

6. Methoden

Falls nicht anders vermerkt, wurden die Arbeitsprotokolle den Methodensammlungen von Sambrook (Sambrook, 1989), Jones (Jones, 1996) und Poirier (Poirier, 1997) sowie den *Current Protocols* (Ausubel, 1991; Robinson, 1999) und der CD- bzw. Online-Version des *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products* (Haughland, 2001) entnommen.

6.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden gemäß den Angaben der Sammlungen, von denen sie bezogen wurden, kultiviert (Rojewski, 2002). Sämtliche Arbeitsschritte mit Zelllinien erfolgten an einer Sterilbank (GelAir BSB 6A, Flow Laboratories, Opera, Italien) unter Befolgung der Grundlagen für steriles Arbeiten (Jones, 1996; Poirier, 1997). Es kamen ausschließlich sterile Plastikwaren zum Einsatz. Alle selbst angesetzten Lösungen wurden vor Gebrauch steril filtriert (Porengröße der Einmal-Sterilfilter: 0,45 μm).

6.2 Auftauen von Zellen

Die von den Sammlungen für eukaryontische Zelllinien bezogenen Zellen wurden in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C rasch aufgetaut, in vorgewärmtes Medium aufgenommen und bei 500 x *g* für 7 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und die Zellen anschließend in der empfohlenen Dichte in Kulturmedium ausgesät.

6.3 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut

Peripheres Blut in Vacutainer® CPT™-Gefäßen (BD Biosciences, Heidelberg) wurde entsprechend den Herstellerangaben 20 Minuten bei 1800 x *g* zentrifugiert, und mononukleäre Zellen wurden aus dem Ficoll®-Gradienten isoliert und nach zweimaligem Waschen mit PBS in mit 20% FBS komplettiertem RPMI1640-Medium in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/mL aufgenommen (Schrezenmeier, 2000).

6.4 *Aufzucht von Zellen*

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Kendro, Berlin) in befeuchteter Atmosphäre bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe (NUNC, Wiesbaden). Alle zwei bis drei Tage wurde die Dichte der Zellsuspensionen bestimmt und die Zellen bei Bedarf entsprechend ihrer Dichte verdünnt. Die Zelldichte entsprach immer den vom Vertreiber beschriebenen Empfehlungen für die jeweilige Zelllinie.

6.5 *Bestimmung der Zelldichte*

Eine Probe der entsprechenden Zellsuspension wurde aus dem jeweiligen Kulturgefäß entnommen und je nach Zelldichte im Verhältnis 1:1 bis 1:10 in gepufferter Trypanblau-Lösung (0,4% Trypanblau; 0,81% NaCl; 0,06% KH₂PO₄) zur Diskriminierung toter von lebenden Zellen gemischt. Die Zelldichte wurde in einer Neubauer-Zählkammer an einem Invertmikroskop (ZEISS ID 03) bei hundertfacher Vergrößerung im Phasenkontrast bestimmt.

Aus Vollblut isolierte, mononukleäre Zellen wurden entsprechend ihrer Zelldichte im Verhältnis 1:1 bis 1:10 in gepufferter Türks-Lösung verdünnt. Nach Aufplatzen der nach der Isolierung von mononukleären Zellen noch vorhandenen kontaminierenden Erythrozyten konnte die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer an einem Invertmikroskop bei hundertfacher Vergrößerung im Phasenkontrast-Verfahren bestimmt werden.

6.6 *Apoptose-Induktion in Zellen mit Arsentrioxid und Zytostatika*

Exponentiell wachsende Zellen wurden in frische Zellkulturflaschen transferiert und unter den vom Vertreiber der Zelllinien empfohlenen Kulturbedingungen kultiviert. Zur Inkubation mit Arsentrioxid bzw. den Zytostatika Doxorubicin, Etoposid, Camptothecin und Mitoxantron mußten - falls notwendig - Verdünnungen aus den entsprechenden Stammlösungen in dem für die jeweilige Zelllinie empfohlenen Medium hergestellt werden. Je nach den in einem Experiment verwandten Zytostatika wurden Versuchsansätze mit den entsprechenden Volumina des Lösungsmittels (ohne Arsentrioxid bzw. Zytostatikum) angesetzt. Die Zellen wurden jeden zweiten Tag oder je nach Bedarf entsprechend ihrer Dichte verdünnt, wobei

mindestens 10% des jeweiligen über zwei Tage konditionierten Mediums transferiert wurden. Lediglich bei der Zelllinie KG-1a wurde kein konditioniertes Medium zugesetzt. Die Zelldichte entsprach immer den vom Hersteller empfohlenen Richtlinien für die jeweilige Zelllinie. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Arbeitsbedingungen an einer für Arbeiten mit Zytostatika geeigneten Sterilbank.

