

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikaliennachweis für die Immunhistochemie

*Tab. 3: Chemikaliennachweis für die Immunhistochemie.*

<b>Bezeichnung der Substanz:</b>	<b>Bezugsquelle und Bestellnummer:</b>
Antikörperverdünnung „Antibody Diluent“	Fa.Dako, Best. Nr.: S 3022
Aceton	Fa. Merck, Best. Nr.: 100013
Aqua dest.	Fa. Millipore, Fa. Braun
BSA (Bovines Serumalbumin)	Fa. Sigma, Best. Nr.: A 3059
Citronensäuremonohydrat	Fa. Merck, Best. Nr.: 100244
Chloralhydrat	Fa. Merck, Best. Nr.: 2425
Dimethylformamid	Fa. Roth, Best. Nr.: 1146120
Dinatriumhydrogenphosphat	Fa. Merck, Best. Nr.: 6580
Eosin	Fa. Merck, Best. Nr.: 15935
Konzentrierte Essigsäure (98%)	Fa. Merck, Best. Nr.: 100063
Ethanol (50%, 70%, 80%, 90%, 96 %)	Hausapotheke Universitätsklinikum Charité
Glycerin	Fa. Janssen Chimica, Best. Nr.: 1589281
Glyceringelatine	Fa. Merck, Best. Nr.: 109242
Hämatoxylin	Fa. Merck, Best. Nr.: 4302
HCl (1N/ 2N)	Fa. Merck, Best. Nr.: 109057/ 109063
Humanalbumin 20%	Fa. Grifols, Best. Nr.: 10577a/ 97
Isopropanol	Hausapotheke Universitätsklinikum Charité
Kaliumalaunsulfat	Fa. Sigma, Best. Nr.: A7210
Kaliumchlorid	Fa. Merck, Best. Nr.: 4935
Kaliumdihydrogenphosphat	Fa. Merck, Best. Nr.: 104873
Kaliumhydroxid	Fa. Merck, Best. Nr.: 9108
Levamisole	Fa. Sigma, Best. Nr.: L 9756
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	Fa. Merck, Best. Nr.: 1.06009
Mowiol	Fa. Hoechst, Best. Nr.: 830- 30
Naphthol-As-Bi-Phosphat	Fa. Sigma, Best. Nr.: N2250
Natriumchlorid	Fa. Merck, Best. Nr.: 106404
Natriumjodat	Fa. Merck, Best. Nr.: 6525
Natriumnitrit	Fa. Sigma, Best. Nr.: S 2252
NaOH (1 N/ 2 N)	Fa. Merck, Best. Nr.: 109137/ 109136
NaOH Plätzchen	Fa. Merck, Best. Nr.: 106498
Naphthol-As-BI-Phosphat	Fa. Sigma, Best. Nr.: N2250
Neufuchsin	Fa. Merck, Best. Nr.: 4041
Paraformaldehyd (PFA)	Fa. Merck, Best. Nr.: 104005
Phloxin B	Fa. Merck, Best. Nr.: 1.15926
Pronase	Fa. Calbiochem, Best. Nr.: 53702
Propandiol (AMPD)	Fa. Merck, Best. Nr.: 801464
Rotihistol	Fa. Roth, Best. Nr.: 66401
Saponin	Fa. Sigma, Best. Nr.: S7900
Tris (Trishydroxyethylaminomethan)-Base	Fa. Merck, Best. Nr.: 108219
Tris (Trishydroxyethylaminomethan)-HCl	Fa. Merck, Best. Nr.: 108382
Triton X	Fa. Calbiochem, Best. Nr.: 648466
Ziegen Serum	Fa. Gibco, Best. Nr.: 16210-064

## 2.1.2 Chemikaliennachweis für Zellkultur und Western Blot

*Tab. 4: Chemikaliennachweis für Zellkultur und Western Blot.*

<b>Bezeichnung der Substanz:</b>	<b>Bezugsquelle und Bestellnummer:</b>
Acrylamide Bis Solution (30%)	Fa. Bio- Rad, Best. Nr.: 161-0158
6-Aminohexansäure (96%)	Fa. Aldrich, Best. Nr.: A4.460-6
APS (Ammonium Persulfat)	Fa. Sigma, Best. Nr.: A9164
Aprotinin	Fa. Roche, Best. Nr.: 981532
Benzamidin	Fa. Sigma, Best. Nr.: 6506
Bovine Serum Albumin Standard	Fa. Bio- Rad, Best. Nr.: 500-0112
Bromphenolblau	Fa. Sigma, Best. Nr.: B6506
Comassie Brilliantblau	Fa. Merck, Best. Nr.: 2309353
DC Protein Assay	Fa. Bio- Rad, Best. Nr.: 500-0116
DMEM (+ 2 % Glutamin)	Fa. Biochrom, Best. Nr.: FG0435
DMEM (high glucose + HCl, Ø Glutamin)	Fa. Biochrom, Best. Nr.: 3057696
DMEM/HAM'S F12 (1:1)	Fa. Biochrom, Best. Nr.: FG4815
DMSO	Fa. Sigma, Best. Nr.: D2650
ECL <sup>TM</sup> -Western Blot Analyse Reagenz	Fa. Amersham, Best. Nr.: RPN 2106
FKS (Fetales Kälberserum)	Fa. Biochrom, Best. Nr.: S 0115, Charge 68 X
Flüssigstickstoff	Fa. AGA, Berlin
Glycerol	Fa. Janssen Chimica, Best. Nr.: 1589281
Glycin	Fa. Serva, Best. Nr.: 23390
Insulin	Fa. Gibco, Best. Nr.: 13007018
Leupeptin	Fa. Sigma, Best. Nr.: L0649
Magermilchpulver	Fa. Bio- Rad, Best. Nr.: 170-6404
2-Mercaptoethanol	Fa. Merck, Best. Nr.: 1.15433
Molekulargewichtsmarker „Rainbow-Marker“	Fa. Amersham,, Best. Nr.: RPN 756
Natriumacid (NaN <sub>3</sub> )	Fa. Merck, Best. Nr.: 6688
NEAA (non- essential amino acids)	Fa. Biochrom, Best. Nr.: K0293
NP-40	Fa. Fluka, Best. Nr.: 74385
Penicillin/ Streptomycin (P/ S)	Fa. Biochrom, Best. Nr.: A2213
PMSF	Fa. Sigma, Best. Best. Nr.: P7626
Ponceau S (0,1 %)	Fa. Sigma, Best. Best. Nr.: P7170
RPMI 1640 Medium (+ 2% Glutamin)	Fa. Biochrom AG, Best. Nr.: FG1215
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	Fa. Life Technologies, Best. Nr.: 15525-O17
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Fa. Bio- Rad, Best. Nr.: 161-0801
Tris (Trishydroxymethyl-aminomethan)	Fa. Merck, Best. Nr.: 108382
Trypsin- EDTA-Lösung (0,05%/ 1%)	Fa. Gibco, Best. Nr.: 25300-054
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate)	Fa. Sigma, Best. Nr.: P9416

In den Tab. 3, 4 und 5 sind die verwendeten Chemikalien und Materialien der experimentellen Untersuchungen in alphabetischer Reihenfolge gelistet. In Immunhistochemie und Western Blot doppelt verwendete Materialien wurden nur in jeweils einer der Tabellen aufgeführt.

