

## VI. Methoden

### 1. Zellkultur

#### 1.1 Allgemeine Techniken

Die Arbeit mit den Zellkulturen erfolgte an einer Bio-48-Sterilbank. Verwendung fanden sterile Einwegartikel oder autoklavierte Glaswaren. Sterilbank und Pipettierhilfen wurden täglich mit 70 % Ethanol desinfiziert.

Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem Zellinkubator des Typs B 5060 EC gezüchtet und in zweitäglichen Abständen unter einem Olympus CK2-Invertmikroskop auf Vitalität, Dichte und eventuelle Kontaminationen kontrolliert. Bei Bedarf wurden die Zellen gespalten und das Medium gewechselt.

#### 1.2 Zellkulturmedium

Die Zellen wurden in folgenden Medien kultiviert:

- *HCT116*, *LS174T*, *Co115* und *SW480* in DMEM + 10 % FCS
- *HCT116 p53<sup>-/-</sup>* in DMEM + 10 % FCS + G418 (0,4 mg/ml) + Hygromycin B (0,1 mg/ml)
- *HCT8* und *HT-29* in RPMI + 10 % FCS
- *HCT15* in RPMI + 20 % FCS
- *WiDr* in MEM + 10 % FCS
- *SW48* in Leibovitz + 10 % FCS

#### 1.3 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Zum Auftauen erwärmt man die Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad, suspendiert sie langsam in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen in 10 ml kaltem Medium und zentrifugiert 5 Minuten bei 400 x g. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in 5 ml frisches Medium resuspendiert. Anschließend verteilt man sie in Zellkulturflaschen. Um die toten Zellen zu entfernen, wird das Medium am folgenden Tag erneuert.

Zum Einfrieren der Zellen muss man sie erst passagieren, d. h., die Zellen werden zuerst in 5 ml Trypsinpuffer gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin für 5 Minuten inkubiert. Anschließend werden sie in 10 ml Medium aufgenommen, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Abschließend wird der Überstand entfernt und die Zellen werden in 1 ml kalter Lösung aus 80 % FCS und 20 % DMSO aufgenommen. Während des langsamen Einfrierens bei -70 °C verhindert das DMSO die Wasserkristallisation innerhalb der Zellen. Nach dem Einfrieren werden die Zellen in flüssigen Stickstoff bei -196 °C überführt.

#### 1.4 Kultivierung von Zellen

Alle zwei bis drei Tage werden die Zellen unter sterilen Bedingungen mit frischem Medium versorgt und alle vier Tage passagiert. Nach Aufnahme der Zellen in Medium wird die gewünschte Menge an Zellen zurück in die Flasche gegeben.

#### 1.5 Zellzahlbestimmung

Für die Aussaat einer bestimmten Anzahl von Zellen für ein Experiment werden die Zellen passagiert. Bei einer 20-fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop werden die Zellen in einer Zählkammer (Hämatocytozometer) gezählt. Je nach Art des Experiments werden 0,01 bis  $0,1 \times 10^6$  pro  $\text{cm}^2$  in Petrischalen ausgesät. Zur Bestimmung der Vitalität werden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und der Prozentsatz der blauen, toten Zellen bestimmt.

## 2. Proteinchemie, Immunchemie, Molekularbiologie

### 2.1. Lysatherstellung

Mittels Zellschaber werden die adhärennten Zellen abgeschabt und mit den im Medium flottierenden Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben, 5 Minuten bei  $400 \times g$  zentrifugiert, das Sediment in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Vorgang wird wiederholt. In Abhängigkeit von der Größe des Sedimentes werden die Zellen mit einem bestimmten Volumen des Lyse-Puffers (Sato et al. Oncogene, 2002, 21, 1727–1738) resuspendiert, gemischt und 15 Minuten in Eis gestellt. Danach wird für 25 Minuten bei  $13.000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt, davon  $5 \mu\text{l}$  für die Proteinbestimmung entnommen und der Rest mit  $5 \times$  DTT Probenpuffer im Verhältnis 4:1 versetzt, 5 Minuten gekocht, kurz zentrifugiert und bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmungsmethode nach Bradford basiert auf der Farbveränderung in Lösungen mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. Das Absorptionsmaximum für eine saure Lösung von Coomassie Brilliantblau verschiebt sich von 465 auf 595 nm, wenn eine Proteinbindung zustande kommt. Aus einer Rinderalbuminlösung mit bekannter Konzentration von 2 mg/ml wird eine Verdünnungsreihe hergestellt und zur Herstellung der Standardkurve verwendet.

