vertikale Elektrophorese von Proteinen wurde das Mini-Protean-System II der Firma Biorad verwendet. Grundsätzlich wurden Gelsysteme mit Trenn- und Sammelgel eingesetzt. Der Aufbau und die Ausstattung der Gelapparatur erfolgte nach den vom Hersteller empfohlenen Richtlinien. Die SDS-PAGE wurde unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit 5-fach konzentriertem Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei der konstanten Spannung von 120 V (Sammelgel) bzw. 180 V (Trenngel). Als Größenstandard diente der Prestained -Molecular-Weight-Standard und der „low-Marker“ der Firma Sigma.

Blotten von Proteinen (Towbin et al., 1979)

Tank-Verfahren

Verwendet wurden Blotapparaturen der Firma Biorad. Nach der Elektrophorese wurde der Sandwich-Blot luftblasenfrei zusammengebaut, so daß die Nitrozellulosemembran zur Anode zeigte. Der Transfer wurde bei 4°C mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA für 60 bis 70 min in Towbin-Puffer durchgeführt.

Die Kontrolle des Transfers erfolgte durch Färbung der Proteine auf der Membran mit dem Ponceau-Rot. Dazu wurde die Membran ca. 1 min in Ponceau-Lösung geschwenkt und dann in aqua dest. solange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards wurden markiert und die Membran durch Waschen mit PBS-Tween wieder entfärbt.

Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot-Analysen

Zum Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrozellulosemembran erfolgte die Blockierung in 10% Magermilchpulver in PBS für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Alle anschließenden Inkubations- und Waschschrte wurden in PBS-Tween oder PBS, pH 7,8, durchgeführt. Die Membran wurde zweimal gewaschen, anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, für 3 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde 6 x 10 min gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper, z.B. einem mit Peroxidase gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:5000), für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlichem Waschen, mindestens 6 x 10 min, konnte der Blot mit dem ECL-Kit der Firma Amersham entwickelt werden. Hierzu wurde die Membran mit Whatman-Papier getrocknet und anschließend mit einer Mischung aus 10 µl Luminol-Lösung A, 1 mL Luminol-Lösung B und 3 µl Luminol-Lösung C für 1 min inkubiert. Nach Trocknen mit Whatman-Papier wurden die Blots in eine Folie gelegt und für 5 s bis 20 min einem Röntgenfilm exponiert, der anschließend in der Entwicklungsapparatur Curix 60 der Firma Agfa entwickelt wurde.

Auswertung

Alle im Kapitel Ergebnisse dargestellten Westernblot-Analysen stehen stellvertretend für drei unabhängig angefertigte Experimente.

Verwendete Erst- und Zweitantikörper

Erstantikörper	Verdünnung in PBS-Tween 0,1%	Zweitantikörper	Verdünnung in 1% BSA-PBS
Mouse-Anti-Human-IgG1 Anti-β1-Integrin mAb 18	1:2000	Goat-Anti-Mouse-IgG (Peroxidase-Konjugat)	1:5000

Tab. 3: Verdünnung der verwendeten Antikörper in der Westernblot-Analyse.

6.2.4 Biotin-Streptavidin-Präzipitation

Biotinylierung vitaler HL-60-Zellen

Aus jeder Fraktion wurden annähernd 25×10^6 Zellen/ml entnommen, dreimal mit kaltem Zellkultur-PBS gewaschen (Zentrifugation 3 min bei 900 RPM), damit die Zellmembran starr wird und kein Biotin in das Zellinnere eindringen kann. 4mg Biotin in 100 µl DMSO wurde dem Zellpellet zugegeben und ad 4 ml mit kaltem PBS resuspendiert, so daß sich eine Biotin-Konzentration von 1 mg/ml einstellte. Auf einem leicht schwenkendem Schüttler wurde die Zellsuspension 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte wieder dreimal der Waschgang mit kaltem PBS.

Streptavidinpräzipitation

1 ml Streptavidinagarose wurde dreimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation höchstens bei 1600 RPM). Jedes biotinmarkierte Zellpellet erhielt 80 µl Streptavidinagarosesuspension und wurde 1h bei 4°C geschwenkt. Dann wurde dreimal mit 1ml Solubilisationspuffer und 2 µl Proteinaseinhibitor gewaschen und bei 1600 RPM zentrifugiert. Der intrazelluläre nichtmarkierte Proteine enthaltende Überstand wurde abpipettiert und das übriggebliebene Streptavidinagarose-Proteinpellet in 80 µl fünffach konzentrierten reduzierendem Probenpuffer 5 min bei 95°C gekocht. Schließlich wurde bei 13000 RPM zentrifugiert und der die Membranfraktion enthaltende Überstand gewonnen.

