

### 3. Methoden

#### 3.1. Routinearbeiten in der Zellkultur

##### *Kultivierung*

Die Kultivierung der Caco-2- und LS180- Zellen erfordert grundsätzlich aseptische Arbeitsbedingungen. Das Passagieren und der Mediumwechsel fanden daher unter einer Reinraumwerkbank (LB-48-C, Heraeus, Hanau, Deutschland) statt. In der restlichen Zeit wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % aufbewahrt bzw. kultiviert. Durch Autoklavieren wurden alle hitze-empfindlichen Verbrauchsmaterialien sterilisiert (2 bar, 121 °C, > 15 min). Glasgefäße und Glaspipetten wurden bei 220 °C für mindestens 2 h heißluftsterilisiert (Umlufttrockenschrank, Heraeus, Hanau, Deutschland). Für die Herstellung der Medien, Puffer und wässrigen Substanzlösungen wurde MilliQ-Wasser verwendet, das beim LAL-Test einen Endotoxingehalt von < 0,06 EU/ml enthielt. Alle Lösungen wurden vor Verwendung an Zellen sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße).

##### *Passagieren*

Alle 3-4 Tage wurden die Caco-2-Zellen bei einer Konfluenz von etwa 80-90 % passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) gespült. Anschließend wurden die Zellen für ca. 3 min mit einer Trypsin (0,05 %)/EDTA (0,02 %)-Lösung (L2153, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) ausgesetzt, um die Zellen vom Boden zu lösen und zu vereinzeln. Danach wurde neues Medium in die Zellkulturflasche zupipettiert, wobei das FKS das Trypsin inaktivierte. Zum Ablösen der LS180-Zellen wurden hingegen Zellschaber (P 99002, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) verwendet. Durch Auf- und Abpipettieren mit einer Pasteurpipette wurden die LS180-Zellen vereinzelt. Zur Bestimmung der Zellzahl (Anzahl der Zellen pro ml Medium) wurden die Zellen mit Tryphanblau (0,5 %; L6323, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) angefärbt und unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Zählkammer gezählt. Der Quotient aus toten, blau gefärbten Zellen und lebenden, ungefärbten Zellen ergab die Zellviabilität. Zellen mit einer Viabilität < 90 % wurden für weitere Einsaaten nicht verwendet. Für die weitere Kultivierung wurden 1-2 x 10<sup>5</sup> Zellen in neue Zellkulturflaschen eingesät.

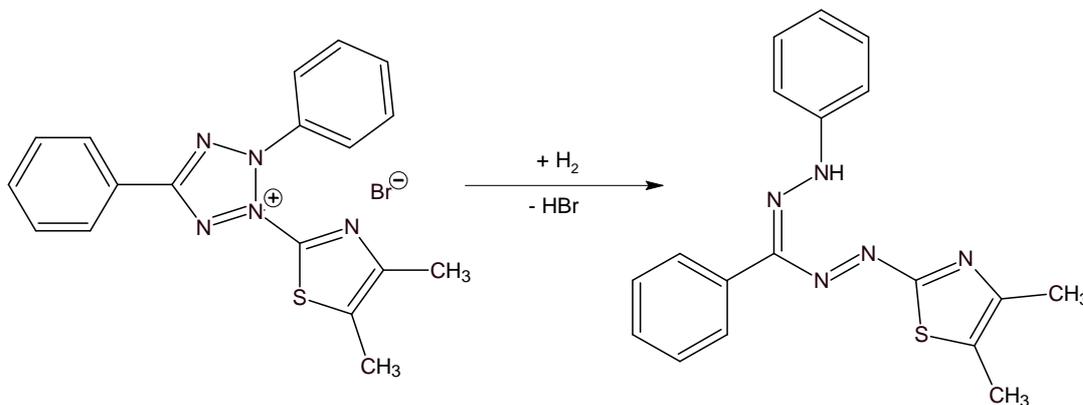
##### *Kryokonservierung*

Das Medium DMEM bzw. MEM wurde mit 20 % FKS und 20 % DMSO supplementiert und ergab das Einfriermedium. 1-10 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden mit 1 ml Einfriermedium versetzt und in

ein Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wurde zuerst für 2 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und anschließend über Nacht bei einer Temperatur von  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde das Kryoröhrchen in einem Tank mit flüssigen Stickstoff überführt. Die Aufbewahrung im Stickstofftank bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  ermöglicht eine längerfristige Lagerung.

### 3.2. *In vitro*-Toxizitätsprüfung

Zur Ermittlung geeigneter Konzentrationen der Testsubstanzen für Zellexperimente wurde die Zellviabilität in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanzen mittels MTT-Test untersucht. Der *in vitro*-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT; M5655, Sigma-Aldrich) zum blau-violett gefärbtem Formazan (Abb.12).