Nach Zugabe des Farbstoffes werden die Standardproben gemischt und für 5 Minuten inkubiert, anschließend ihre optische Dichte bei 595 nm in einem Photometer bestimmt. Die Proben mit den unbekanntem Proteinkonzentrationen werden ebenfalls gemessen. Anhand der Standardkurve erfolgt die Bestimmung ihrer Konzentrationen.

### 2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Trenngel wird zwischen zwei Glasplatten im Abstand von einem Millimeter gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach Verfestigung des Trenngels wird das überschichtete Wasser entfernt und das Sammelgel (3 %) aufpolymerisiert. Das fertige Gesamtgel wird in eine Elektrophoreseapparatur (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) eingesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Während der Gelherstellung wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 100 °C denaturiert. Als Marker diente ein Farb-Molekulargewichtsmarker (Wide Range, # C3437, Sigma). Die elektrophoretische Auftrennung wird ca. 1 ½ Stunden bei einer Spannung von 100 V durchgeführt.

Sobald der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht, wird die Elektrophorese beendet und das Gel 10 Minuten in 4 °C kalten Blotpuffer gelegt.

### 2.4. Western Blot

Die separierten Proteine werden durch das Western Blotting in einer mit Blotpuffer gefüllten Blotkammer auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran transferiert. Unter Kühlung mit Eis wird die Blotkammer zwei Stunden an einen Strom der Stärke 0,2 mA angeschlossen.

Nach Beenden des Blottens wird die PVDF-Membran mit 5 % Magermilchpulver in 0,1 % Tween-20 in PBS- oder TBS-Puffer eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch abgesättigt, um die unspezifischen Antikörperbindungen zu verhindern. TBS-Puffer wird genutzt bei phosphorylierten Proteinen. Nach dem Waschen mit 0,1 % Tween-20 in PBS oder TBS wird die Membran über Nacht bei 4 °C auf einem Schütteltisch mit dem ersten Antikörper gegen das gesuchte Protein inkubiert. Die verwendeten Antikörper werden in Tabelle 4 beschrieben.

<b>Antigen</b>	<b>Molekulargewicht des Antigens (kDa)</b>	<b>Herkunft und Antikörperklasse</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Verdünnung oder Endkonzentration</b>
β-Aktin	40	Maus	Sigma	A-5441	1:200.000
Bcl-XL	25–29	Maus (IgG2a)	Pharmingen	66461A	1:500 in 1 % Magermilch, 2. AK 1:1.500 in 1 % Magermilch
Cyclin D1	33	Maus (Ig)	Neomarkers	RB-010-80	(1:3.000)

E2F-1	60	Maus (IgG2a)	Santa Cruz	sc-251 (KH 95)	(1:200)
Mps1	97	Maus (IgG1)	Upstate/Biomol	05-682	1:2000 in 1% Magermilch, 2. AK1:1500 in Magermilch
p21	21	Kaninchen (IgG)	Santa Cruz	sc-397	200 µg/ml (1:5.000)
p53 Protein	53	Maus (IgG (mAB DO-7))	Dako	M 7001	1:3.000 (Ascites)
PARP	89	*intaktes 116 *fragmentiert Maus (IgG)	Pharmingen	556362	(1:4.000)
PARP p85 Fragment	85	Kaninchen (IgG)	Promega	G7341	(AK 1:1 in Glycerin vorverdünnt) Western Blot: 1:2.500 Histochemie: 1:50
Retinoblastom Protein (Rb)	120	Maus (IgG)	Pharmingen	14001	Blockiere 1. bei 4 °C mit Magermilch, 1. AK 1:500 3 h bei Raumtemperatur
STAT3 Protein	85	Kaninchen (Ig)	NEB cell signaling	9132	1:2000 in 1% Magermilch, 2. AK1:1500 in Magermilch
p-STAT3 (Ser727)	92	Kaninchen (Ig)	NEB cell signaling	9134S	1:1.000 in 5 %TBST
p-STAT3 (Tyr705)	92	Maus (IgG2b)	Santa Cruz	sc 8059	1:500 in 1 % Magermilch, 2. AK 1:1.500 in 1 % Magermilch
γ-Tubulin		Maus (IgG1)	Sigma	T-6557	Für Histochemie: (1:500)

Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % Tween-20 in PBS oder TBS wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper, der ein Peroxidase-konjugiertes Ziegenimmunglobulin gegen Maus IgG oder Kaninchen IgG ist, eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Die verwendeten konjugierten Antikörper werden in der Tabelle 5 beschrieben.