6.2.5 FACScan (Fluorescence-Activated-Cell-Scanning)-Analyse

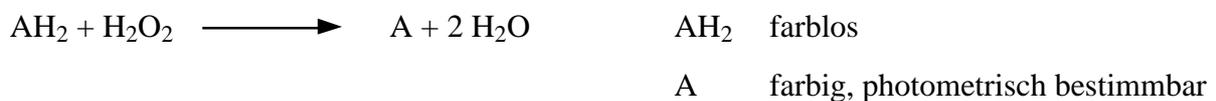
In der FACScan-Analyse werden Zellen einzeln hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom an einem Analysepunkt vorbeigeleitet (hydrodynamische Fokussierung), wo sie auf ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften hin durch einen Laser untersucht werden. Am Analysepunkt kann anhand des Vorwärtstreulichts des Laserstrahls die Zellgröße und anhand des Rechtwinkelstreulichts die Zelldichte und Granularität bestimmt werden. Die Zellen können des weiteren durch Markierung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen bestimmte Proteine charakterisiert werden. Es können mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig gemessen werden, wenn sich ihre Absorptionsspektren überlappen, ihre Emissionsspektren aber unterschiedlich sind.

Vorinkubierte HL-60-Zellen (siehe Inkubation mit Sialinsäurevorläufer-Analoga) wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml zunächst mit Zellkultur-PBS gewaschen und dann mit dem Erstantikörper Anti- $\beta 1$ -mAb K20 (25 $\mu\text{g/ml}$) bzw. Anti- $\beta 1$ -mAb 12G10 (10 $\mu\text{g/ml}$) in FACS-Flow-Puffer plus 1% BSA 1h bei 4°C markiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Flow-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem FITC-konjugierten Zweitantikörper Goat-anti-mouse-IgG in FACS-Flow-Puffer plus 1% BSA 1h bei 4°C. Zur Messung einer unspezifischen Bindung des Zweitantikörpers wurde ein Ansatz nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Nach weiteren zwei Waschgängen mit FACS-Flow-Puffer wurden die Zellen wieder auf 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Aus dieser Population wurden im FACScan die Fluoreszenzintensitäten von 1×10^5 Zellen gemessen und eine Verteilungskurve angelegt.

6.2.6 Adhäsionsassay

Die Adhäsion von Zellen wird durch Quantifizierung der Fraktion der adhärenen Zellen analysiert, wobei sowohl die direkte Zellzählung als auch verschiedene indirekte Methoden in Gebrauch sind. Hier wurde der enzymatische Nachweis adhärenen Zellen nach der Peroxidase-Methode (Löster and Horstkorte, 2000) gewählt.

Das Enzym katalysiert über die Oxidation eines geeigneten Substrates die Bildung eines Farbstoffes:



Die Farbstoffbildung ist der Zahl der adhärenen Zellen proportional.

Adhäsionsplattenbeschichtung

Die Adhäsionsplatte wurde zur einen Hälfte mit 20 µg/ml Fibronectin (spezifische Adhäsion) und zur anderen Hälfte mit 10 mg/ml BSA (unspezifische Adhäsion) als Kontrolle beschichtet (50 µl/Well) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Platte zweimal mit PBS (150 µl/Well) gespült und für 4 h bei 4°C mit 1% BSA-PBS-Lsg. (200 µl/Well) blockiert. Nach einem weiteren Waschgang mit PBS wurde vor der Zellaussaat serumfreies Medium vorgelegt (50 µl/Well).

Peroxidasemarkierung der Zellen

Es wurden unbehandelte HL-60-Zellen als Kontrolle und mit ManNAc- bzw. ManNProp-inkubierte HL-60-Zellen verwendet (siehe Abschnitt "Inkubation mit Sialinsäurevorläufer-Analoga"). 6×10^6 Zellen pro Fraktion wurden in 15 ml Rörchen 3 min. bei 900 RPM zentrifugiert, um anschließend den serumhaltigen Mediumüberstand abzusaugen. Dann wurden die Zellpellets mit jeweils 1 ml frischem Medium resuspendiert und mit 100 µl HRP (20 mg/ml) 15 min bei 37°C im Brutschrank markiert. Anschließend wurden die Fraktionen 3 min bei 900 RPM zentrifugiert und vom Überstand getrennt. Dann wurden sie mit 5ml vorgewärmten serumfreien Medium gewaschen, wieder wie oben zentrifugiert und vom Überstand getrennt.

