

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeine Hinweise

Alle Puffer und Lösungen wurden - falls nicht anders angegeben - mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Die verwendeten Materialien für die Zellkultur waren entweder vom Hersteller steril verpackte Einmalartikel oder sie wurden vor ihrer Verwendung in einem Autoklaven bei 121 °C 20 min dampfsterilisiert. Sofern bei einigen der folgenden Methoden und Inkubationsschritte keine Temperatur angegeben worden ist, wurde bei Raumtemperatur gearbeitet.

2.2 Geräte

2.2.1 Zellkultur

- Begasungsbrutschrank Cellstar; Nunc Intermed GmbH, Wiesbaden, Deutschland
- CASY-Zellzählgerät; Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
- Gasbrenner Schütt Flamy S; Schütt GmbH, Göttingen, Deutschland
- Lichtmikroskop TMS-F; Nikon, Japan
- Mikroplattenphotometer Tecan Spectra Fluor; Tecan, Österreich
- Rundschtüttler, SLT Shaker; Elmech GmbH, Celle, Deutschland
- SLT-Mikrotiterplattenreader; SLT Labinstrument, Wien, Österreich
- Sterile Laminar-Flow-Box Herasafe; Heraeus-Christ, Hanau, Deutschland
- Vakuumpumpe Vacusafe; Integra Biosciences, Schweiz
- Werkbank Clean Air CLF 360; Woerden, Niederlande.

2.2.2 Sonstige Geräte

- Analysenwaage AC 210 D; Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Fluoreszenzmikroskop BX 41; Olympus, Japan
- Heizbäder B-480/ 485; Büchi AG, Schweiz
- pH-Meter CG 817-T; Schott Geräte, Hofheim, Deutschland
- Spektrofluorometer RF-5001 PC, Fa; Shimadzu, Japan
- Trockenschrank WTB; Binder, Tutlingen, Deutschland
- Ultraschallbad Sonorex RK 100; Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
- Vortex Genie II; Scientific Industries, USA
- Wasserbäder 1002-1013, GFL, Burgwedel, Deutschland.

2.3 Verbrauchsmaterialien

2.3.1 Untersuchungsmaterialien

- Amentoflavon; Roth, Wiesbaden, Deutschland
- Apigenin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Arabinosylcytosin HCl; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Bilobalid; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Coffein; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Curcumin; Eastman, USA
- Deoxyepiganin; Frau Prof. Dr. Winterhoff, Münster, Deutschland
- (-)-Epicatechin; Roth, Wiesbaden, Deutschland
- (-)-Epigallocatechin (EGC); Roth, Wiesbaden, Deutschland
- (-)-Epigallocatechingallate (EGCG); Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Forskolin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Ginkgolid A; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Ginkgolid B; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Ginkgo-biloba-Extrakt; Schwabe GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Grüner Tee Extrakt (EFLA[®]85942); Emil Flachsmann AG, Schweiz
- L-Theanin; Chromadex, USA
- Luteolin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- N⁶, 2'-O-dibutylryladenosine-3', 5'-cyclic monophosphate, Sodium Salt; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- (-)-Nicotin, sterile; Roth, Wiesbaden, Deutschland
- Rolipram; MB Biomedicals, USA
- Theobromin; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Theophyllin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Vinpocetin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- 3,3',5'-Triiodo-l-Triiodotyronine, Sodium salt; Sigma, Deisenhofen, Deutschland.

2.3.2 Zellkultur

- 24/ 6-Well-Tissue Culture Plate; Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- Casy Clean Lösung; Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
- Casy Ton Lösung; Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland

- Einmal-Injektionskanülen Gr. 1, Sterican; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Fetales Kälberserum (FBS); Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Flüssigkeitsreservoir steril 55 ml; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Hämatoxylinlösung III nach Gill; Merck, Darmstadt, Deutschland
- MEM-Earle's; Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container; Nalge Nunc International, Großbritannien
- Natrium Pyruvat; Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Nicht-essentielle Aminosäure; Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Omnifix-Einmalspritzen 1 ml/ 2 ml/ 10 ml; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- PBS-Dulbecco-Puffer; Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Sterilfilter Minisart, Porengröße 0.2 µm; Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Tissue Culture Flask 50/ 250 ml, steril; Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- Trypsin/ EDTA Solution 0.05 %/ 0.02% (w/v); Biochrom KG, Berlin, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen 15/ 50 ml, steril; Corning Inc., USA.

Sterile Einwegware, wie Pipetten, Schraubdeckelröhrchen, Zentrifugenröhrchen und Gefäße für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc (Wiesbaden, Deutschland), Roth (Wiesbaden, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Greiner (Nürtingen, Deutschland) bezogen.

2.3.3 Chemikalien

- 7-Amino-4-methylcumarin (AMC); Serva, Heidelberg, Deutschland
- Aceton; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Bisbenzimid, (Hoechst33258); Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Desoxyribonucleic acid (DNA) Sodium salt, Type XIV: From Herring Testes; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Dimethylsulfoxid (DMSO); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Dinatriumhydrogenphosphat*12H₂O (Na₂HPO₄); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol (EtOH); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA); Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Formaldehyd; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glycerol; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Hämatoxylin-Lösung III nach Gill, Merck, Darmstadt, Deutschland
- HEPES, Hemisodium salt; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- H-Histidyl-L-Leucin (H-His-L-Leu); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin-OH* 4 H₂O; Bachem, Schweiz
- Isopropanol; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Leucin Aminopeptidase, microsomal (LAP) (EC: 3.4.11.2); Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Lisinopril; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Methanol (MeOH); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumchlorid; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumdihydrogenphosphat * H₂O (NaH₂PO₄); Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydroxid; Merck, Darmstadt, Deutschland
- o-Phthalaldehyd; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Phosphoramidone disodium salt; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Salzsäure (HCl); Merck, Darmstadt, Deutschland
- SAAP-AMC (N-Succinyl-Ala-Ala-Phe-7-Amido-4-methylcumarin); Bachem AG, Schweiz.