<b>Tabelle 5: Antikörperkonjugate</b>					
<b>Spezifität</b>	<b>Konjugiert mit</b>	<b>Herkunft und Antikörperklasse</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Verdünnung oder Endkonzentration</b>
Kaninchen IgG	Peroxidase	Ziege (IgG (H+L))	Dianova	111-035-003	(1:1.500)
Kaninchen IgG	Biotin	Esel (IgG (H+L))	Dianova		(1:400)
Maus IgG	Peroxidase	Ziege (IgM + IgG)	Dianova	115-035-044	(1:3.000)
Maus IgG	Biotin	Esel (IgG (H+L), F(ab)2)	Dianova	715-066-150	(1:400)
Biotin	Streptavidin Cy3		Dianova	016-160-084	(1:400)

Zur Detektion der Peroxidaseaktivität wird die Membran nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % Tween-20 in PBS oder TBS fünf Minuten mit einer Substratlösung (Super Signal von West Pico) inkubiert und die Lumineszenz des Produktes durch Belichten eines Films (T-Mat Plus DG) für 1–60 Sekunden mit der Membran dokumentiert. Um die relative Proteinexpression zu bestimmen, wird der Film in einem Scanner (von BIO-RAD) ausgewertet und die Bandenintensität mit dem TINA *software* Programm berechnet.

## 2.5. Isolation der Plasmid-DNA mit Qiagen-Säulen

Die Plasmidextraktion erfolgte mit einem Plasmid-Isolierungs-Satz von Qiagen. Plasmidhaltige Bakterienklone wurden auf Ampicillin-LB-Platten zur Vereinzelnung ausplattiert und ein Klon in 100 ml Ampicillin-haltigem (100 µg/ml) LB-Medium über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugieren mit 6.000 x g für 10 Minuten bei 4 °C wurde das Sediment in 4 ml des Puffers P1 aufgenommen und durch Zugabe von 4 ml eines NaOH- und SDS-haltigen Puffers (P2) sowie Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter alkalischen Bedingungen lysiert. Das Lysat wurde durch Zugabe von 4 ml Kaliumazetatlösung (P3) neutralisiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 30 Minuten mit 12.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde noch einmal 10 Minuten mit 12.000 x g zentrifugiert und dann auf eine mit dem mitgelieferten Puffer QBT-äquilibrierte Chromatographiesäule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml des Waschpuffers (QC) wurde die DNA mit 5 ml Elutionspuffer (QF) eluiert und mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurde bei 4 °C und 12.000 x g (Zentrifuge JA2-21 mit Rotor JA20, Beckmann) für 30 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, wenige Minuten

getrocknet, in 100 µl sterilem Wasser oder Tris Puffer (pH 8,0) aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Die Qualität der eluierten Plasmide (1–2 µg) wurde durch Restriktionsverdau (10 µl der Plasmidlösung) und Elektrophorese überprüft.

## 2.6. Isolation von RNA aus Zellen

Für die RNA-Isolierung aus Zellkulturen wurden die Zellen durch Zugabe von 200–300 µl RNA-Clean lysiert. Nach Zugabe von 100–200 µl Chloroform wurde das Homogenat durch mehrmaliges Umdrehen gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde anschließend zur Trennung der Phasen 15 Minuten bei 12.000 x g (4 °C) zentrifugiert und die obere wässrige, RNA-haltige Phase abgehoben. Nach Zugabe von Isopropanol im Verhältnis 1:1 wurde die Mischung 15 Minuten bei 4 °C inkubiert sowie danach 15 Minuten bei 12.000 x g (4 °C) zentrifugiert. Das RNA-Sediment wurde mit 75 % Ethanol gewaschen und mit 7.500 x g (4 °C) acht Minuten zentrifugiert. Nach einem kurzen Trocknungsschritt bei 37 °C wurde die RNA in ca. 25–50 µl Depc (Diethyl-pyrocyanat) -H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei –70 °C gelagert.