**Abbildung 12:** Reduktive Spaltung des gelben Farbstoffes MTT in blaues Formazan

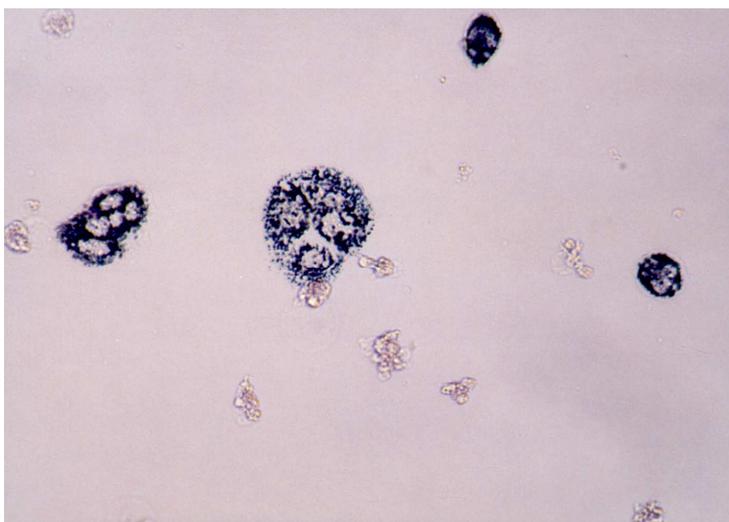
Die reduktive Spaltung des Tetrazoliumringes erfolgt nur in lebenden Zellen in Abhängigkeit von Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums oder der Succinat-Dehydrogenase. Eine Schädigung der Zellen resultiert in einer verminderten Formazanbildung gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Durch Lyse der Zellen wird das blaue Formazan freigesetzt und bei einer Wellenlänge von 550 nm photometrisch quantifiziert. Die gebildete Formazanmenge wird als optische Dichte (OD-Wert) erfasst.

Für den MTT-Test wurden semikonfluente Caco-2- oder LS180-Zellen trypsinisiert, gezählt und in 96-Well-Platten ausgesät. Die Zahl der auszusäenden Zellen wurde experimentell ermittelt. Als optimal erwies sich eine Zellzahl von 1600 Zellen/Well, da am 4. Tag nach Einsaat die Konfluenz annähernd 50 % betrug und die Messung der optischen Dichte im Anschluss des MTT-Tests einen Wert  $< 1$  ergab. Die letzte Reihe der Mikrotiterplatte enthielt keine Zellen, sondern nur Medium und diente bei der Auswertung als Leerwert (Blank). 24 h nach Einsaat erfolgte die Behandlung der mittlerweile adhärenierten Zellen mit 6 verschiedenen

Konzentrationen der Testsubstanzen als 4-fach-Bestimmung. Die Verdünnungsreihen wurden in Medium hergestellt, die Lösungsmittelkonzentration betrug  $\leq 0,1\%$ . Die Zellen für die unbehandelte Kontrolle erhielten nur Medium. Nach 48 h Inkubationszeit (Tag 3) wurde der Überstand und damit die Testsubstanzen entfernt und die Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  frischem Medium versetzt, um eine mögliche Reduktion des MTT durch die Testsubstanzen zu vermeiden. Das Medium enthält Phenolrot als pH Indikator, das jedoch mit der Messung nicht interferiert (Hansen, 1989). Nachfolgend wurde 25  $\mu\text{l}$  MTT-Lösung (5 mg/ml PBS) in jede Vertiefung hinzupipettiert und die Platte im Brutschrank bei 37 °C für 3 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Beurteilung der Formazanbildung. Auf diesem Wege können Aussagen über zytotoxische und zytostatische Effekte getroffen werden.



**Abbildung 13:** Formazanbildung bei Caco-2-Zellen. Alle Zellen leben und sind teilungsfähig. 3 d nach Einsaat wurden Caco-2-Zellen für 3 h Inkubation mit MTT inkubiert.



**Abbildung 14:** Formazanbildung bei Caco-2-Zellen. Die blau angefärbten Zellen leben, zeigen aber keine Zellteilung. Tote Zellen sind ungefärbt. 3 d nach Einsaat wurden Caco-2-Zellen für 3 h Inkubation mit MTT inkubiert.

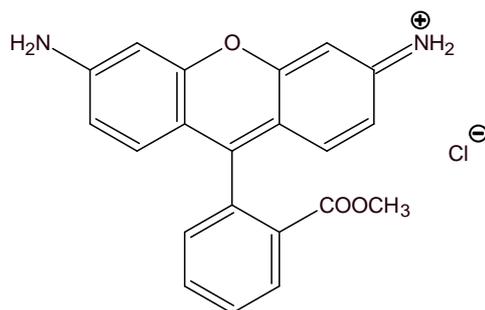
Anschließend wurde in jedes Well 75 µl einer 25 % igen SDS-Lösung hinzu gegeben und die Zellen über Nacht im Brutschrank lysiert. Am Tag 5 wurde die optische Dichte (OD) bei 550 nm mit Hilfe eines Plattenphotometers (EAR 400 AT) bestimmt. Für die Auswertung wurden die OD-Werte mit dem Blank subtrahiert ( $OD_{\text{korr.}}$ ). Die Zellviabilität wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Viabilität [\%]} = 100 \times (OD_{\text{korr. behandelte Zellen}}) / (OD_{\text{korr. unbehandelte Zellen}})$$

Die Konzentration, bei der die Zellviabilität bei 50 % liegt entspricht dem  $IC_{50}$ -Wert. Die  $IC_{50}$ -Werte wurden anhand der Überlebenskurven der jeweiligen Testsubstanzen ermittelt.