2.3.4 Puffer und weitere Lösungen

- PBS-Puffer 150 mM NaCl, 8,33 mM Na₂HPO₄, 1,67 mM KH₂PO₄, pH 7,4
- HEPES-Puffer 50 mM HEPES, 154 mM NaCl, pH 7,4
- Phosphat-Puffer 83 mM K₂HPO₄*3 H₂O, 326 mM NaCl, pH 8,3
- DNA-Puffer 41 mM Na₂HPO₄ * 12H₂O, 9 mM NaH₂PO₄ * H₂O, 2 mM EDTA, pH 7,4 (2x konzentrierter DNA-Puffer für die Kalibriergerade)
- DNA-Stammlösung 1.0 mg DNA/ml H₂O
- Hoechst 33258 Stammlösung 1.0 mg/ml H₂O, Lagerung bei 4 °C
- Hoechst 33258 Arbeitslösung 10.0 µl Stammlösung + 990 µl H₂O PBS-Puffer.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivieren und Passagieren von SK-N-SH Zellen

SK-N-SH Zellen, (humane Neuroblastom-Zelllinie aus Knochenmarksmetastasen, ATCC Nr. HTB11) sind adhärent wachsende Zellen. Sie wurden in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von $A = 25 \text{ cm}^2$ in 5 ml Minimal Essential Medium-(MEM mit Earls Salz) mit 10 % FBS, Natriumpyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ und 95 % Luft enthielt, als Monolayer kultiviert.

Zum Passagieren wurde zunächst das Medium jede Woche abgesaugt und die maximal 90 % konfluent gewachsenen Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 2.5 ml Trypsin-EDTA-Lösung für ein bis zehn Minuten zugegeben. Die Trypsinlösung sollte nicht länger als 10 min auf den Zellen sein, da sie zellschädigend wirken kann. Nach Ablösung der Zellen durch leichtes Klopfen gegen den Kulturflaschenboden wurden sie von der Kulturflasche abgespült. Durch Zugabe von 30 ml frischem MEM Earle Medium (37 °C, 10 % FBS) wurde die Trypsinierung gestoppt und die Zellen durch mehrfaches Pipettieren suspendiert und in 24-Well-Platten á 1 ml vereinzelt.

Die übrig gebliebenen fünf bis sechs ml der Zellsuspension wurden in eine neue Zellkulturflasche mit einer Bodenfläche von $A = 25 \text{ cm}^2$ ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Während der nächsten 24 Stunden erfolgte kein weiterer Mediumwechsel oder eine andere Manipulation mit den frisch eingesäten Zellen. Mit jeder Passage nahm der Anteil gut proliferierender Zellen zu und der schlecht proliferierenden ab. Damit wurde die Zellkultur von Passage zu Passage uniformer und homogener (bis zu 40 Passagen). Sämtliche Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank.

2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Konservierung von Kulturzellen erfolgte durch Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -195 °C. Nach Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen in einer konfluent bewachsenen Gewebekulturplatte (Durchmesser 100 mm, ca. 5×10^6 Zellen) abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Durch Zentrifugation (200 x g, 3 min) wurden die Zellen anschließend pelletiert und in 1.0 ml Einfriermedium (Medium, 10 % (v/v) FBS, 10 % DMSO) resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension

wurde in Kryoröhrchen überführt und innerhalb von zwei Tagen im Nalgene Cryo Freezing Container in Isopropanol kontinuierlich auf -80 °C abgekühlt. Für eine längere Lagerzeit wurde flüssiger Stickstoff verwendet.

Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem Wasserbad (37 °C). Schrittweise wurden die Zellen im Medium ($5\text{ ml } 4\text{ °C}$) resuspendiert. Nach schonender Zentrifugation ($200 \times g$, 3 min) wurden die Zellen erneut im Medium resuspendiert. Zum vollständigen Auswaschen des aus dem Einfriermedium stammenden DMSO wurde dieser Vorgang erneut wiederholt. Die Zellen wurden zur ersten Passage mit Medium, dem 20% FBS zugesetzt wurde, kultiviert.

2.5 Methoden der Enzymbestimmungen

2.5.1 Bestimmung der Aktivität der NEP

2.5.1.1. Aufnahme einer Kalibriergeraden für 7-Amino-4-methylcumarin

Die NEP- Aktivitätsmessung beruht auf der Fluoreszenzmessung des 7-Amino-4-methylcumarin (AMC). Zunächst musste eine Kalibriergerade mit bekannten AMC-Konzentrationen erstellt werden und die dazugehörige Fluoreszenz wurde anschließend gemessen. Dafür wurden bei Raumtemperatur aus einer 1 mg/ml AMC-Stammlösung Verdünnungen von 10.0 ; 5.0 ; 2.5 ; 1.0 ; 0.5 und $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ AMC mit HEPES-Puffer hergestellt und jeweils $50\text{ }\mu\text{l}$ der jeweiligen Verdünnung in 1.5 ml Eppendorfröhrchen gegeben.

Anschließend erfolgte in jedes Eppendorfröhrchen die Zugabe von $350\text{ }\mu\text{l}$ HEPES-Puffer und $800\text{ }\mu\text{l}$ Aceton. Nach sorgfältigem Mischen wurde jede AMC- Verdünnung drei-mal gegen einen Nullwert aus $350\text{ }\mu\text{l}$ HEPES-Puffer und $800\text{ }\mu\text{l}$ Aceton bei einer Extinktion von $\lambda_{\text{ex}} = 367\text{ nm}$ und einer Emmision von $\lambda_{\text{em}} = 440\text{ nm}$ (Spaltbreiten 3 nm) vermessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu).

