

## **4 Methoden**

### **4.1 Zellkultur**

#### **4.1.1 Zellkulturmedien**

Die Zellen wurden in folgenden Medien kultiviert:

5583-S, DLD1, SW480, LS174T und HCT116 in DMEM + 10% FCS.

HT 29, CSC-1, NCM460 in RPMI + 10% FCS.

LoVo in Nut Ham Mix + 20% FCS.

HCT116+ch3 in DMEM + 10% FCS + 0,4 mg/ml Geneticin. Die Experimente wurden ohne Geneticin durchgeführt.

#### **4.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Die Zellen wurden in Kryoröhrchen in 80% FCS und 20% DMSO tiefgefroren und in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}$  C aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei  $37^{\circ}$  C erwärmt und langsam in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen in 10 ml kaltem Medium suspendiert und 5 Minuten bei  $400 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden sie auf Zellkulturflaschen verteilt und mit weiteren 10 ml Medium inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium erneuert, um tote Zellen zu entfernen.

Vor dem Einfrieren wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums mit 5 ml Trypsinpuffer gewaschen und mit 1 ml Trypsin für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden sie in 10 ml Medium aufgenommen, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 5 Minuten bei  $400 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, und die Zellen wurden in 1 ml kalter Lösung aus 80% FCS und 20% Dimethylsulfoxid aufgenommen, in ein Kryoröhrchen gegeben und in Kunststoffüllen eingeschweißt. Das DMSO verhindert Kristallisation innerhalb der Zellen während des Einfrierens. Die Zellen wurden zunächst für ein bis zwei Tage bei  $-70^{\circ}$  C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff mit einer Temperatur von  $-196^{\circ}$  C überführt wurden.

### **4.1.3 Kultivieren der Zellen**

Die Zellen wuchsen adhären und wurden in Zellkulturflaschen mit 10 ml des entsprechenden Mediums in einem Brutschrank mit in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37° C kultiviert. Unter sterilen Bedingungen erhielten die Zellen alle zwei bis drei Tage frisches Medium. Zur Passage wurden die etwa 60-80% konfluent gewachsenen Zellen alle drei bis vier Tage nach Waschen mit 5 ml Trypsinpuffer mit 1 ml Trypsinlösung für 10 Minuten inkubiert. Durch das Trypsin wurden die Zellen vom Boden abgelöst und Zell-Zell-Kontakte gelöst, so dass sich die Zellen abrundeten und vereinzelt vorlagen. Dann wurden die Zellen in Medium aufgenommen und die gewünschte Menge Zellen in die Flasche zurückgegeben. Durch den Proteinanteil im Kälberserum des Mediums wurde das Trypsin inaktiviert und eine weitere Proteolyse verhindert. Anschließend wurde 10 ml frisches Medium hinzugegeben.

### **4.1.4 Zellzahlbestimmung mit Trypanblaufärbung**

Um für die Versuche eine bestimmte Anzahl von Zellen auszusäen, wurden die Zellen nach Inkubation mit Trypsin in 5 ml Medium aufgenommen, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden in 10 ml Medium mit einer Pipette resuspendiert. Zu 50 µl Zellsuspension wurden 50 µl Trypanblau gegeben und anschließend mittels Hämatozytometer unter dem Mikroskop bei einer 20-fachen Vergrößerung gezählt. Zur Bestimmung der Anzahl Zellen in einem Milliliter wurde, um die Verdünnung und das Volumen im Hämatozytometer zu berücksichtigen, der Mittelwert der vier gezählten Quadrate mit  $2 \times 10^4$  multipliziert. Je nach Art des Experiments wurden zwischen 0,01 und 0,1 Zellen pro cm<sup>2</sup> in Petrischalen ausgesät.

## **4.2 Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität**

### **4.2.1 MTT-Test**

Der MTT-Test dient der Messung der metabolischen Aktivität von Zellen zur Bestimmung von Wachstum, IC<sub>50</sub>-Werten und Überleben. Der Test basiert auf der Ringspaltung des wasserlöslichen schwach gelben Tetrazoliumsalzes MTT durch mitochondriale

Dehydrogenasen lebender Zellen zu dem wasserunlöslichen dunkelblauen Formazan. Das Formazan wird mit organischen Lösungsmitteln wie Isopropanol wieder in Lösung gebracht. Es kann dann bei einer Wellenlänge von 550 nm photometrisch bestimmt werden. In diesem Test werden alle zum Zeitpunkt der Messung lebenden Zellen erfasst.