### 2.1.3 Bezugsquellen verwendeter Materialien und Geräte

*Tab. 5: Aufstellung verwendeter Materialien und Geräte.*

<b>Bezeichnung des Materials/ der Geräte:</b>	<b>Bezugsquelle:</b>
Autoradiographiefilm (18 x 24 cm)	Fa. AGFA, Chronex 5
Blotgerät	Fa. Biometra
Brutschrank	Fa. Heraeus Instruments
Dampfdrucktopf	Fa. BEKA
Deckplättchen	Fa. Menzel
Elektrophoresekammer Mini-ProteanN & SE600	Fa. BIO-RAD, Fa. Hoefer
Falcon-Tubes	Fa. Falcon
Faltenfilter	Fa. Schleicher & Schuell
Feinwaage FA-110- 4	Fa. Faust
Feuchtkammer	Fa. Nunc
Filmkassette 24 x 30 cm	Fa. Amersham
Filterpapier	Fa. Schleicher & Schüll
Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop	Fa. Zeiss, Axiophot 1
Gefriermikrotom 2800 Frigocut E	Fa. Leica
Indikatorstreifen	Fa. Merck
Küvetten	Fa. Brand
Kulturschalen (100 x 20 mm)	Fa. Falcon
Kulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> )	Fa. Falcon
Laminar-flow Sterilbank	Fa. Heaeus Instruments, Lamin Air HBB 2448
Magnetrührer	Fa. IKA Labortechnik, Combimag RCH
Nitrocellulosemembran Hybond C	Fa. Schleicher & Schüll
Objektträger, beschichtet	Fa. Menzel „Super Frost“, Fa. Dako „Chem Mate“
Ölstift	Fa. DAKO Pen
Paraffinmikrotom	Fa. Mikrom, Typ HM 400R
pH-Meter	Fa. Knick, Digital-pH-Meter 646
Pipetten und Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf
Scanner	Fa. Kodak
Standküvetten nach Hellenthal	Werkstatt Photochemie
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)	Fa. Nalgen
Software	Fa. Kodak, Scannersoftware Fa. Zeiss, AxioVersion 3.1 Fa. Kodak, Digital Science Fa. Adobe, Photoshop 6.0 Fa. Microsoft, Power Point 2000
Spektrophotometer Ultraspec 2	Fa. Biochrom
Thermomixer	Fa. Eppendorf
Vortexer “VF 2”	Fa. Janke & Kunkel, IKA Labortechnik
Waage	Fa. Sartorius
Wasserbad	Fa. Julabo, Fa. GEL
Zentrifugen	Fa. Eppendorf, „Centrifuge 5415C“, „5417 R“ Fa. Sigma, „6K10“
Zellschaber	Fa. Nunc

## 2.1.4 Antikörper

### 2.1.4.1 Primäre Antikörper

*Tab. 6: Bezugsquellen und Konzentration der eingesetzten Primärantikörper.*

Nr.	Antikörper:	Klonalität/ Spezies:	Bezugsquelle/ Bestellnummer:	Verdünnung:	
				Immunhisto	Western Blot
1.	Syntaxin 3	polyklonal/ Kaninchen	Thierry Galli, Institut du Fer à Moulin, Paris	<b>1 : 6500 APAAP</b> <b>1 : 800 IF</b>	<b>1 : 10000</b>
2.	Cellubrevin (VAMP-3)	polyklonal/ Kaninchen	Thierry Galli, Institut du Fer à Moulin, Paris	<b>1 : 4500 APAAP</b> <b>1 : 800 IF</b>	<b>1 : 2500</b>
3.	SNAP 23	polyklonal/ Kaninchen	Thierry Galli, Institut du Fer à Moulin, Paris	<b>1 : 2500 APAAP</b> <b>1 : 800 IF</b>	<b>1 : 2500</b>
4.	Syntaxin 1	monoklonal/ Maus	Fa. Sigma Best. Nr.: S 0664	<b>1 : 200</b>	—
5.	SNAP 25	monoklonal/ Maus	Stemberger Monoclonals Best. Nr.: SMI-81R-500	<b>1 : 1000</b>	—
6.	$\beta$ -Aktin	monoklonal/ Maus	Fa. Sigma, Clon AC15 Best. Nr.: A5441	—	<b>1 : 5000</b>
7.	Chromogranin A (Cg A)	polyklonal/ Kaninchen	Fa. Dako Best. Nr.: A0430	<b>1 : 400</b>	—
8.	Chromogranin A	monoklonal/ Maus	Fa Dako Best. Nr.: K021	<b>1 : 200</b>	—
9.	Synaptophysin 38 (Sy 38)	polyklonal/ Kaninchen	Fa Dako Best. Nr.: A0010	<b>1 : 200</b>	—
10.	Synaptophysin 38	monoklonal/ Maus	Fa. Linaris Best. Nr.: K001	<b>unverdünnt</b>	<b>1 : 5000</b>
11.	Neuronspezifische Enolase (NSE)	monoklonal/ Maus	Fa. Dako Best. Nr.: M0873	<b>1 : 30</b>	—
12.	Tryptase	monoklonal/ Maus	Fa. Chemicon Best. Nr.: MAB1222	<b>1 : 1000</b>	—
13.	Chymase	monoclonal/ Maus	Fa. Chemicon Best. Nr.: MAB1254	<b>1 : 1000</b>	—
14.	CD 3	monoklonal/ Maus	Fa Dako Best. Nr.: M7193	<b>1 : 25</b>	—
15.	CD 54	monoklonal/ Maus	Fa. Dako Best. Nr.: F7143	<b>1 : 50</b>	—
16.	CD 45	monoklonal/ Maus	Fa. Dako Best. Nr.: R7087	<b>1 : 5</b>	—
17.	CD 68	monoklonal/ Maus	Fa. Dako Best. Nr.: M0814	<b>1 : 50</b>	—
18.	CD 138	monoklonal/ Maus	Fa. Dako Best. Nr.: C7256	<b>1 : 5</b>	—
19.	H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	monoklonal/ Maus	Labor Adam Smolka, USA University of South Carolina	<b>1 : 2000</b>	—
20.	Insulin	monoklonal/ Maus	Fa. Biotrend Best. Nr. Mob234	<b>1 : 800</b>	—
21.	Glukagon	polyklonal/ Kaninchen	Fa. Dako Best. Nr.: A0565	<b>1 : 800</b>	—
22.	Somatostatin	monoklonal/ Ratte	Fa. Chemicon Best. Nr.: MAB354	<b>1 : 200</b>	—

### 2.1.4.2 SNARE-Antikörper: Syntaxin 3, SNAP 23, Cellubrevin

**Tab. 7:** Charakterisierung der SNARE-Antikörper Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin.

Antikörper:	Klonalität/ Spezies:	Molekulargewicht:	Peptidsequenz des GST-Fusionsproteins:	Verdünnung:
Syntaxin 3	polyklonal/ Ratte	35 kD	zytoplasmatische Domäne des humanen Syntaxin 3	<i>Bennett et al. (1992)</i> <i>Bennett et al. (1993)</i>
SNAP 23	polyklonal/ Ratte	27 kD	N-terminale Domäne des rekombinanten humanen Proteins	<i>Ravichandran et al. (1996)</i> <i>Wong et al. (1997)</i>
Cellubrevin (VAMP 3)	polyklonal/ Ratte	14 kD	N-terminale Peptidsequenz aus 13 AS (MSTGPTAATGSNC)	<i>Mc Mahon et al. (1993)</i> <i>Chilcote et al. (1995)</i>

Die in den vorliegenden Untersuchungen eingesetzten Antikörper gegen die SNARE (SNAP-Rezeptor)-Proteine *Syntaxin 3*, *Cellubrevin* und *SNAP 23* wurden im Labor von Thierry Galli, Institut de Fer á Moulin, Paris, experimentell erzeugt. Die polyklonalen Primärantikörper wurden gewonnen, indem Ratten mit in *E. coli* rekombinant hergestellten Glutathion-S-Transferase fusionierten Peptidsequenzen der zytoplasmatischen Domäne von *Syntaxin 3* (35 kD), der N-terminalen Domäne von *SNAP 23* (27 kD) bzw. einer dreizehn Aminosäuren umfassenden N-terminalen Peptidsequenz des *Cellubrevins* (14 kD) immunisiert wurden (siehe Tab. 7). Nach Affinitätsreinigung der Antikörper wurden diese lyophilisiert und aliquotiert. Der Versand und die Lagerung erfolgte bei – 80°C. Die Spezifität der Antikörper wurde in dieser Arbeit anhand eines Peptidverdrängungsassays (siehe Kap. 2.2.13) belegt.