Stimulation der Zellen mit PMA, Mn²⁺ und Calphostin und Ausplattieren (Tab. 4)

Nach der Peroxidase-Markierung wurden die Zellpellets mit vorgewärmten serumfreien Medium (SFM) und den herkömmlichen Adhäsionsmodulatoren ad 1,5 ml resuspendiert. Aus jeder Fraktion wurde ein Volumen von 50 µl Zellsuspension pro Well ausplattiert. Dies entspricht 2×10^5 Zellen pro Well. Da in jedem Well bereits 50 µl serumfreies Medium vorgelegt worden sind, halbieren sich die Konzentrationen der Adhäsionsmodulatoren

	<u>PBS</u> 30 µl	800 nM <u>PMA</u> 30 µl	50 mM <u>Mn²⁺</u> 30 µl	0,5mM <u>Calphostin C</u> 1,5 µl / 3 µl
<u>Vorinkubierte Zellen</u>	ad 1,5 ml SFM und 1:2 Verdünnung <i>Kontrolle</i>	ad 1,5 ml SFM und 1:2 Verdünnung <i>8 nM</i>	ad 1,5 ml SFM und 1:2 Verdünnung <i>0,5 mM</i>	ad 1,5 ml SFM und 1:2 Verdünnung * <i>0,25µM / 0,5 µM</i>

* bei der PMA / Calphostin C Kombination in Abb. 16 wurde PMA 5 min vor Calphostin C gegeben

Tab. 4: Konzentrationen herkömmlicher Adhäsionsmodulatoren für die Inkubation hochsialylierter HL-60-Zellen.

Quantifizierung adhärenter Zellen

Die Zellen wurden für 1h Adhäsionszeit im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach wurde zweimal mit vorgewärmten PBS (200 µl/Well) durch vorsichtiges Pipettieren und Ausklopfen der Adhäsionsplatte gespült. Anschließend wurde die Adhäsionsplatte mit dem Farbreaktionspuffer (200 µl/Well) für 30 Min. im Brutschrank bei 37°C inkubiert und oben gezeigte Reaktion eingeleitet. Nach Beendigung der Reaktion mit Stoppuffer (50 µl/Well) wurde die aufgetretene Färbung photometrisch bei 450 nm gemessen.

6.2.7 Immunfluoreszenz

Unbehandelte und ManNAc, ManProp- bzw. PMA-inkubierte HL-60-Zellen wurden auf Träger mit Fibronectin (20 µg/ml) ausgesät und mit 3% Paraformaldehyd in PBS 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Saponin permeabilisiert, mit 0,5% BSA-PBS und 0,1 M Glycin 20 min bei Raumtemperatur blockiert und mit dem primären Antikörper 30 min bei Raumtemperatur markiert. Der sekundäre mit Fluorescein-Isothiozyanat-gekoppelte Antikörper wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und nach Elevation-Zugabe mit einem Objektgläschen zugedeckt. Die Präparate wurden mit einem Zeiss-Axiolab-Mikroskop ausgewertet.

6.2.8 cDNA-Expressionsanalyse

Die cDNA-Expression wurde mittels der Atlas Array Technologie bestimmt (Clontech). Die Analyse erfolgte den Richtlinien des Herstellers entsprechend. HL-60-Zellen wurden 48h mit und ohne 10 mM ManNProp inkubiert. Anschließend wurde aus den Zellpellets RNA gewonnen, auf Menge und Reinheit mittels 1% reduzierender Agarosegelelektrophorese überprüft und mittels RT-PCR unter Anwendung des vom Hersteller mitgelieferten CDS-Primers in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Proben wurden mit ³²P markiert und mittels Säulenchromatographie gereinigt. Die Hybridisierung der markierten cDNA mit den Arrayproben erfolgte über Nacht bei 68°C. Die Arrays wurden gewaschen und mittels eines Phosphor-Imagers ausgewertet. Die dargestellten cDNA-Arrays stehen stellvertretend für drei unabhängig durchgeführte Experimente.