

2.1. Material

2.1.1. Material für Nukleinsäuretechniken

2.1.1.1. Vektoren und Plasmide

Das 610 bp große, humane **nbk-Fragment** ist mit einem myc-tag versehen und liegt mit den Schnittstellen HindIII/XbaI auf dem pcDNA3 Plasmid (Invitrogen). Das 650 bp große, humane **bax-Fragment** ist ebenfalls mit einem myc-tag versehen und liegt mit den Schnittstellen HindIII/XbaI auf dem pcDNA3 Plasmid. Beide Plasmide wurden von Prof. P.T. Daniel, Klinik für Hämatologie, Charité Campus Berlin-Buch bereitgestellt

pTRE2 (Clontech) ist ein 3,8 kb großer Tetracyclin-induzierbarer Vektor in den das myc-nbk-Fragment (pTRE-Nbk) sowie das myc-bax-Fragment (pTRE-Bax) kloniert wurden.

pTK-Hyg (ClonTech) ist ein 5,1 kb große Plasmid, das für die Selektion der stabil transfizierten Zellen verwendet wurde. Es enthält das Hygromycin-Resistenz-Gen.

2.1.1.2. Enzyme

Verwendete Restriktionsenzyme und Restriktionspuffer (Gibco)

Enzym	Puffer	Puffer	pH	Tris-HCl	MgCl ₂	NaCl	KCl
EcoRI	3	2	8,0	50 mM	10 mM	50 mM	-
Hind III	2	3	8,0	50 mM	10 mM	100 mM	-
KpnI	4	4	7,4	20 mM	5 mM	-	50 mM
PstI	2	6	7,4	50 mM	6 mM	50 mM	50 mM
PvuII	6						
XbaI	2						

2.1.1.3. Transformation

LB-Medium (Gibco BRL)

Trypton 10 g
 Hefeextrakt 5 g
 NaCl 10 g
 NaOH (1M) 1ml
 A. bidest ad 1000 ml
 Ampicillin (50 µg/ml)
 +14 g Agar (bei Verwendung in Petrischalen)
 E. coli DH5α (ClonTech), kompetente Zellen

2.1.1.4. Kits zur Nukleinsäureextraktion

Gelextraktions-Kit	Qiagen
Plasmid Midi Kit	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Qiagen
RNeasy Kit für Gesamt-RNA	Qiagen

2.1.2. Material für zellbiologische Techniken

2.1.2.1. Eukaryotische Zellen und Nährlösungen

Humane Melanomzelllinien

Aus Primärtumoren: A-375 (Giard *et al*, 1973), Bro (Lockshin *et al*, 1985), IGR39 (Aubert *et al*, 1980), JPC-298 (Aubert *et al*, 1993), Mel-57 (Bruggen *et al*, 1981), Mel-HO (Holzmann *et al*, 1988), Mel-JuSo (Ziegler-Heitbrock *et al*, 1985).

Aus Metastasen: IGR37 (Aubert *et al*, 1980), M5 (Liao *et al*, 1975), Mel-2A (Bruggen *et al*, 1981), MeWo (Puche *et al*, 1977), NKI-4 (de Vries *et al*, 1974), O-Mel-2 (de Vries und Spits, 1984), SK-Mel-13, SK-Mel-19, SK-Mel-23, SK-Mel-28 (Carey *et al*, 1976).

M186 ist eine **Mischkultur** von Melanomzellklonen, die aus Melanom-Metastasen gewonnen wurde (Raisova *et al*, 2001).

Tetracyclin-regulierbare Melanomzellen

Die Tetracyclin-regulierbaren Melanomzelllinien Bro-Tet-On, SK-Mel-13-Tet-On, Mel-2a-Tet-Off, SK-Mel-19-Tet-Off wurden durch stabile Transfektion des Tet-On- bzw. Tet-Off-Plasmids (Clontech) in die entsprechende Melanomzelllinie Bro, SK-Mel-13, Mel-2A und SK-Mel-19 gewonnen. Die Doxycyclin-Induzierbarkeit der generierten Zelllinien wurde nach transienter Transfektion mit dem Luziferase-kodierenden Plasmids pTRE-Luc (Clontech) mit Hilfe eines Luziferase-Assays (Promega) detektiert. Die beschriebenen Tetracyclin-regulierbaren Zelllinien lagen zu Beginn der Doktorarbeit bereits im Labor vor.

Die **Jurkat Leukämiezelllinien** stammt von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig).

SW480 und Colo205 Kolonkarzinomzelllinien wurden von Prof. C. Hanski, Klinik für Gastroenterologie, Charité Campus Benjamin Franklin bereitgestellt

Melanozyten-Kulturen wurden aus menschlichen Vorhäuten isoliert.

Lösungen für die Zellkultur

- FCS (Seromed)
- Trypsin/EDTA 0,05/0,02% (w/v) in PBS w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ (Seromed)
- PBS w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ (Phosphate Buffered Saline; Seromed)
- Penicillin/Streptomycin 10.000 U / 10.000 µg / ml (Seromed)

Nährmedien:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium 1660 mit Glucose 4,5 g/l (Gibco BRL)
- Roswell Park Memorial Institute (RPMI)

je 500 ml Medium wurden 50 ml FCS und 5 ml Penicillin/Streptomycin zugegeben

Antibiotika

- Ampicillin (Gibco): 50 mg/ml in steril filtriertem Wasser

- Geneticin (Gibco): 100 mg Geneticin gelöst in 2 ml PBS
- Hygromycin (Boehringer): 50 mg/ml
- Doxycyclinhydrochlorid (ICN): 1mg/ml in steril filtriertem Wasser

2.1.2.2. Transfektion

- DMRIE-C (1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethylammonium-bromid) Reagenz (Invitrogen), Lipid für DNA-Transfektion (1,05 µl/ml)
- Oligofectamine (Invitrogen), Lipid für RNA- und DNA-Transfektion (1,05 µl/ml)
- OPTI-MEM 1 (Gibco), Medium ohne Serum und ohne Penicillin/Streptomycin
- Selektionsmedium 1: DMEM 1965, mit 10% Serum, mit Penicillin/Streptomycin, 100 µg/ml Geneticin
- Selektionsmedium 2: DMEM 1965, mit 10% Serum, mit Penicillin/Streptomycin, 100 µg/ml Geneticin, 50 µg/ml Hygromycin

2.1.2.3. DNA-Antisense

Das Antisense-Oligodesoxyribonukleotid asbax richtet sich gegen die Sequenz des humanen bax-Gens, das Kontroll-ODN scbax ist zu keiner bekannten Sequenz des humanen Genoms komplementär. Beide ODNs (TIB MOLBIOL) sind in A. bidest gelöst (100 µM).

Sequenz des asbax-ODN: 5'- TCGATCCTGGATGAAACCCT -3'
 Sequenz des scbax-ODN: 5'- CTCCCCCACTTCGCCTCGC -3'

Transfektionsreagenzien

- Oligofectamine (Invitrogen), Lipid für DNA- und RNA-Transfektion (4 µl/ml)
- OPTI-MEM 1 (Gibco), Medium ohne Serum und ohne Penicillin/Streptomycin

2.1.2.4. RNA-Interferenz

Die gegen das humane bax-Gen gerichtete siRNA sibax und die ungerichtete Kontroll-siRNA scbax sind in TE-Puffer gelöst (100 µM). 99 am jeweiligen 3' Ende steht für zwei DNA-Basen

Sequenz sibax: 5'- CCAUCAUGGGCUGGACAUU99 -3'
 3'- 99GGUAGUACCCGACCUGUAA -5'

Transfektionsreagenzien

- Oligofectamine (Invitrogen), Lipid für DNA- und RNA-Transfektion (4 µl/ml)
- OPTI-MEM 1 (Gibco), Medium ohne Serum und ohne Penicillin/Streptomycin

2.1.2.5. Caspasen- und Cathepsininhibitoren

Name (Sequenz)	Substrate	Firma
zVAD (Z-Val-Ala-Asp-FMK)	Caspasen, Cathepsine, Calpaine	Calbiochem
Q-VD-Oph (Q-Val-Asp-CH ₂ -OPH)	Caspasen, Cathepsine	Calbiochem
zWEHD (Z-Trp-Glu-His-Asp-FMK)	Caspase-1	R&D
Systems		
zVDVAD (Z-Val-Asp-Val-Ala-Asp-FMK)	Caspase-2	R&D
Systems		
zDEVD (Z-Asp-Glu-Val-Asp-FMK)	Caspase-3	R&D
Systems		
zYVAD (Z-Tyr-Val-Ala-Asp-FMK)	Caspase-4	R&D
Systems		
zVEID (Z-Val-Glu-Ile-Asp-FMK)	Caspase-6	R&D
Systems		
zIETD (Z-Ile-Asp-Thr-Asp-FMK)	Caspase-8	R&D
Systems		
zLEHD (Z-Leu-Glu-His-Asp-FMK)	Caspase-9	R&D
Systems		
zAEVD (Z-Ala-Glu-Val-Asp-FMK)	Caspase-10	R&D
Systems		
zFA-FMK (Z-Phe-Ala-FMK)	Cathepsin B, L	R&D
Systems		
Cathepsin H Inh. (H-Leu-CMK)	Cathepsin H	Calbiochem
Cathepsin K Inh. II (Boc-Phe-Leu-Leu-Z)	Cathepsin K, B	Calbiochem
Cathepsin L Inh. III (Z-Phe-Tyr-DMK)	Cathepsin L	Calbiochem
Cathepsin S Inh. (Z-Phe-Leu-COCHO)	Cathepsin S	Calbiochem