6.7 *Apoptose-Induktion in Zellen mit Maus-Anti-Human-CD95-Antikörper*

Zur Kultivierung der Zellen wurde ein Kulturmedium gewählt, welches keine oder nur ein Minimum potentiell mit Antikörpern interagierende Proteine (außer humanem Ferritin und BSA) enthielt. Hierzu wurden exponentiell wachsende CCRF-CEM bzw. Jurkat-Zellen einmal in PBS gewaschen und in serumfreies QBSF 51®-Medium überführt. Zur Inkubation mit Maus-IgG_{2a,k} (Klon UPC-10), Maus-IgG_{2b,k} (Klon MOPC-141), Maus-IgM (Klon MOPC-104E), Maus-IgG_{2b,k}-Anti-Human-CD95 (Klon SM1/23), Maus-IgM-Anti-Human-CD95 (Klon 7C11) bzw. Maus-IgM-Anti-Human-CD95 (Klon CH11) wurden jeweils 3×10^5 Zellen in 1 mL QBSF 51®-Medium für 24 Stunden mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen inkubiert. In den Experimenten wurden zunächst solche Antikörper bzw. deren Isotyp-Kontrollen zugegeben, welche Apoptose blockieren (i. e. Maus-IgG_{2b,k}-Anti-Human-CD95, Klon SM1/23 bzw. Maus-IgG_{2b,k}, Klon MOPC-141). Nach einstündiger Inkubation unter optimalen Kulturbedingungen (37°C, 5% CO₂ und 95% relative Luftfeuchtigkeit) wurden die Apoptose-induzierenden Substanzen bzw. die Kontrollen für diese Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen zugegeben (i. e. Arsentrioxid, PBS, Etoposid, DMSO, Maus-IgM-Anti-Human-CD95 Klon 7C11 sowie Klon CH11 bzw. Maus-IgM) und für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert (Rojewski, 2001a; Schrezenmeier, 2001b).

6.8 *Caspasen-Inhibition mit Boc-D-FMK, Z-Asp-2,6-DBMK, Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK und Z-VAD-FMK*

Je 2×10^5 Zellen der Zelllinien CCRF-CEM bzw. Jurkat wurden einmal in PBS gewaschen und in 1 mL QBSF 51®-Medium für eine Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen der Caspasen-Inhibitoren Boc-D-FMK, Z-Asp-2,6-DBMK, Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK bzw. Z-VAD-FMK unter optimalen

Kulturbedingungen (37°C, 5% CO₂ und 95% relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Anschließend wurden die Apoptose-induzierenden Substanzen bzw. die Kontrollen für diese Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen zugegeben (i. e. Arsentrioxid, PBS, Etoposid, DMSO) und für weitere 24 Stunden im Brutschrank gelagert (Rojewski, 2001b).

6.9 Annexin V-FITC-Färbung

Während des Prozesses der Apoptose kommt es in den betroffenen Zellen zu einem Zusammenbruch der Symmetrie der Zellmembran. In lebenden Zellen sind Phosphatidylserin-Moleküle lediglich auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Zellmembran anzutreffen (Castedo, 1996). Im Laufe der Apoptose kann Phosphatidylserin auch in der äußeren Lage der Zellmembran nachgewiesen werden. Annexin V ist ein im Serum zirkulierendes Protein, welches in Anwesenheit von Ca²⁺ an Phosphatidylserin bindet.

Die Annexin V-FITC-Färbung erfolgte, wie bei der Annexin V-FITC/7-AAD-Doppelmarkierung beschrieben. Die Zellen wurden jedoch nach der Annexin V-FITC Inkubation zweimal mit jeweils 1 mL ABB gewaschen und unmittelbar anschließend im Durchflußzytometer untersucht.