### 3.3. Rhodamin 123-Akkumulationstest

Der Test beruht auf der Akkumulation des P-gp Substrats Rhodamin 123 (RH 123) in Zellen über eine definierte Inkubationszeit in Gegenwart von Testsubstanzen. Nach Waschen und Lyse der Monolayer wird die intrazelluläre RH 123-Konzentration fluorimetrisch bestimmt. Der Zellinhalt repräsentiert den Einfluss des P-gp auf die RH 123-Akkumulation.



**Abbildung:** Struktur des Rhodamin 123

#### *Durchführung*

Zellen mit einer Konfluenz von 80-90 % wurden trypsinisiert und in eine 48-Well-Mikrotiterplatte eingesät. Die Anzahl der Zellen pro Well betrug bei Caco-2  $2 \times 10^4$ , bei LS180  $1,5 \times 10^4$  Zellen. Die Caco-2-Zellen benötigten eine Kultivierungszeitdauer von 21 d, wobei ein Mediumwechsel alle 7 d stattfand. LS180-Zellen wurden für 7 d im Brutschrank kultiviert. Bei beiden Zelllinien erfolgte alle 2 Tage eine Supplementierung des Mediums mit frischem Medium. Vor Testbeginn wurden die Zellen mit HBSS gespült, um tote Zellen, Schleim o.ä. zu entfernen und für 30 min im Brutschrank äquilibriert. Für den Test wurde das HBSS mit einer RH 123-HBSS-Lösung (+/-Testsubstanz) ausgetauscht und die Zellen für 90 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gespült und anschließend mit Triton X-100 (1 % ige Lösung in PBS) lysiert.

Sofern vorhanden wurden Luftblasen mit einer Nadel beseitigt. Der RH 123-Gehalt des Zell-Lysats wurde mit einem Plattenfluorimeter (485 Ex/530 Em) ermittelt. Der Test wurde mindestens fünfmal wiederholt und wies für jede Testsubstanz eine 4-fach-Bestimmung auf. Die gemessenen Fluoreszenzwerte spiegeln den RH 123-Zellinhalt wider.

#### *Auswertung*

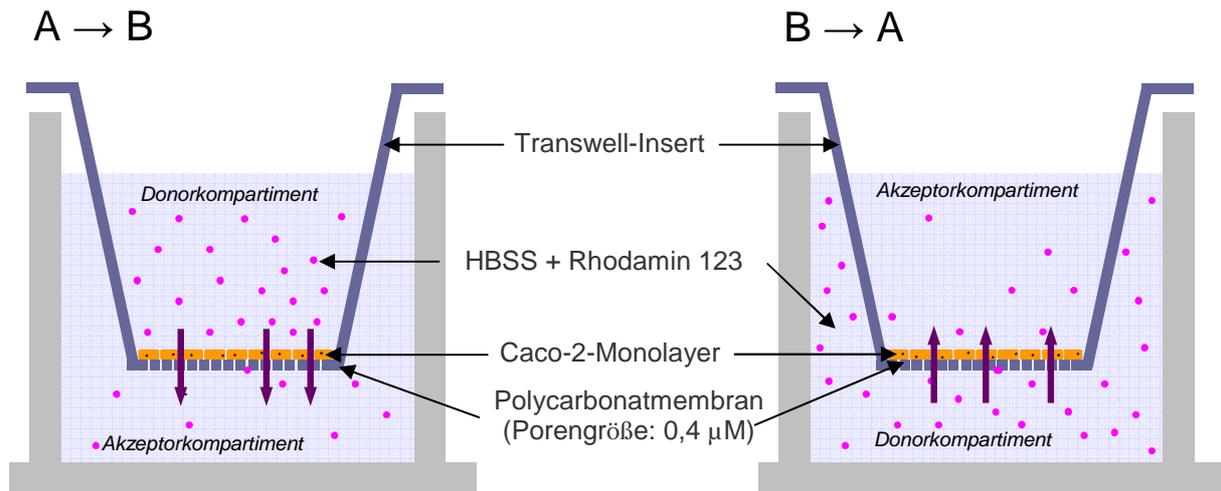
Um den Einfluss einer Testsubstanz auf die RH 123-Akkumulation zu bestimmen, wurde der Quotient aus den Fluoreszenzwerten der mit Testsubstanz inkubierten Zellen und den Fluoreszenzwerten der unbehandelten Zellen (= Kontrolle) gebildet und mit 100 multipliziert. Der so gebildete Wert wurde als RH 123-uptake [%] bezeichnet. Werte kleiner 100 % weisen auf eine Reduktion des RH 123-Zellinhalts, Werte größer 100 % auf eine Steigerung hin. Es wurden zwei Testvarianten verwendet, um zu bewerten, ob eine Testsubstanz P-gp hemmt bzw. die P-gp-Expression induziert:

**Test I:** 2 d Inkubation der Zellen mit Testsubstanz, Akkumulationstest ohne Testsubstanz  
→ *Aussagen zur Induktion*

**Test II:** RH 123-Akkumulationstest in Gegenwart der Testsubstanzen  
→ *Aussagen zur Inhibition*

### **3.4. Bidirektionale Transportstudien**

Für die Transportstudien wurden Caco-2-Zellen mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/Well auf Transwell®-Filtereinsätzen (Material: Polycarbonat, Porengröße:  $0,4 \mu\text{m}$ , Fläche:  $1,13 \text{ cm}^2$ , No. 3401, Corning costar) in 12-Well-Platten eingesät und für 21 Tage kultiviert. Eine Mediumzugabe von  $200 \mu\text{l}$  pro Well erfolgte alle 2 d, wobei jeweils nach 7 d das Medium komplett ausgetauscht wurde. Vor dem Versuch wurde das Medium entfernt, die Monolayer 2 x mit HBSS gespült und für 30 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Kontrolle der Dichtigkeit der konfluenten Monolayer wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) unter Verwendung eines Widerstandsmessgeräts (EVOMX, World Precision Instruments, Deutschland) bestimmt. Monolayer mit einem TEER kleiner als  $300 \Omega \text{ cm}^2$  wurden ausgeschlossen. Anschließend wurde das HBSS mit den jeweiligen RH 123-Probeflösungen ersetzt. Je nach Richtung des zu untersuchenden Transports wurde in eine neue 12-Well-Platte  $1,5 \text{ ml}$  HBSS oder RH 123-Probeflösung vorgelegt und die Filter, die entweder  $0,5 \text{ ml}$  HBSS oder RH 123-Probeflösung enthielten, wurden bei Versuchsbeginn in diese Platte umgesetzt. Das Kompartiment mit RH 123-Probeflösung stellte das Donorkompartiment, das Kompartiment mit HBSS das Akzeptorkompartiment dar.



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung der bidirektionalen Transportstudien mit Transwells<sup>®</sup>

Nach 15, 30, 45, 60, 90 und 120 min wurde die Akzeptorlösung vollständig entnommen und durch frisches HBSS ersetzt. Die Transportversuche erfolgten unter Sink-Bedingungen, da weniger als 10 % der Ausgangskonzentration im Akzeptorpuffer erschien. Während der Inkubationszeit befanden sich die Transwell<sup>®</sup> Platten in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und einer Rüttelgeschwindigkeit von 50-60 rpm. Abschließend wurde die Integrität der Monolayer nochmals mit der Bestimmung des TEER-Wertes überprüft. Monolayer mit TEER-Werten kleiner als 300 Ω cm<sup>2</sup> wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Die entnommenen Proben wurden am Fluoreszenzmessgerät (Cytofluor 2300, Millipore) vermessen und der Fluoreszenzfarbstoffgehalt mit Hilfe einer Kalibriergerade bestimmt. Die zu jedem Zeitpunkt durch den Filter gelangte Farbstoffmenge wurde gegen die Zeit aufgetragen und die Steigung der erhaltenen Geraden mittels linearer Regression berechnet. Der apparente Permeabilitätskoeffizient ( $P_{app}$ ) wurde nach folgender Formel berechnet.

$$P_{app} = (dQ/dt)/A \times n_0 \quad [cm/s]$$

Für die Berechnung der Absorptions- und Sekretionsquotienten wurde der Permeabilitätskoeffizient für RH 123 und der Permeabilitätskoeffizient von RH 123 in Gegenwart des nicht-kompetitiven Inhibitors Elacridar, welcher den Efflux zu 100 % hemmt, für beide Transportrichtungen ermittelt. Der Absorptions- (AQ) und Sekretionsquotient (SQ) wurden wie folgt berechnet:

$$AQ = (P_{GF,AB} - P_{AB})/P_{GF,AB} \quad SQ = (P_{GF,BA} - P_{BA})/P_{GF,BA}$$

### 3.5. Bestimmung der intrazellulären ATP-Menge

Zur Detektion des zellulären ATP-Gehalts in Caco-2- und LS180-Zellen wurde das *Luminescence ATP Detection Assay Kit* (ATPlite, Perkin Elmer) verwendet. Der Assay basiert auf der Reaktion zwischen ATP und D-Luciferin, bei der neben Oxyluciferin Licht entsteht, welches mit einem Luminometer detektiert werden kann. Die Reaktion wird durch die Luciferase in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  katalysiert.