2.1.3. Material für RNA- und Proteinanalytik**2.1.3.1. Northern-Blot**RNA-Ladepuffer

Formaldehyd	2,3 µl
Formamid	6,7 µl
Glycerin	1,26 µl
Ethidiumbromid	0,1 µl
MOPS Puffer (10x)	0,75 µl
A. bidest	3 µl

10x MOPS Puffer (pH 7,0)

41,2 g MOPS, 26,6 ml NaOAc (3 M), 20 ml EDTA (0,5 M), ad 1000 ml A. bidest Der Puffer wird autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Lösung für RNA Gel

3,6 g Agarose (1,2%), 53 ml Formaldehyd, 29,2 ml 10x Mops, 218,2 ml A. bidest

Hybridisierungslösung

Dextransulfat (10%), SDS (1%), NaCl (1 M), ad 50 ml (erwärmen zum Lösen) A. bidest

Waschpuffer

SSC (20 x) (pH 7.4): 175,3 g NaCl, 88,2 g NaCl pH 7,0 ad 1000 ml A. bidest

SSC (2 x), 1% SDS: 100 ml SSC (20 x), 100 ml SDS (10%) ad 1000 ml A. bidest

SSC (0,1 x): 2,5 ml SSC (20 x) ad 500 ml A. bidest

RNA-Marker (Gibco)

Die Fragmentlängen in Nukleotiden: 9049, 7046, 4040, 2003, 1035, 240

2.1.3.2. SDS-PAGEProteinbestimmung

BCA Protein Assay Kit Pierce

Coomassie-Färbelösung Roth

Proteinmarker

Prestained SDS-Page Standard (Broad Range) BioRad

Proteinextraktionspuffer:

Standardpuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 0,5% SDS, 1 mM EDTA, pH 8,0, 5 µg/ml Pepstatin, 2 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 0,1% µg/ml Aprotinin

Puffer für den Nachweis von Caspasen-Spaltprodukten: CHAPS-Puffer (Cell Signaling)

Harnstoff-Puffer für den Nachweis von PARP-Spaltprodukten: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 6 M Harnstoff, 10% Glycerol, 2% SDS, 0,00125% Bromphenolblau, 5% β-Mercaptoethanol

Proteaseninhibitoren

Pepstatin 0,5 mg/ml in A. bidest Sigma

Leupeptin 10 µg/ml in A. bidest Sigma

Aprotinin 10% in A. bidest Sigma

PMSF 100 mM in DMSO Sigma

Proteinprobenpuffer (4x)

40% Glycerin, 12% β-Mercaptoethanol, 4% Bromphenolblau, 0,8% SDS

Laufpuffer nach Laemmli (10x)

72 g Glycin, 15 g Tris ad 500 ml A. bidest

Laufpuffer (1x)

100 ml 10 x Laufpuffer, 10 ml SDS (10%) ad 1000 ml A. bidest

Trenngelpuffer (pH 8,8)

0,64 M Tris-Base, 0,12 M Tris-HCl, 0,2% SDS ad 500 ml A. bidest

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,33 M Tris-Base, 0,2% SDS ad 500 ml A. bidest

<u>Sammelgel, 5 ml</u>	<u>5%</u>
30% Acryl-/Bisacrylamid 37,5:1	0,8 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
A. bidest	1,7 ml
10% Ammoniumpersulfat	30 µl
TEMED	15 µl

<u>Trenngel, 10 ml</u>	<u>7,5%</u>	<u>10%</u>	<u>12%</u>	<u>15%</u>
30% Acryl-/Bisacrylamid 37,5:1	2,5 ml	3,3 ml	4 ml	5 ml
Trenngelpuffer	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
A. bidest	2,5 ml	1,7 ml	1 ml	-
10% Ammoniumpersulfat	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

2.1.3.3. Western-BlotTransferpuffer

500 ml 1 x Laufpuffer, 200 ml Methanol ad 1000 ml A. bidest

PBS-Tween (0,05%)

9,55 g PBS Dulbecco, 0,5 ml Tween ad 1000 ml A. bidest

Milchpulver (5%)

5 g Trockenmilchpulver (fettfrei) ad 100 ml PBS-Tween

Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Firma
AIF	Ziege	1:200	Santa Cruz
β-Aktin	Maus	1:5000	Sigma
Bax	Kaninchen	1:500	Santa Cruz
Bcl-2	Maus	1:400	Santa Cruz
Bcl-x _L	Kaninchen	1:200	Santa Cruz
Caspase-3 Pro-Form	Kaninchen	1:250	Transduction Laboratories
Caspase-3	Maus	1:1000	Cell Signaling
Caspase-6	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Caspase-7	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Caspase-8	Maus	1:1000	Cell Signaling
Caspase-9	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Cathepsin B	Kaninchen	1:200	Santa Cruz
Cathepsin D	Ziege	1:200	Santa Cruz
Cathepsin H	Ziege	1:200	Santa Cruz
Cathepsin K	Ziege	1:200	Santa Cruz
Cathepsin L	Ziege	1:200	Santa Cruz
Cytochrom C	Maus	1:1000	BD Pharmingen

DFF45	Kaninchen	1:250	Cell Signaling
LimpII	Ziege	1: 400	Santa Cruz
Nbk	Ziege	1:200	Santa Cruz
PARP	Maus	1:5000	Biomol
VDAC	Maus	1:1000	Calbiochem

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
Anti-Anti-Maus konjugiert mit HRP	1:5000	Dako
Anti-Anti-Ziege konjugiert mit HRP	1.5000	Dako
Anti-Anti-Kaninchen konjugiert mit HRP	1:5000	Dako

2.1.4. Material für Nachweise von Apoptose und Nekrose

2.1.4.1. Apoptosestimulanzien

- CH-11 (Immunotech), agonistischer CD95L-Antikörper, 1 µg/µl
- Doxorubicinhydrochlorid (Alexis), gelöst in A. bidest, 0,5 mM
- VP-16 (Sigma), Etoposid, gelöst in DMSO, 20 mM
- Pamidronat (Novartis Pharma), gelöst in A. bidest, 21,5 mM

2.1.4.2. Kits zur Detektion von Apoptose und Nekrose

- | | |
|--|----------|
| • Cell Death Detection Kit | Roche |
| • Cytotoxicity Detection Kit (LDH) | Roche |
| • Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit | Alexis |
| • ApoAlert Caspase Colorimetric Assay | Clontech |
| • In Situ Cell Death detection Kit (TUNEL) | Roche |

2.1.4.3. DNA-Färbungen (Bisbenzimid, TUNEL)

- Bisbenzimid, 1 µg/ml PBS

Bisbenzimid-Fixierungslösung

4 g Formaldehyd ad 100 ml PBS

Bisbenzimid-Permeabilisierungslösung

0,2% Triton X-100 ad 100 ml PBS

TUNEL-Fixierungslösung

4 g Paraformaldehyd ad 100 ml PBS (pH 7,4)

TUNEL-Permeabilisierungslösung

0,1% Triton X-100, 0,1% NaCl ad 100 ml PBS

2.1.5. Sonstige Materialien

2.1.5.1. Weitere Lösungen und Puffer

Dextranlösung (10%):	1% SDS, 1 M NaCl, 10% Dextran
DNA-Ladepuffer:	Glycerin 40%, Bromphenolblau 0,25%, Xylencyanol 0,25%
EDTA (0,5 M):	186,1 g EDTA ad 1000 ml A. bidest, pH 8,0
Formaldehydpuffer (10 x):	41,2 g MOPS, 26,6 ml NaAcetat (3 M), 20 ml EDTA (0,5 M ad 1000 ml A. bidest, pH 7,0
Homogenisierungspuffer	0,25 M Sucrose, Hepes, EDTA
Lithiumchlorid (8 M)	10,17 g LiCl ₂ gelöst in 30 ml A. bidest
Lysepuffer (DNA-Leiter)	10 mM Tris (pH 8,0), 1,2% SDS, 20 mM EDTA (pH 7,0) ad 10 ml A. bidest
Natriumacetat (3 M):	408,1 g NaAcetat ad 1000 ml A. bidest, pH 5,2
Propidiumjodid-Lösung	0,1% Triton X-100, 0,1 % NaCl, 20 µg/ml Propidiumjodid, 200 µg/ml RNase A ad 10 ml PBS
SDS (10%):	100 g SDS ad 1000 ml A. bidest, pH 7,2
TAE (Tris-Acetat, 50 x):	40 mM Tris-Base, 40 mM Eisessig, 1 mM EDTA (pH 8,0)
TBS (10 x):	24,2 g Tris-Base, 80 g NaCl, pH 7,6 ad 1000 ml A. bidest
TE-Puffer (Tris-EDTA):	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0

