

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Arzneistoffe

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Inhibitoren und Arzneistoffe sind in der nachfolgenden Tabelle (**Tab. 2-1**) aufgelistet

Substanzklasse	Name	Bezugsquelle
EGF-Rezeptor-Inhibitoren	Ab-3103	Abcam, Cambridge, UK
	Cetuximab (Erbix TM)	Merck Pharma, Darmstadt, D
	Erlotinib (Tarceva TM)	Roche, Penzberg, D
HDAC-Inhibitoren	MS-275	Alexis Biochemicals, Lausen, CH
	Natriumbutyrat	Biomol, Hamburg, D
	Trichostatin A	Alexis Biochemicals, Lausen, CH
HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor	Fluvastatin	Calbiochem, Bad Soden, D
IGF-1-Rezeptor-Inhibitoren	AG1024	Calbiochem, Bad Soden, D
	NVP-AEW541	Novartis, Basel, CH
Multi-Kinase-Inhibitor	Sorafenib (Nexavar TM)	Bayer Healthcare, West Haven, CT
Proteasominhibitor	Bortezomib (Velcade TM)	Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, UK
Somatostatine	Somatostatin-14	Sigma, Deisenhofen, D
	Octreotid	Sigma, Deisenhofen, D
Zytostatika	Docetaxel	Sigma, Deisenhofen, D
	Doxorubicin	Sigma, Deisenhofen, D
	5-Fluorouracil	Sigma, Deisenhofen, D
	Gemcitabin (Gemzar TM)	Lilly Pharma, Gießen, D
	SN-38	Sigma, Deisenhofen, D

Tabelle 2-1: Liste der untersuchten Arzneistoffe und Chemikalien.

2.1.2 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die immunzytochemischen Untersuchungen und Western Blot Analysen eingesetzt (Tab. 2-2).

Zielprotein	Herkunft	Art des Antikörpers	Arbeitsverdünnung	Bezugsquelle
Primärantikörper				
β-Aktin	Maus	monoklonal	1:5000 (WB)	Sigma, D
Bax	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Santa Cruz, CA
Bcl-2	Kaninchen	polyklonal	1:1000(WB)	Cell Signaling, MA
Cyclin B1	Kaninchen	polyklonal	1:200 (WB)	Santa Cruz, CA
Cyclin D1	Kaninchen	polyklonal	1:200 (WB)	Santa Cruz, CA
ERK1/2	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Santa Cruz, CA
pERK1/2	Maus	monoklonal	1:500 (WB)	Santa Cruz, CA
IGF-1R-β	Kaninchen	polyklonal	5 µg/ml (IZ), 1:1000 (WB)	Santa Cruz, CA
p-IGFR/p-Insulin R	Kaninchen	polyklonal	1:1500 (WB)	Biomol, D
Insulin R α	Kaninchen	polyklonal	1:200 (WB)	Santa Cruz, CA
IgG Isotypkontrolle	Kaninchen	polyklonal	5 µg/ml (IZ)	DAKO, D
P21 ^{Waf1/Cip1}	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling, MA
P27 ^{Kip1}	Kaninchen	polyklonal	1:200 (WB)	Santa Cruz, CA
Sekundärantikörper				
Kaninchen-IgG-FITC	Ziege	polyklonal	5 µg/ml (IZ)	BD Pharmingen, D
Kaninchen-IgG-POD	Ziege	polyklonal	1:10000 (WB)	GE Healthcare, S
Maus-IgG-POD	Ziege	polyklonal	1:10000 (WB)	GE Healthcare, S

Tabelle 2-2: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.

2.1.3 PCR-Primer

Die Primerpaare zur Durchführung von RT-PCR-Untersuchungen wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) bezogen (Tab. 2-3).

Name des Gens	Sequenz (5'-3')	Produktgröße (bp)	Position in der mRNA
IGFR-1R- β	F: GAAGTGGAAACCCTCCCTCTC R: CTTCTCGGCTTCAGTTTTGG	241	1932-1951 2172-2153
β -Aktin	F: ATCATGTTTGAGACCTTCAACAC R: TCTGCGCAAGTTAGGTTTTGTC	822	437-459 1258-1237

Tabelle 2-3: Primerpaare für die RT-PCR.

F: „forward primer“, R: „reverse primer“

2.1.4 Chemikalien und Lösungen

Salze und Puffersubstanzen wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Lösungsmittel und Lösungen wurden in analytischer Qualität von J.T. Baker (Deventer, NL), Merck, Roth und Sigma bezogen. Spezielle Substanzen wurden von nachfolgend aufgelisteten Firmen bezogen:

Artikel	Hersteller
Agarose	Gibco BRL, Paisley, GB
Ac-DEVD-AMC	Calbiochem, Bad Soden, D
Aprotinin	Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen, D
BSA	Sigma, Deisenhofen, D
Deoxycholinsäure	Sigma, Deisenhofen, D
Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen, D
DMSO	Sigma, Deisenhofen, D
DNase I	Roche, Grenzach, D
Ethidiumbromid	Gibco BRL, Paisley, GB
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen, D
Glycerin	Sigma, Deisenhofen, D
IGF-1	Sigma, Deisenhofen, D
JC-1	Molecular Probes, Leiden, NL
Kristallviolett	Sigma, Deisenhofen, D
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen, D
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, D
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt, D

Artikel	Hersteller
Nonidet P-40	Sigma, Deisenhofen, D
Natriumdesoxycholinsäure	Sigma, Deisenhofen, D
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen, D
PMSF	Sigma, Deisenhofen, D
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen, D
SDS	Sigma, Deisenhofen, D
Taq-Polymerase	GE Healthcare, Uppsala, S
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen, D
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, D
Tween 20	Sigma, Deisenhofen, D

2.1.5 Kommerziell erworbene Kit-Systeme

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Kit-Systeme aufgelistet.