### 2.1.4.3 Sekundäre Antikörper

**Tab. 8:** Bezugsquellen und Konzentration der eingesetzten Sekundärantikörper.

Antikörper:	Klonalität/ Spezies:	Bezugsquelle/ Bestellnummer:	Verdünnung:	
			Immunhisto	Western Blot
IgG mouse-anti-rabbit (Primärer APAAP-Ak)	monoklonal/ Maus	Fa. Dako Best. Nr.: M0737	1 : 50	—
IgG rabbit-anti-mouse (Brückenantikörper)	polyklonal/ Kaninchen	Fa. Dako Best. Nr.: Z0259	1 : 50	—
APAAP-Komplex-Antikörper	monoklonal/ Maus	Fa. Dako Best. Nr.: D0651	1 : 50	—
POD IgG goat-anti-rabbit	polyklonal/ Ziege	Fa. Dianova Best. Nr.: 111-035-045	—	1 : 20000
POD IgG goat-anti-mouse	polyklonal/ Ziege	Fa. Dianova Best. Nr.: 315-035-045	—	1 : 4000
Cy2 goat-anti-rabbit IgG	polyklonal/ Ziege	Fa. Dianova Best. Nr.: 111-225-045	1 : 400	—
Cy3 goat-anti-mouse IgM + IgG	polyklonal/ Ziege	Fa. Dianova Best. Nr.: 115-165-068	1 : 1000	—

### 2.1.5 Puffer und Lösungen der Immunhistochemie

#### **APAAP-Entwicklungslösung (120 ml):**

Lösung A, B und C mischen, durch Faltenfilter klären und pH mit NaOH auf 8.8.

#### **Substratlösung A:**

87,5 ml Tris-Substratpuffer (s.u.), 31,5 ml Propandiol (21%), 50 mg Levamisole.

#### **Substratlösung B:**

750 µl N,N-Dimethylformamid, 62,5 mg Naphthol-As-Bi-Phosphat.

#### **Substratlösung C:**

250 µl Neufuchsinstammlösung (5%), 25 mg Natriumnitrit, 600 µl Aqua dest.

#### **Citratpuffer:**

10 mM Citronensäure-Monohydrat in Aqua dest., pH 6.0.

#### **Elvanolherstellung:**

1 g Mowiol in 4 ml PBS, 2 ml Glycerin (pH 8.0), 30 h rühren. 15 Min. bei 12000 rpm zentrifugieren. Aliquotieren. Lagerung bei -20°C.

#### **Eosinlösung:**

2300 ml Ethanol (96%), 30 ml Phloxin B Lsg. (5%), 300 ml wässrige Eosinlösung (2%) und 30 ml konzentrierte Essigsäure (98%) ad 3l Aqua dest.

#### **Neufuchsinstammlösung (5%):**

5 g Neufuchsin in 100 ml Salzsäure (2 N). Lichtgeschützte Lagerung.

#### **PBS (Phosphate Buffered Saline):**

2 mM Kaliumchlorid, 140 mM Natriumchlorid, 15 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 8 mM Dinatriumhydrogenphosphat ad Aqua dest., pH 7.4.

#### **TBS (Tris Buffered Saline) / TBST (TBS mit Triton X):**

50 mM Tris-Base, 150 mM NaCl / TBS mit 0,1% Triton X.

#### **Tris-Substratpuffer (Entwicklungspuffer):**

150mM NaCl, 40 mM Tris-Base, 10 mM Tris-HCl in Aqua dest., pH 8.0, Lagerung 4°C.

#### **Stocklösung für die Sekundärantikörperverdünnung der APAAP-Methode:**

Humanalbuminlösung (10%) mit RPMI-Medium 1:10 mischen.

#### **Zellkernfärbung mit Hämalaun nach Mayer:**

Hämatoxylin 0,5 g, Natriumjodat 0,1 g, Kaliumalaunsulfat 25 g, Chloralhydrat 25 g, Citronensäuremonohydrat 0,5 g ad 1l Aqua dest. Lösung über Nacht bei RT rühren, durch Faltenfilter klären.

### **2.1.6 Puffer und Lösungen des Western Blots**

#### ***Anodenlaufpuffer:***

25 mM Tris in Aqua dest., pH 8.9.

#### ***A1-Puffer / A2-Puffer (Anode)***

300 mM Tris / 25 mM Tris, 20% Methanol ad 500 ml Aqua dest.

#### ***Coomassie-Färbelösung:***

0,1% Coomassie Brilliantblau, 50% Methanol, 7,5% konzentrierte Essigsäure (98%).

#### ***K-Puffer (Kathode):***

40 mM 6-Aminohexansäure (96%), 20% Methanol.

#### ***Kathodenlaufpuffer:***

25 mM Tris, 1900 mM Glycin und 1% SDS in Aqua dest., pH 8.3.

#### ***NP-40-Puffer (3%):***

50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 150 mM Natriumchlorid, 0,1% Natriumazid, 3% NP-40.

#### ***PAGE-Entfärbelösung:***

20% Methanol, 10% konzentrierte Essigsäure (98%).

PBST (Phosphat Buffered Saline mit Tween):

0,2% Tween in PBS (s.o.).

#### ***Probenpuffer (2x):***

50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2,5% 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 10% Glycerol,  
0,025% Bromphenolblau.

#### ***Proteinaseinhibitorenmix:***

2 µg/ml Aprotinin (1:100), 2 mM Benzamidin (1:100), 20 µg/ml Leupeptin (1:200)  
und 2 mM PMSF (1:50) in Mischung (2: 1) aus TNA-Puffer und NP-40-Puffer.

#### ***Sammelgel (5%) (2 große Gele, 10 x 15 cm):***

13,6 ml Aqua dest., 3,4 ml Acrylamide Bis Solution (30%), 2,5 ml Tris (1000 mM,  
pH 6.8), 0,2 ml SDS (10%), 0,2 ml APS (10%), 0,02 ml TEMED.

#### ***Stripping-Puffer:***

62,5 mM Tris, 2% SDS, 100 mM 2-Mercaptoethanol ad 500 ml Aqua dest. (pH 6.7).

#### ***TNA-Puffer:***

50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 150 mM Natriumchlorid, 0,1% Natriumazid,  
0,1% NP-40 ad 100 ml Aqua dest.

#### ***Trenngel (15%) (2 große Gele, 10 x 15 cm):***

6,8 ml Aqua dest., 2,4 ml Glycerol, 20 ml Acrylamide Bis Solution (30%),  
10 ml Tris (1500 mM, pH 8.8), 0,4 ml SDS (10%), 0,4 ml APS (10%), 0,016 ml TEMED.