2.1.5.2. Chemikalien und Radiochemikalien

Acridin-Orange	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1)	Biorad
Agarose	Gibco
APS	Biorad
Bisbenzimid	Hoechst
Bromphenolblau	Biorad
d(ATG)-Mix: dATP, dTTP, dGTP	Gibco
DMSO	Sigma
EDTA	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Formaldehyd	J.T. Baker
Formamid	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycin	Serva
Harnstoff	United States Biochemical (USB)
Isopropanol	J.T. Baker
β-Mercaptoethanol	Merck
Methanol	J.T. Baker
Mounting-Medium	MoBiTec
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
SDS	Sigma

Natriumhydroxid	Merck
Non-Fat Dry Milk	Biorad
PBS Dulbecco Pulver	Biochrom AG
Ponceau S	Sigma
Propidiumjodid	Sigma
RNase A	Sigma
Saccharose	Merck
TEMED	Biorad
Tween-20	Sigma
Triton-X-100	Merck
Salzsäure	Merck
Xylencyanol	Biorad

Radiochemikalien:

(alpha- ³² P) dCTP, 3000 Ci / mmol, 10 µCi / µl	NEN
--	-----

2.1.5.3. Sonstige Materialien

Blue und Red Cap Tubes (50 ml)	Falcon
Kryoröhrchen	Falcon
Filmkassetten	Kodak
Filterpapier 3MM	Whatman
Filtriergerät	Milipore
Gelfiltrationssäulen: NAPTM-5 Columns	Pharmacia Biotech
Gewebekulturflaschen	Falcon
Glas-Homogenisator (Douncer)	Biorad
Heparin-Spritzen	Beckton Dickinson
Hybridisierungs-Transfermembran	Du Pont
Hyperfilm ECL	Amersham
Mikrofilter (0,2 µm)	Braun
Mikrotiterplatten (24 well)	Falcon
Nitrozellulose-Membran (Protran BA 83)	Schleicher & Schuell
Petrischalen	Falcon
Phosphoimaging-Platte 20x40 cm 2040S	Fuji
Röntgenfilme	Fuji
Salmon Sperm DNA Solution	Gibco
Schwarz-Weiß Filme	Polaroid
Transfektionsröhrchen	Nunc
6-well Zellkultur-Platten	Falcon
24-well Zellkultur-Platten	Nunc
96-well Zellkultur-Platten	Nunc
Zellschaber	Costar

2.1.5.4. Geräte

Autoklav	Webeco
Bidest-Gerät Destamat	Heraeus
Brutschrank mit Schüttler	GFL
Cytospin 2	Shandon
Durchflusszytometer	Beckton Dickinson
Elektrophoreseapparaturen	Pharmacia Biotech
ELISA-Photometer	Dynatech
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Heizblock	Techne
Mikroskop	Olympus
Mikrowelle	Bosch
pH-Meter mit Ingold-Elektrode 405	Knick
Phosphoimager	Fuji
Photometer	Beckman
Pipettierhilfe	Hirschmann
Schüttler	Köttermann
Sofortbildkamera	Polaroid
Transformatoren LKB-Gps 200/400	Pharmacia
Vakuumzentrifuge	Uniequip
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Vortex	Bender&Holbein
Wasserbad	B. Braun
Kühlzentrifuge	Beckman Coulter
Sorvall-Zentrifuge mit Rotoren HS-4, SS-34	Du Pont
Tischzentrifuge: Biofuge 13	Heraeus

2.2. METHODEN

2.2.1. Nukleinsäuretechniken

2.2.1.1. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Zur Messung wurde ein UV/VIS Spektrophotometer verwendet. Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Bei der DNA-Bestimmung entspricht eine Optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml (bei RNA: 40 µg/ml). Zur Bestimmung der Reinheit einer Nukleinsäurelösung wird der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm gebildet. Dieser Quotient sollte für RNA im Bereich von 1,8 - 2,0 und für DNA im Bereich von 1,6 - 1,8 liegen.

2.2.1.2. Agarosegelelektrophorese

In Agarosegelen können lineare DNA-Moleküle von etwa 0,1 bis 60 kb aufgetrennt werden. Je nach gewünschter Agarosekonzentration (0,8%-2%), die der DNA-Größe angepasst wird, wird die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE gelöst. Zur Anfärbung der DNA wird der TAE-Puffer mit 0,5 µg Ethidiumbromid pro ml Puffer versetzt. Die Proben werden vor dem Befüllen der Geltaschen mit Ladepuffer gemischt (1/5 bis 1/10 ihres Volumens). Die Elektrophorese wird mit einer Spannung von 50 bis 120 V durchgeführt. Unter UV-Licht kann die Ethidiumbromid-gefärbte DNA im Agarosegel sichtbar gemacht und ausgewertet werden.

2.2.1.3. Restriktion

Die Plasmide oder DNA-Fragmente werden mit einem Überschuss an Enzymen verdaut. Es wurden 5 bis 10 Units des Enzyms pro 1 µg DNA eingesetzt. Mit Hilfe des jeweiligen Reaktionspuffers wurden optimale Restriktionsbedingungen für die Enzyme eingestellt. Der Ansatz wurde zum vollständigen Verdau bei 37°C im Wasserbad für eine bis drei Stunden inkubiert. Bei einem Verdau mit zwei Enzymen gleichzeitig wurde der Reaktionspuffer so gewählt, dass beide Enzyme eine möglichst hohe Aktivität aufwiesen. Gab es diese Möglichkeit nicht, so wurde die DNA nacheinander verdaut und zwischen den Reaktionen gefällt und gereinigt. Das myc-nbk- bzw. myc-bax-Fragment wurde per Restriktionsverdau mit den Enzymen HindIII und XbaI aus dem jeweiligen pcDNA3-Vektor herausgeschnitten.

2.2.1.4. Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel wurden die Ethidiumbromid-gefärbten Banden kurz unter UV-Licht sichtbar gemacht und die gewünschten DNA-Banden mit einem Skalpell im Gel markiert. Das eigentliche Ausschneiden der DNA aus dem Gel erfolgte ohne UV-Bestrahlung anhand der Markierungen, um DNA-Schäden zu vermeiden. Die

ausgeschnittene DNA wurde mit Hilfe eines Gelextraktion-Kits (Qiagen) gemäß dem Hersteller-Protokoll aus dem Gel eluiert und in TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.5. Ligation

Ligation bezeichnet die Verknüpfung der kompatiblen Enden zweier Nukleinsäure-Moleküle mit Hilfe einer Ligase. DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und einer im gleichen Strang eines doppelsträngigen DNA-Moleküls gegenüberliegenden freien 3'-Hydroxyl-Gruppe. Bei der Ligationsreaktion wird das gewünschte DNA-Fragment in den passenden Vektor eingebaut. Um eine optimale Ligationsreaktion zwischen dem zu insertierendem Fragment und Vektor zu erreichen, sollte das Insert in etwa dreifach molarem Überschuss vorliegen. Die Effizienz der Ligation ist bei DNA-Fragmenten mit glatten Enden geringer als bei Fragmenten mit überhängenden Enden. Die Ligationsansätze wurden bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Kontrolle wurde parallel dazu ein Reaktionsansatz ohne Insert-DNA angesetzt. Ein Teil des Reaktionsansatzes wurde zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. 2-3 µl vom Reaktionsansatz wurden zur Transformation verwendet. Das myc-nbk-Fragment bzw. das myc-bax-Fragment wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII und XbaI in die MCS des entsprechenden pTRE2-Vektors eingefügt und resultierte in pTRE2-Nbk bzw. pTRE2-Bax.

2.2.1.6. Transformation

Zur Vervielfältigung wurde das gewünschte Plasmid in kompetente Bakterien (*E. coli*) eingebracht, die dann nach Ampicillinresistenz selektiert wurden. 50 µl der kompetenten Zellen wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß auf Eis gestellt. Dazu wurden 1-3 µl (1-10 ng) Ligationsansatz gegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden auf Eis für 30 min inkubiert, danach einem Hitze-Schock (37°C) für 20 s ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden bei RT 0,95 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen eine Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert. In dieser Zeit konnten die Bakterien das Gen für die Ampicillinresistenz exprimieren. Von diesem Ansatz wurden 10 µl, 50 µl und 200 µl auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Außerdem wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Als Negativkontrolle: kompetente Zellen ohne DNA und als Positivkontrolle: kompetente Zellen mit 500 pg Kontrollvektor.

2.2.1.7. Plasmid-Präparation

Für die **Minipräparation** wurden die Bakterienklone mit sterilen Plastikspitzen in je 2 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert (maximal 18 h). Die Plasmid-DNA wurde aus 1 ml Über-Nacht-Kultur mit Hilfe eines Plasmid

Mini Kits (Qiagen) gewonnen. Die Präparation erfolgte gemäß dem Hersteller-Protokoll. Die extrahierte Plasmid-DNA wurde in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und mit Hilfe eines Restriktionsverdau kontrolliert.