Artikel	Hersteller
Apoptotic DNA-Ladder Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, D
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL
Cycle Test PLUS DNA Reagent Kit	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Cytotoxicity Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Dynabead Purification Kit	Dynal, Oslo, N
ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Uppsala, S
Fix & Perm Cell Permeabilization Kit	Caltag Laboratories, Hamburg, D
Live/Dead-Assay	Molecular Probes, Leiden, NL
RNA-Clean LS System Kit	Hybaid AGS, Heidelberg, D
Superscript Preamplification System	Gibco BRL, Paisley, GB

2.1.6 Zellmodelle

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden insgesamt an 8 Zelllinien sowie Primärzellkulturen von gastrointestinalen Karzinomen unterschiedlicher Herkunft erarbeitet:

Gastrointestinale neuroendokrine Zelllinien

Als Modellsysteme für die heterogene Gruppe der gastrointestinalen neuroendokrinen Tumore (NET) wurden 2 Zelllinien mit unterschiedlicher Differenzierung verwendet. Zum einen die moderat wachsenden BON-Zellen (Verdopplungsrate 34 ± 4 Std), bei denen es sich um eine humane Pankreaskarzinoid-Zelllinie handelt (Evers et al., 1994). Als Beispiel einer schnell wachsenden NET-Zelllinie wurden CM-Zellen (Verdopplungsrate: 21 ± 1 Std.) verwendet, bei denen es sich um eine humane Insulinom-Zelllinie handelt (Baroni et al., 1999), die freundlicherweise von Professor P. Pozzili (Universität La Sapienza, Rom, Italien) zur Verfügung gestellt wurde

Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms

Bei Hep-G2-Zellen handelt es sich um eine mäßig differenzierte humane Hepatomzelllinie (ATCC, Rockville, MD, Nr. HB-8065) (Aden et al., 1979), bei Huh-7 Zellen um eine hochdifferenzierte hepatozelluläre Karzinomzelllinie humanen Ursprungs (JCRB, Tokio, JP, Nr. 0403,) (Nakabayashi et al., 1982).

Kolorektale Karzinomzelllinien

HCT-116 und HT-29-Zellen sind 2 schwach differenzierte und stark proliferierende kolorektale Adenokarzinom-Zelllinien humanen Ursprungs. (ATCC, Rockville, MD; HT-29: Katalognr. HTB-38; HCT-116 Katalognr.: CCL-247) (Fogh, 1975, Brattain et al., 1981).

Cholangiozelluläre Karzinomzelllinien

EGI-1- und TFK-1-Zellen sind 2 humane cholangiozelluläre Karzinomzelllinien. EGI-1-Zellen (DSMZ, Braunschweig, D, Nr. ACC 385) wurden aus einem soliden Tumor von einem Patienten mit fortgeschrittenem Gallengangskarzinom entwickelt (Scherdin et al., 1987). TFK-1 Zellen (DSMZ, Nr. ACC 344) wurden aus Tumorgewebebeobachten eines Patienten mit einem extrahepatischen Cholangiokarzinom angelegt (Saijyo et al., 1995).

Primärzellkulturen von gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren (NET) und kolorektalen Karzinomen (CRC)

Für funktionelle und immunzytochemische Untersuchungen wurden Primärzellkulturen aus Biopsaten histologisch verifizierter gastrointestinaler NET (Magen (n = 1), Ileum (n = 2) oder Rektum (n = 1)), sowie aus Biopsaten von Patienten mit einem CRC (n = 8)

etabliert. Die Biopsien wurden im Rahmen von diagnostischen endoskopischen Untersuchungen in der Medizinischen Klinik I der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (CBF) entnommen. Die Verwendung des menschlichen Tumormaterials erfolgte gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturverfahren

2.2.1.1 Passagieren der Zelllinien

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Zur Passage wurden die maximal 80 % konfluent gewachsenen Zellen zuerst mit 10 ml PBS gewaschen und dann für 5-10 min. mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Nach Ablösung der Zellen wurde das Trypsin durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:10 in neue Zellkulturflaschen ausgesät und mit frischem Kulturmedium versorgt. Zwischen den Passagierungen erfolgte im 2-tägigen Rhythmus ein Austausch des Kulturmediums.