Kalibriergerade für 7-Amino-4-methylcumarin in HEPES-Puffer pH 7,4

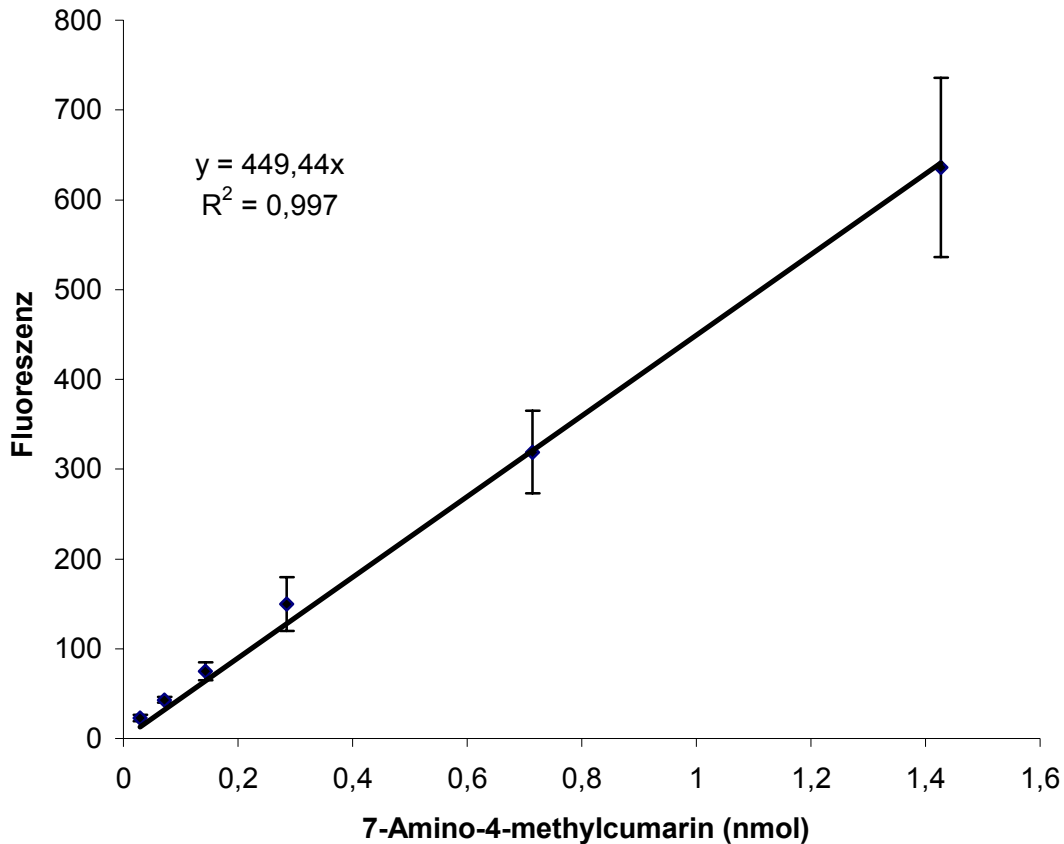


Abbildung 9: Kalibriergerade für NEP-Assay. Jeweils 50 μ l jeder AMC wurde bei einer Extinktion von λ_{ex} = 367 nm und einer Emmision von λ_{em} = 440 nm in 350 μ l HEPES-Puffer und 800 μ l Aceton bei einem Split von 3 nm gegen die Kontrolle gemessen.

2.5.1.2. NEP-Bestimmung im Akutversuch

Die Bestimmung basierte auf der von Bormann und Melzig (2000) beschriebenen, zweistufigen Methode mit N-Succinyl-Ala-Ala-Phe-7-Amino-4-methylcumarin (SAAP-AMC) als Substrat. Während der ersten Reaktion setzte NEP aus dem Substrat Phe-AMC frei, das in einer weiteren enzymatischen Reaktion durch Leucin-Aminopeptidase-Zugabe (LAP) zu AMC abgebaut wurde, dessen Konzentration fluorimetrisch bestimmt werden konnte.

Hierzu musste das Medium von den in den Wells adhären gewachsenen Zellen abgesaugt werden. Danach wurden 50 μ l Testlösung mit 50 μ l SAAP-AMC (50 μ M) und 400 μ l HEPES-Puffer (50 mM + 154 mM NaCl, pH 7,4) auf die Zellen gegeben und die Ansätze wurden für 60 Min bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 50 μ l Phosphoramidon (50 μ M) wurde die Reaktion gestoppt. 400 μ l Überstand wurden in 1.5 ml Eppendorfröhrchen überführt. Die Zugabe von 20 μ l LAP (1:235 in HEPES-Puffer

verdünnt), die zeitgleich zur ersten Reaktionszeit bei 56 °C vorinkubiert worden war, startete die zweite Reaktion zur Bildung von AMC. Die Ansätze wurden dabei für 60 min bei 56 °C inkubiert. Durch 800 µl Aceton wurde die Reaktion durch Proteindenaturierung gestoppt. Danach wurde die Fluoreszenz der Ansätze bei einer Anregungswellenlänge von 367 nm, einer Emissionswellenlänge von 440 nm und Spaltbreiten von jeweils 3 nm gemessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu).

Zeitgleich wurde je Testwert ein Kontrollwert, der 50 µl SAAP-AMC, 400 µl HEPES-Puffer, 50 µl Phosphoramidon, 20 µl LAP und 800 µl Aceton enthielt, mitgeführt.

2.5.1.3. NEP-Bestimmung im Langzeitversuch

Bei den Langzeitversuchen mussten die Extrakte sowie Reinsubstanzen zunächst in Wasser oder DMSO gelöst werden. Diese wurden anschließend unter der Sterilbank durch einen Sterilfilter von 0.2 µm Porendurchmesser filtriert und 24 Stunden nach dem Passieren der Zellen zum Medium zugegeben. Dabei wurde die gewünschte Konzentration angesetzt. Analog zu den Akutversuchen wurde ebenfalls eine Kontrolle mitgeführt. Nach weiteren drei bis vier Tagen wurde das Medium vollständig abgesaugt und 400 µl HEPES-Puffer, 50 µl SAAP-AMC wurden auf die Zellen pipettiert und für 60 min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Der weitere Ablauf entsprach dem Vorgehen im Abschnitt 2.5.1.2.