Zur **Midipräparation** wurden die übrigen 1 ml Bakteriensuspension aus der über-Nacht-Kultur, die nicht für die Plasmid-Minipräparation verwendet wurden, in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angesetzt und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die Plasmid-DNA des gesamten Ansatzes wurde mit Hilfe eines Plasmid Midi Kits (Qiagen) gemäß dem Hersteller-Protokoll extrahiert. Die präparierte DNA wurde in 200 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.2. Zellbiologische Techniken

2.2.2.1. Passage und Lagerung eukaryotischer Zellen

Melanomzellen und Melanozyten-Kulturen wurden in DMEM-1965- bzw. RPMI-1640-Medium mit 10% FCS in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5% CO₂ enthielt, kultiviert. Die verwendeten Melanomzelllinien sowie Melanozyten-Kulturen wuchsen adhärent auf dem Boden der Kulturflaschen. Das Zellmedium wurde jeden zweiten bis dritten Tag erneuert, wobei vor jedem Mediumwechsel die Zellen mit sterilem PBS gespült wurden, um sowohl tote Zellen als auch saure Stoffwechselprodukte zu entfernen. Um die subkonfluent gewachsenen Zellen zu Passagieren, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und ca. 5 min mit 0,3% Trypsin inkubiert. Nach Ablösung der Zellen vom Boden wurden sie mit Medium von der Kulturflasche abgespült und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 rpm pelletiert und in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden je nach Proliferationsrate mit entsprechender Zellzahl für die Versuche ausgesät oder weiter kultiviert.

Zur Lagerung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und in 10% FCS-haltigen Medium 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium mit 25% FCS und 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden die Röhrchen in Zellstoff verpackt und langsam bei -80°C eingefroren. Zur endgültigen Lagerung wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2.2. Wachstumskurven

Mit Hilfe von Wachstumskurven lässt sich die das Verhältnis von Proliferation und Zelltod einer Zellkultur analysieren. 5×10^4 Zellen wurden pro 6-well ausgesät. Nach 24 h wurde bei einer Zellpopulation Doxycyclin zur Promotorinduktion ins Medium zugegeben, bei einer Kontrollgruppe nicht. Alle 48 h wurde das Medium (mit oder ohne Doxycyclin) erneuert. Zur Zellzahlbestimmung wurden alle 48 h zwei wells eines 6-wells pro Gruppe geerntet und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer festgestellt.

2.2.2.3. Transfektion

Die Transfektion ist eine Technik mit deren Hilfe die Einschleusung von DNA in höher entwickelte Zellen ermöglicht wird. Im Prinzip eignen sich alle verfügbaren eukaryotischen Zellen als Wirtszellen für die Aufnahme von Fremd-DNA. Bei einer transienten Transfektion wird die eingeschleuste DNA nicht ins Chromosom der Empfängerzelle eingebaut. Die in die Wirtszellen eingeschleusten Gene sind nur vorübergehend aktiv und gehen im Verlauf weiterer Zellteilungen wieder verloren. Werden die eingeschleusten Fremd-Gene jedoch in das Genom der Wirtszelle eingebaut und persistieren in den Wirtszellen, so spricht man von einer stabilen Transfektion. Die Zelllinie SK-Mel-13-Tet-On wurde jeweils mit einer Anzahl von 10^6 Zellen in drei Kultur-Flaschen ausgesät und kultiviert, bis die Zellen eine Konfluenz von 40-50% aufwiesen. Die Transfektion wurde in einer 6-well-Platte durchgeführt. Jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät und 24 h später transfiziert. 6 ml OPTI-MEM wurden mit 6,3 μ l DMRIE-C pro 6-well in ein Transfektionsröhrchen gegeben, vorsichtig geschwenkt und bei 25°C für 30 min inkubiert. 10 μ g der Tetracyclin-regulierbaren Plasmid-DNA und das pTK-Hyg-Resistenz-Plasmid (2,5 μ g pro 6-well-Platte, nur bei stabiler Transfektion) wurden mit 1 ml OPTI-MEM sterilfiltriert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die sterilfiltrierten Plasmide (250 μ l = 2,5 μ g) zur DMRIE-C-Lösung gegeben, geschwenkt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Das Medium wurde von den 6-well-Platten entfernt und die Zellen wurden kurz mit OPTI-MEM gewaschen. Jeweils 1 ml der DNA-Lipid-Mischung wurde in jedes well gegeben. Anschließend wurden die Zellen im Inkubator für 4h inkubiert. Bei der transienten Transfektion wurde nun das Transfektionsmedium gegen frisches Medium gewechselt. Die Zellen wurden mit Doxycyclin zur Promotorinduktion behandelt. Nach 24 h - 96 h wurden die transfizierten Zellen geerntet und auf RNA- und Proteinebene untersucht. Bei der stabilen Transfektion wurde zwei Tage nach der Transfektion das Medium gegen Selektionsmedium (Geneticin- und Hygromycin-haltig) gewechselt. Eine Woche später waren ca. 95% der Zellen abgestorben. Das Selektionsmedium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Nach fünf bis sechs Wochen Wachstum hatten sich einzelne Klonpopulationen gebildet. Ein solche Population wurde mit einer Pipetten-Spitze von den anderen Klonen separiert, abtrypsiniert und in einer Mikrotiterplatte (96-well) vereinzelt. Die Einzelklone wurden dann nacheinander in 24-well Platten, 6-well Platten und schließlich in Kultur-Flaschen hochgezogen. zwei Tage vor der Zellernte wurden die Zellen mit Doxycyclin zur Promotorinduktion (2 μ g/ml) behandelt. Anschließend wurden die Klone auf RNA- und Proteinebene auf Expression untersucht.

2.2.2.4. Konstruktion stabiler Zellklone mit Hilfe des Tet-On-Expressionssystems

Mit Hilfe des Tetracyclin-regulierbaren Expressionssystems (Tet-On, Tet-Off) lässt sich die Expression eines beliebigen Gens in doppelt stabil-transfizierten Zellen spezifisch regulieren.

Grundlage dieses Systems ist der Mechanismus der Tetracyclin-Resistenz in *E. coli*. Das Tetracyclin-Repressor-Protein (TetR) reguliert in *E. coli* negativ die Expression des Tetracyclin-Resistenz-Gens indem es in Abwesenheit von Tetracyclin, bzw. dessen Derivat Doxycyclin, an die Operator-Sequenz des Gens bindet und damit die Genexpression verhindert (Gossen und Bujard, 1992). Im Tetracyclin-regulierbaren Expressionssystem Tet-Off wurde TetR mit der Aktivierungsdomäne (AD) des Herpes simplex Virus VP16 fusioniert. Das resultierende Hybridprotein, der „Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator“ (tTA), ist kein transkriptioneller Repressor mehr, sondern ein Aktivator, der bei Abwesenheit von Tetracyclin bindet und die Genexpression aktiviert. Das Tet-On-System basiert dagegen auf dem „reversen Tet-Repressor“ (rTetR), der sich in vier Aminosäuren von TetR unterscheidet (Hillen und Berens, 1994) und nur in Anwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin an die Operator-Sequenz des Tetracyclin-Resistenz-Gens bindet. Das entsprechende Fusionsprotein mit AD von VP16 ist ein „reverser Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator“ (rtTA), der bei Tetracyclin-Anwesenheit bindet und die Genexpression ermöglicht.

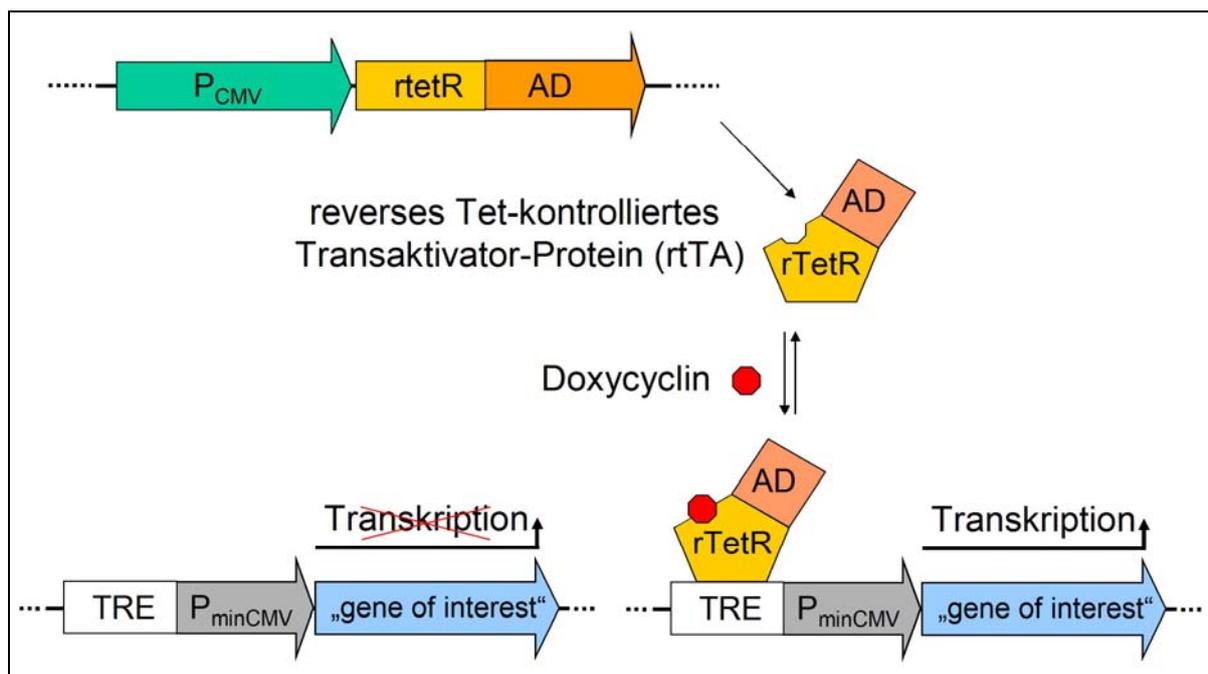


Abb. 8: Das Tetracyclin-regulierbare-Expressionssystem (Tet-On)