2.2.1.2 Präparation von Primärzellkulturen aus Biopsaten von gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren und kolorektalen Karzinomen

Die Präparation der Primärzellkulturen aus den Gewebeproben erfolgte durch mechanische Zerkleinerung und enzymatische Verdauung (Maaser et al., 2002). Zunächst wurden die Gewebestücke in PBS mit einem Skalpell zerkleinert und mit einer 1 %-igen Trypsin/EDTA-Lösung und Kollagenaselösung für 15 min. bei Raumtemperatur enzymatisch aufgeschlossen. Danach wurden die Enzyme durch zweifaches Waschen und Zentrifugieren (12000 rpm, 5 min., 20°C) entfernt und die erhaltenen Zellpellets in PBS resuspendiert. Die anschließende mechanische Vereinzelung erfolgte mit Hilfe der Medimachine (Becton Dickinson, Heidelberg, D). Nachdem das PBS durch Zentrifugation (12000 rpm, 5 min., 20°C) entfernt worden war, wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und zunächst die Zellkonzentration (Zellzählung in der Neubauerkammer) und die Zellviabilität mittels Trypanblaufärbung (siehe **Kap. 2.2.3.1**) bestimmt. Die Zellen wurden daraufhin in einer Dichte von 5-10 x 10⁴ Zellen/Loch in einer 24-Loch-Platte ausgesät und für 24-48 Stunden im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) angezchtet. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage ausgetauscht.

2.2.2 Nachweis der Rezeptorexpression

2.2.2.1 Nachweis der Genexpression mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt (Saiki et al., 1985) und wird eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Durch Erhitzen wird der DNA-Doppelstrang denaturiert, dann mit zwei kurzen Oligonukleotiden (Primer), welche die gesuchte Sequenz begrenzen, hybridisiert und durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) verlängert. Die PCR findet in einem Thermocycler statt, der die Proben präzise auf die für den jeweiligen Schritt benötigte Temperatur erhitzt oder kühlt. Ein Zyklus eines PCR-Programms beinhaltet die Denaturierung der DNA, die Hybridisierung der Primer und der DNA-Polymerisation (Elongation). Durch jeden durchlaufenen Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der DNA-Moleküle.

Für die Amplifikation von RNA ist es notwendig, die RNA zunächst in DNA umzuschreiben, da die Ausgangs-RNA nicht direkt als Matrize von der Taq-Polymerase erkannt werden kann. Dieser Schritt erfolgt durch die Zugabe von Enzymen, die als Reverse Transkriptasen bezeichnet werden und die aus der RNA eine komplementäre DNA (cDNA) bilden (Reverse Transkription).

Die Durchführung der RT-PCR erfolgte nach einer in unserer Arbeitsgruppe seit langem etablierten Methode (Glassmeier et al., 1998). Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus den Zellen wurde der kommerziell erwerbliche RNA-Isolierungs-Kit (*RNA-Clean-LS System Kit*, Hybaid AGS, Heidelberg, D) verwendet. Die Reverse Transkription zur Synthese der cDNA erfolgte mit dem Kit-System *Superscript Preamplification System* (GibcoBRL, Paisley, GB) mit der *Superscript II* Ribonuklease H⁻ (RNase H⁻). Das PCR-Programm wurde für das jeweilige Primerpaar optimiert, um eine maximale Sensitivität und Spezifität der PCR zu erreichen. Die optimierten Bedingungen für die verwendeten Primerpaare (**Kap. 2.1.3, Tab. 2-3**) sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (**Tab. 2-4**).

Name des Gens	Denaturierung Temperatur & Zeit	Hybridisierung Temperatur & Zeit	Elongation Temperatur & Zeit	Anzahl der Zyklen
IGF-1R-β	94°C (40 s)	63°C (60 s)	72°C (60 s)	30
β-Aktin	94°C (40 s)	63°C (60 s)	72°C (60 s)	30

Tabelle 2-4: Optimierte PCR-Bedingungen für die RT-PCR von IGF-R-β- und β-Aktin.

Im Anschluss an die PCR wurden die Reaktionsansätze mit Hilfe der Gelelektrophorese analysiert.

Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente wurden in 1-2 %-igen Agarosegelen in 1x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer (Rezept für 50x TAE: 2 M Tris-Base, 1 M Eisessig, 50 mM EDTA, pH 8,0) aufgetrennt und anschließend durch Ethidiumbromidfärbung dargestellt. Als Größenstandard wurde der 100 bp Marker *Ready-Load 100 bp DNA Ladder* (Invitrogen, Karlsruhe, D) verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung bei 100 V wurde die DNA unter UV-Licht visualisiert und mit einer Digitalkamera (Polaroid, Offenbach, D) dokumentiert.

2.2.2.2 Immunzytochemischer Nachweis der Rezeptorexpression

Immunzytochemische Untersuchungstechniken ermöglichen die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen in Zellen. Primärantikörper binden zunächst spezifisch an zelluläre Proteine. Von den Zielproteinen gebundene Primärantikörper werden anschließend durch Sekundärantikörper gebunden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind (indirekte Immunfluoreszenz).

Zum Nachweis der entsprechenden Rezeptoren wurden die Tumorzellen nach Waschen mit PBS zunächst mit einem kommerziellen Kit permeabilisiert (*Fix & Perm Cell Permeabilization Kit*, Caltag Laboratories, Hamburg, D). Anschließend wurden die Zellen 1 Std. lang mit dem entsprechenden Primärantikörper oder der Isotypkontrolle IgG (Verdünnungen siehe **Kap. 2.1.2, Tab. 2-2**) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper (Verdünnungen siehe **Kap. 2.1.2, Tab. 2-2**) inkubiert. Bei den Zelllinien wurden die Fluoreszenzintensitäten in anschließenden Messungen mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, D) bestimmt und mittels der CellQuest Software (Becton Dickinson) ausgewertet (Höpfner et al., 2004; Sutter et al., 2006). Bei den Primärzellkulturen erfolgte der Nachweis der Rezeptorexpression mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (Axioskop-2, Zeiss, Jena, D).