### Protokoll für den MMT-Test

**Tag 1** Zellen mit einer Konfluenz von etwa 50-70% wurden für 10-15 Minuten mit 1 ml Trypsin inkubiert. Die Zellen wurden gezählt und in Mikrotiterplatten ausgesät. Die Zahl der auszusäenden Zellen (**Tabelle 2**) wurden experimentell ermittelt, so dass die Konfluenz am Tag 4 zwischen 30-40 % betrug und die später gemessene optische Dichte im mittleren Bereich lag.

**Tabelle 2:** Zellzahlen für den MTT-Test

Zelllinie	LS 174T	5583-S	LoVo	HT 29	SW480	DLD1
Zellzahl pro Petrischale	7 000	10 000	10 000	3 000	6 000	6 000

Die Zellen wurden fünfmal in 100 µl Medium jeweils für 8 verschiedene Konzentrationen des Medikaments und jeweils zweimal 100 µl Medium als Leerwert in Mikrotiterplatten gegeben.

**Tag 2** Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen eines Zytostatikums verdünnt in 50 µl Medium für 48 Stunden. Die unbehandelten Zellen erhielten 50 µl Medium.

**Tag 4** Nach 48 Stunden wurden 25 µl MTT in jede Vertiefung hinzupipettiert, und die Platten wurden 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Dann wurden 100 µl Extraktionspuffer in jede Vertiefung hinzugegeben und mit einer Eppendorfpipette auf- und abpipettiert, damit sich die gebildeten Kristalle lösen konnten. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten mindestens 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Danach wurden eventuell vorhandene Luftblasen mit einer Nadel entfernt, da diese die Messung im Photometer stören würden. Die optische Dichte wurde bei 550 nm Wellenlänge im ELISA-Photometer gemessen, und die IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus den Überlebenskurven bestimmt. Der Prozentsatz überlebender Zellen wurde folgendermaßen berechnet:

$$100 \cdot \frac{(\text{Mittelwert der optischen Dichte der behandelten Zellen})}{(\text{Mittelwert der optischen Dichte der nicht behandelten Zellen})}$$

### 4.2.2 Klonogener Test

Zellen mit einer Konfluenz von 50% wurden für 10-15 Minuten mit 1 ml 0,5% Trypsin inkubiert. Danach wurde 1 ml Trypsinpuffer dazugegeben und die Zellen wurden auf- und abpipettiert, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Die Zellen wurden gezählt und je dreimal in 3 ml Medium in Petrischalen mit einer Wachstumsfläche von 22 cm<sup>2</sup> ausgesät. Die Zellzahlen (**Tabelle 3**) wurden experimentell bestimmt, so dass die gebildeten Kolonien nach 12-15 Tagen noch nicht ineinander wuchsen und in den Petrischalen mit den unbehandelten Zellen etwa 100 bis 200 Kolonien vorhanden waren. Die *plating efficiency* (PE) der Zellpopulation wird durch die Anzahl an Kolonien in der unbehandelten Kontrolle dividiert durch die Anzahl der ausgesäten Zellen errechnet. Für normale Zellen liegt sie zwischen 0,5 und 0,8. In Tumorzellen ist sie oft geringer und zum Teil kleiner als 0,01. Die *plating efficiency* der verschiedenen Zelllinien, aus der sich die Zahl der auszusäenden Zellen pro Schale ergibt, ist in **Tabelle 3** gezeigt.

**Tabelle 3:** Zellzahlen für den klonogenen Test

Zelllinie	<i>Plating efficiency</i> (PE)	Zellzahl pro Petrischale (22 cm <sup>2</sup> )
5583-S	18 – 21%	500
LS 174T	9 – 17%	800
LoVo	43 – 56%	200
HT 29	43 – 51%	200
SW480	25 – 37%	200
DLD1	39 – 42%	200
NCM460	35 – 51%	150
CSC-1	44 – 54%	200
HCT116+ch3	30 – 48%	950

Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Chemotherapeutika in 1 ml Medium behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Petrischalen mit 2 ml PBS gewaschen. Dann wurden 4 ml frisches Medium hinzugegeben und die Schalen im Brutschrank inkubiert und möglichst wenig bewegt, um ein Ablösen von proliferierenden Zellen zu verhindern.