Das reverse Tetracyclin-kontrollierte Transaktivator-Protein (rtTA) ist ein Hybridprotein aus dem „reversen Tetracyclin-Repressor“ (rTetR) und der Aktivierungsdomäne (AD) des Herpes simplex Virus VP16. Dieser Transaktivator bindet bei Anwesenheit von Doxycyclin an das „Tetracyclin responsive element“ (TRE). Dadurch wird der minimale Promotor P_{minCMV} aktiviert und das „gene of interest“ transkribiert. Im Gegensatz zum Tet-Off-System, in dem die Genexpression nur in Abwesenheit von Doxycyclin aktiviert ist.

Um eine Tet-On-Zelllinie zu etablieren, werden Zellen mit einem Plasmid, das den rtTA sowie ein Geneticin-(G418)-Resistenz-Gen trägt, transfiziert. Stabil-transfizierte Klone werden mit G418 selektiert und auf Induzierbarkeit des Promotors mit Doxycyclin getestet. In

einer zweiten Transfektion wurden die generierten Tet-Zellen mit dem pTRE-Plasmid transfiziert, das ein so genanntes „gene of interest“ enthält. Dieses „gene of interest“ steht unter der Kontrolle eines Minimal-Promotors (PminCMV), der mutationsbedingt konstitutiv nicht mehr aktiv ist, sondern nur aktiviert wird wenn rtTA an das stomaufwärts von PminCMV befindliche „Tetracyclin responsive element“ (TRE) bindet. Die Tet-On-Zelllinie SK-Mel-13-Tet-On wurden mit pTRE-Nbk bzw. pTRE-Bax, sowie dem das Hygromycin-Resistenzgen tragende Plasmid pTK-Hyg kotransfiziert. Mit Hilfe der kotransfizierten Hygromycin-Resistenz wurden doppelt-stabil transfizierten Zellklone selektiert.

Für die Aktivierung des pTRE-Promotors (Tet-On-Zelllinien) bzw. dessen Inaktivierung (Tet-Off-Zelllinien) wurden 2 µg/ml Doxycyclin (gelöst in sterilfiltriertem A. bidest) zum Medium zugegeben.

2.2.2.5. DNA-Antisense

Die DNA-Antisense-Technik ermöglicht das Herunterregulieren der Proteinexpression eines spezifischen Gens (Zamecnik und Stephenson, 1978). Antisense-Oligodesoxyribonukleotide (ODNs) binden über Watson-Crick-Basenpaarung an komplementäre Sequenzen einer Ziel-mRNA und bilden DNA-RNA-Heteroduplexe aus. Die solchermaßen gebundene mRNA kann nicht mehr an den Ribosomen translatiert werden und wird durch RNase H abgebaut. Die Melanomzelllinie A-375 wurde in einer Dichte von $4-5 \times 10^5$ Zellen/well in 6-well Platten ausgesät und 24 h später transfiziert. Pro well einer 6-well Platte wurden 4 µl Oligofectamine mit 11 µl OPTI-MEM 1 in einem Transfektionsröhrchen für 10 min bei RT inkubiert. Parallel dazu wurden 2 µl der ODN-Lösung in 183 µl OPTI-MEM 1 in einem Transfektionsröhrchen gelöst. Beide Ansätze wurden vereinigt und für 20 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden 1 x mit OPTI-MEM 1 gewaschen und anschließend pro well mit 800 µl OPTI-MEM 1 befüllt. Dann wurde in jedes well vorsichtig 200 µl ODN-Oligofectamine-Lösung (finale ODN-Konzentration: 200 nM) zugegeben und die Zellen bei 37°C inkubiert. Nach 4 h wurden 500 µl Wachstumsmedium mit 30% FCS pro well zugegeben. Die Ernte der Zellen erfolgte 44 h nach Transfektion.

2.2.2.6. RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlich auftretender zellulärer Mechanismus zur Sequenz-spezifischen Inhibition der Proteinexpression durch kleine, doppelsträngige RNA-Moleküle (Fire *et al*, 1998), so genannte siRNAs (small interfering RNA). RNAi verhindert die Proteinexpression mit einer höheren Potenz als alle anderen Strategien der reversen Genetik wie DNA-Antisense, Aptamere oder Ribozyme, und ist deshalb zum Mittel der Wahl geworden um Genexpression zu inhibieren. siRNAs binden intrazellulär an den RISC-Proteinkomplex (RNA-Induced Silencing Complex), der RNase-Aktivität aufweist. Am RISC

wird die doppelsträngige siRNA entwunden und in den Komplex integriert. Über Watson-Crick-Basenpaarung bindet die nun einzelsträngige siRNA den RISC-Komplex an komplementäre mRNA, die degradiert wird.

In 6-well Platten wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät und 24 h später transfiziert. Pro 6-well Platte wurden 24 μ l Oligofectamine mit 72 μ l OPTI-MEM 1 in einem Transfektionsröhrchen für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 6 μ g siRNA in 1100 μ l OPTI-MEM 1 zu dem Lipidansatz gegeben und nach vorsichtigem Mischen für 20 min bei RT inkubiert. Nun wurden die Zellen einmal mit OPTI-MEM 1 gewaschen und mit 800 μ l OPTI-MEM 1 pro well beschichtet. 200 μ l Transfektionsansatz wurden pro well zu den Zellen gegeben. Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurde 1 ml Medium mit 20% FCS pro well zugegeben. 24-72 h nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen geerntet.

2.2.2.7. Inhibition von Caspasen und Cathepsinen

$1,2 \times 10^6$ Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät und nach 24 h, parallel zur Doxycyclininduktion, mit irreversiblen Caspase- bzw. Cathepsin-Inhibitoren behandelt. Die Inhibitoren binden selektiv an die aktiven Proteasen und verhindern damit deren Aktivität. Alle Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und mit Medium auf ihre finalen Konzentrationen verdünnt (50 nM bis 100 μ M). 24-48 h nach Inhibitor-Behandlung wurden die Zellen mit Hilfe des DNA-Fragmentierungs-ELISA auf Apoptose untersucht.

2.2.2.8. Herstellung einer gereinigten Mitochondrien- und Zytosolfraktion

Zur Bestimmung der Cytochrom C- und AIF-Freisetzung wurden jeweils 5×10^7 Zellen trypsinisiert, mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und bei 4°C mit 600 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Zytosol-Extraktionspuffer (Alexis) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in einem Glas-Homogenisator (1 ml) mit 40-80 Stößen homogenisiert. Das Homogenisat wird mit 700 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um die Zellkerne zu entfernen. Der Überstand wurde zur Sedimentierung der Mitochondrien mit 10000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der neue Überstand enthielt die zytosolischen Fraktion und wurde bei -20°C gesammelt. Das Pellet wurde in 100 μ l Mitochondrien-Extraktionspuffer resuspendiert und ebenfalls bei -20°C gelagert (mitochondriale Fraktion).

2.2.2.9. Aufreinigung eines Lysosomen-freien zytosolischen Extraktes

Zur Herstellung Lysosomen-freier Proteinextrakte wurden 1×10^7 Zellen trypsinisiert, mit PBS gewaschen und in 500 μ l Homogenisierungspuffer für 1 min auf Eis äquilibriert. Anschließend wurde die Zelllösung in einen 1 ml Glas-Homogenisator überführt und so lange auf Eis homogenisiert bis ~50% der Zellen aufgebrochen waren (80-100 Stöße). Zunächst wird das Homogenisat bei 4°C mit 800 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der

Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und für 25 min bei 18500 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut verworfen, der Überstand vorsichtig abgenommen und bei 4°C mit 18500 g für 25 min abzentrifugiert. Der nun erhaltene Lysosomen-freie Überstand wurde bei -20°C eingefroren.