2.2.3 Untersuchungen zur Zellviabilität und Zellwachstum

2.2.3.1 Trypanblaufärbung zur Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Die Anzahl und Viabilität von Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärbung der Zellen mit Trypanblau (4 %-ige Lösung) bestimmt. Bei dieser Färbung tritt der Farbstoff durch die poröse Membran toter Zellen in das Zytoplasma ein und färbt diese dunkelblau, während lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen und farblos bleiben.

2.2.3.2 Zellquantifizierung mittels Kristallviolett-Methode

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsstudien erfolgten nach der so genannten Kristallviolett-Methode (Gillies et al., 1986). Diese Art der Quantifizierung basiert auf der photometrischen Messung des Farbstoffs Kristallviolett (N-Hexamethyl-Pararosanilin), der sich an die DNA der Zellen anlagert.

Zunächst wurden die Zellen auf 96-Loch-Platten in einer Dichte von 1000 Zellen/Loch ausgesät und nach 72 Stunden mit den jeweiligen Substanzen in Fünf- bzw. Zehnfachansätzen inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 200 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch 15-minütige Inkubation mit 100 µl Glutaraldehyd (1 % in PBS) fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit Kristallviolett (0,1 % in PBS). Danach wurde der überschüssige, ungebundene Farbstoff durch 30-minütiges Spülen in einem perfundierten Becherglas (Durchflussrate 500 ml H₂O/min.) entfernt. Das restliche Wasser wurde entfernt. Anschließend fand eine 24-stündige Inkubation mit 100 µl Triton X-100 (0,2 % in PBS) im Brutschrank statt, um das gebundene Kristallviolett in Lösung zu bringen und somit eine homogene Farblösung zu erhalten. Die Lösung wurde dann photometrisch bei 570 nm in einem ELISA-Reader (MRX 2, Dynex Technologies, Denkendorf, D) gemessen. Bei einer Zelldichte von 5000-50000 Zellen/Loch ist die Absorption proportional zur Zellzahl (**Abb. 2-1**).

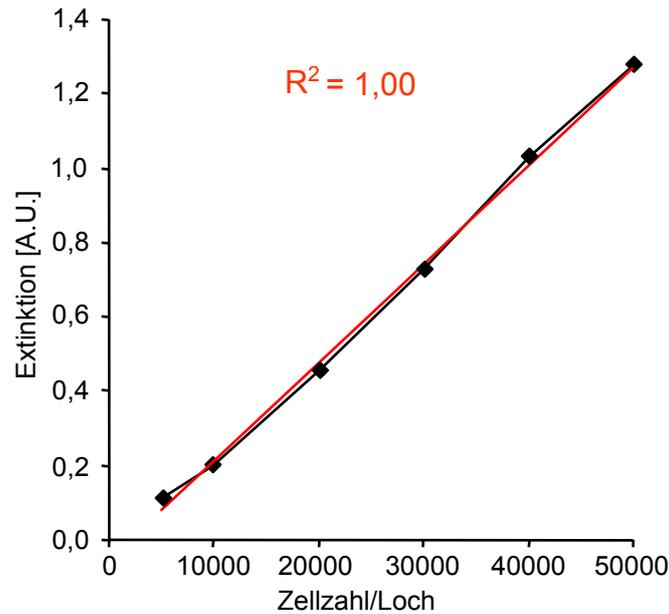


Abbildung 2-1: Darstellung einer repräsentativen Kalibrierungsgeraden der Kristallviolett-Methode.

2.2.3.3 Zytotoxizitätsnachweis durch Messung der LDH-Aktivität

Toxische Substanzen schädigen Zellen unspezifisch und bewirken einen Verlust der Integrität der Zellmembran. Dies führt zur Freisetzung des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH), welches im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden kann. Die Quantifizierung der LDH-Aktivität stellt somit eine Möglichkeit zur Bestimmung der zytotoxischen Potenz eines Pharmakons dar.

Die Messung der LDH-Aktivität erfolgte mit dem *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, D). Dieser enzymatische Test basiert auf der kolorimetrischen Bestimmung von Formazan, welches photometrisch quantifiziert wird. Die Formazanbildung erfolgt als LDH-abhängige Protonierung des schwach gelblichen Tetrazolium Salzes INT (Testprinzip siehe **Abb. 2-2**).