Nach 12-15 Tagen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 2 ml kaltem PBS gewaschen und für 10 Minuten mit 2 ml eiskaltem Methanol fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Kolonien mit 3 ml Kristallviolett (Lösung 1:10 in Ethanol, dann Verdünnung 1:800 in PBS) für 15 Minuten gefärbt. Nach Entfernung des Kristallviolett wurden die Petrischalen erneut mit PBS gewaschen und an der Luft getrocknet.

Mit Hilfe von Mikroskop und Lichtschirm wurden die Kolonien mit mehr als 50 Zellen gezählt. Der Prozentsatz überlebender Kolonien wurde folgendermaßen berechnet:

$$100 \cdot \frac{(\text{Mittelwert der überlebenden Kolonien der behandelten Zellen})}{(\text{Mittelwert der überlebenden Kolonien der nicht behandelten Zellen})}$$

### **4.3 Nachweis von Apoptose und Seneszenz**

#### **4.3.1 Western Blot**

##### **Aussaat der Zellen**

Es wurden zwischen  $0,5 \times 10^6$  und  $1 \times 10^6$  Zellen in  $22 \text{ cm}^2$  Petrischalen in 3 ml Medium ausgesät. Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert und dann mit 5-FU ( $31,3 \text{ } \mu\text{M}$ ) über 48 Stunden behandelt. Die Spaltung von PARP wurde 48 und 72 Stunden nach der Behandlung bestimmt.

##### **Lysatherstellung**

Mittels Zellschaber wurden die adhärenen Zellen abgeschabt und mit den im Medium flottierenden Zellen in 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben, 5 Minuten bei  $400 \times g$  zentrifugiert, in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurden je nach Größe des Sediments 100 bis  $300 \text{ } \mu\text{l}$  Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren hinzugegeben. Die Zellen wurden für 15 Minuten auf Eis lysiert und alle 5 Minuten im Vortexmixer gemischt. Danach erfolgte die Trennung der solubilisierten Proteine von den nicht solubilisierten Zellresten durch Zentrifugieren bei  $15\,000 \times g$  für 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$ . Das Sediment wurde verworfen und aus dem Überstand wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

### Proteinbestimmung

Die verwendete Proteinbestimmungsmethode basiert auf Farbveränderungen des Farbstoffes in Lösungen mit unterschiedlichen Proteinmengen. Das Absorptionsmaximum für eine saure Lösung von Coomassie Brilliantblau wird von 465 nm auf 595 nm verschoben, wenn eine Proteinbindung zustande kommt. Aus einer Rinderalbuminlösung mit bekannter Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Nach Zugabe des Farbstoffes wurden diese Standardproben 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde ihre optische Dichte bei 595 nm im Photometer bestimmt. Die optische Dichte der Proben mit den unbekanntem Proteinkonzentrationen wurden ebenfalls gemessen, und anhand der Standardkurve wurde ihre Konzentrationen bestimmt.

### SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteinproben nach dem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Es wurden Acrylamidkonzentrationen von 7,5% für das Trenngel und von 3% für das Sammelgel verwendet. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten im Abstand von 1 mm gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach dreißigminütiger Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel darüber gefüllt. Nachdem die Polymerisation des Sammelgels beendet war, wurde das Gel in eine Elektrophoreseapparatur eingesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt.

Den Proteinproben war 5 x DTT Probenpuffer im Verhältnis 4:1 zugesetzt worden. Jeweils 20 µg Protein wurden pro Bahn über eine Stunde bei einer Spannung von 150 V elektrophoretisch aufgetrennt. Der mitaufgetragene Molekulargewichtsmarker wird in **Tabelle 4** beschrieben.

**Tabelle 4:** Verwendeter Molekulargewichtsmarker für die Elektrophorese.

Protein	Molekulargewicht (kDa)	Farbe
Myosin (Kaninchenmuskel)	285	Blau
β-Galactosidase (E. coli)	145	Türkis
Albumin (Rinderserum)	74	Pink
Ovalbumin (Hühnerei)	45	Gelb
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	29	Orange
Trypsininhibitor (Sojabohne)	22	Grün
α-Lactalbumin (Kuhmilch)	15	Lila
Aprotinin (Rinderlunge)	7	Blau

Sobald der im Probenpuffer enthaltenen Farbstoff Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel für 15 Minuten in 4°C kalten Blotpuffer gelegt.