6.10 7-AAD Färbung

Bei 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) handelt es sich um eine Substanz, welche nach Assoziation mit DNA-Molekülen ihre Fluoreszenzeigenschaften ändert (Gill, 1975). 7-AAD interkaliert mit hoher Selektivität zwischen den Desoxyribosenukleotiden Guanin und Cytosin (Chen Chiao, 1979; Philpott, 1996). In lebenden Zellen kann die Substanz nicht in das Innere von Zellen gelangen. Während der Apoptose verlieren Zellen ihre Membranintegrität, und 7-AAD kann in die Zelle gelangen und mit der DNA interagieren (Schmid, 1994a; Schmid, 1994b). Zusätzlich bietet der Nachweis apoptotischer Zellen mit 7-AAD die Möglichkeit, zwischen früh-apoptotischen und spät-apoptotischen Zellen (Philpott, 1996; Lecoeur, 1998) sowie den von apoptotischen Zellen abgespaltenen Vesikeln, den *apoptotic bodies* (Lecoeur, 1998), zu unterscheiden. Diese Färbung wurde, wie bei Philpott (Philpott, 1996) beschrieben, durchgeführt.

6.11 *Annexin V-FITC/7–AAD-Doppelmarkierung*

Die Färbung wurde in Anlehnung an die von Philpott (Philpott, 1996) beschriebene Methode durchgeführt (Rojewski, 2002).

Je Färbung wurden ca. 5×10^5 bis 2×10^6 Zellen in 1 mL Annexin V-Bindepuffer ABB gewaschen, bei $6800 \times g$ für 30 Sekunden abzentrifugiert, in $100 \mu\text{L}$ ABB aufgenommen und mit $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC versetzt. Nach Durchmischen des Färbeansatzes wurde dieser 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, anschließend das Volumen mit ABB auf 1,1 mL aufgefüllt, der nach 30 Sekunden bei $6800 \times g$ erhaltene Überstand wurde verworfen und die pelletierten Zellen in $300 \mu\text{L}$ ABB resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden $50 \mu\text{L}$ 7–AAD-Stammlösung (10 mg/50 mL) gegeben. Nach 20-minütiger Inkubation bei 2°C unter Lichtabschluß wurde das Arbeitsvolumen mit ABB auf 1,1 mL aufgefüllt und der Überstand nach Abzentrifugieren ($6800 \times g$ für 30 Sekunden) verworfen. Die Zellen wurden in 1 mL ABB gewaschen und anschließend in $300 \mu\text{L}$ ABB resuspendiert. Die Fluoreszenzintensitäten der mit Annexin V-FITC und 7–AAD inkubierten Zellen wurden unmittelbar nach der Färbung im Durchflußzytometer bestimmt. Die Detektion des an apoptotische Zellen gebundenen Annexin V-FITC erfolgte im Fluoreszenzkanal FL-1, für 7–AAD im Fluoreszenzkanal FL-3.

6.12 *MitoTrackerRed CMXRos- bzw. MitoTrackerRed CM-H₂XRos-Färbung*

MitoTrackerRed-Farbstoffe sind Mitochondrien-spezifische Farbstoffe, welche durch die Zellmembran passiv aufgenommen werden und eine Thiol-reaktive Chloromethylgruppe besitzen. Die Reaktion dieser reaktiven Gruppe wird für die Assoziation des Farbstoffes mit den Mitochondrien verantwortlich gemacht (Chen, 1994). Die Aufnahme des Farbstoffes ist abhängig vom Mitochondrienpotential. Veränderungen des Mitochondrienpotentials werden zum Nachweis früher apoptotischer Prozesse herangezogen (Macho, 1996), bei denen es auch zur Veränderung der Mitochondrienstruktur bzw. zu Vorgängen an der Mitochondrienmembran kommt (Wang, 1996; Susin, 1999).

Inkubationen mit den Fluoreszenzfarbstoffen MitoTrackerRed CMXRos bzw. MitoTrackerRed CM-H₂XRos wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde 1 mL der jeweiligen Zellsuspension (ca. 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen) unter sterilen Arbeitsbedingungen aus dem entsprechenden Zellkulturgefäß entnommen und in ein 1,5 mL Polypropylen-Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes (Endkonzentration 200 nM MitoTrackerRed-CMXRos bzw. 300 nM MitoTrackerRed CM-H₂XRos) und Durchmischen der Zellsuspension wurden die Zellen 45 Minuten im Inkubator gelagert. Anschließend wurde der nicht an die Mitochondrien gebundene überschüssige Farbstoff durch zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS entfernt, die Zellen in 300 μ L PBS aufgenommen und im Durchflußzytometer analysiert.