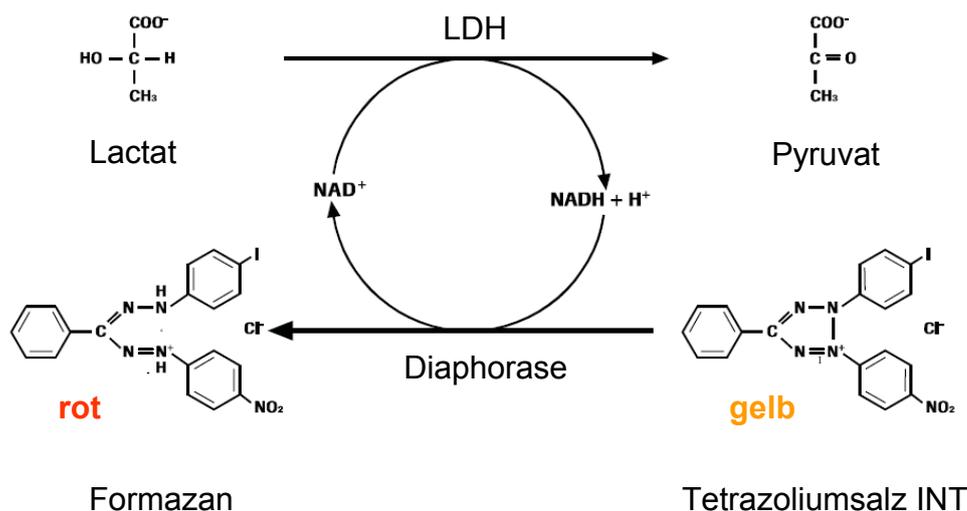


Abbildung 2-2: Testprinzip der LDH-Messung. Die LDH-katalysierte Umwandlung von Laktat zu Pyruvat resultiert in der Reduktion von NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$. In der sich anschließenden durch Diaphorase katalysierten Redoxreaktion wird das schwach gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) zu rotem Formazan reduziert, welches photometrisch quantifiziert wird.

Die Zellen wurden in 96-Loch-Platten ausgesät und nach 72 Stunden mit den jeweiligen Arzneistoffen inkubiert. Die Freisetzung der LDH wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Inkubation bestimmt. Die minimale LDH-Aktivität wurde im Überstand unbehandelter Kontrollzellen gemessen, die maximale LDH-Aktivität wurde durch Zusatz von 100 μl Triton X-100 (2 % in Kulturmedium) zu unbehandelten Zellen erhalten. Zur LDH-Bestimmung wurden jeweils 100 μl des Kulturüberstands in eine neue 96-Loch-Platte überführt und 100 μl des Reaktionsmix aus dem *Cytotoxicity Detection Kit* wurden zu jedem Ansatz hinzugefügt. Anschließend wurden die Ansätze bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und alle 5 min. wurde die Absorption bei 490 nm im ELISA-Reader (MRX-2, Dynex Technologies, Denkendorf, D) gemessen, bis die obere Nachweisgrenze erreicht war. Die Berechnung der Zytotoxizität erfolgte durch Quotientenbildung aus der maximalen LDH-Aktivität eines Ansatzes mit der im Überstand gemessenen LDH-Aktivität. Die „Blankwerte“ (nur Medium) wurden zuvor entsprechend abgezogen.

2.2.3.4 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Zellviabilität

Die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mittels eines Viabilitäts- und Zytotoxizitäts-Assays („Live/Dead-Assay“, Molecular Probes, Leiden, NL). Der „Live/Dead-Assay“ ist ein Zwei-Farben-Fluoreszenz-Test zur simultanen Identifizierung lebender und toter Zellen. Das Zellwand-permeable Esterase-Substrat

Calcein-AM diffundiert als nicht-fluoreszierende Substanz in das Zytoplasma der Zellen. Im Zytoplasma wird durch Abspaltung des Acetoxymethylesterrests durch unspezifische Esteraseaktivität das stark fluoreszierende Calcein gebildet, welches im Zytoplasma lebender Zellen zurückgehalten wird und eine Grünfluoreszenz verursacht. Der zweite, rotfluoreszierende Farbstoff, Ethidium-Homodimer-1, interkaliert in die zelluläre DNA. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wird von Zellen mit intakter Zytoplasmamembran nicht aufgenommen, dringt jedoch in tote Zellen schnell ein. Somit weisen lebende Zellen eine Grünfluoreszenz und tote Zellen eine Rotfluoreszenz auf.

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Glasplättchen angezogen. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Pharmakon wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Calcein-AM- sowie Ethidium-Homodimer-1-haltigem PBS (320 nM/ 2 μ M) für 90 min. im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) inkubiert. Mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop-2, Zeiss, Jena, D) wurden Bilder der gefärbten Zellen aufgenommen. Die quantitative Bestimmung lebender und toter Zellen erfolgte durch Auszählung von jeweils vier zufällig ausgewählten Bildausschnitten des entsprechenden Glasplättchens, aus denen der Mittelwert berechnet wurde.

2.2.4 Apoptoseuntersuchungen

Zum Nachweis apoptoseinduzierender Effekte der untersuchten Inhibitoren bei gastrointestinalen Tumorzellen wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die das zelluläre Selbstzerstörungsprogramm (Apoptose) zu unterschiedlichen Zeitpunkten identifizieren (siehe **Kap. 1.2.3**). Zum einen wurden mitochondriale Veränderungen sowie die Aktivität eines Schlüsselenzyms der Apoptose, Caspase-3, als Ausdruck eines frühen Apoptosestadiums gemessen. Zum anderen wurde eine Fragmentierung der DNA („*Laddering*“) als Zeichen eines späten Apoptosestadiums untersucht.