## 2.7. RT-PCR

Für den sensitiven Nachweis der Expression bestimmter Transkripte mithilfe der RT-PCR wurde zuerst nach der in Abschnitt 3.2. beschriebenen Methode die RNA präpariert. Nach Konzentrationsbestimmung und visueller Kontrolle in einem Agarosegel wurden 50 ng RNA und 0,6 µM des entsprechenden gen-spezifischen Primers für die RT-PCR eingesetzt, wobei der OneStep-RT-PCR-Satz (Qiagen) benutzt wurde.

## 2.8. Restriktionsverdau

In einem 20-µl-Ansatz wurden 500 ng DNA, eine entsprechende Menge Restriktionspuffer (gewählt passend zum jeweiligen Enzym) und 5 U des Restriktionsenzym verwendet. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die Analyse des geschnittenen DNA im Agarosegel.

## 2.9. Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA oder RNA gemäß ihrer Größe im Agarosegel erfolgte in einer horizontalen Gel-Elektrophoreseapparatur. Die gewählte Agarosekonzentration lag je nach gewünschtem Trennbereich zwischen 0,7 und 3 %. Als Standard wurde eine 1,5%ige Konzentration gewählt. Nach dem Lösen der Agarose in 1 x TBE-Puffer durch Kochen wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml) zugegeben (die Temperatur sollte zu diesem Zeitpunkt unter 60 °C liegen), das Gel gegossen und gekühlt. Die Proben wurden mit DNA-

---

Probenpuffer versetzt. Für den Lauf wurde eine Spannung von 100 V über einem Zeitraum von ca. 0,5–1 Stunde angelegt. Das Gel wurde später auf einem UV-Leuchtschirm fotografiert.

### **3. Zellbiologie**

#### 3.1. Immunhistochemie

##### 3.1.1. Anfertigung von Cytospins

Die Zellen werden passagiert, einmal mit PBS gewaschen und dann gezählt. Anschließend werden sie in PBS aufgenommen, sodass eine Zellsuspension von ca.  $1 \times 10^6$ /ml entsteht. Zunächst werden 50  $\mu$ l PBS drei Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Schließlich werden 50  $\mu$ l Zellsuspension für fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Abschließend werden die Objektträger aus der Zentrifuge entnommen und 30 Minuten oder länger bei Raumtemperatur getrocknet. Bevor die Objektträger für die Aufbewahrung bei  $-20$  °C oder  $-70$  °C gestellt werden, fixiert man sie für 10 Minuten mit Azeton.

##### 3.1.2. Kernfärbung mit DAPI

Bevor die aufgetauten Objektträger für 10 Minuten in eiskaltes Methanol gestellt werden, wird mit einem DAKO-PEN ein Kreis um den Zellbereich gemalt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wird 80  $\mu$ l DAPI-Lösung (DAPI in PBS, 0,5  $\mu$ g/ml) pro Objektträger pipettiert und 15 Minuten in einer verdunkelten Glasbox inkubiert. Anschließend werden sie zweimal mit PBS gewaschen und in destilliertem Wasser stehen gelassen. Mit Fluoromount G werden die Objektträger eingedeckt. Die Deckgläser werden nur leicht angedrückt, ohne die Zellen zu zerquetschen.

##### 3.1.3. Allgemeine Methodik der Fluoreszenzfärbung der Zellen

Bevor die aufgetauten Objektträger 15 Minuten in Lsg. A (siehe entsprechende Färbung) gestellt werden, wird mit einem DAKO-PEN ein Kreis um den Zellbereich gemalt. Sie werden dreimal mit TBS gewaschen und anschließend 10 Minuten in Lsg. B gestellt. Dann wird wieder dreimal mit TBS gewaschen, bevor die Objektträger für 20 Minuten in Lsg. C blockiert werden. Lsg. C wird durch Abtropfen entfernt und der erste Antikörper in Lsg. C auf die Zellen pipettiert und für 60 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS wird der zweite biotinylierte Antikörper in Lsg. C auf die Zellen aufgetragen und für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wird dreimal mit TBS gewaschen, bevor das Streptavidin-Cy3 1:400 in Lsg. C pipettiert und 20 Minuten inkubiert wird. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS wird 10 Minuten mit DAPI (0,5  $\mu$ g/ml in PBS) inkubiert. Abschließend wird dreimal mit TPS

gewaschen und die Objektträger werden in destilliertes Wasser gestellt, bevor sie mit Fluoromount G eingedeckt werden.