Die Abnahme der mitochondrialen Aktivität kann durch die Fähigkeit lebender Zellen bestimmt werden, die nichtfluoreszierende Verbindung MitoTrackerRed CM-H₂XRos in den Fluoreszenzfarbstoff MitoTrackerRed CMXRos zu oxidieren. Wie oben für MitoTrackerRed CMXRos beschrieben, kann dann im Durchflußzytometer der Prozentsatz fluoreszierender Zellen nachgewiesen werden.

6.13 *JC-1-Färbungen zum Nachweis des Zusammenbruchs des mitochondrialen Redoxpotentials*

Zur Bestimmung des mitochondrialen Redoxpotentials wurden ca. 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß transferiert, 10 Minuten bei 37°C unter Lichtabschluß mit 10 nM JC-1 inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen. Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten für FL-1 und FL-2 konnten dann im Durchflußzytometer analysiert werden (Körper, 2001; Schrezenmeier, 2001a).

6.14 *Dihydroethidium-Färbungen zum Nachweis von ROS (reactive oxygen species)*

Zum Nachweis der *reactive oxygen species* wurde 1 mL der jeweiligen Zellsuspension (ca. 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen) unter sterilen Arbeitsbedingungen aus dem entsprechenden Zellkulturgefäß entnommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß transferiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (vgl. **Abbildung 19**) mit DHE (Endkonzentration 5 μ M bzw. 10 μ M) im Inkubator bei 37°C und zweifachem

Waschen der Zellen mit PBS erfolgte der Nachweis der *reactive oxygen species* im Fluoreszenzkanal (FL-2) des Durchflußzytometers.

6.15 *Nachweis freier NO-Radikale mit dem APO-Alert™-System der Firma BD Clontech, Heidelberg*

Der Nachweis freier NO-Radikale geschah mit dem APO-Alert™-System der Firma BD Clontech (Heidelberg). Die Durchführung der Färbung bzw. die Inkubation der Zellsuspensionen mit dem NO-Nachweisreagenz vor der Induktion mit den Apoptose-induzierenden Substanzen Arsentrioxid und Etoposid erfolgte wie vom Hersteller empfohlen. Die Färbungen mit Annexin V-PE wurden nach dem Ernten der Zellen analog zu der in diesem Kapitel beschriebenen Annexin V-FITC-Färbung durchgeführt. Der Nachweis der Fluoreszenzen des oxidierten NO-Radikalfängers (*NO-dye*) und von Annexin V-PE erfolgte im Durchflußzytometer.

6.16 *PhiPhiLux G₂D₂-Färbungen*

Bei der Substanz PhiPhiLux G₂D₂ handelt es sich um ein überwiegend Caspase-3-spezifisches Substrat der Aminosäuresequenz GDEVDGI (Rano, 1997; Thornberry, 1997), welches nach enzymatischer Spaltung durch Caspase-3 durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt werden kann und ein Fluoreszenzmaximum bei 580 nm besitzt. Je Versuchsansatz wurden ca. 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen in 70 μ L der vom Hersteller gelieferten fertigen Inkubationslösung (Substrat in RPMI 1640-Medium) resuspendiert, mit 7 μ L FBS versetzt, nach vorsichtigem Durchmischen der Suspension 30 Minuten im Inkubator gelagert, einmal mit dem vom Hersteller beigefügten *flow cytometry buffer* gewaschen, in 300 μ l des *flow cytometry buffer* aufgenommen und anschließend durchflußzytometrisch untersucht (Rojewski, 2001a; Schrezenmeier, 2001b).

6.17 *FITC-VAD-FMK und FITC-YVADAPK-DNP-Färbung*

Der Nachweis aktiver Caspasen mit den an Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Inhibitoren VAD-FMK bzw. YVADAPK-DNP erfolgte gemäß den Herstellerangaben für FITC-VAD-FMK (CaspACE). Hierzu wurde 1 mL der jeweiligen Zellsuspension (ca. 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen) unter sterilen Arbeitsbedingungen aus dem jeweiligen

Zellkulturgefäß entnommen und in ein 1,5 mL Polypropylen-Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zugabe des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes (Endkonzentration 5 μ M) und Durchmischen der Zellsuspension wurden die Zellen 20 Minuten im Inkubator gelagert. Anschließend wurde der nicht an aktivierte Caspasen gebundene überschüssige Inhibitor durch einmaliges Waschen der Zellen mit PBS entfernt, die Zellen wurden 20 Minuten in mit 0,5% Formaldehyd angereichertem PBS fixiert, einmal mit PBS gewaschen, in 300 μ L PBS aufgenommen und im Durchflußzytometer analysiert (Rojewski, 2001a; Schrezenmeier, 2001b).