2.2.4.1 Semiquantitative Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials

Veränderungen des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi_M$) und des Mitochondrienvolumens (V_M) können simultan mittels des fluoreszierenden Farbstoffes JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid) dargestellt werden. JC-1 diffundiert potenzialunabhängig bis zu einer „Basiskonzentration“ ins Mitochondrium und emittiert nach Anregung grünes Licht ($\lambda = 520$ nm). Darüber hinaus diffundiert mehr JC-1 potentialabhängig in das Mitochondrium. Je höher das $\Delta\Psi_M$ ist, desto mehr positiv geladenes JC-1 gelangt in das Mitochondrium. Dort bildet es

konzentrationsabhängig Aggregate, die nach Anregung rotes Licht emittieren ($\lambda = 560$ nm). Die Grünfluoreszenz ist also ein Maß für das Mitochondrienvolumen, die Rotfluoreszenz/Grünfluoreszenz ein Maß für das mitochondriale Membranpotenzial. Die Fluoreszenzintensitäten werden semiquantitativ im Durchflusszytometer bestimmt, d.h. es werden die Fluoreszenzveränderungen im Vergleich zu Kontrollansätzen gemessen. Die zu untersuchenden Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und nach 72 Stunden mit dem jeweiligen Pharmakon inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Färbung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ JC-1 für 15 min. bei 37°C im Dunkeln. Die Zellen wurden dann zweimal mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und dann in neuem Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Messung im Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, D).

2.2.4.2 Caspase-3-Aktivitätsbestimmung

Die Caspase-3 ist ein Schlüsselenzym der Apoptose. Die Zunahme ihrer Aktivität stellt ein entscheidendes Signal in der Apoptosekaskade dar. Die Aktivität der Caspase-3 wird experimentell durch die Spaltung eines spezifischen Substrates bestimmt. Dieses Substrat besteht aus dem acetylierten Peptid Ac-DEVD (N-Acetyl-Aspartat-Glutamin-Valin-Aspartat), welches an das Fluorophor AMC (7-Amino-4-Methylcumarin) gekoppelt ist. Aktive Caspase-3 spaltet das Substrat Ac-DEVD-AMC nach dem zweiten Aspartat, das so frei gesetzte AMC fluoresziert. Die Fluoreszenzantwort wird in einem Fluorometer gemessen. Die Fluoreszenz von AMC wird bei 380 nm angeregt und zwischen 430–460 nm emittiert.

Zunächst wurden zytosolische Zellextrakte durch Inkubation (30 min., 4°C) von ca. 10^6 Zellen pro Ansatz mit 400 μl Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 130 mM NaCl, 1 % Triton X-100, pH 7,5) gewonnen. Die weitere Aufarbeitung der Lysate erfolgte analog zu **Kap. 2.2.6.1** Anschließend wurde eine Proteinbestimmung mit der BCA-Methode durchgeführt (siehe **Kap. 2.2.6.2**) und die Lysate wurden auf eine Proteinkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt. Zur semiquantitativen Bestimmung der Caspase-3-Aktivität wurden die Lysate mit 100 μl Substratlösung (20 $\mu\text{g/ml}$ Ac-DEVD-AMC in 20 mM HEPES, 10 % Glycerin, 2 mM Dithiothreitol (DTT)) versetzt und 1 Std. bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenzemission des freigesetzten AMC wurde dann in einem Fluorometer (VersaFluor-Fluorometer, Biorad, München, D) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm bestimmt. Die Proportionalität von Enzymkonzentration und Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe

einer Standard-Verdünnungsreihe rekombinanter Caspase-3 für das relevante Fluoreszenzintervall überprüft (**Abb. 2-3**).

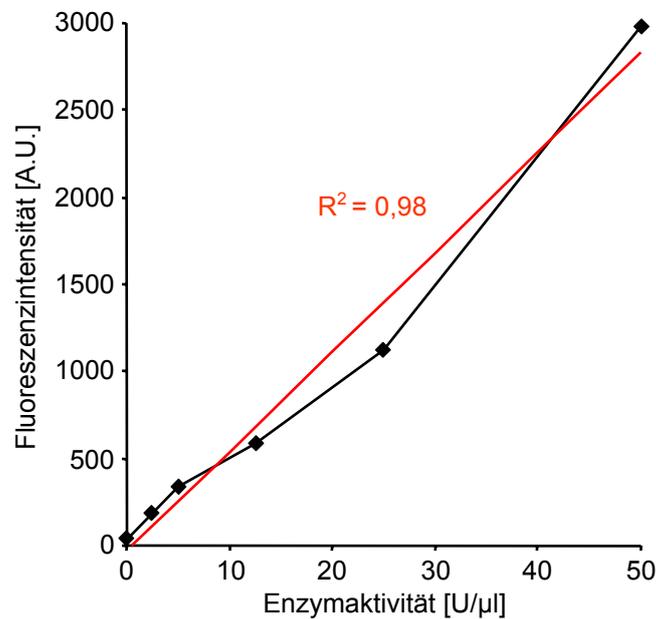


Abbildung 2-3: Darstellung einer repräsentativen Kalibrierungsgeraden zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität.