### 2.1.7 Gewebe

Für die durchgeführten immunhistologischen APAAP-Untersuchungen wurde in Paraffin eingebettetes, bioptisch oder intraoperativ gewonnenes Gewebe aus dem Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Charité, Campus Virchow und Campus Mitte verwendet. Wie aus Tab. 9 und 10 hervorgeht, wurden in dieser Arbeit insgesamt 70 Gewebeproben zur APAAP-Untersuchung herangezogen. Sie stammen aus den Jahren 1993 bis 2001. Es handelt sich sowohl um morphologisch unauffällige, repräsentative Gewebeproben aus disseminierten Regionen des gesamten Gastrointestinaltrakts, Leber und Pankreas (siehe Tab. 9) als auch um Gewebeproben von 19 Tumoren neuroendokriner Herkunft (siehe Tab. 10). Das Untersuchungsmaterial der in dieser Arbeit erfassten neuroendokrinen Tumore wurde nach immunhistologischen Einschlusskriterien ausgewählt. Es wurden lediglich Tumore mit positivem Antigennachweis der in Kap. 1.11 beschriebenen neuroendokrinen Marker NSE, Chromogranin A (Cg A) und Synaptophysin 38 (Sy 38) in unsere Auswertungen einbezogen. Für die Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden darüber hinaus sechs Pankreasgewebe und jeweils drei Dünndarm- und Magengewebe aufgearbeitet, bei denen es sich um intraoperativ gewonnene Resektate handelte, die unmittelbar in flüssigem Stickstoff fixiert wurden. Die entsprechenden histologischen Befunde des Instituts für Pathologie der Charité lagen für alle 82 Gewebe vor.

**Tab. 9:** Aufstellung der morphologisch unauffälligen Gewebe der APAAP-Untersuchungen.

Nr.	Lokalisation:	Anzahl:
1.	Pankreas	11
2.	Leber	5
3.	Magenfundus	4
4.	Magencorpus	3
5.	Magenantrum	3
6.	Duodenum	4
7.	Jejunum	4
8.	Ileum	6
9.	Kolon	6
10.	Rektum	5
<b>Normalgewebe gesamt</b>		<b>51</b>

**Tab. 10:** Aufstellung der neuroendokrinen Tumorgewebe der APAAP-Untersuchungen.

Nr.	Lokalisation:	Anzahl:
1.	NET Magen	3
2.	NET Pankreas	7
3.	NET Dün- und Dickdarm	7
4.	Insulinom Pankreas	2
<b>Neuroendokrine Tumore (NET)</b>		<b>19</b>

### 2.1.8 Zelllinien

Für unsere experimentellen Betrachtungen wurden 16 Zelllinien kultiviert, um diese anhand der Western Blot Analyse und der Immunfluoreszenzdiagnostik zu untersuchen. Im Detail wurden 15 in der Monolayerkultur adhärent wachsende Zelllinien sowie die Suspensionszelllinie *KU-812* verwendet, die in folgender Tabelle 11 gelistet sind.

*Tab. 11: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.*

Nr.	Bezeichnung:	Spezies:	Kurze Charakterisierung:	Nährmedium und Zusätze:	Referenz:
1.	<b>RBL-2H3</b>	Ratte	<b>Basophile Leukämiezelllinie</b>	DMEM, 5% FKS, 1% P/ S	<i>Barsumian EL et al. Eur J Immunol (1981)</i>
2.	<b>KU-812</b>	Human	<b>Basophile Leukämiezelllinie</b>	RPMI, 20% FKS, 1% P/ S, 50 mM Mercaptoethanol	<i>Kishi K Leukemia Res (1985)</i>
3.	<b>BON</b>	Human	<b>Neuroendokrines Pankreaskarzinom</b>	DMEM/ HAM'S (1: 1), 10% FKS, 1% P/ S	<i>Evers BM et al. Gastroenterology (1991)</i>
4.	<b>QGP-1</b>	Human	<b>Nonfunktioneller Inselzelltumor des Pankreas</b>	RPMI, 10% FKS, 1% NEAA	<i>Kaku M et al. Gann (1980)</i>
5.	<b>PANC-1</b> ⊗	Human	<b>Adenokarzinom des Pankreas</b>	DMEM, 10% FKS	<i>Lieber M Int J Cancer (1975)</i>
6.	<b>CAPAN-1</b> ⊗	Human	<b>Adenokarzinom des Pankreas</b>	RPMI, 15% FKS	<i>Fogh J J Natl Cancer Inst (1977)</i>
7.	<b>PLC</b> ⊗	Human	<b>Hepatom</b>	DMEM, 10% FKS	<i>Aden DP et al. Nature (1979)</i>
8.	<b>CaCo-2</b> ⊗	Human	<b>Adenokarzinom des Kolons</b>	DMEM, 10% FKS	<i>Fogh J et al. J Natl Cancer Inst (1977)</i>
9.	<b>HT-29</b> ⊗	Human	<b>Adenokarzinom des Kolons</b>	DMEM, 10% FKS	<i>Fogh J et al. Human Tumor Cells in vitro (1977)</i>
10.	<b>IEC-6</b> ⊗	Ratte	<b>nicht neoplastisch transformiertes Dünndarmepithel</b>	DMEM (high glucose), 5% FKS, 1% P/S, 1% Insulin	<i>Quaroni &amp; May Meth Cell Biol (1980)</i>
11.	<b>MKN-28</b>	Human	<b>gut differenziertes tubuläres Adenokarzinom des Magens</b>	DMEM, 10% FKS, 1% P/ S	<i>Motoyama T et al. Acta Pathol Jpn. (1986)</i>
12.	<b>MKN-45</b>	Human	<b>niedrig differenziertes tubuläres Adenokarzinom des Magens</b>	DMEM, 10% FKS 1% P/ S	<i>Motoyama T et al. Acta Pathol Jpn. (1986)</i>
13.	<b>AGS</b> ⊗	Human	<b>Adenokarzinom des Magens</b>	DMEM, 10% FKS 1% P/ S	<i>Barranco SC et al. Cancer Res (1983)</i>
14.	<b>KATO-3</b> ⊗	Human	<b>Adenokarzinom des Magens, Siegelringzelltyp</b>	DMEM/ RPMI (1: 1), 10% FKS, 1% P/ S	<i>Sekiguchi M et al. Jpn J Exp Med (1978)</i>
15.	<b>HeLa</b> ⊗	Human	<b>Zervixepithelkarzinom</b>	DMEM, 10% FKS, 1% NEAA	<i>Scherer et al. J Exp Med (1953)</i>
16.	<b>PC-12</b> ⊗	Ratte	<b>Phäochromozytom</b>	DMEM, 10% FKS, 1% NEAA	<i>Greene &amp; Tischler Proc Natl Acad Sci (1976)</i>