2.5.2 Bestimmung der Aktivität des ACE

2.5.2.1. Aufnahme einer Kalibriergeraden für das Reaktionsprodukt aus H-Histidyl-L-Leucin (H-His-L-Leu) und o-Phthalaldehyd

Durch die Fluoreszenzmessung eines Komplexes aus H-His-L-Leu mit o-Phthalaldehyd konnten Rückschlüsse auf die ACE-Aktivität gewonnen werden. Hierzu musste zunächst eine Kalibriergerade mit bekannten H-His-L-Leu-Konzentrationen erstellt und die dazugehörige Fluoreszenz gemessen werden. Dafür wurden bei Raumtemperatur aus einer 1 mg/ml H-His-L-Leu –Stammlösung Verdünnungen von 10.0; 5.0; 2.5; 1.0; 0.5 und 0.1 µg/ml L-His-L-Leu mit Phosphat-Puffer hergestellt und jeweils 20 µl der jeweiligen Verdünnung in 2.0 ml Eppendorfröhrchen gegeben.. Anschließend erfolgte in jedes Eppendorfröhrchen die Zugabe von 230 µl Phosphat-Puffer, 1.0 ml NaOH (0.4 N), 100 µl o-Phthalaldehyd und 300 µl HCl (2.0 N). Nach sorgfältigem Mischen wurde jede Verdünnung dreimal gegen einen Nullwert aus 250 µl Phosphat-Puffer, 1 ml NaOH (0.4 N), 100 µl o-Phthalaldehyd und 300 µl HCl (2 N) bei einer

Anregungswellenlänge von 360 nm, einer Emissionswellenlänge von 500 nm und Spaltbreiten von jeweils 3 nm gemessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu).

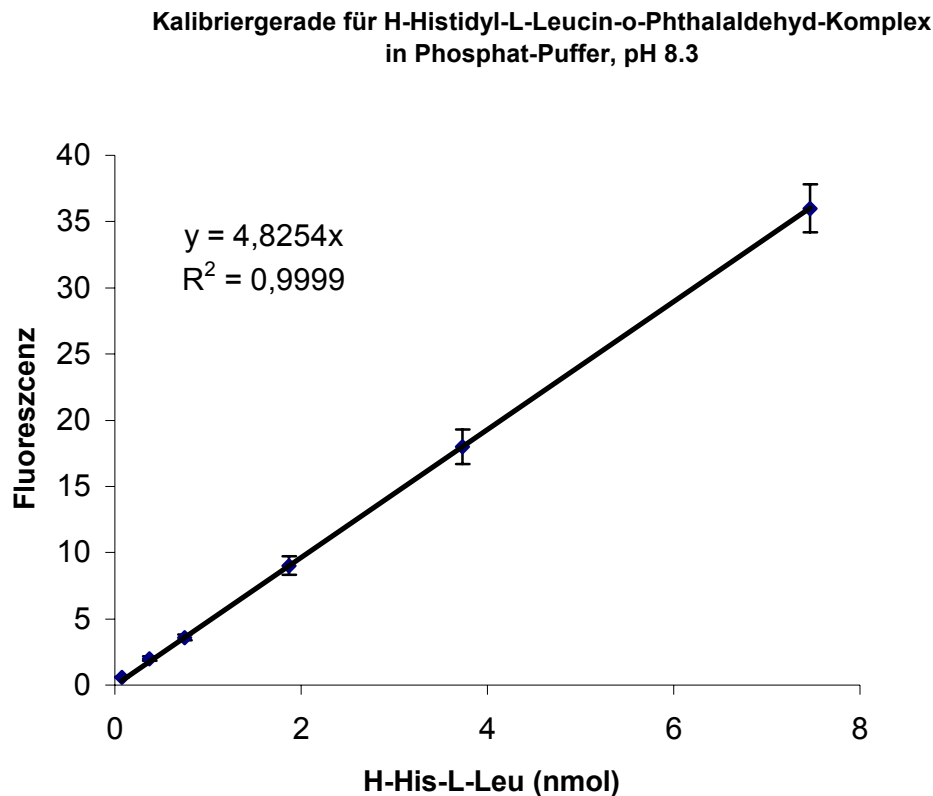


Abbildung 10: Kalibriergerade für ACE-Assay. Jeweils 20 µl jeder H-His-L-Leu-Verdünnungen wurde bei einer Extinktion von $\lambda_{ex} = 360$ nm und einer Emission von $\lambda_{em} = 500$ nm in 230 µl Phosphat-Puffer, 1 ml (0.4 N) NaOH und 100 µl o-Phthalaldehyd bei einem Split von 3 nm gemessen.

2.5.2.2. ACE-Bestimmung im Langzeitversuch

Die Bestimmung wurde nach der Vorschrift von Bormann und Melzig (2000) durchgeführt. Das Enzym ACE katalysiert dabei die Bildung von His-Leu aus Hip-His-Leu. Nach Ende der Reaktionszeit bildete das Dipeptid mit o-Phthalaldehyd einen fluoreszierenden Komplex, dessen Emission als Maß für die Enzymaktivität benutzt wurde.

Bei den Langzeitversuchen mussten die Extrakte sowie Reinsubstanzen zunächst in Wasser oder in DMSO gelöst werden. Diese wurden anschließend unter der Sterilbank durch einen Sterilfilter mit 0.2 µm Porendurchmesser filtriert und 24 Stunden nach dem Passieren der Zellen zum Medium zugegeben. Dabei wurde eine Konzentration angesetzt. Nach weiteren 72-96 Stunden wurde das Medium vollständig abgesaugt und 260 µl Phosphat-Puffer, 20 µl Hip-His-Leu wurden auf die Zellen pipettiert und für 20

min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. 250 µl davon wurden in 2 ml Eppendorfröhrchen gegeben und die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1.0 ml NaOH (0.4 N) gestoppt.

Nach der Zugabe von 100 µl einer frisch hergestellten methanolischen o-Phthalaldehydlösung (2 % in Methanol) wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln gelassen. Durch Zusatz von 300 µl HCl (2 N) wurde die Reaktion beendet. Danach wurde die Fluoreszenz der Ansätze bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm, einer Emissionswellenlänge von 500 nm und Spaltbreiten von je 3 nm gemessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu). Zeitgleich wurde je Testwert ein Kontrollwert, der 20 µl Hip-His-Leu, 260 µl Phosphat-Puffer, 1.0 ml NaOH (0.4 N), 100 µl o-Phthalaldehydlösung und 300 µl HCl enthielt, mitgeführt.