2.2.2.10. Acridin-Orange-Färbung

Acridin-Orange ist ein pH-Indikator, der zum Anfärben von Lysosomen verwendet wird. In saurem Milieu emittiert Acridin-Orange oranges bis rotes Licht (lysosomaler pH-Wert: ~5,0), während es bei neutralem pH-Wert grün erscheint (zytoplasmatischer pH-Wert: ~7,0). Subkonfluent gewachsene Zellen wurden für 30 min mit Acridin-Orange (5 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und mit PBS auf eine Zellzahl von 50000/100 µl eingestellt. Mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge wurden 50000 Zellen für 4 min bei 700 rpm auf einen Objektträger zentrifugiert. Die Zellfärbung wurde direkt im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.3. RNA- und Proteinanalytische Methoden

2.2.3.1. Northern-Blot

Bei dieser Methode wird RNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus der Gelmatrix eines Trenngels auf eine geeignete Trägerschicht aus Zellulose oder Nylon übertragen. Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster der RNA-Moleküle bleibt nach der Übertragung erhalten, so dass eine exakte Replik des Gels entsteht. Die RNA wird vor dem Transfer in einem Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei es zu einer vollständigen Denaturierung der RNA kommt. Der Nachweis spezifischer RNA-Moleküle erfolgt durch Hybridisierung mit einer geeigneten radioaktiv markierten Gen-Sonde, z.B. einer zur RNA komplementären DNA. Auf diese Weise lässt sich nachweisen, ob eine Zellpopulation bestimmte RNA-Sequenzen exprimiert. Sie werden nach Autoradiographie der Hybridisierungsmembran als Bande auf einem Röntgenfilm sichtbar.

Die RNA-Proben (je 20 µg) werden in der Vakuumzentrifuge eingengt und die Pellets in Ladepuffer gelöst. Sie werden bei 90°C für zwei min denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Für einen 20 x 18,5 cm² großen Gelträger werden 300 ml 1,2% Agaroselösung benötigt, die in autoklaviertem A. bidest aufgekocht werden. Zur Lösung werden unter dem Abzug Formaldehyd und 10 x MOPS Puffer gegeben. Das Gel wird in den Gelträger gegossen und polymerisiert aus. Nach 5-minütigem Leerlauf bei 150 V werden die RNA-Proben aufgetragen und bei RT mit 130 Volt in drei bis vier Stunden aufgetrennt. Das Gel wird unter UV-Licht photographiert.

Der Transfer der RNA aus dem Gel auf die darüber liegende Membran erfolgt durch Kapillarkräfte. Das Gel wird unter Schütteln in 50 mM NaOH für 30 min inkubiert, damit

größere RNAs durch partielle Hydrolyse besser auf die Membran transferierbar werden. Das Gel wird zweimal mit A. bidest gewaschen und 20 min in 20 x SSC Puffer inkubiert. Das Gel wird mit der glatten Seite auf den vorher mit 3 MM Filterpapier bedeckten Gelträger in 20 x SSC Puffer gelegt. Luftblasen werden mit einer sauberen Pipette entfernt. Eine zurechtgeschnittene Nylonmembran (Genescreen Plus) wird kurz in A. bidest getaucht und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Drei zurechtgeschnittene 3 MM Filterpapiere und Zellstoff werden darauf positioniert. Anschließend wird ca. 500 g Gewicht auf den Zellstoff gelegt. Der Transfer läuft über Nacht. Am folgenden Tag wird der Turm abgebaut und die Nylonmembran kurz in 1x SSC gewaschen. Die Nylonmembran wird anschließend an der Luft getrocknet, die RNA im Ofen bei 60°C an der Membran fixiert. Zur Bestätigung des Transfers wird die Membran fotografiert.

Die Hybridisierungsröhrchen werden mit A. bidest gefüllt und die eingerollte Membran hineingelegt. Die Membran wird in Hybridisierungslösung für drei Stunden bei 60°C im Rotationsofen inkubiert. Für die weitere und bessere Blockierung der unspezifischen Stellen wird die Membran dann mit denaturierter Lachssperma-DNA (10 mg/ml) inkubiert. Zur Herstellung von radioaktiven DNA-Sonden wird ein Reaktionsmix zusammengestellt:

Reaktionsmix für 1 Ansatz:

Primer/Puffer	3,0 µl
dATP, dTTP, dGTP (je 100 mM)	1,2 µl
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10 µCi/µl)	1,0 µl
Klenow-Enzym (5 U/µl)	0,2 µl

Es werden ca. 10 ng eines Fragments mit A. bidest auf 4,6 µl Volumen gebracht, 5 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert, kurz zentrifugiert und sofort auf Eis gestellt. Dann werden die 5,4 µl Reaktionsmix dazugegeben und eine Stunde bei RT inkubiert. Die Säule wird mit 10 mM TE-Puffer äquilibriert. Die Probe wird mit dem Puffer auf 100 µl Volumen gebracht, auf die Säule gegeben und mit 400 µl Puffer eingeführt. Anschließend wird mit 1 ml Puffer eluiert. Die Einbaurate wird bestimmt, indem ein Aliquot vor und nach der Reinigung im Szintillationszähler gemessen wird. Die Sonde wird 5 min bei 100°C denaturiert und in die Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung wird über Nacht bei 60°C unter Rotation im Inkubator durchgeführt.

Die Hybridisierungslösung wird entfernt und die Membran dreimal mit 2 x SSC für 3-5 min bei RT in der Hybridisierungsröhre und dann noch zweimal in einer Schale unter Bewegung gewaschen. 2 x SSC mit 0,1% SDS wird im Wasserbad auf 60°C vorgewärmt. Die Membran wird dann dieser Lösung für eine Stunde inkubiert. Zuletzt wird 30 min in 0,1 x SSC bei RT unter Bewegung inkubiert. Nach kurzem Waschen in A. bidest wird die Membran in Folie verpackt und in einer Kassette mit einer Imaging-Platte bei RT exponiert. Die Imaging-Platte

wird anschließend mit dem Phosphoimager quantifiziert. Die feuchte Membran wird bei 90°C in 0,1 x SSC-Puffer mit 1% SDS für 30 min gekocht und kurz mit A. bidest gewaschen. Zur Kontrolle wird die gestrippte Membran für 1-4 Stunden auf der Phosphoimaging-Platte exponiert.

2.2.3.2. Herstellung von Proteinlysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Sedimente eukaryotischer Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Je 3 - 5 x 10⁶ Zellen wurden in 100-500 µl kaltem Lysepuffer mit 1 ml Spritzen geschert, 10 min mit höchster Umdrehung pro min in einer Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert und die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Rückstände bestehen hauptsächlich aus DNA und Membranresten, die bei der SDS-PAGE stören würden. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert.

BCA Protein Assay (Pierce)

Die Konzentration von Proteinen kann durch eine Farbreaktion in Lösung photometrisch bestimmt werden. Dazu wurden dreimal je 1 µl Lysat und als Negativkontrolle dreimal 1 µl Lysepuffer in einer Mikrotiterplatte mit Flachboden vorgelegt. Als Eichlösungen dienen verschiedene BSA-Konzentrationen die mit dem gleichen Puffer wie die Proben verdünnt werden. Je Probe wurden 200 µl Reaktionsmix zugegeben. Die Platte wurde 30 min bei 37°C inkubiert und bei 550 nm im ELISA-Reader vermessen. Mit Hilfe der bekannten Konzentrationen an BSA können die Proteinmengen der Lysate errechnet werden.

Coomassie-Färbung (Roth)

Die Proteinkonzentration von CHAPS-Extrakten wurde mit Hilfe eines Coomassie-Gels festgestellt. Dazu wurden je 10 µl einer Probe mit 3,3 µl Protein-Probenpuffer versetzt, 5 Min bei 95 °C denaturiert und in einem 12% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Zur Entfernung unspezifischer Färbung wurde das Gel in 25%-iger Methanol Lösung 30 min gewaschen. Zur Auswertung wurden die gefärbten Banden eingescannt und quantifiziert.

2.2.3.3. Diskontinuierliche SDS-PAGE

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese können denaturierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei wandern die denaturierten, durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zur Anode. Durch Molekulargewichtsstandards kann die Größe der Proteine bestimmt werden. TEMED und 10%-iges Ammoniumpersulfat werden erst kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben. Zuerst wird das Trenngel eingegossen und mit 100 µl Isopropanol überschichtet. Nach der

Polymerisierung wird der Überstand abgegossen, mit Filterpapier nachgetrocknet und das Sammelgel darüber geschichtet. Ein Kamm mit zehn Taschen wird unverzüglich in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Die Zellysate bzw. der Standard wird mit 1/3 Volumen 4 x Protein-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Währenddessen werden die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, mit 1 x Laufpuffer bedeckt und die Kämmen gezogen. Die Taschen werden gespült und die Gelen von Luftblasen befreit. Die Proben werden mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen gefüllt. Die Elektrophorese wird bei 80-160 V durchgeführt.

2.2.3.4. Western-Blot

Beim Western-Blot werden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Membran transferiert, auf der sie indirekt detektiert werden können. Hier werden über die Bindung spezifischer primärer Antikörper Meerrettich-Peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper gebunden. Die Meerrettich-Peroxidase setzt ein Chemilumineszenzreagenz um, das emittierte Lumineszenzlicht kann auf Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Der Blot wird in einer Wet-Blot-Kammer (BioRad) so aufgebaut, dass das Gel zur Kathode hin ausgerichtet liegt und die Nitrocellulose-Membran zur Anode. An den Außenseiten werden je zwei Filterpapiere und je ein Schwamm positioniert. Dazu werden die Membran und die Filterpapiere vorher auf die Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Blot-Komponenten werden im Blotpuffer luftblasenfrei aufeinander gelegt. Die Kammer wird auf Eis gestellt, um die entstehende Hitze abzufangen. Der Western-Blot erfolgt für 90 min bei 100 mA. Zum Nachweis des Transfers werden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S angefärbt. Diese Färbung ist reversibel, die Membran kann anschließend mit PBS-Tween wieder vollständig entfärbt werden. Die Nitrocellulosemembran wird in einer Schale über Nacht bei 4°C oder 1 h bei RT mit 5% Trockenmilch in PBS-Tween inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren.