In eine 96-Well-Platte wurden  $1,6 \times 10^4$  Zellen eingesät und für 7 d (LS10-Zellen) bzw. für 21 d (Caco-2-Zellen) kultiviert. Das Medium wurde entfernt und durch 100  $\mu$ l Substanzlösung (in HBSS) ersetzt. Die Kontrolle enthielt nur HBSS. Die Zellen wurden für 90 min mit der Testsubstanz inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und auf freigesetztes ATP quantitativ untersucht. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gespült.

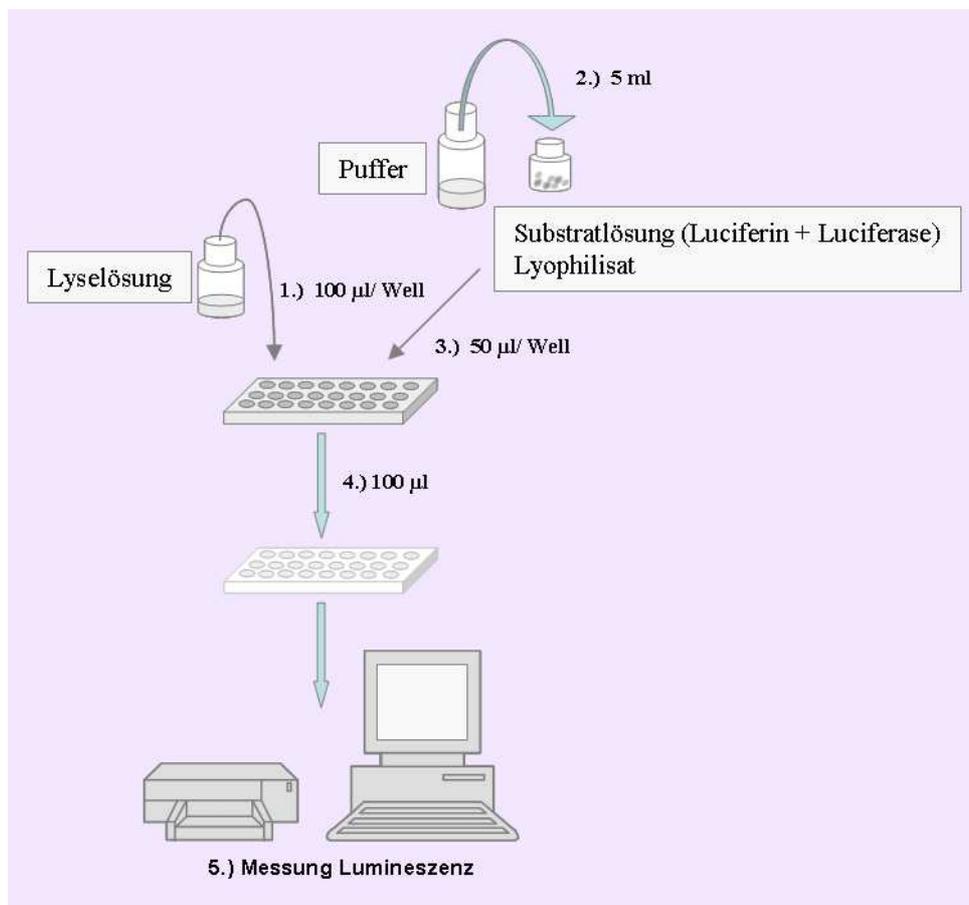


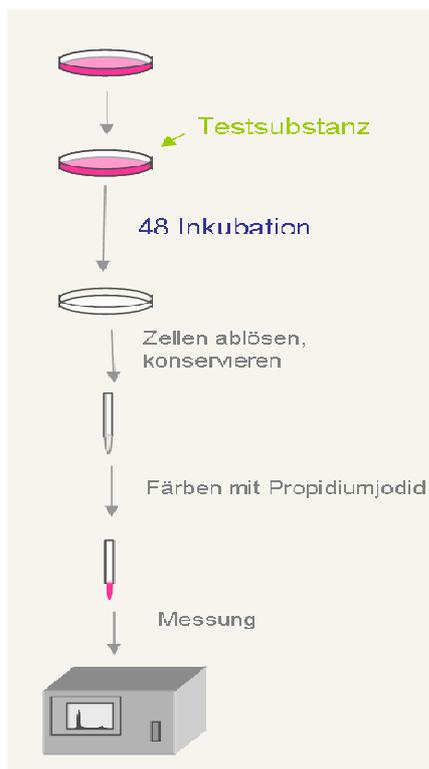
Abbildung 16: Schematischer Ablauf des ATP-Assay nach Entfernung des Überstands

Um die ATP-Zellinnenkonzentration zu bestimmen wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  Lyselösung des Kits versetzt (Abb.16, Schritt 1). Nach 10 min Schütteln auf dem Easysaker EAS 2/4 wurde 50  $\mu\text{l}$  der rekonstituierten Substratlösung zupipettiert (Schritt 2 und 3) und für weitere 10 min geschüttelt. 100  $\mu\text{l}$  Lösung wurden mit einer Mehrkanalpipette in eine weiße 96-Well-Platte (Optiplate™, Packard) überführt (Schritt 4) und für 5 min lichtgeschützt aufbewahrt. Abschließend wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt mittels des Luminometers bestimmt (Schritt 5).