2.2.4.3 Nachweis der DNA-Fragmentierung

Die DNA-Fragmentierung zu Oligonukleosomen ist ein irreversibler Schritt im apoptotischen Programm. Die am Ende der Apoptosesignalkaskade aktivierte Endonuklease schneidet die DNA an den für das Enzym zugänglichen Linkerregionen der Nukleosomen zuerst in große Fragmente und darauf in kleinere Fragmente, bestehend aus Multimeren von ungefähr 180 Basenpaaren (bp) oder Vielfachen davon. Methodisch kann Apoptose daher anhand einer charakteristischen DNA-Leiter im Agarosegel nachgewiesen werden.

Die Aufreinigung der DNA der behandelten Zellen erfolgte mit dem *Apoptotic DNA Ladder Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, D). Nach der Lyse (6 M Guanidin-HCl, 10 mM Harnstoff, 10 mM Tris-HCl, 20 % Triton X-100, pH 4,4) der Zellen wurde das Lysat in ein Filterröhrchen mit Glasfaser-Vlies übertragen und zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde die DNA von den restlichen Lysatkomponenten separiert, da sich DNA in Gegenwart eines chaotropen Salzes (Guanidin-HCl) an die Oberfläche der Glasfasern bindet (Vogelstein und Gillespie, 1979). Verbleibende Verunreinigungen wurden durch mehrfaches Waschen mit dem Waschpuffer (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, 80 % Ethanol, pH 7,5) entfernt und die DNA schließlich mit dem Elutionspuffer

(40 mM Tris, pH 8,5) eluiert. Nach photometrischer Bestimmung des DNA-Gehalts anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm wurden die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht visualisiert (siehe „Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA“, **Kap. 2.2.2.1**).

2.2.5 Zellzyklusanalysen

Die Zellzyklusanalyse nach Vindelov und Christensen (Vindelov und Christensen, 1990) basiert auf der Isolierung von Zellkernen und der Anfärbung der nukleären DNA mit Propidiumiodid. Der DNA-Gehalt der Zellkerne verdoppelt sich während eines Zellzyklus, so dass je nach DNA Gehalt eine Zuordnung der Zellen zu einer bestimmten Zellzyklusphase möglich ist.

Die Zellen wurden mit 0,1 % Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in einer Dichte von 5×10^5 entnommen. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 1 min., 20°C) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 500 µl Zitrat/DMSO Puffer (0,25 M Sucrose, 40 mM Trinatriumcitrat-Dihydrat, 0,5 % DMSO) gewaschen. Für die Isolierung und Anfärbung der Zellkerne wurde der *Cycle Test PLUS DNA Reagent Kit* von Becton Dickinson (Heidelberg, D) verwendet. Die Proben wurden dann im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) gemessen und die Zellzyklusverteilung wurde mit dem Programm ModFit LT (Verity Software House, Topsham, ME) ausgewertet.

2.2.6 Western Blot

Der Western Blot (Immunoblot) ist eine Methode zum Nachweis und zur semiquantitativen Bestimmung spezifischer Proteine. Dazu werden zunächst Proteine aus Zelllysaten mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (**Kap. 2.2.6.3**) nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert (*blotting*) (**Kap. 2.2.6.4**). Die immobilisierten Proteine können dann mittels spezifischer Antikörper detektiert werden. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgt durch eine Chemilumineszenz-Messung eines markierten, zweiten Antikörpers (**Kap. 2.2.6.5**). Zur Beladungskontrolle, d.h. um sicher zu gehen, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wird in einem weiteren Schritt das „housekeeping“ Protein β -Aktin detektiert.

2.2.6.1 Gewinnung von Proteinlysaten

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurden die Zellen mit 1 ml TEN-Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7,5) versetzt und mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst.

Die Proben wurden dann in 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (14000 rpm, 1 min., 4°C). Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die erhaltenen Pellets in 50-100 µl RIPA-Puffer (*Radio-Immuno-precipitation-Assay-Puffer*: 1 % Nonidet P-40, 0,5 % Natriumdesoxycholsäure, 0,1% SDS, 0,1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1µg/ml Pepstatin in PBS) resuspendiert. Die Zellyse wurde auf Eis (15 min. Inkubation) durchgeführt. Dabei wurden zelluläre Proteine in Lösung gebracht. Durch anschließendes Zentrifugieren (14000 rpm, 15 min., 4°C) wurden unlösliche Bestandteile wie z.B. Zellkerne, Zellmembranen und das Zytoskelett abgetrennt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt.

2.2.6.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt einer Probe wurde mit dem BCA-Test bestimmt (Smith et al., 1985). Diese Methode basiert darauf, dass die Aminogruppen der Proteine in alkalischem Medium Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren. Cu^+ reagiert dann mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) zu einem violetten Komplex. Diese Farbreaktion wurde kolorimetrisch bestimmt. Als Referenzprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA) im Konzentrationsbereich 0-2 mg/ml genutzt.