Nach dem Blockieren wird die Membran eine Stunde mit dem primären Antikörper in 5%-iger Milch-PBS-Tween-Lösung bei RT inkubiert. Bestimmte Antikörper müssen auch über Nacht bei 4°C inkubiert werden um eine optimale Bindung ans Antigen zu gewährleisten. Nachdem die Membran dreimal für 5 min mit PBS-Tween gewaschen wurde, wird der sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper in 5%-iger Milch-PBS-Tween-Lösung zugegeben und die Membran für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wird die Membran dreimal für 5 min mit PBS/Tween gewaschen. Die ECL-Reagenzien (Enhanced Chemoluminescence) werden zu gleichen Teilen gemischt und auf die Membran gegeben. Nach 1 min Inkubation während dessen die Membran immer wieder mit der ECL-Lösung überspült wird, kann die Membran zwischen zwei sauberen Folien luftblasenfrei in eine Filmkassette gespannt werden. In einer Dunkelkammer werden Röntgenfilme von 1 s Dauer bis zu mehreren Stunden aufgelegt. Zur

Auswertung werden die Proteinbanden auf dem Röntgenfilm anhand des Markers identifiziert, eingescannt und gegebenenfalls quantifiziert.

2.2.3.5. Nachweis von Caspasenspaltprodukten

Für den Nachweis von Caspasenspaltprodukten im Western-Blot wurde CHAPS-Puffer verwendet, der stabilisierend auf die Spaltprodukte wirkt. Etwa 4×10^6 Zellen wurden in PBS mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturflasche gelöst. Die Zellen wurden pelletiert und in ca. 200 μ l CHAPS-Puffer aufgenommen. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen der Zellen werden die Plasmamembranen zerstört. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm wird der Überstand vom Zelldebris getrennt und bei -20°C aufbewahrt. Da eine Bestimmung des Proteingehalts mit Hilfe des BCA-Protein-Assay-Reagenz nicht möglich ist, mussten die Proteinkonzentrationen in einem Coomassie-Gel bestimmt werden.

2.2.3.6. Nachweis von PARP-Spaltprodukten

Für den Nachweis von PARP-Spaltprodukten im Western-Blot wurden $\sim 4 \times 10^6$ Zellen in speziellem Harnstoff-Puffer lysiert. Um das Protein PARP von der DNA zu lösen wurde das Zelllysate für 15 s mit Ultraschall behandelt (der Harnstoffpuffer unterstützt die Dissoziation) und für 15 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wurden die Proteine im 7,5% Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe der Western-Blot Analyse untersucht.

2.2.4. Nachweise für Apoptose und Nekrose

2.2.4.1. DNA-Fragmentierungs-ELISA

Mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA (Roche) lässt sich DNA-Fragmentierung in Zelllysaten feststellen und somit Apoptose messen. Der Test basiert auf dem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip unter Verwendung zweier Antikörper gegen DNA und Histon-Proteine. Dies ermöglicht den spezifischen Nachweis von Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten. Im ersten Inkubationsschritt wird ein Anti-Histon-Antikörper adsorptiv an der Wand einer Mikrotiterplatte fixiert, anschließend werden unspezifische Bindungsstellen mit Inkubationspuffer abgesättigt. Im zweiten Inkubationsschritt werden die in der Probe enthaltenen Nukleosomen über ihren Histon-Anteil von dem an der Wand immobilisierten Antikörper gebunden. Im dritten Inkubationsschritt bindet Anti-DNA-Peroxidase (POD) an den DNA-Anteil der Nukleosomen. Nach Auswaschen des ungebundenen Peroxidase-Konjugates wird der Anteil der im Immunkomplex fixierten Peroxidase mit ABTS als Substrat photometrisch bestimmt.

Nach Behandlung wurden die Zellen in 6-well-Platten einem Apoptose-Test unterzogen. Die Platten wurden bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die

verbleibenden Zellen mit 1 ml Lysepuffer pro well bei RT lysiert. Danach wurden die Zellen erneut bei 1200 rpm für 10 min abzentrifugiert. 20 µl der jeweiligen Proben wurden auf die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Nach Zugabe von 80 µl Immunreagenz Lösung wurden die Proben unter moderatem Schütteln für 120 min bei RT inkubiert. Die Wells wurden dreimal mit Inkubationspuffer gewaschen bevor 100 µl Substrat-Lösung zugegeben wurde. Nach 1-2 min Inkubation wurde die Farbreaktion bei 405 nm im ELISA gemessen. Die Kontrollwerte wurden gleich dem Wert 1 gesetzt und die gemessenen Werte auf die Kontrollen bezogen.

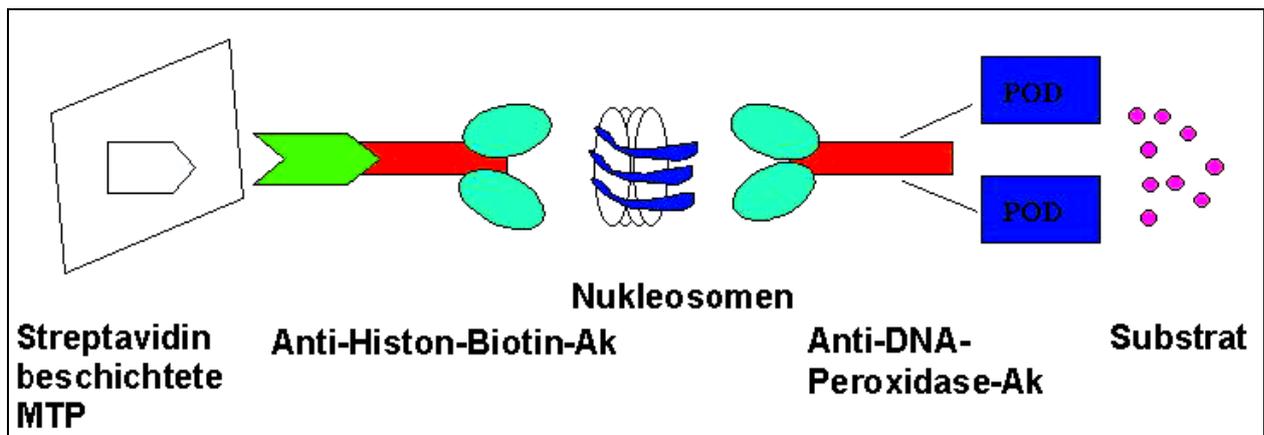


Abb.9: Der Cell Death Detection ELISA detektiert DNA-Fragmentierung nach dem Sandwich-Prinzip

Die lysierte Probe wird in eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (MTP) gegeben. Ein Biotin-gekoppelter Anti-Histon-Antikörper fixiert die Histone und die darum gewundene DNA der Nucleosomen an der MTP. Ein zweiter Peroxidase-gekoppelter Anti-DNA-Antikörper bindet an die freien DNA-Enden (DNA-Fragmentierung) und komplettiert damit das so genannte „Sandwich.“ Ein Peroxidase-Substrat führt zur messbaren Farbreaktion.

2.2.4.2. Nekrose-ELISA

Beim Platzen der Zellen durch Schädigung der Plasmamembran (Nekrose) werden Moleküle aus dem Zytoplasma freigesetzt. Eine schnelle Methode zum Nachweis von Nekrose ist die Bestimmung der Aktivität des zytosolischen Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH) im isolierten Überstand von Zellen mit Hilfe des Cytotoxicity Detektion Kit (Roche). Die Aktivität dieses Enzyms wird nach zwei enzymatischen Schritten gemessen. Im ersten Schritt katalysiert LDH die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, während NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Im zweiten Schritt transferiert Diaphorase H/H^+ auf das Tetrazoliumsalz 2-[4-Iodphenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyl-tetrazolium (gelb), das dadurch zu Formazansalz (rot) reduziert wird. Gemessen wird die Absorption bei 490 nm mit dem ELISA-Photometer. Die Aktivität der LDH im Überstand ist proportional zur Menge der Zellen. Nach Behandlung der Zellen wurde der Überstand abgenommen und bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:4 verdünnt und in 96-well-Platten transferiert. Nach Zugabe von 100 µl Reaktionsgemisch wurden die Proben bei RT 30 min im Dunkeln inkubiert und bei 490 nm im

ELISA-Photometer gemessen. Die Kontrollwerte wurden gleich dem Wert 1 gesetzt und die Werte der Proben darauf bezogen.