2.6 DNA-Bestimmung

2.6.1 Prinzip der Bestimmung

Die Menge an Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist ein zuverlässiger Endpunkt für einen Zellproliferations-Assay. Die Bestimmung der DNA-Menge innerhalb weniger Minuten mit Bisbenzimid (Hoechst 33258) ist bereits eine etablierte Methode (Brunk et al. 1979; Cesarone et al. 1979; Labarca and Paigen 1980). Die Messung basiert auf der Verstärkung der Fluoreszenz und der Verschiebung der Emissionswellenlänge des Bisbenzimids nach Bindung an die zelluläre DNA. Daraus folgt eine lineare Abhängigkeit zwischen der Fluoreszenz und der DNA-Konzentration über einen weiten Konzentrationsbereich. Diese Reaktion war selbst bei Vorhandensein von anderen zellulären Komponenten wie RNA, Proteinen oder Carbohydraten sehr spezifisch (Brunk et al. 1979). Der Assay wurde mit zellulären Extrakten in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen durchgeführt, da hier wahrscheinlich durch Dissoziation der DNA und Chromatin die DNA-Bindungsstellen besser zugänglich sind, was mit einer Erhöhung der Fluoreszenz einhergeht (Labarca and Paigen 1980). Es zeigte sich, dass mit Zellrohextrakten und hohen Salzkonzentrationen diese fluorimetrische Methode der DNA- Bestimmung zuverlässig und bis zu einer DNA-Konzentration von 10 ng (DNA-Menge in ca. 1000 Zellen) sensitiv ist (Labarca and Paigen 1980).

2.6.2 Aufnahme einer Kalibriergeraden

Um Rückschlüsse auf die Zellzahl pro Well zu erhalten, musste zunächst eine Kalibriergerade mit bekannten DNA-Konzentrationen erstellt und die dazugehörige Fluoreszenz gemessen werden. Dafür wurden bei Raumtemperatur aus einer 1 mg/ml DNA-Stammlösung (Typ XIV) Verdünnungen von 10.0; 5.0; 2.5; 1.0 und 0.5 µg/ml DNA mit H₂O hergestellt und jeweils 370 µl der jeweiligen Verdünnung in 1.5 ml Eppendorfröhrchen gegeben.

Anschließend erfolgte in jedes Eppendorfröhrchen die Zugabe von 370 µl 2fach konzentriertem DNA-Puffer und 60 µl Hoechst-33258-Arbeitslösung. Nach sorgfältigem Mischen wurde jede DNA-Verdünnung drei-mal gegen einen Nullwert aus 740 µl 2fach konzentriertem DNA-Puffer und 60 µl Hoechst-33258-Arbeitslösung bei einer Anregungswellenlänge von 356 nm, einer Emissionswellenlänge von 458 nm und Spaltbreiten von je 5 nm gemessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu).

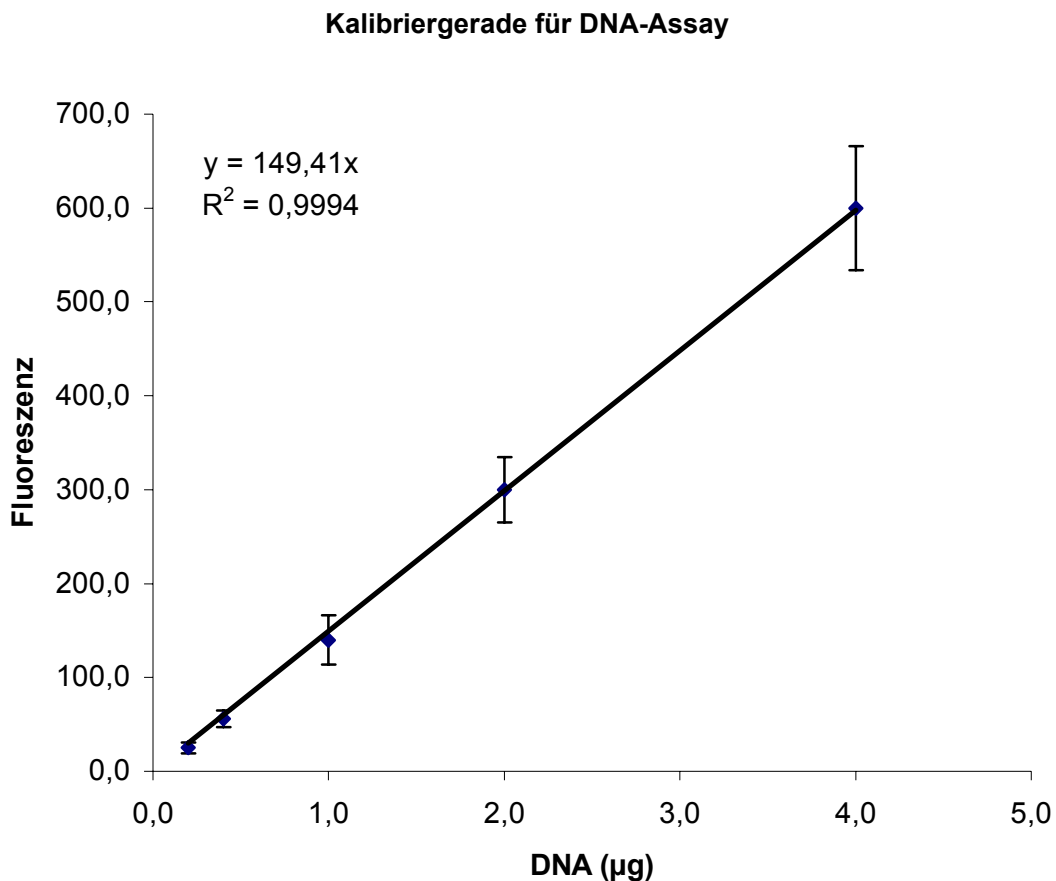


Abbildung 11: Kalibriergerade für DNA-Assay. Jeweils 370 µl jeder DNA-Verdünnung wurde bei einer Extinktion von $\lambda_{ex}=356$ nm und einer Emmision von $\lambda_{em}=458$ nm in 370 µl 2fach konzentriertem DNA-Puffer und 60 µl Hoechst 33258 Arbeitslösung bei Spaltbreiten von 5 mm gemessen.