### Western Blot

Das Gel wurde in einer Schale mit kaltem Blotpuffer auf einen Schwamm und ein darüber liegendes Filterpapier gelegt und mit einer 9 x 6,5 cm großen, vorher mit 70% Ethanol benetzten Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran bedeckt. Auf die Membran wurden ein zweites Filterpapier und ein weiterer Schwamm geschichtet. Diese Anordnung wurde in eine Halterung eingespannt und in die mit kaltem Blotpuffer gefüllte Blotkammer gehängt, so dass das Gel zur Kathode ausgerichtet war und die Membran zur Anode, damit die negative geladenen Proteine vom Gel auf die Membran übertragen wurden. Die Blotkammer wurde unter Kühlung mit Eis für zwei Stunden an einen Strom der Stärke 200 mA angeschlossen. Danach wurde die PVDF-Membran mit 5% Magermilchpulver in PBS Tween für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt, um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Nach Waschen mit PBS Tween wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper gegen Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase (PARP) inkubiert. Die verwendeten Antikörper sind in **Tabelle 5** beschrieben. Die während der Apoptose stattfindende proteolytische Spaltung der 116 kDa Form des PARP-Proteins in zwei Fragmente (89 und 24 kDa) kann durch eine Antigen-Antikörperreaktion nachgewiesen werden (106). Als zweiter Antikörper wurde Meerrettichperoxidase(HRP-)konjugiertes Ziegenimmunglobulin gegen Maus (IgG + IgM) verwendet. Der zweite Antikörper wurde in PBS Tween nach erneutem Waschen der Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur appliziert. Zur Detektion der Peroxidaseaktivität wurde die Membran nach Waschen mit PBS Tween für 5 Minuten mit einer Substratlösung inkubiert und die Lumineszenz des Produktes durch Belichten eines Films für 1-60 Sekunden mit der Membran dokumentiert. Zur Bestimmung der relativen Proteinexpression wurden die Banden mit einem *Scanner* gelesen und ihre Dichte wurde mit der Dichte der unbehandelten Kontrolle verglichen. Der Prozentsatz der PARP-Spaltung wurde folgendermaßen geschätzt:

$$100 \cdot \frac{(\text{Intensität der 89 kDa PARP-Bande})}{(\text{Intensität der 89 kDa PARP-Bande} + \text{Intensität der 116 kDa PARP-Bande})}$$

Um die Mengen aufgetragenen Proteins vergleichen zu können, wurde die Membran mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Actin, einem in Eukaryonten ubiquitär vorkommenden Protein des Zytoskeletts, inkubiert. Die Proteinmenge wurde mit dem zuvor beschriebenen Lumineszenz-Verfahren sichtbar gemacht und dokumentiert.

**Tabelle 5:** Verwendete Antikörper.

Spezifität	Molekulargewicht (kDa)	Herkunft	Endkonzentration
PARP	116 (intakt) 89 (fragmentiert)	Maus	1: 4 000 (Aszites)
$\beta$ -Actin Maus (IgG+ IgM) (peroxidasekonjugiert)	42	Maus Ziege	0,001 $\mu$ g/ml 0,25 $\mu$ g/ml

#### 4.3.2 SA-b-Gal-Färbung

Die Methode beruht auf dem Nachweis einer erhöhten Aktivität von SA- $\beta$ -Gal (*senescence-associated  $\beta$ -galactosidase*) in seneszenten Zellen.

Die Zellen wurden in 9,6 cm<sup>2</sup> Petrischalen ausgesät. Die Zellzahlen betragen zwischen 0,01 x 10<sup>6</sup> für die nicht behandelten und 0,1 x 10<sup>6</sup> für die behandelten Zellen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 5-FU (31,3  $\mu$ M) über 48 Stunden behandelt. Dann wurden sie mit PBS gewaschen und für 5 Tage in frischem Medium inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde jeweils 1 ml glutaraldehydhaltige Fixationslösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen dann mit 1 ml der Färbelösung mit 5-Bromo-4-chloro-3-indol- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-Gal) als Substrat über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, mit Deckgläsern eingedeckt und unter dem Mikroskop in 40-facher Vergrößerung evaluiert und fotografiert.