6.18 *FITC-VAD-FMK/ MitoTrackerRed CMXRos Doppelmarkierung*

Die Färbung wurde, wie für MitoTrackerRed CMXRos beschrieben, durchgeführt. Allerdings wurden die Zellen nach 25 Minuten aus dem Inkubator entfernt, die entsprechende Menge FITC-VAD-FMK wurde zugegeben (vgl. FITC-VAD-FMK und FITC-YVADAPK-DNP Färbung in diesem Kapitel), und nach weiteren 20 Minuten Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen, wie für FITC-VAD-FMK beschrieben, gewaschen und fixiert.

6.19 *Annexin V-FITC/ MitoTrackerRed CMXRos Doppelmarkierung*

Die Färbung wurde wie für MitoTrackerRed CMXRos beschrieben, durchgeführt, jedoch wurden die Zellen im Anschluß an die Färbung einmal mit ABB gewaschen. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte, wie für die Annexin V-FITC-Färbung dargestellt.

6.20 *Nachweis der zytoplasmatischen Proteine Caspase-3, Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP), GDP-Dissoziations-Inhibitor (D4-GDI), p53 und Ki67*

Der Nachweis zytoplasmatischer Proteine erfolgte, wie bei Rojewski et al. (Rojewski, 2002) für Ki67 beschrieben. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden ca. 5×10^5 bis 2×10^6 pelletierte Zellen in einem 1 mL-Polypropylengefäß kurz geschüttelt und mit 100 μ L Fixierungslösung (DAKO IntraStain Solution A) fixiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Volumen mit PBS auf 1,1 mL aufgefüllt, die Zellen für 30 Sekunden bei 6800 x g aus der Suspension pelletiert, nach

Verwerfen des Überstandes kurz geschüttelt und mit 100 μ L Permeabilisierungslösung (DAKO IntraStain Solution B) für 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Zu diesen 100 μ L Permeabilisierungslösung wurden 10 μ L Maus-IgG_{1, κ} -FITC, 20 μ L Maus-IgG_{2a, κ} -PE, 20 μ L Maus-IgG_{2b, κ} -FITC, 5 μ L Maus-IgG_{1, κ} -Anti-Human-(D4-GDI)-FITC, 20 μ L Maus-IgG_{1, κ} -Anti-Human-Ki67-FITC, 1 μ L Maus-IgG_{2b, κ} -Anti-human-p53-FITC, 20 μ L Kaninchen-Anti-Human-(Aktivierte-Caspase-3)-PE bzw. 10 μ L Kaninchen-Anti-Human-PARP-FITC zugegeben. Nach weiteren 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß wurde das Volumen mit PBS auf 1,1 mL aufgefüllt, die Zellen für 30 Sekunden bei 6800 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die in 300 μ L PBS resuspendierten Zellen wurden anschließend sofort im Durchflußzytometer auf Bindung der spezifischen Antikörper untersucht. Die jeweiligen Isotyp-Kontrollen dienten zur Definition der Eigenfluoreszenzintensität der Zellen (Radbruch, 1992; Ormerod, 1994; Owens, 1995; Jarosqeski, 1997).

6.21 *Nachweis des zytoplasmatischen Proteins LRP*

Nach einmaligem Waschen in PBS wurden ca. 5×10^5 bis 2×10^6 pelletierte Zellen in einem 1 mL-Polypropylengefäß kurz geschüttelt und mit 100 μ L Fixierungslösung (DAKO IntraStain Solution A) fixiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Volumen mit PBS auf 1,1 mL aufgefüllt, die Zellen für 30 Sekunden bei 6800 x g aus der Suspension pelletiert, nach Verwerfen des Überstandes kurz geschüttelt und mit 100 μ L Permeabilisierungslösung (DAKO IntraStain Solution B) für 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Zu diesen 100 μ L Permeabilisierungslösung wurden 5 μ L Maus-IgG_{2b}-Anti-Human-LRP-FITC zugegeben. Nach weiteren 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß wurde das Volumen mit PBS auf 1,1 mL aufgefüllt, die Zellen für 30 Sekunden bei 6800 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach 20-minüterer Färbung der in 100 μ L Permeabilisierungslösung (DAKO IntraStain Solution B) resuspendierten Zellen mit Ziege-F(ab')₂-Anti-Maus-IgG-FITC im Dunkeln wurden die Zellen nochmals mit 1 mL PBS gewaschen, in 300 μ L PBS aufgenommen und sofort im Durchflußzytometer auf Bindung der spezifischen Antikörper untersucht. Eine Isotyp-Kontrolle des Primärantikörpers LRP diente zur