2.6.3 Bestimmung der DNA-Konzentration in 24-Well Zellkulturplatten

Die Bestimmung wurde in 24-Well Zellkulturplatten mit Hoechst 33258 Reagenz nach der Lyse der Zellen durch Einfrieren in deionisiertem destillierten Wasser durchgeführt (Labarce et al. 1980; Rago et al. 1990). Für die DNA-Bestimmung wurden die in den Wells adhärent gewachsenen Zellen nach dem Enzym-Assay vorsichtig mit 1.0 ml 37 °C warmer 0.9 % NaCl-Lösung gewaschen. Danach wurden 400 µl H₂O zugegeben und die Platten bei -20 °C eingefroren. Ein erneutes Auftauen und Einfrieren der Platten erfolgte nach 24 Stunden. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Zellen aufbrachen und die DNA freigesetzt wurde. Für den DNA-Assay wurden die Platten aufgetaut, die Lösungen in jedem Well durch mehrfaches Pipettieren resuspendiert und jeweils 50 µl in ein 1.5 ml Eppendorfröhrchen überführt, in denen 690 µl DNA-Puffer und 60 µl Hoechst-33258-Arbeitslösung vorgelegt wurden. Nach sorgfältigem Mischen, wurde jedes Röhrchen dreimal gegen einen Nullwert aus 740 µl DNA-Puffer und 60 µl Hoechst-33258-Arbeitslösung bei einer Anregungswellenlänge von 356 nm und einer Emissionswellenlänge von 458 nm (Spaltbreiten von je 5 nm) gemessen (Spectrofluorometer RF 5001 PC, Fa. Shimadzu). Mit den erhaltenen Werten wurde über die zuvor erstellte Kalibriergerade die DNA-Menge in µg ermittelt.

2.7 Bestimmung des β-Amyloid-Peptids (1-42)

Die Bestimmung wurde nach der Vorschrift des menschlichen β-Amyloid-Peptids (1-42) (N) Assay Kit (L), (Code Nr.27712 Immuno-Biological Laboratories Co.) durchgeführt. Dieser Kit ist ein Sandwich ELISA, welcher zwei Arten hoch spezifischer Antikörper benutzt. Tetramethylbenzidine (TMB) wird als Substrat (Chromogen) verwendet.

Die Methode kann 6.25 - 400 pg/ml Aβ₁₋₄₂ erfassen, das entspricht 1.4 - 88.7 pmol/l. Aβ₁₋₄₂ (N) Assay Kit (L) ist für die qualitative Ermittlung von menschlichem Aβ₁₋₄₂ in der Cerebrospinal-Flüssigkeit, in Zellkulturmedien oder im Extrakt von Gehirngewebe geeignet (Horikoshi et al. 2004). Sowohl rekombinante als auch native Formen von menschlichem Aβ₁₋₄₂ können mit diesem Kit erfasst werden.

2.7.1 Vorbereitung der Lösungen

- **Wasch-Puffer:**

Der Wasch-Puffer wurde auf Raumtemperatur eingestellt. Vor dem Gebrauch sollte der Wasch-Puffer vollständig gemischt werden, danach wurden 50 ml Wasch-Puffer mit 1.950 l destilliertem Wasser verdünnt und gemischt. Er wurde im Kühlschrank aufbewahrt und musste innerhalb von zwei Wochen nach der Verdünnung verbraucht werden.

- **Antikörperlösung**

Der Antikörper war 30fach konzentriert. Er wurde mit 11.6 ml der entsprechenden Lösung für die Antikörper verdünnt. Dieser Schritt erfolgte kurz vor der Anwendung des Antikörpers.

- **Standardlösung**

Der Standard wurde mit 1.0 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Die vorbereitete Lösung enthielt 800 pg/ml A β 1-42.

- **Verdünnung der Standardlösung**

Für die Verdünnung der Standardlösung wurden acht Eppendorfröhrchen vorbereitet. Es erfolgte die Zugabe von 230 μ l EIA-Puffer in jedes Eppendorfröhrchen.

Anschließend wurden 230 μ l aus der 800 pg/ml Standardlösung bei Raumtemperatur in das erste Eppendorfröhrchen überführt. Die Lösung wurde gemischt. Die Konzentration der Lösung betrug 400 pg/ml. Danach wurden 230 μ l aus der 400 pg/ml Lösung in das zweite Eppendorfröhrchen gegeben und die Lösung wurde gemischt. Die Konzentration der Lösung betrug 200 pg/ml. Die folgenden Verdünnungen (100; 50; 25; 12.5; 6.25 pg/ml) wurden in der gleichen Art und Weise durchgeführt.

2.7.2 Vorbereitung der Testproben

2.7.2.1. Erste Experimentserie

Zellen in Konzentrationen von 100000 Zellen/ml wurden in 6-Well-Platten (a` 2ml) ausgesät und für weitere ein bis zwei Tage, bis die Zellen konfluent waren, kultiviert. Anschließend wurde das Medium (10 % FBS) abgesaugt und durch 1 ml FBS (1 %) Medium ersetzt. Die Extrakte und die Reinsubstanzen mussten zunächst in Wasser oder in DMSO gelöst werden. Im nächsten Schritt wurden die Extrakte und Reinsubstanzen unter der Sterilbank durch einen Sterilfilter von 0.2 μ m Porendurchmesser filtriert, auf die gewünschte Konzentration verdünnt und zum Medium zugegeben. Die Zellen in den

Platten wurden drei Tage im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ und 95 % Luft enthielt, kultiviert. Daraufhin wurde das Medium bei -20 °C gesammelt und bis zur Bestimmung des Aβ1-42 Peptids gelagert.

2.7.2.2. Zweite Experimentserie

Die Platten wurden wie oben (erster Kit) beschrieben, vorbereitet. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden die zu untersuchenden Substanzen und Extrakte in die Platten für zwei Tage zum Medium zugegeben. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 1.0 ml 1 % FBS Medium ersetzt. Nach 24 Stunden wurde das Medium bei -20 °C gesammelt und bis zum Zeitpunkt der Bestimmung des Aβ1-42 Peptids gelagert.