Im Einzelnen handelte es sich um 12 maligne transformierte epitheliale Zelllinien gastrointestinalen (*MKN-28*, *MKN-45*, *AGS*, *KATO-3*), hepatopankreatischen (*PANC-1*, *CAPAN-1*, *PLC*) und neuroendokrinen Ursprungs (*BON*, *QGP-1*, *PC-12*), zwei transformierte basophile Leukämiezelllinien (*RBL-2H3* und *KU-812*), die nicht neoplastisch transformierte Dünndarmepithelzelllinie *IEC-6* und die zahlreich untersuchte epithelähnliche humane Adenokarzinomzelllinie *HeLa*. Neben den drei von der Spezies *Ratte* abstammenden Zelllinien *RBL-2H3*, *IEC-6* und *PC-12* wurden ausschließlich Zelllinien *humanen* Ursprungs ausgewählt. Die Charakterisierung der einzelnen Zelllinien und deren zur Aufzucht verwendete Nährmedien werden in Tab. 11 aufgeführt. Alle gekennzeichneten Zelllinien (⊗) wurden von der ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MA, USA) bezogen und sind dort molekularbiologisch charakterisiert. Die Zelllinien *BON*, *QGP-1*, *MKN-28* und *MKN-45* wurden durch entsprechende Referenzlabore bezogen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 HE (Hämatoxylin-Eosin)-Färbung

Die HE-Färbung ist eine Übersichtsfärbung, die der histologischen Darstellung paraffinierter Gewebe dient. Die Objektträger wurden in vertikale Küvetten gestellt und für 3 Min. in die Zellkernfärbung mit Hämatoxylin nach Meyer getaucht. Nach Spülung mit Leitungswasser und Gegenfärbung mit Eosinlösung für 15 Sekunden konnten die Präparate unter Verwendung von Glyceringelatine eingedeckelt und mikroskopisch betrachtet werden.

### 2.2.2 Prinzip der Antigen-Antikörperreaktion der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (z.B. Immunfluoreszenz, APAAP-Methode) dient der *in-situ-Identifikation* von Zell- und Gewebsbestandteilen, die durch entsprechende Markierung von Antigen oder Antikörper im Präparat sichtbar gemacht werden [Boenisch T (1989)]. *Polyklonale* Antikörper werden von verschiedenen B-Lymphozyten der mit entsprechendem Antigen hyperimmunisierten Tiere (z.B. Ratte) gebildet und reagieren mit verschiedenen Epitopen des Antigens. *Monoklonale* Antikörper stammen von Plasmazellklonen der Spezies Maus. Sie sind immunhistochemisch identisch und reagieren nur mit einem spezifischen Epitop des Antigens. Um die Spezifität der immunhistochemischen Reaktion zu überprüfen, wurden in den durchgeführten Versuchen entsprechende *Negativ-* und *Positivkontrollen* vorgenommen.

Die immunhistochemische Darstellung von SNARE-Proteinen in fixiertem Gewebe und Zellen wird durch ihr niedriges endogenes Expressionsniveau und ihre komplexe Bindung mit anderen

regulatorischen Peptiden erschwert [Weimbs et al. (2003)]. Daher wurden multiple Vorversuche zur Optimierung der Antigendarstellung vorgenommen (s.u.).

### 2.2.3.1 Immunfluoreszenz an Zelllinien

Zunächst wurden konfluent wachsende Zellen (siehe Kap. 2.2.8) auf Deckgläschen in Zellkulturschalen herangezüchtet. In Vorversuchen wurde die jeweils zur bestmöglichen Antigendarstellung geeignete Fixierungsmethode (PFA/ Saponin/ Carnoy/ Methanol-Aceton) ermittelt. Die optimale Fixierung der Zellen erfolgte schließlich in einem Methanol-Acetongemisch (1:1) für 2 Min. bei RT. Nach kurzer Lufttrocknung der Deckgläschen wurden die unspezifischen Bindungen für 30 Min. mit Ziegen Serum (5 %) in PBS blockiert. Die Primärantikörperverdünnung erfolgte in einem Gemisch aus 0,1 % BSA in PBS. Hiervon wurden 30 µl auf jedes Deckgläschen pipettiert und diese in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4° C inkubiert. Als Negativkontrolle setzten wir das Medium der Primärantikörperverdünnung ein, als Positivkontrolle wurde jeweils ein etablierter Antikörper (z. B. Cg A) mitgeführt. Zur Sichtbarmachung des Antigen-gebundenen Primärantikörpers wurden die *Sekundärantikörper Cy2 oder Cy3* (siehe Tab. 8) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um an Ig G gekoppelte Carbocyaninfarbstoffe gegen den entsprechenden polyklonalen (Cy2) oder monoklonalen (Cy3) Primärantikörper. Sie fluoreszieren durch Anregung im spezifischen Wellenlängenbereich (Absorptionsmaximum Cy2: 482 nm, Cy3: 550 nm) in grüner (Cy2) bzw. roter (Cy3) Farbe. Nach Zentrifugieren des entsprechenden Sekundärantikörpers wurde dieser ebenfalls in 0,1 % BSA in PBS gelöst und für 30 Min. lichtgeschützt bei RT auf die Deckgläschen aufgetragen. Nach gründlichem Waschen mit PBS konnten die Zellen mit 96 % Ethanol nachfixiert, mit Elvanol eingedeckelt und der Immunfluoreszenzanalyse unter dem Mikroskop Axiophot der Fa. Zeiss zugeführt werden.

### 2.2.3.2 Immunfluoreszenz an Geweben

Die bei – 196° C in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Pankreas-, Magen- und Darmpräparate wurden in Tissue Tek eingebettet, mit Hilfe des Gefriermikrotoms 8 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf beschichtete Objektträger aufgetragen. Die *Pankreaspräparate* wurden für 2 h bei RT luftgetrocknet und anschließend in 1 % PFA-Lösung 10 Min. bei RT fixiert. In den Immunfluoreszenzen mit Glukagon und Insulin wurden die Kryostatschnitte vorhergehend 2 x 15 Min. mit PBS gewaschen, um unspezifische Proteinrückstände zu entfernen. Die Gefrierpräparate des *Dünndarms* und *Magens* wurden nach kurzem Auftauen 20 Min. bei RT fixiert, wonach sie in einem Gemisch aus 0,1 % Triton X in PBS nachinkubiert wurden, um die Permeabilität für die Antikörper zu verbessern. Nach der Fixierung erfolgte *für alle*

*Gefriergewebe* einheitlich die Blockierung in 5 % Ziegen Serum für eine Dauer von 30 Min. und darauf erneutes Waschen in PBS. Hiernach konnte die Primärantikörperlösung in der in Tabelle 6 ersichtlichen jeweiligen Verdünnung in 0,1 % BSA in PBS über Nacht bei 4° C inkubiert werden. Am Folgetag wurde nach erneutem Waschen die Sekundärantikörperlösung (siehe Tab. 7) in 0,1 % BSA in PBS aufgetragen, für 1 h im Dunklen belassen, die zweiminütige Nachfixierung mit 96 % Ethanol vorgenommen und die Präparate abschließend in Elvanol eingedeckelt.

#### **2.2.4 Einfach- und Doppelfluoreszenz**

Anhand der Einfachfluoreszenz wird *ein* spezifisches Antigen detektiert. Erweiternd dient die Doppelfluoreszenz dazu, *zwei* Antigene auf subzellulärer Ebene anhand verschiedener Primärantikörper zu markieren, um diese untereinander in Beziehung zu setzen. Lassen sich beide in denselben intrazellulären Kompartimenten lokalisieren, spricht man von sog. *Kolokalisation* oder *Doppellokalisierung*.