### 3.6. Durchflusszytometrie zur Zellzyklusanalyse

Die Durchflusszytometrie, auch unter der Bezeichnung FACS bekannt (Fluorescence Activated Cell Sorting), ermöglicht die Detektion und Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen (oder anderen Partikeln), wenn sie in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl treten. Setzt man Fluoreszenzfarbstoffe wie Propidiumjodid und DAPI ein, welche in die DNA einer Zelle interkalieren, kann man anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität Rückschlüsse auf den Gehalt der DNA ziehen. Zeitgleich werden zusätzlich Lichtbeugungs- und Lichtstreuungseffekte gemessen. Sie geben Auskunft über die Größe der Zelle sowie intrazelluläre Strukturen (z. B. Größe des Zellkerns). Mit Hilfe dieser Parameter lassen sich Aussagen zum Zellzyklusstatus einzelner Zellen treffen.

#### Durchführung



Für die Zellzyklusuntersuchungen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in Petrischalen ( $d = 60 \text{ mm}$ ) eingesät und im Brutschrank kultiviert. 24 h nach Einsaat wurde das Medium durch eine Testsubstanz-Lösung (in Medium) ersetzt und die Zellen für 48 h mit der Testsubstanz inkubiert. Die Kontrolle erhielt nur Medium. Nach Ablauf der 48 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült und anschließend trypsinisiert. Nach Zugabe von 2 ml PBS, welches 10 % FKS zur Inaktivierung des Trypsins enthielt, wurde die Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 3 min bei  $1300 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und mit 3 ml EtOH ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) unter Zutropfen versetzt. Die so erhaltenen Proben wurden bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  konserviert. Am

Tag der Zellzyklusanalyse wurden die Proben bei  $1500 \text{ min}^{-1}$  ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen mit PBS gespült und anschließend zentrifugiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurden die Zellen in  $300 \mu\text{l}$  Propidiumjodid-Lösung aufgenommen und resuspendiert, für 30 min im Brutschrank inkubiert und abschließend mit einem FACS-Gerät (FACS Calibur, Becton Dickinson) vermessen. Die Auswertung der aufgenommenen Dot Plots und Histogramme wurde mit dem Software Programm WinMDI 2.8 vorgenommen.

### **3.7. Bestimmung des Proteingehalts von P-Glykoprotein**

#### **3.7.1. Gewinnung der Proteinproben**

In eine 12-Well-Platte wurden  $2 \times 10^5$  Zellen eingesät und für 19 d (Caco-2) bzw. für 6 d (LS180) im Brutschrank kultiviert. Ab dem Tag 6 bzw. 19 wurden die Zellen für 48 h mit der Testsubstanz (Lösung in Medium) inkubiert. Am Tag 21 bzw. 8 wurden die Zellen nach der Vorschrift von Collet aufgearbeitet (Collet et al., 2004). Zuerst wurden die Zellen mit PBS gespült und mit einem Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Kapitel 7.5.) 30 min lysiert. Bei der Lyse werden zelluläre Proteasen freigesetzt, so dass die Gefahr der Proteindegradation besteht. Durch Zugabe eines Protease-Inhibitor-Cocktails zum Lysepuffer und Ablauf der Lyse im Kühlraum bzw. auf dem Eisbad kann dies vermieden werden. Nachdem die Platte für 3 sec ins Ultraschallbad kam, wurde die Platte 30 min bei  $13.000 \times g$  und einer Temperatur von  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert und der Probenüberstand in kleine Eppendorfgefäße überführt. Nach Entnahme einer Proteinprobe von  $25 \mu\text{l}$  wurden die Proben bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren und aufbewahrt. Der Proteingehalt der Proben erfolgte mit dem BCA-Assay.

#### **3.7.2. BCA-Assay**

Der BCA-Assay ist eine gebräuchliche Methode zur quantitativen Bestimmung des Proteingehalts, welche von Smith et al. 1985 beschrieben wurde. Das Prinzip beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine in alkalischer Lösung mit anschließender Bildung eines violett gefärbten Komplexes mit Bicinchoninsäure (BCA), welcher bei  $562 \text{ nm}$  photometrisch vermessen wird. Der Assay wurde mit einem kommerziell erhältlichen BCA-Kit (BCA1, Sigma-Aldrich, Deutschland) anhand des Standardprotokolls für eine 96-Wellplatte durchgeführt. Dazu wurden  $25 \mu\text{l}$  einer Proteinprobe in ein Well pipettiert und mit  $200 \mu\text{l}$  BCA-Arbeitslösung versetzt, gemischt (Easysshaker EAS 2/4) und die Platte bei  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  für 15 min inkubiert (BM 200 Inkubator, Memmert, Deutschland). Nach Abkühlen auf Raum-

temperatur wurde der gebildete Farbkomplex bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einem Plattenphotometer (EAR 400 AT) vermessen. Der Proteingehalt der Probe wurde anhand einer Kalibriergeraden, welche den Konzentrationsbereich von 200-1000 µg/ml abdeckte, bestimmt. Die Konzentrationen der Bestandteile des Lysepuffers lagen unterhalb der maximal erlaubten Konzentration, so dass mit keinen nennenswerten Interferenzen zu rechnen war.