2.7.3 Messverfahren

Alle Reagenzien wurden ungefähr 30 Minuten vor der Weiterverarbeitung auf Raumtemperatur gebracht. Sie wurden vollständig vor dem Gebrauch gemischt. Die Standardkurve wurde gleichzeitig mit den Testproben vorbereitet. Hierzu mussten 100 µl der Standardlösung, Nullwert und Testproben in die geordneten Wells zugegeben werden. Die Platte wurde für eine Nacht bei 4 °C nach Bedeckung mit einer Plattenkappe inkubiert. Am nächsten Tag folgte der zweite Schritt bei dem die Wells kräftig mit dem Wasch-Puffer gewaschen wurden. Jedes Well wurde mit dem Wasch-Puffer aufgefüllt, 15-30 Sekunden inkubiert. Anschließend wurde der Wasch-Puffer aus den Well vollständig entfernt. Dieser Schritt wurde sieben bis neun-mal wiederholt. Anschließend wurde 100 µl von der Antikörperlösung in die Wells zugegeben und die Platte wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Wells mit dem Wasch-Puffer neun-mal wie vorher gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Chromogen (TMB) wurde die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen belassen. Es entstand eine blaue Lösung. Durch 100 µl Stopplösung (1.0 N H₂SO₄) wurde die Reaktion beendet. Danach wurde die Absorption der Ansätze bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb von 30 Minuten gemessen (Spectrafluor, Tecan).

2.8 Bestimmung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP)

Intrazelluläres cAMP wurde mit Hilfe des „Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit“ der Firma Cayman Chemical (Vertrieb BIOZOL Diagnostica GmbH, Eching, Germany) bestimmt. Der Test basiert auf einer Konkurrenzreaktion vom freien (zu bestimmenden) cAMP und Acetylcholinesterasegebundenen cAMP um eine limitierte Anzahl an Bindungsstellen eines cAMP-spezifischen Antikörpers. Bei dem Test wird die bekannte Konzentration des an die Acetylcholinesterase gebundenen cAMP konstant gehalten, während die Konzentration des zu bestimmenden cAMP variiert. Der letztlich an den Antikörper gebundene Anteil des cAMP mit konjugierter Acetylcholinesterase ist umgekehrt proportional zur unbekanntem Menge an freiem cAMP. Der cAMP-spezifische Antikörper bindet an einen sekundären Antikörper auf einer Mikrotiter-Platte. Gemessen wird die Aktivität der Acetylcholinesterase, die Acetylcholin in Thiocholin spaltet. Thiocholin reagiert in einer weiteren Reaktion mit 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure. Die resultierende Gelbfärbung kann spektralphotometrisch mit Hilfe der Absorption bei 412 nm bestimmt werden. Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.8.1 Vorbereitung der Testproben

Zellen in Konzentrationen von 100000 Zellen/ml wurden in 6-Well-Platten (a` 2ml) ausgesät und für weitere zwei bis drei Tage, bis die Zellen konfluent waren, kultiviert. Die Extrakte und die Reinsubstanzen mussten zuerst in Wasser oder in DMSO gelöst werden. Im nächsten Schritt wurden die Extrakte und Reinsubstanzen unter der Sterilbank durch einen Sterilfilter von 0.2 µm Porendurchmesser filtriert, auf die gewünschte Konzentration verdünnt und zum Medium zugegeben. Die Zellen in den Platten wurden drei Tage im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ und 95 % Luft enthielt, kultiviert. Anschließend wurde die Isolierung des intrazellulären cAMP durchgeführt.

2.8.2 Isolierung des intrazellulären cAMP

Nach drei Tagen Kultivation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2.0 ml PBS gewaschen. Zunächst wurden 300 µl HCl (0.1 M) in jedes Well zugegeben. Die Zellen mit HCl wurden bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Danach wurden die

Zellen abgekratzt und durch mehrfaches Pipettieren suspendiert. Die Zellen wurden in Eppendorfröhrchen umgefüllt und für 10 min zentrifugiert (1000 g). Der Überstand wurde in neue saubere Eppendorfröhrchen umgefüllt und konnte entweder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder sofort für die Bestimmung der cAMP-Konzentration verwendet werden.

2.8.3 Vorbereitung der Lösungen

- **Wasch-Puffer:**

Der Wasch-Puffer wurde auf Raumtemperatur eingestellt. Vor dem Gebrauch sollte der Wasch-Puffer vollständig gemischt werden, danach wurden 5.0 ml des Wasch-Puffer-Konzentrats mit 1.995 l destilliertem Wasser verdünnt und gemischt. Anschließend wurde 1.0 ml von Tween 20 hinzugefügt und gemischt. Er wurde im Kühlschrank aufbewahrt. Die Haltbarkeit dieser Verdünnung betrug zwei Monate.

- **EIA Puffer**

Der EIA Puffer war 10fach konzentriert. Es wurden 10.0 ml vom EIA Puffer mit 90.0 ml destilliertem Wasser verdünnt und gemischt. Der Puffer wurde im Kühlschrank aufbewahrt. Die Haltbarkeit betrug zwei Monate.

- **cAMP AChE Tracer (Acetylcholinesterasegebundener cAMP)**

Der cAMP AChE Tracer wurde mit 6.0 ml EIA Puffer verdünnt. 60 μl Tracer-Farbstoff wurden zugegeben. Die Lösung wurde gemischt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Haltbarkeit betrug vier Wochen.

- **cAMP Antiserum**

Das cAMP Antiserum wurde mit 6.0 ml EIA Puffer verdünnt, 60 μl Antiserum-Farbstoff wurden zugegeben. Die Lösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt. Die Haltbarkeit betrug vier Wochen.

- **Standardlösung**

Der Standard wurde mit 1.0 ml EIA Puffer aufgelöst. Die vorbereitete Lösung enthielt 3.0 pmol/ml cAMP. Die Lösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt und musste innerhalb von sechs Wochen nach der Verdünnung verbraucht werden.

- **Verdünnung der Standardlösung**

Für die Verdünnung der Standardlösung wurden acht Eppendorfröhrchen vorbereitet. In Eppendorfröhrchen Nr. 1 wurden 900 μl EIA Puffer gegeben. Es erfolgte die Zugabe von 500 μl EIA-Puffer in die Eppendorfröhrchen zwei bis acht. Zunächst wurden 100 μl aus der 3.0 pmol/ml Standardlösung bei Raumtemperatur in das erste Eppendorfröhrchen überführt. Die Lösung wurde gemischt. Die Konzentration der

Lösung betrug 1.5 pmol/ml. Danach wurden 500 µl aus der 1.5 pmol/ml Lösung in das zweite Eppendorfröhrchen gegeben und die Lösung wurde gemischt. Die Konzentration der Lösung betrug 0.75 pg/ml. Die folgenden Verdünnungen (0.375; 0.187; 0.093; 0.046; 0.023 pg/ml) wurden in der gleichen Art und Weise hergestellt.