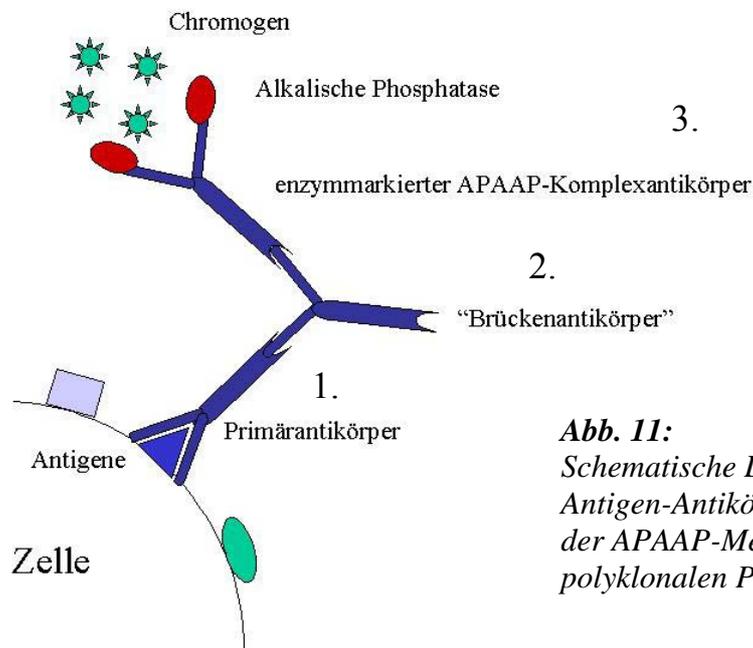
Anstelle eines Primärantikörpers wurde nun - analog zu der in Kap. 2.2.3 beschriebenen Methode - eine Mischung aus *zwei Primärantikörpern* auf die zur Untersuchung herangezogenen Zellen aufgetragen. Anschließend konnten diese durch ein Sekundärantikörpergemisch aus Cy2 und Cy3 visualisiert werden, wobei Cy2 polyklonale Primärantikörper der Spezies Kaninchen (rb) und Cy3 monoklonale Primärantikörper der Spezies Maus (m) markierte.

#### **2.2.5 APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase)**

Immunenzymatische Färbemethoden wie die APAAP-Methode oder die POD-Methode nutzen eine Enzym-Substratreaktion um farblose Chromogene in ein gefärbtes Endprodukt umzuwandeln. Bei der von *Cordell* entwickelten *APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase)* [Cordell et al. (1984)] hydrolysiert das Enzym Alkalische Phosphatase das Substrat Naphtholphosphatester zu Phosphaten und Phenolkomponenten, die mit Chromogenen wie Neufuchsin unlösliche Azofarbstoffe bilden. Ein Brückenantikörper verbindet den enzymkomplexierten APAAP-Antikörper mit einem unkonjugierten, gegen das Antigen gerichteten Primärantikörper, der somit visualisiert wird. Die Kolokalisation von APAAP-Befunden in Serienschnitttechnik beinhaltet die Abfolge der histologischen Präparate in geringer Schnittdicke mit dem entsprechenden Nachweis zweier Antigenen in denselben intrazellulären Strukturen.

Zur Etablierung der Primärantikörper, insbesondere der verwendeten SNARE-Antikörper, wurde in Vorversuchen die Methode der Antigendemaskierung (Mikrowelle versus Dampfdruckverfahren), die optimale Inkubationszeit und die in Tab. 6 angegebene optimale

Konzentration durch Schachbretttitration ermittelt. Durch enzymatische Pronaseandauung konnte die Antigendarstellung der SNARE-Antikörper *nicht* optimiert werden.



**Abb. 11:**  
Schematische Darstellung der Antigen-Antikörperkomplexbindung der APAAP-Methode für einen polyklonalen Primärantikörper. [eigene Grafik]

Die Anfertigung der Paraffinschnitte der ausgewählten Gewebe erfolgte bei einer Temperatur von  $-18^{\circ}\text{C}$  am Mikrotom. Die Schnittdicke betrug  $1\text{-}2\ \mu\text{m}$ , die der Serienschnitte  $0,5\ \mu\text{m}$ . Nach Auffangen im Wasserbad ( $50^{\circ}\text{C}$ ) und Aufbringen auf die beschichteten Objektträger wurden diese bei  $35^{\circ}\text{C}$  über Nacht im Brutschrank getrocknet. Zur *Entparaffinierung* wurden die Präparate für je 10 Min. in einer absteigenden alkoholischen Verdünnungsreihe (Rotihistol  $\rightarrow$  Isopropanol  $\rightarrow$  Ethanol 96 %  $\rightarrow$  80 %  $\rightarrow$  70 %  $\rightarrow$  50 %) getaucht und schließlich in Aqua dest. für 5 Min. hydratisiert. Unmittelbar darauf erfolgte das sog. *feuchte Autoklavieren* in Citratpuffer im Dampfdrucktopf für 3 Min. Nach Abkühlung der Präparate wurde unter Vermeidung von Austrocknung je  $50\text{-}200\ \mu\text{l}$  der in Antibody Diluent hergestellten Primärantikörperverdünnung aufpipettiert. Als Negativkontrolle setzten wir das Verdünnungsmedium ein, als Positivkontrolle wurde jeweils ein etablierter Antikörper (z. B. Cg A) mitgeführt. Nach der nächtlichen Inkubation in einer Feuchtkammer und mehrfachem Waschen in TBS mit 0,1% Triton X (TBST) erfolgte das Auftragen der entsprechenden APAAP-Sekundärantikörper (siehe Tab 8), die in einer Stocklösung aus 10 % -Humanalbuminlösung in RPMI-Medium (1:10) angesetzt waren. Die Zusammenstellung in Tab. 12 veranschaulicht die unterschiedliche Sekundärantikörperabfolge bei verwendetem monoklonalem respektive polyklonalem Primärantikörper. Der finale APAAP-Komplex-Antikörper trägt den zur Erzeugung des Farbstoffes notwendigen Enzymkomplex. Durch Eintauchen der Präparate in die APAAP-

*Entwicklungslösung* (siehe Kap. 2.1.5) für 20 Min. wurde die Lokalisation des Antigens durch die rote Farbreaktion markiert. Abschließend erfolgte für 5 Min. die Zellkernfärbung mit Hämalaun nach Mayer, dann das Eindeckeln mit Glyceringelatine.

**Tab. 12:** Entwicklungsschritte der APAAP-Methode bei mono- und polyklonalem Antikörper.

Entwicklungsschritte:	monoklonaler Primärantikörper :	Zeit in Min.	polyklonaler Primärantikörper:
1. Waschen	TBST	30' ↓ 30'	TBST
2. Sekundärantikörper:	IgG rabbit-anti-mouse (Brückenantikörper)	30' ↓ 30'	IgG mouse-anti-rabbit (Primärer APAAP-Ak)
3. Waschen:	TBST	5' ↓ 5'	TBST
4. Sekundärantikörper:	APAAP-Komplex-Ak	30' ↓ 30'	IgG rabbit-anti-mouse (Brückenantikörper)
5. Waschen:	TBST	5' ↓ 5'	TBST
6. Sekundärantikörper:	IgG rabbit-anti-mouse (Brückenantikörper)	15' ↓ 30'	APAAP-Komplex-Ak
7. Waschen:	TBST	5' ↓ 10'	TBST
8. Sekundärantikörper:	APAAP-Komplex-Ak	15' ↓ –	—
9. Waschen:	TBST	10' ↓ –	—
10. Entwicklung	APAAP-Entwicklungslösung	20' ↓ 20'	APAAP-Entwicklungslösung

### 2.2.6 Auswertung der immunhistochemischen Befunde

Zur immunhistochemischen Analyse gehörte die Auswertung der *Signalintensität (I)* und die der *subzellulären Lokalisation (SZL)* der Antigene sowie die quantitative Auszählung der antigenpositiven Zellen. Zur Bewertung der Färbeintensität der antigenpositiven Zellen im Normal- und Tumorgewebe wurde die in Tab. 13 dargestellte modifizierte *semiquantitative Schätzungsskala* nach Jaros *et al.* (1992) verwendet. Bezüglich der Angabe der subzellulären Lokalisation wurde unterschieden, ob es sich um eine **intrazelluläre (IZ)** oder eine **plasmamembranäre (PM)** Anordnung des dargestellten Antigens handelte. Ein intrazelluläres Signal in der immunhistochemischen Darstellung kann demnach als Verteilung des Antigens auf endomembranären Strukturen oder im Zytoplasma interpretiert werden. Gelegentlich war immunhistochemisch ein vesikuläres oder granuläres Expressionsmuster zu erkennen.