Definition der Eigenfluoreszenzintensität der Zellen, ein Ansatz ohne Primärantikörper zusätzlich der Überprüfung der Spezifität des Sekundärantikörpers.

6.22 PKH26-Markierung

PKH26 ist ein in die Zellmembran integrierender, aliphatischer Fluoreszenzfarbstoff (Horan, 1989). Die *in vivo* ermittelte Halbwertszeit der Fluoreszenz beträgt mehr als 100 Tage bei RBC von Kaninchen. Somit zählt PKH26 zu den stabilen Fluoreszenzfarbstoffen. Mit jeder Zellteilung nimmt die Konzentration des Farbstoffes in der Zellmembran ab, da der in der Membran vorhandene Farbstoff gleichermaßen auf die durch die Teilung entstehenden Zellen weitergegeben wird. Die Färbung von Suspensionszellen mit dem *PKH26 Fluorescent Cell Linker Kit* wurde, wie vom Hersteller empfohlen, durchgeführt. Bei Markierungen der Zelllinien HEL, K-562, K-562(0.02), K-562(0.1), HL-60, HL-60/MX1 und HL-60/MX2 wurde die doppelte Menge des empfohlenen PKH26-Fluoreszenzfarbstoffes verwendet und die Inkubationszeit mit PKH26 verdoppelt, um eine ausreichend hohe Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen zu erzielen (Rojewski, 2002). Da die Zellen durch die Erhöhung der Inkubationszeiten längere Zeit dem Reagenz *Diluent C* ausgesetzt waren, wurden die nichtgefärbten Kontrollzellen ebenfalls über die gesamte Zeit der Inkubation mit diesem Reagenz behandelt. In den Kontrollansätzen wurde statt dem Farbstoff PKH26 das entsprechende Volumen des Lösungsmittels (eine 70%-ige Ethanollösung) zugegeben. Die verwandten PKH26-Konzentrationen zeigten in nicht mit Arsentrioxid behandelten Zellen keine toxischen Effekte. Dies wurde auch bei Experimenten mit Lymphozyten und Zytokin-aktivierten Killerzellen *in vivo* beschrieben (Wallace, 1993).

6.23 Propidiumiodid-Färbung

Propidiumiodid ist ein in doppelsträngige DNA und RNA interkalierender Farbstoff. Nach Permeabilisierung der Zellmembran und Abbau von RNA durch RNasen kann eine Propidiumiodid-Färbung auch zur Bestimmung des DNA-Gehaltes einer Zelle genutzt werden. Zellen in der G₂/M-Phase besitzen die doppelte Menge DNA wie ruhende Zellen (G₀/G₁-Phase). Zellen in der DNA-Synthesephase (S-Phase) besitzen einen DNA-Gehalt, der zwischen dem der G₀/G₁-Phase und dem der G₂/M-

Phase anzusiedeln ist. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten können Zellen einer bestimmten Zellzyklusphase zugeordnet werden.

Die hier beschriebene Methode ist eine Modifikation der von Dr. Anne Harley, Cytoc Corporation, Marlborough, MA, USA (Harley, 2001) beschriebenen Methode (Rojewski, 2002): Maximal 1×10^6 Zellen wurden mit 10 mL PBS gewaschen und mit $1000 \times g$ bei 2°C für 7 Minuten abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 1 mL PBS resuspendiert und tropfenweise zu 2 mL auf -20°C vorgekühltem Ethanol pipettiert. Während dieses Vorganges wurde das Gefäß, in welches die Zellsuspension zugegeben wurde, auf einem Vertikal-Rotationsschüttler (Vortex-Genie 2, maximale Stufe) geschüttelt. Zur Fixierung der Zellen wurde der Ansatz 48 Stunden bei -20°C inkubiert und dann mit $1000 \times g$ bei 2°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die fixierten Zellen in $500 \mu\text{L}$ PIB aufgenommen, 30 Minuten im Dunkeln bei 37°C oder Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde unverzüglich die Fluoreszenzintensität der Zellen bestimmt.