2.8.4 Messverfahren

Die Bestimmung erfolgte in einer 96 Well-Platte (Abb. 14). Ungefähr 30 Minuten vor der Weiterverarbeitung wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Sie wurden vollständig vor dem Gebrauch gemischt. Die Standardkurve wurde gleichzeitig mit den Testproben vorbereitet.

Zuerst wurden 50 µl EIA Puffer in die sogenannte „non-spezifische Binding“ (NSB) Wells und 50 µl EIA Puffer in die sogenannte „die Maximum-Bindung“ (B₀) Wells zugegeben. Danach wurden 50 µl Verdünnung der Standardlösung in die sogenannte „Standardswells“ und 50 µl Untersuchungslösung in die sogenannte „Samples“ Wells gegeben (Abb. 12).

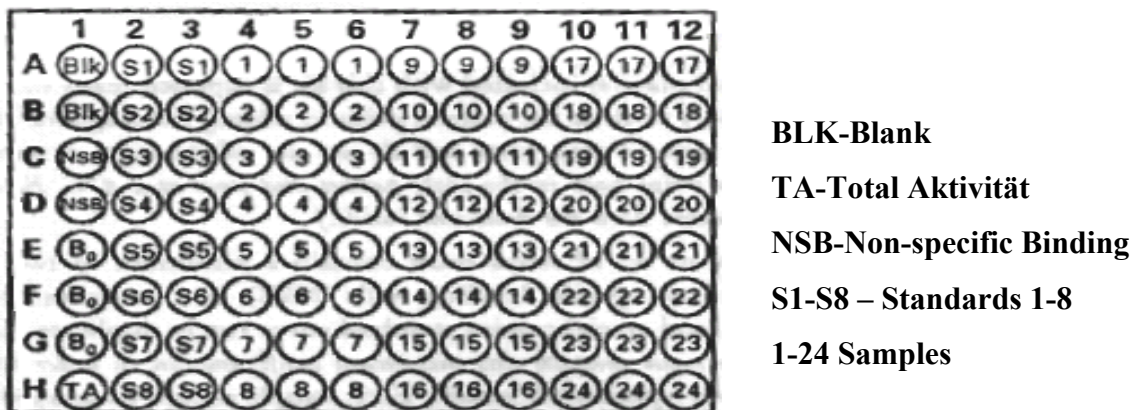


Abbildung 12: Format der 96 Well-Platte für die Bestimmung der Konzentration des intrazellulären cAMP.

Dann wurden 50 µl von cAMP AChE Tracer in die Wells mit Ausnahme der Total Aktivität (TA) und Blank (Blk) Wells zugegeben. Anschließend wurden 50 µl von cAMP Antiserum in die Wells mit Ausnahme von TA, NSB und Blk Wells zugegeben. Die Platte wurde für 18 Stunden bei 4 °C nach Bedeckung mit einer Plattenkappe inkubiert, und am nächsten Tag folgte der zweite Schritt, bei dem die Wells kräftig mit dem Wasch-Puffer gewaschen wurden. Jedes Well wurde mit dem Wasch-Puffer aufgefüllt, 15–30 Sekunde inkubiert und anschließend wurde der Wasch-Puffer aus den Wells vollständig entfernt. Dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt. Anschließend wurden 200 µl von dem Ellman's Reagenz in die Wells und 5 µl vom Tracer in die TA

Wells zugegeben. Die Platte wurde nach Bedeckung mit einer Plattenkappe für 90-120 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Danach wurde die Absorption der Ansätze bei einer Wellenlänge von 405 bis 420 nm gemessen (B_0 Wells gleich 0.3 A.U.) (Spectrafluor, Tecan).

2.9 Hämatoxylin-Färbung von Zellkulturen nach Arabinosylcytosin-Behandlung

Material:

1. Brenner zur Sterilisation der Deckgläschen
2. Deckgläschen, steril
3. Objektträger, steril
4. sterile 6-Well-Gewebekulturplatten

Bei allen folgenden Arbeitsschritten musste insbesondere darauf geachtet werden, dass die Zellen nicht austrockneten. Generell wurden die Deckgläschen mit Methanol/ HCl entfettet, mit Ethanol oder Methanol gewaschen und ggf. zum Sterilisieren abgeflammt.

Durchführung:

SK-N-SH-Zellen wurden auf sterilisierten Deckgläschen in einer 6-Well Gewebekulturplatte kultiviert (jeweils Zugabe von 2.0 ml Medium nach Anhaftung der Zellen auf dem Deckgläschen). Zur optimalen Vorbereitung der Zellen wurde auf eine gut vereinzelt Aussaat geachtet. Die Kultivierungsdauer betrug 24 h. Danach wurden die Zellen mit Arabinosylcytosin 60 ng/ml behandelt und weitere vier Tage inkubiert. Außerdem wurden Kontrollen ohne Arabinosylcytosin verwendet. Im ersten Schritt wurde das Kulturmedium vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Danach wurden die adhärenen SK-N-SH-Zellen zwei-mal mit PBS, pH 7.4, (1x konz., ca. 1.5 ml/ Schale) gewaschen.

Formaldehydfixierung:

Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurde 10 % Paraformaldehydlösung, pH 7.4, zupipettiert (2 ml/Well), für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und danach 3x mit destilliertem Wasser gewaschen. Im folgenden Schritt wurde die Hämatoxylinfärbung vorgenommen. Danach wurden die Deckgläschen 3x mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Vorbereitung der Lagerung sowie der Beobachtung im Lichtmikroskop wurde das Deckgläschen umgekehrt (Zellen nach unten!) mit den präparierten Zellen auf einen Tropfen Glycerol-PBS-Lösung auf einen Objektträger gelegt. Zum Schluss wurden die Präparate getrocknet, lichtgeschützt und kühl gelagert.