2.2.4.3. Caspase-3-Aktivitäts-ELISA

Caspase-3 wird aktiviert indem die inaktive Proform in zwei aktive Spaltprodukte aufgespalten wird. Die Aktivität der Caspase-3 kann photometrisch mit Hilfe des ApoAlert Caspase Colorimetric Assays (Clontech) bestimmt werden, indem ein Caspase-3-Substrat dem Zelllysat zugegeben wird, das bei Spaltung Licht emittiert. Die Messung der Caspase-3-Aktivität erfolgte gemäß dem Hersteller-Protokoll. 2×10^6 Zellen wurden in Lysepuffer suspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Reaktionspuffer gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von $5 \mu\text{l}$ Caspase-3 Substrat (DEVD-pNA, Endkonzentration $50 \mu\text{M}$) wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Messung der Caspase-3-Aktivität erfolgte bei 405 nm im ELISA.

2.2.4.4. DNA-Leiter

Die DNA liegt im Zellkern um Histone gewunden vor. Jeweils 8 Histone bilden einen Komplex der als Nukleosom bezeichnet wird. In apoptotischen Zellen können aktivierte Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängige Endonukleasen die so genannte linker-DNA nur zwischen den Nukleosomen schneiden. Dadurch ergeben sich spezifische DNA-Fragmente, die ca. 180 bp (1 Nukleosom) oder Vielfache davon groß sind. Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese kann man DNA-Fragmente anhand ihrer Größe voneinander trennen. Zur Auftrennung der Fragmente nutzt man die pH-Wert-abhängige, negative Ladung der Nukleotide und den Siebeffekt des Agarosegels. Die DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei kleine Fragmente schneller sind als große. Dadurch ergibt sich für die DNA apoptotischer Zellen ein charakteristisches Muster, gleich den Sprossen einer Leiter. Zur Detektion einer DNA-Leiter wurden $\sim 5 \times 10^6$ Zellen in 1 ml PBS vom Schalenboden abgekratzt und in einer Tischzentrifuge für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in $750 \mu\text{l}$ PBS resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation in der Tischzentrifuge (30 s) wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in $250 \mu\text{l}$ TE-Puffer suspendiert und mit $250 \mu\text{l}$ frisch angesetzten Lysepuffer versetzt. Um die Lyse der Zellen zu unterstützen wurden die Zellen vorsichtig geschwenkt bis die Suspension viskos wurde, anschließend wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert. In das Zelllysat wurde $300 \mu\text{l}$ eiskaltes Lithiumchlorid (LiCl_2) zur Proteinfällung gegeben. Dazu wurde das Lysat 15 min auf Eis gestellt. Um die Proteine von den anderen Zellbestandteilen zu trennen, wurde das Lysat für 60 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die DNA befand, wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen. Zum Fällern der DNA wurden $800 \mu\text{l}$

Isopropanol (100%) zum Überstand gegeben und dieser vorsichtig geschwenkt. Mit Hilfe einer erneuten Zentrifugation (45 min bei 4°C und 13.000 U/min) sedimentierte die DNA. Der Überstand wurde verworfen, die Seiten und der Boden des Reaktionsgefäßes wurden mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 5 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 30 min unter dem Abzug getrocknet. Um die sedimentierte DNA wieder in Lösung zu bringen wurde das Reaktionsgefäß mit 40 µl TE-Puffer mehrmals gespült. Anschließend wurden durch fünfminütiges Zentrifugieren mit der Tischzentrifuge unlösliche Partikel in der Lösung abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 µl RNase A (2 mg/ml) für 10 min bei 37°C behandelt. Restliche RNA-Fragmente sollten durch diesen Schritt abgebaut werden. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

2.2.4.5. Zellzyklusanalyse

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers lässt sich die Menge Propidiumjodid-gefärbter DNA einer einzelnen Zelle bestimmen. In gesunden Zellen ist die kleinste mögliche Menge an DNA vorhanden, wenn sich die Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus befindet. In apoptotischen Zellen gelangen aufgrund der DNA-Fragmentierung kleine DNA-Fragmente aus dem Zellkern ins Zytosol. Permeabilisiert man die Plasmamembran so gelangt diese extranukleäre DNA aus der Zelle und die apoptotischen Zellen weisen eine geringere DNA-Menge auf als Zellen die sich in der G1-Phase befinden (Nicoletti *et al*, 1991). 5×10^5 Zellen wurden in Zellkulturflaschen ausgesät und 24 h später mit Doxycyclin zur Promotorinduktion behandelt. Nach 96 h wurden die Zellen trypsinisiert und mit 4°C kaltem PBS auf 1 Mio. Zellen pro ml eingestellt. Die Zellen wurden für 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert und das Pellet anschließend in 70% EtOH suspendiert (1 Mio. Zellen / ml). Nun wurden die Zellen für 2 h bei -20°C inkubiert. Die Lösung wurde durchmischt, 1 ml abgenommen und 5 min bei 2500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 2500 rpm) wurde das Pellet mit Propidiumjodid-Lösung (20 µg/ml) für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.4.6. Bisbenzimid-Färbung

Zur Visualisierung von Apoptose auf Einzelzellniveau eignen sich Zellkernanfärbungen mit dem Farbstoff Bisbenzimid (Dapi, Hoechst-33342). Bisbenzimid interkaliert in die DNA und eignet sich Chromatinkondensation darzustellen. Apoptotische Zellkerne erscheinen nach Bisbenzimid-Färbung stärker angefärbt und von geringerer Größe als gesunde Zellkerne. Subkonfluent gewachsene Zellen wurden 24-48 h nach Induktion mit Doxycyclin trypsinisiert und mit PBS auf die Zellzahl 50000/100 µl eingestellt. Mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge

wurden 50000 Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert. Nach Lufttrocknung wurden die Zellen in 4%-iger Formaldehyd-Lösung (Methanol-frei) für 30 min bei 4°C fixiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nun für 20 min bei RT im Dunkeln mit Bisbenzimid-Färbelösung (1 µg/ml) inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und dann in Mounting-Medium eingebettet. Anschließend wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Quantifizierung wurden mindestens 500 Zellen pro Ansatz gezählt. Die apoptotischen Zellen wurden als Prozentangabe der Gesamtzellzahl angegeben.

2.2.4.7. TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Färbung (Terminal dUTP Nick-End Labeling) erlaubt es Zellen, abhängig vom Grad ihrer DNA-Fragmentierung, unterschiedlich stark anzufärben. Das Enzym terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) katalysiert die Polymerisierung von Nukleotiden an freie 3'-OH Enden der DNA. Die TUNEL-Reaktion nutzt dieses Prinzip zur Darstellung von DNA-Einzelstrangbrüchen indem Fluorescein-markierte Nukleotide bereitgestellt werden die von der TdT in die DNA eingebaut werden. Subkonfluent gewachsene Zellen wurden 48-96 h nach Induktion mit Doxycyclin trypsinisiert und mit PBS auf die Zellzahl 50000/100 µl eingestellt. Mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge wurden 50000 Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert. Nach Lufttrocknung wurden die Zellen in 4%-iger Paraformaldehyd-Lösung für 1 h bei RT fixiert. Nach einmaliger Wäsche mit PBS wurden sie Zellen für 2 min auf Eis in Permeabilisierungslösung inkubiert. Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und mit dem TUNEL-Reaktionsmix für 1 h bei 37 °C in feuchter Umgebung im Dunkeln inkubiert. Nach erneuter zweimaliger PBS-Wäsche wurden die Zellen mit Bisbenzimid-Lösung für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in Mounting-Medium eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Für die Quantifizierung wurden mindestens 500 Zellen pro Ansatz gezählt Die apoptotischen Zellen wurden als Prozentangabe der Gesamtzellzahl angegeben. Die Bilder der TUNEL-Färbung und der Bisbenzimid-Färbung die unter verschiedenen Filtern aufgenommen wurden, wurden übereinander gelegt.

2.2.5. Tierexperimente

Zur Abschätzung der Tumorgenität *in vivo* wurden sechs bis acht Wochen alte Nacktmäusen (Balb-C-nu/nu, Dänemark) stabil transfizierte Melanomzellen injiziert. Die Melanomzellen wurden dazu nach kurzer Behandlung mit Trypsin/EDTA geerntet und zweimal mit FCS-haltigem Medium gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden zweimal ca. 10⁶ Zellen in jeweils 200 µl PBS resuspendiert und in beide Flanken der Bauchseite einer Maus subkutan injiziert. Zur Induktion des Tetracyclin-regulierbaren Promotors erhielt eine Gruppe

der Tiere Sucrose-haltiges (50 mg/ml) Trinkwasser mit Doxycyclin (2 mg/ml), eine Kontrollgruppe erhielt lediglich Sucrose-haltiges Trinkwasser. Sobald Tumore sichtbar waren, wurden alle drei Tage die TumorgroÙe und das Gewicht der Maus festgestellt (Eberle *et al*, 2003). Die Tumor-Volumina wurden zweidimensional nach der Formel Länge x Breite² x 0,52 kalkuliert (Xie *et al*, 2001).

2.2.6. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Bei der Auswertung der Messwerte wurden Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und die zugehörigen Standardabweichungen angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie Student's T-Test wurden mit dem Programm Microsoft Excel errechnet.