### **3.7.3. Probenvorbereitung**

Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden aufgetaut. Das berechnete Probenvolumen mit einem Proteingehalt von 20 µg Gesamtprotein wurde mit Dithiothreitol versetzt (1/3 des Probenvolumens) und für 5 min auf einem Heizblock bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurde das gesamte Probenvolumen in eine Geltasche eines SDS-Polyacrylamid-Gels pipettiert.

### **3.7.4. Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung des Proteingemischs nach ihrem Molekulargewicht wurden die Proben einer Gelelektrophorese in einem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE 7,5 %) unterworfen. Dazu wurde das Trenngel frisch hergestellt und zwischen zwei Glasplatten pipettiert, mit Isopropanol überschichtet und für 20 min ausgehärtet. Das Sammelgel wurde nach Entfernen des Isopropanols über das Trenngel pipettiert. Das luftblasenfreie Stecken der Kämme erfolgte im Anschluss. Anschließend wurde das Gel abermals für 20 min getrocknet bzw. auspolymerisiert.

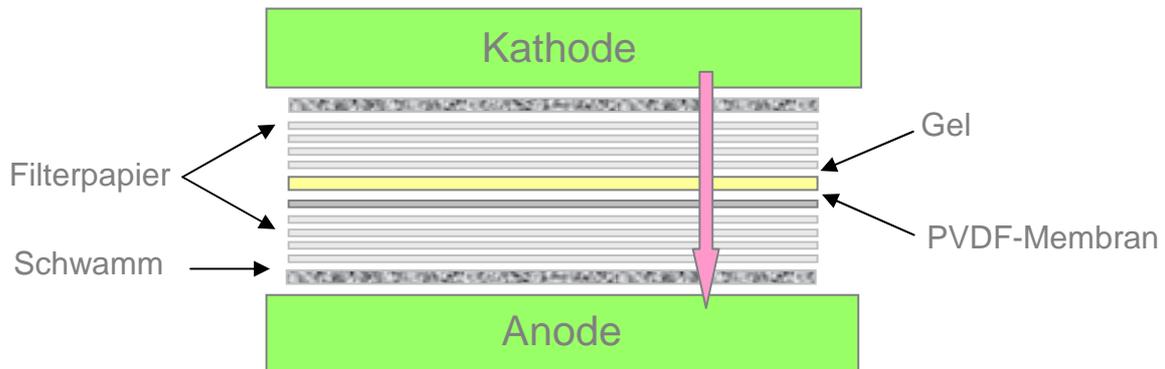
Die fertigen Gele wurden in die Elektrophoresekammern gestellt und diese mit Laufpuffer befüllt. Anschließend wurden die Proben aufgetragen. Mit Hilfe eines Biometra Standard Power Pack P25 wurde ein Strom von 35 mA bis zum Passieren des Sammelgels, danach von 125 mA angelegt

### **3.7.5. Western Blot**

Bei diesem Schritt wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran durch Anlegen eines elektrischen Feldes (100 mA) über Nacht im *semi-dry*-Verfahren transferiert (elektrophoretische Elution).

Zuerst wurden die Gele aus der Elektrophoresekammer genommen und zusammen mit den zurechtgeschnittenen Filterpapieren und Schwämmen für 15 min in Blottpuffer gelegt. In der Zwischenzeit wurden die PVDF-Membranen nachfolgend in Methanol, Aqua bidest und

Blotpuffer äquilibriert. Der Aufbau der Transferapparatur erfolgte entsprechend der Abbildung 17. Als Elektroden dienten hierbei Platindrähte im Puffertank.