Als erstes wurde eine Proteinstandardreihe aus einer BSA-Stocklösung (2mg/ml) hergestellt. Je 20 µl der Standardreihe und der Zellysate wurden zur Doppelbestimmung auf eine 96-Loch-Platte pipettiert. Der Reaktionsmix aus dem *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, IL) wurde frisch angesetzt und je 100 µl zu den Proben gegeben. Anschließend wurden die Ansätze für 30 min. bei 37°C inkubiert und dann bei 570 nm im ELISA-Reader (MRX 2, Dynex Technologies, Denkendorf, D) gemessen. Nach Erstellen einer Kalibrierungsgeraden wurde mit Hilfe der Gleichung der Regressionsgeraden die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

2.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wandern die Proteine durch ein elektrisches Feld in einem Polyacrylamid-Netzwerk (Acrylamid/Bisacrylamid), das als Molekularsieb fungiert. Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich die Proteine auf Grund ihrer Größe auftrennen. Durch Zugabe des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden nicht-kovalente Bindungen in nativen Proteinen gelöst. Die SDS-Anionen binden an die Hauptketten der Proteine, wodurch die Eigenladung der Proteine überdeckt wird

und die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken wird β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) eingesetzt. Dadurch wird gewährleistet, dass nur die Größe des Proteins als Trennkriterium wirkt. Im elektrischen Feld wandert der SDS-Protein Komplex dann zum Plus-Pol.

In der vorliegenden Arbeit wurden fertige Polyacrylamidgele der Firma BioRad (München, D) verwendet und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte in einer Miniatur-Elektrophoresezelle (*Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell*, BioRad). Die Proteinlysate wurden mit Lysepuffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und mit 4x-Probenpuffer (250 mM Tris-HCl, 40 % Glycerol, 4 % SDS, 0,005 % Bromphenolblau, 10 % β -Mercaptoethanol) versetzt. Nach der Denaturierung der Proteine (5 min., 95°C) wurden die Ansätze auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard dienten der *Precision Plus Protein All Blue Standards* (BioRad) und der *Prestained SDS-PAGE Standards - low range Marker* (BioRad). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bis zum Verlassen des Sammelgels bei 100 V, und anschließend im Trenngel bei 200V.

2.2.6.4 Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf Membranen

Innerhalb eines Gels wäre die Detektion von Proteinen durch Antikörper nur unter Verlust der Auflösung oder meist gar nicht zu erreichen. Daher werden die im Gel aufgetrennten Proteine nach der SDS-PAGE durch ein vertikal angeordnetes elektrisches Feld auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert (*blotting*).

Für den elektrischen Transfer wurde die Blot-Einrichtung *Mini Trans Blot Cell* der Firma BioRad (München, D) verwendet. Als erstes wurde die PVDF-Membran (Perkin Elmer, Waltham, MA) kurz in Ethanol gespült. Dann wurden die Elektrodenschwämme, Filterpapiere und die PVDF-Membran für 5 min. in Transferpuffer (25 mM Tris, 50 mM Glycin, 20 % Methanol) equilibriert und in die Blotkassette zusammen mit dem Gel als ein „Sandwich“ eingesetzt. Die Blotkassette wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer überführt. Zur Kühlung wurde ein Kühlelement in die Blotkammer gegeben und die gesamte Apparatur auf Eis gestellt. Der Transfer erfolgte je nach Größe des Proteins für 90-120 min. bei 100 mA.

2.2.6.5 Immundetektion immobilisierter Proteine

Dieser Schritt diente der Visualisierung des gesuchten Proteins mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion und Detektion über ein geeignetes Substrat. Zur Blockierung

unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst 1 Std. bei Raumtemperatur in einer Blockierungslösung bestehend aus 5 % Magermilch in TBS-Tween (0,1 % Tween in TBS) inkubiert. Die Membran wurde dann mit dem jeweiligen Primärantikörper in TBS-Tween (Verdünnungen siehe **Kap. 2.1.2, Tab. 2-2**) über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal für 15 min. mit TBS-Tween gewaschen. Daraufhin wurde die Membran mit dem Peroxidase (POD)-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung: siehe **Kap. 2.1.2, Tab. 2-2**) 1 Std. lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Zur Detektion der Immunreaktion diente ein Chemilumineszenz-Substrat (ECL Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Uppsala, S), in dem die Membran für 1 min. unter leichtem Schwenken inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran kurz zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Durch Auflegen der Membran auf einen Autoradiografiefilm (Hyperfilm ECL, Uppsala, S) in einer Röntgenkassette für 10 s.- 60 min. wurden die Proteine visualisiert.

Zur mehrmaligen Verwendung der Membran wurden nach der Detektion die Antikörper von den Proteinen wieder abgetrennt („*Stripping*“). Die PVDF-Membran wurde dazu für 6 min. bei Raumtemperatur in „*Stripping*“-Puffer (0,2 M NaOH) inkubiert und dann dreimal für 10 min in TBS-Tween (0,1 % Tween in TBS) gewaschen. Nach dem „*Stripping*“ konnte die Membran einer weiteren Detektion mit Antikörpern unterzogen werden

2.2.7 Statistik

Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Experimente als Vierfachbestimmung durchgeführt. Die Berechnung der statistischen Parameter erfolgte unter Verwendung des MS-DOS-Programms InStat (Version 2.05a, GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Alle Versuchsansätze waren voneinander unabhängig und wurden unter Annahme einer Normalverteilung der Messergebnisse mit dem ungepaarten, zweiseitigen *Student-t*-Test verglichen. Die Überprüfung einer Varianzhomogenität wird bei der t-Test-Berechnung durch InStat standardmäßig mit dem *F*-Test durchgeführt. Die Unterschiede zwischen zwei Versuchsansätzen wurden als signifikant betrachtet, wenn die p-Werte kleiner als 0,05 waren.