#### 3.1.3.1. PARP-Färbung

Folgende Lösungen werden benötigt:

Lsg. A = 4 % Formaldehyd in TBS

Lsg. B = 0,5 % Triton X 100 in TBS (500 µl Triton X100 in 100 ml TBS)

Lsg. C = Blockierungslösung (5 % Eselserum + TBS + 0,1 % Tween)

#### 3.1.3.2. Zentrosomenfärbung mit anti- $\gamma$ -Tubulin

Folgende Lösungen werden benötigt:

Lsg. A = eiskaltes Methanol (-20 °C)

Lsg. B = 0,5 % Triton X 100 in TBS (500 µl Triton X100 in 100 ml TBS)

Lsg. C = Blockierungslösung (5 % Eselserum, 0,1 % Triton X100 in TBS)

#### 3.1.3.3. Doppelfärbung der adhärenen Zellen mit anti-Mps1 und anti- $\gamma$ -Tubulin

Folgende Lösungen werden benötigt:

Lsg. A = Fixierungs- und Permeabilisierungslösung (4 % Formaldehyd + 1 mM MgCl<sub>2</sub> + 0,5 % Triton X100 in PBS)

Lsg. B = Blockierungslösung (5 % Eselserum, 0,1 % Triton X100 in TBS)

Das Medium wird von den Schalen abgenommen und vorsichtig mit PBS zweimal gewaschen. Bevor die Zellen 10 Minuten mit der Lsg. A bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert werden, wird mit einem DAKO-PEN ein Kreis um den Zellbereich gemalt. Dann wird die Lsg. A entfernt, dreimal mit PBS gewaschen und sofort weiter gefärbt oder die Schalen bei 4° C in PBS aufbewahrt. Anschließend wird mit Lsg. B für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer blockiert. Der Maus-anti- $\gamma$ -Tubulin-Antikörper wird 1:500 und der Kaninchen-anti-Mps1-Antikörper 1:2.000 in Lsg. B verdünnt, auf den Zellbereich pipettiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es wird anschließend dreimal mit TBS gewaschen und die beiden zweiten Antikörper (anti-Maus IgG-Biotin vom Esel und anti-Kaninchen IgG-Cy3 vom Esel) werden 1:400 in Lsg. B verdünnt, auf den Zellbereich pipettiert und 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Abschließend wird erneut dreimal mit TBS gewaschen und schließlich 10 Minuten mit DAPI (0,5 µg/ml in PBS) inkubiert. Zum Schluss wird dreimal mit TPS gewaschen



und die Schalen werden mit destilliertem Wasser überschichtet, bevor sie mit Fluoromount G eingedeckt werden.

### 3.2. Transiente Transfektion

#### 3.2.1. Transiente Überexpression von Plasmid-kodierten Proteinen

Zur transienten Überexpression eines Proteins wurde die Transfektion mit der cDNA des jeweiligen Genes durchgeführt. Das Fugene 6 Reagenz (Roche Molekular Biochemicals, Mannheim, Germany) wurde nach dem Protokoll des Herstellers benutzt. Für die Transfektion wurde 2–4 µg Plasmid DNA/0,2 x 10<sup>6</sup> Zellen verwendet.

#### 3.2.2. Transiente Suppression von selektierten Genen

Die selektive Suppression von Genen wurde durch die Benutzung von Gen-spezifischen siRNAs (*small interfering RNAs*) erreicht. Für die Transfektion wurde das Oligofectamine Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Um eine maximale Suppression zu erhalten, wurde die Menge der benutzten siRNA pro 0,1 x 10<sup>6</sup> Zellen für jedes untersuchte Gen optimiert.