6.24 *Nachweis der Oberflächenproteine P-Glykoprotein, CD90, CD95, TNFRI und TNFRII*

5×10^5 bis 2×10^6 Zellen wurden nach einmaligem Waschen (PBS + 0,1% BSA) in $100 \mu\text{L}$ PBS aufgenommen. Zu diesen $100 \mu\text{L}$ PBS wurden $20 \mu\text{L}$ Maus-IgG_{1,k}-FITC, $20 \mu\text{L}$ Maus-IgG_{2a,k}-PE, $20 \mu\text{L}$ Maus-IgG_{2b,k}-FITC, $20 \mu\text{L}$ Maus-IgG_{1,k}-Anti-Human-CD90-PE, $20 \mu\text{L}$ Maus-IgG_{1,k}-Anti-Human-CD95-FITC, $20 \mu\text{L}$ Maus-IgG_{2b,k}-Anti-Human-P-Glykoprotein-FITC, $20 \mu\text{L}$ Maus-IgG_{1,k}-Anti-Human-TNFRI-FITC bzw. $20 \mu\text{L}$ Maus-IgG_{2a,k}-Anti-Human-TNFRII-PE zugegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Volumina mit PBS auf 1,1 mL aufgefüllt, die Zellen für 30 Sekunden bei $6800 \times g$ abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die in $300 \mu\text{L}$ PBS resuspendierten Zellen anschließend sofort im Durchflußzytometer auf Bindung der spezifischen Antikörper untersucht. Die Isotyp-Kontrollen dienten zur Definition der Eigenfluoreszenzintensität der Zellen (Radbruch, 1992; Ormerod, 1994; Owens, 1995; Jarosqueski, 1997).

6.25 Bestimmung der Fluoreszenzintensität im Durchflußzytometer FACScan

Das Durchflußzytometer FACScan ist mit einem Laser ausgestattet, welcher monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm liefert. Die Fluoreszenzfarbstoffe FITC, PE, 7-AAD, PKH26, PhiPhiLux G₂D₂, MitoTrackerRed CMXRos, MitoTrackerRed CM-H₂XRos (nach Oxidation), Propidiumiodid, DHE (nach Oxidation), JC-1 und *NO-dye* (nach Reaktion mit NO-Radikalen) werden durch Licht dieser Wellenlänge angeregt. Die von diesen Farbstoffen emittierte Fluoreszenz kann von unterschiedlichen Detektoren des Durchflußzytometers, wie vielfach ausführlich beschrieben, detektiert werden (Radbruch, 1992; Ormerod, 1994; Owens, 1995; Jarosqueski, 1997; Robinson, 1999; Haughland, 2001).

Nach den jeweiligen Inkubationen mit

- den Fluoreszenzfarbstoffen 7-AAD, Propidiumiodid, DHE, JC-1, MitoTrackerRed CMXRos, MitoTrackerRed CM-H₂XRos,
- den an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern Maus-IgG_{1,κ}-PE, Maus-IgG_{1,κ}-Anti-Human-CD90-PE, Maus-IgG_{1,κ}-FITC, Maus-IgG_{1,κ}-Anti-Human-TNFRI-FITC, Maus-IgG_{2a,κ}-PE, Maus-IgG_{2a,κ}-Anti-Human-TNFRII-PE, Maus-IgG_{2b,κ}-FITC, Maus-IgG_{2b,κ}-Anti-Human-CD95-FITC, Maus-IgG_{2b,κ}-Anti-Human-P-Glykoprotein-FITC, Maus-IgG_{1,κ}-FITC, IgG_{1,κ}-Anti-Human-Ki67-FITC,
- den an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Proteinen bzw. Peptiden Annexin V-FITC, Annexin V-PE, FITC-VAD-FMK, FITC-YVADAPK-DNP, PhiPhiLux G₂D₂
- bzw. dem NO-Radikalfänger *NO-dye* der Firma BD Clontech

wurde die Fluoreszenzintensität von 50.000 Zellen bestimmt, sofern die Zellzahl dies ermöglichte oder dies im Kapitel *Ergebnisse* nicht anders erwähnt ist.