**Abbildung 17:** Zusammensetzung des Blotsandwichs für den Transfer von Proteinen

### *Immundetektion der transferierten Proteine und Entwicklung der Blots*

Zur Vermeidung einer unspezifischen Adsorption der Antikörper an Membran wurden am nächsten Tag die nicht besetzten Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert. Als Blocklösung wurde eine Lösung aus 5 % Magermilchpulver (Sucofin®) in TBST verwendet. Die Membranen wurden für 1 h in jeweils 50 ml Blocklösung bei etwa 30 rpm geschüttelt (Heidolph Duomax 1030). Danach wurde die Milch entfernt und die Membranen dreimal mit TBST für je 5 min geschüttelt. Nach diesem Waschschrift wurden die Membranen mit dem primären Antikörper C219 anti-Pgp (1:400 Verdünnung) für 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Vor und nach Zugabe des mit Meerrettichperoxidase markiertem sekundären Antikörpers (1:1000 Verdünnung) für 1 h wurden die Membranen abermals dreimal mit TBST gewaschen. Zur Sichtbarmachung der markierten Proteinbanden wurden die Membranen für 1 min mit dem LumiGlo®-Kit (enthält Luminol und Peroxid-Reagenz) versetzt. Die Membranen wurden zwischen zwei transparenten Folien gelegt, mit einem X-ray-Film bedeckt und der Film in einer Kassette zwischen 20 sec und 1 min belichtet. Danach wurde der Film im Entwickler geschwenkt bis die Banden sichtbar waren, anschließend mit Wasser gespült und fixiert.

### **3.8. Herstellung der Maillard-Reaktionsprodukte**

Die COST (European Cooperation in the field of Scientific and Technical Research) führte 1999 eine Vorschrift zur Herstellung von Melanoidinen ein (COST Action 919), um Einflüsse unterschiedlicher Herstellungsmethoden auf Forschungsergebnissen zu reduzieren und damit eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Als Standard-MRP-Modell-Gemisch ist eine 0,05 molare Lösung aus Glucose und Glycin vorgesehen, welches nach 120 min Erhitzen bei

125 °C im wasserfreien Milieu erhalten wird. In Anlehnung an die Herstellungsvorschrift nach COST 919 wurden weitere Zucker-Aminosäure-Mischungen hergestellt. Als reduzierende Zucker wurden D-Glucose, D-Fructose und Lactose eingesetzt, welche mit den L-Aminosäuren: Glycin, Prolin, Serin, Asparagin, Asparaginsäure, Tryptophan und Arginin gemischt wurden. Zur Herstellung der einzelnen Zucker-Aminosäure-Mischungen wurden äquimolare Mengen des reduzierenden Zuckers und der L-Aminosäure eingewogen und in 20 ml Milli-Q-Wasser im Ultraschallbad vollständig gelöst. Die Lösung wurde über Nacht bei -80 °C eingefroren und nachfolgend in einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-4, Christ, Osterode, Deutschland) lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in einem offenen 25 ml Becherglas für exakt 120 min bei 125 °C erhitzt (Umlufttrockenschrank Heraeus, Hanau, Deutschland), anschließend im Kühlraum bei 4 °C abgekühlt und für 10 min gemörsert. Die Proben wurden bei -80 °C aufbewahrt. Die MRP-Gemische wurden anschließend einer Lösungsmittelextraktion unterworfen. Zuerst wurden die wasserlöslichen Bestandteile extrahiert. Dafür wurden 4 g Pulver dreimal mit je 40 ml Wasser versetzt und bei Raumtemperatur je 1 h geschüttelt (THYS 2, VEB Labortechnik, Ilmenau, Deutschland). Nach jedem Vorgang wurde die Suspension 5 min bei 1500 min<sup>-1</sup> zentrifugiert, der Überstand abgenommen und gesammelt. Die wässrigen Auszüge wurden nach Einfrieren lyophilisiert und bei -80 °C aufbewahrt. Aus dem wasserunlöslichen Rückstand wurde 3 x mit 96 % igem EtOH die ethanollösliche Fraktion gewonnen. Abschließend wurde das Lösungsmittel Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt und der so gewonnene Rückstand bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.9. Gaschromatographie

Zur quantitativen Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren in den Maillard-Proben stand ein Gaschromatograph der Firma Hewlett Packard (HP 5890 Serie II) mit Autosampler (HP 7673 A) und Flammenionisationsdetektor (FID) zur Verfügung. Als Trennsäule diente eine Carbowax 20 M (Polyethylenglykol, Molekulargewicht: 20000) mit einer Länge von 30 m und einem Durchmesser von 0,32 mm. Als Trägergas wurde Stickstoff verwendet, wobei die Flussrate während des Laufs 2,7 ml/min betrug. Die Proben wurden im Injektor bei 250 °C verdampft. Während des Laufs von 28,5 min Dauer erhöhte sich alle 4 min die Initialtemperatur von 90 °C auf eine Endtemperatur von 180 °C. Die Detektortemperatur betrug 300 °C.

Zur quantitativen Bestimmung der SCFAs wurden für Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure Kalibriergeraden im Bereich von 1 bis 12 mg/ml erstellt.

---

Die Maillard-Proben wurden zu je 10 mg/ml in Milli-Q-Wasser ( pH < 4) gelöst. Die Proben wurden angesäuert, um die Salze der SCFAs quantitativ in die freie Säure zu überführen. Zur Vorabtrennung hochmolekularer Verbindungen wurden die Proben mit einem Filter der Porengröße 0,45 µm filtriert. Alle Proben, einschließlich der Proben für die Kalibriergerade, wurden fünfmal gaschromatographisch gemessen.