Um die *Anzahl antigenpositiver Zellen* in der gastrointestinalen Mukosa vergleichend darzustellen, wurde deren Vorkommen in drei unterschiedlich lokalisierten Blickfeldern in 200-facher Vergrößerung ausgezählt und quantitativ erfasst. Bei Auswertung mehrerer Gewebe (z.B. 6 Kolonpräparate) wurde ein Mittelwert der antigenrepräsentierenden Zellen für das entsprechende Antigen errechnet und graphisch dargestellt (siehe Abb. 37).

**Tab. 13:** Legende zur qualitativen Auswertung der Färbeintensität.

<b>Zeichen für Signalintensität (I):</b>	<b>Erläuterung:</b>
–	negativ = keine Reaktivität
+	schwach aber spezifisch positive Reaktivität
++	mäßig positive Reaktivität
+++	stark positive Reaktivität
++++	übermäßig starke positive Reaktivität

### 2.2.7 Fotografische Dokumentation

Die immunhistochemisch aufgearbeiteten Gewebe und Zellen wurden licht- und immunfluoreszenzmikroskopisch durch das Invertmikroskop *Axiophot 1* der Fa. Zeiss betrachtet. Die fotografische Dokumentation konnte anhand der integrierten digitalen Kamera und der Software *Axiovision 3.1* der Fa. Zeiss vorgenommen werden. Die Zusammenstellung und Bearbeitung der digitalen Aufnahmen erfolgte mit den Bildbearbeitungsprogrammen *Power Point 2000* der Fa. Microsoft und *Photoshop 6.0* der Fa. Adobe.

### 2.2.8 Zellkultur

Zellkulturen werden aus reseziertem Tumorgewebe oder permanent vermehrten Nacktmaus-Xenografts gewonnen. Ein wichtiger Vorteil ist die Proliferationsaktivität der Zellen, durch die vergleichende Untersuchungen biologischer Prozesse *in vitro* unter standardisierten Bedingungen vorgenommen werden können.

Bei den für unsere Untersuchungen ausgewählten Zelllinien (siehe Kap. 2.1.8) handelte es sich, bis auf die *Suspensionszelllinie KU-812*, um adhärent wachsende *Monolayerkulturen*. Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Luft, 5% CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre auf 100 mm Zellkulturschalen bzw. 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (KU-812) bis zur Konfluenz inkubiert und lichtmikroskopisch kontrolliert. Es erfolgte alle zwei Tage ein Medienwechsel. Jegliche Manipulationen an der Zellkultur wurden unter einer laminar flow-Sterilbank vorgenommen. Die jeweils zelllinienspezifische Medienzusammensetzung kann der Übersicht Tab. 11 entnommen werden. Konfluente Zellen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit im Verhältnis 1:2 bis 1:5 subpassagiert. Hierfür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung 5 Min. bei 37°C inkubiert und so von der Wachstumsfläche abgelöst. Durch das Zentrifugieren bei 800 rpm wurden die Zellen sedimentiert, in steril filtriertem Kulturmedium resuspendiert und auf mehrere Kulturschalen verteilt. Um die Immunfluoreszenz an HT-29 und BON-Zellen (s.o.) durchzuführen, wurden sterile Deckgläschen mit einer Ringpinzette auf dem Boden der Kulturschale verteilt. Die

Versuche konnten erfolgen, sobald die Zellen adhären an diese angewachsen waren, aber noch nicht gänzlich konfluieren.

### 2.2.9 Herstellung der Proteinlysate und Proteinbestimmung

Für die Herstellung der Proteinlysate wurde das zellbedeckende Medium abgesaugt, mit vorgekühlter PBS gespült und die Kulturschale auf Eis gestellt (4°C). Um den Zellrasen zu lösen und eine proteolytische Modifikation der Proteine zu inhibieren, wurden pro Schale 800 µl TNA-Puffer und 400 µl 3%-ige NP-40-Puffer mit der entsprechenden Konzentration der Proteinaseinhibitoren zugegeben (siehe Kap. 2.1.6). Nach 10 Min. Inkubation auf Eis wurden die Zellen gründlich abgeschabt, in einen Eppendorfbehälter überführt, erneut mit der Pipette resuspendiert und in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge der Fa. Sigma bei 20000 g sedimentiert. Der abpipettierte Überstand stellt das sog. *Proteinlysate* der Zelllinie dar. Die so gewonnenen Lysate wurden, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten und den Einfluss unterschiedlichen Proteingehaltes zu minimieren, einer quantitativen *Proteinbestimmung* unterzogen. Das auf *kolorimetrischer* Grundlage basierende *DC Protein Assay* nach *Lowry* beruht im wesentlichen auf einer chemischen Reaktion zwischen alkalischem Kupfertartrat und den Folinreagenz reduzierenden Aminosäuren [Lowry et al. (1951)]. Die somit induzierte Farbveränderung wurde durch Messung der entsprechenden Extinktion der Probe im Wellenlängenbereich von 750 nm photometrisch bestimmt. Es wurden sowohl die Extinktionswerte der mit bovinem Serumalbumin (BSA) in TNA-Puffer angesetzten Standardverdünnungsreihe (0,2 - 2,0 µg BSA/µl) als auch die der jeweiligen Zelllysate (je 100 µl) in Doppelbestimmungen ermittelt. Anhand einer angefertigten Eichgerade konnte die entsprechende Proteinkonzentration des jeweiligen Zellpellets rechnerisch bestimmt werden. Die *endgültige Proteinkonzentration* der Zelllysate wurde einheitlich auf 0,5 µg/µl eingestellt. Schließlich wurden diese in zweifachen SDS-Probenpuffer 1:1 überführt und bei 95°C für 5 Min. denaturiert.