In Ansätzen, welche mit den an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern Maus-IgG_{1,κ}-FITC, Maus-IgG_{1,κ}-Anti-Human-(D4-GDI)-FITC, Maus-IgG_{2b,κ}-FITC, Maus-IgG_{2b,κ}-Anti-Human-p53-FITC, Maus-IgG_{2,κ}-Anti-Human-LRP-FITC, Kaninchen-Anti-Human-(Aktivierte-Caspase-3)-PE bzw. Kaninchen-Anti-Human-(PARP-*cleavage-site*-(214/215))-FITC inkubiert wurden, wurde die Fluoreszenzintensität von 25.000 Zellen bestimmt, sofern dies im Kapitel *Ergebnisse* nicht anders erwähnt ist.

Die Fluoreszenzintensität der an Zellen gebundenen, an FITC ($\lambda_{\max} = 525 \text{ nm}$) gekoppelten Antikörper und Peptide, des JC-1 (angeregte Monomere: $\lambda_{\max} = 525 \text{ nm}$) sowie des *NO-dye* (nach Reaktion mit NO-Radikalen, $\lambda_{\max} = 515 \text{ nm}$) wurde im Fluoreszenzkanal FL-1 (Detektor für Licht der Wellenlänge 530 nm) des Durchflußzytometers bestimmt. Die Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Propidiumiodids ($\lambda_{\max} = 620 \text{ nm}$), der an Zellen gebundenen, an PE ($\lambda_{\max} = 575 \text{ nm}$) gekoppelten Antikörper und des an PE gekoppelten Annexin V, des Membran-Vitalfarbstoffes PKH26 ($\lambda_{\max} = 567$), der Farbstoffe MitoTrackerRed CMXRos, MitoTrackerRed-CM-H₂XRos ($\lambda_{\max} = 599$), DHE ($\lambda_{\max} = 620 \text{ nm}$) und der angeregten JC-1-Aggregate ($\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$) sowie des Caspasen-Substrats PhiPhiLux G₂D₂ ($\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$) konnten im Fluoreszenzkanal FL-2 (Detektor für Licht der Wellenlänge 542 nm - 585 nm) des Durchflußzytometers gemessen werden. Für den Nachweis 7-AAD-positiver Zellen ($\lambda_{\max} = 660 \text{ nm}$) wurde die Fluoreszenz in Kanal FL-3 (Detektor für Licht der Wellenlänge 670 nm) bestimmt.

Die Aquirierung der Meßwerte sowie die Auswertung der mit dem Durchflußzytometer erhaltenen Daten erfolgte mit der vom Hersteller gelieferten Software *CellQuest* gemäß dem Benutzerhandbuch (*CellQuest™ Software User's Guide*, 1996). Mit dem Durchflußzytometer wurden fünf unterschiedliche Parameter erfaßt: die vorwärts gerichtete Streustrahlung als Maß für die Größe der Zellen, die Seitwärtsabstrahlung (Streuung) des Laserlichts als Maß für die Granularität der Zellen und die Fluoreszenzintensitäten der Zellen in den Wellenlängenbereichen, welche von den Detektoren FL-1, FL-2 und FL-3 gemessen werden können. Hierzu erfolgte i. a. eine Darstellung der Zellen gemäß ihrer Größe und Granularität in einem zweidimensionalen Diagramm. Nach Ausschluß des Zelldebris bei der Auswertung konnten die Fluoreszenzintensitäten der Zellen gegenüber der Anzahl der Zellen in einem Histogramm aufgetragen werden. Im Anhang ist beispielhaft je eine Auswertung für eine Annexin V-FITC/7-AAD- und eine Annexin V-FITC/MitoTrackerRed CMXRos-Doppelmarkierung dargestellt (**Abbildungen 37 und 38, Seiten 158 und 159**).

6.26 *Statistische Auswertung*

Bei Mehrfachmessungen (≥ 3 Messungen) wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen mit dem Programm MS Excel (Firma Microsoft) bestimmt. Nach Überprüfung der Werte auf Normalverteilung (mit dem Programm NCSS) wurde ein Student's T-Test durchgeführt (StatView, Firma Abacus Concepts). Bei wichtigen Vergleichen sind neben den Mittelwerten und Standardabweichungen auch die p -Werte des Student's T-Tests zur Angabe der Signifikanz dargestellt.