### 2.2.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die vertikale *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)* nach dem Prinzip von *Laemmli* ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts in einem diskontinuierlichen Puffersystem in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) [Laemmli UK (1970)]. Die Gelelektrophorese besteht aus einem großporigen *Sammelgel*, in dem die Proteine konzentriert werden und einem darunter liegenden *Trenngel*, in dem die Auftrennung der Proteine nach Molmasse erfolgt (siehe Kap. 2.1.6). Die Polyacrylamidkonzentration des

verwendeten Trenngels variiert in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine. In Vorversuchen wurde auf eine differenzierte elektrophoretische Auftrennung im niedrigen *Molmassebereich* Wert gelegt, denn das Molekulargewicht der eingesetzten SNARE-Proteine lag *zwischen 10 und 37 kD*. Die entsprechende *Gelkonzentration* wurde somit *auf 15 %* festgelegt. Nachdem das Trenngel zwischen zwei durch Kunststoffspacer in einen Abstand von 1 mm gebrachte Glasplatten (11 x 16 cm) gegossen wurde, erfolgte unmittelbar das Einbringen des mit Glycerol versetzten Sammelgels. Nach dessen Polymerisation wurde jeweils 40 µl (entsprechend 20 µg) der 16 Proteinlysate, die zuvor 5 Min. bei 95°C denaturiert wurden, in die entsprechend gekennzeichneten Probenflasche aufgetragen. Zunächst wurde durch die angelegte Spannung von 150 V der Übergang der Proben vom Trenn- in das Sammelgel erzielt. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei 350 V für weitere 120 Min. Als Molmassenstandard wurde der Molekulargewichtsmarker *rainbow marker* der Fa. Biorad eingesetzt, der insbesondere den niedrigen Molmassebereich bis 10 kD markiert. Nach der stattgehabten Elektrophorese wurde das Gel in der Coomassie-Färbelösung für 30 Min. inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PAGE-Entfärbelösung konnten die bläulich markierten Proteinbanden anschließend auf einer Durchlichtvorrichtung auf eine homogene Auftrennung der Proteine hin überprüft und das Gel letztendlich in Kathodenpuffer (K-Puffer) überführt werden.

### 2.2.11 Western Blot

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden im *Western Blot* nach *Towbin et. al. (1979)* durch Elektrotransfer auf eine Hybond C Nitrocellulosemembran übertragen (sog. *blotting*). Zur Optimierung des Proteintransfers in der Trans-Blot-Apparatur der Fa. Biometra wurden die Blotmembran, das Elektrophoresegel und das umgebende Filterpapier zuvor in verschiedenen Transferpuffern (K-Puffer/ A1/ A2-Puffer, siehe Kap. 2.1.6) inkubiert. Die Proteine wurden für 95 Min. bei einer Stromstärke von ~ 400 mA bei einer Gelgröße von 9 x 14 cm<sup>2</sup> (= 3 mA/cm<sup>2</sup>) auf die Nitrocellulosemembran im Sandwichverfahren elektrotransferiert. Nach Beendigung wurde die Auftrennung der Proteinbanden unterschiedlichen Molekulargewichts durch einminütige Färbung mit Ponceau S Lösung visualisiert und die Membran zum Zwecke der Inkubation mit verschiedenen Primärantikörpern zertrennt und beschriftet. Zur Suppression unspezifischer Proteinbindungsstellen diente die Blockierung in einem Absättigungspuffer aus 5% Magermilchpulver in PBS mit 0,2% Tween (PBST) für 30 Min. Die Membranstreifen wurden über Nacht mit den ebenfalls in Absättigungspuffer angesetzten SNARE-Primärantikörpern *Syntaxin 3*, *SNAP 23* und *Cellubrevin* bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert.

Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Membranstreifen am Folgetag mehrfach in PBST gewaschen. Die Detektion der gebundenen polyklonalen Primärantikörper erfolgte durch einen ebenfalls in Magermilchpuffer befindlichen *Peroxidase-gekoppelten POD-Sekundärantikörper* (siehe Tab. 8) für 2 h bei RT. Die Visualisierung des enzymgekoppelten Antikörpers wurde durch das *ECL<sup>TM</sup> (enhanced chemiluminescence)* Western Blot Analysesystem durchgeführt. Die am Sekundärantikörper gebundene Peroxidase katalysiert die Oxidation des Wirkstoffs Luminol unter alkalischen Bedingungen, wobei es zur Emission von Licht im Wellenlängenbereich von 428 nm kommt. Nach einminütiger Benetzung der Blotmembran mit dem ECL-Reagenz wurde ein Autoradiographiefilm für 30 Sekunden in einer Filmkassette aufgelegt und dieser somit belichtet. Abschließend erfolgte die Filmentwicklung in einer Dunkelkammer. Die detektierten Proteinbanden wurden anhand der Durchlichtvorrichtung eines Scanners im Bildformat gespeichert.

### **2.2.12 Proteinstripping der Blotmembran**

Durch die Proteinauftrennung im Gel und den Transfer auf die Blotmembran treten *methodisch bedingte Schwankungen* zwischen der aufgetragenen und der übertragenen Proteinmenge auf. Um die ermittelten Intensitäten der Proteinbanden in Bezug zur auf die Blotmembran übertragenen Proteinmenge quantifizieren zu können, wurde als interne Kontrolle ein ubiquitär vorkommendes, konstant exprimiertes, sog. *housekeeping protein* [Yamada et al. (1997)] eingesetzt. In unserer Arbeit wurde das in zahlreichen gastrointestinalen und hämatologischen Zellen endogen vorkommende  $\beta$ -Aktin ausgewählt. Die zuvor gebundenen Antikörper konnten durch das sog. *Stripping* von der Nitrozellulosemembran entfernt werden. Hierzu wurde die Blotmembran für 30 Min. in einem Mercaptoethanol enthaltenden *stripping buffer* (siehe Kap. 2.1.6) im Wasserbad (60°C) geschwenkt. Nach mehreren Waschvorgängen mit PBST und Blockierung mit 5% Magermilchpulver in PBST wurden die Membranstreifen erneut mit einem monoklonalen, gegen das Antigen  $\beta$ -Aktin gerichteten Primärantikörper über Nacht inkubiert. Die weitere Abfolge der Entwicklungsschritte durch den POD-gekoppelten Sekundärantikörper sowie anhand des ECL-Reagenzes folgte wie zuvor in Kap. 2.2.11 beschrieben.

### **2.2.13 Peptidverdrängungsassay**

Die Methode der *kompetitiven Peptidverdrängung* dient dem Nachweis der Antikörperspezifität der verwendeten Primärantikörper. Es wurden mehrfach jeweils 10  $\mu$ l (= 5  $\mu$ g) des Proteinlysates von HT-29 Zellen durch die SDS-Gelelektrophorese (s. o.) aufgetrennt und diese im zuvor beschriebenen Western Blot Verfahren auf Nitrocellulose übertragen. Daraufhin wurden zwei

Blotmembranstreifen lediglich mit den Primärantikörpern *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* inkubiert. Zwei weitere Nitrozellulosestreifen wurden sowohl mit den genannten SNARE-Primärantikörpern als auch mit 0,5 mg/ml ihres *korrespondierenden synthetischen Antigens* (siehe Tab. 7) präinkubiert. Für *SNAP 23* stand kein stabiles synthetisches Antigen zur Verfügung. Durch Zugabe der entsprechenden Antigene sollten die SNARE-Antikörper im Komplex gebunden werden. War folglich kein entsprechendes spezifisches Signal im Western Blot sichtbar, konnte hierdurch indirekt auf die Spezifität des zugehörigen Antikörpers geschlossen werden.

#### **2.2.14 Quantitative Auswertung der Proteinbanden**

Zur *quantitativen, densitometrischen Auswertung* sowie der vergleichenden Betrachtung der Proteinbanden wurde die Software *Digital Science* der Fa. Kodak herangezogen. Einerseits wurden die mittleren Nettointensitäten der SNARE-Proteinbanden, andererseits die ihrer korrelierenden  $\beta$ -Aktinbanden densitometrisch erfasst. Der hieraus gebildete Quotient gab die *relative Proteinexpression* der einzelnen SNARE-Proteine in der jeweiligen Zelllinie in *willkürlichen Einheiten* wieder. Diese gab Auskunft über die Relation des untersuchten Proteins im Vergleich zur geblotteten Menge an Gesamtprotein und wurde in dieser Arbeit auch als  *$\beta$ -Aktin-Ratio* bezeichnet.