

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Kultivieren von Zellen

Die Nierenkarzinomzelllinien A498, SN12 und ACHN (Referenzen für die verwendeten Zelllinien siehe unter 2.2) wurden nach Anleitung der American Type Culture Collection (ATCC) in Earle's MEM, ergänzt mit 20mM Glutamin und 10% FKS, kultiviert und bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert.

Unter sterilen Bedingungen wurden die Zellen einmal wöchentlich umgesetzt. Dabei wurde das alte Zellmedium dekantiert und die Zellen mit 10ml PBS gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurden die Zellen durch Inkubation (2min) mit 5ml Trypsin von der Kulturflasche abgelöst. Im Anschluss wurde durch Zugabe von 15ml Waschmedium, das FKS enthält, die Proteaseaktivität des Trypsins gestoppt.

Im weiteren Verlauf wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10min bei 1400rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5ml Medium resuspendiert. Davon wurde ein Milliliter zusammen mit 24ml frischem Medium in einer neuen Zellkulturflasche angesetzt.

Bestimmung der Zellzahl

Nach einer zehnmütigen Zentrifugation der Zellen bei 1400rpm erfolgte das Mischen von 20µl der Zellen mit 20µl Trypanblau. Mit 7,5µl aus diesem Gemisch wurden eine Zählkammer beladen und vier Quadranten ausgezählt.

In die anschließende Berechnung der Zellzahl pro Milliliter gingen der Verdünnungsfaktor (2), die Anzahl der ausgezählten Quadranten der Zählkammer (4), der Faktor der Zählkammer (10⁴) und die gezählte Zellmenge ein:

$$\frac{\text{gezählte Zellmenge}}{4} \times 2 \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Für jeden Versuchsansatz wurden 1×10^6 Zellen in 25cm^2 Kulturflaschen oder in 6-well-Platten ausgesät. Nachdem die Zellen sich im Durchschnitt ein- bis zweimal geteilt hatten, wurden sie mit Butyrat (0,1, 1 und 10mM), Valproat (0,1, 1 und 10mM) und Trichostatin A (0,1, 1 und $10\mu\text{M}$) über einen Zeitraum von 24h und 48h behandelt und unter den oben genannten Bedingungen kultiviert und inkubiert.

Ernten der Zellen

Nachdem die Zellen standardmäßig durch Trypsin von der Kulturflasche abgelöst worden waren, erfolgte eine zehnmündige Zentrifugation bei 1400rpm. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit 10ml PBS gewaschen und 10min bei 1400rpm zentrifugiert.

Danach schloss sich die Resuspendierung der Pellets in 1ml PBS an. Das Volumen wurde auf zwei Eppendorfröhrchen zu je $500\mu\text{l}$ aufgeteilt, wobei eines der Zellpellets zur Protein-, das andere zur RNA-Aufarbeitung verwendet wurde.

Im Anschluss wurden die Eppendorfröhrchen bei maximaler g-Zahl 25s zentrifugiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.2 Proteinaufarbeitung und Western blotting

3.2.1 Proteinaufarbeitung

Die Zellpellets wurden mit $100\mu\text{l}$ RIPA-Puffer, der als Lysepuffer fungierte, resuspendiert und für 30min inkubiert. In dieser Zeit lösten sich die Zellmembranen auf, und das Protein wurde freigesetzt.

Danach erfolgte die Zentrifugation des Volumens 30min bei 55k rpm und 4°C . Dieses bewirkte, dass die Proteine von den verbliebenen Zelltrümmern getrennt wurden. Die Proteinlysate wurden in Eppendorfröhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff (-196°C) schock-gefroren.

Es schloss sich die Aufbewahrung der Proteinlysate bei -80°C an.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach dem Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry. Die Proteine bilden mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung violett gefärbte Chelat-Komplexe. Dieser Reaktionsschritt entspricht der Biuretreaktion. In einem zweiten Schritt kommt es zur Reduktion von Heteropolysäuren durch aromatische Aminosäuren unter der Bildung von Mischoxiden. Es entsteht ein blauer Farbstoff. Anschließend wird mit Hilfe eines

ELISA-Readers die Extinktion gemessen und die Konzentration anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($E = \epsilon \times c \times d$) berechnet.

In 96-well-Platten wurden jeweils 5µl des Proteinlysates in zwei Wells pipettiert. Darauf erfolgte die Inkubation der Proben mit 25µl der Substanz A und 200µl der Substanz B 10min bei Raumtemperatur. Dann wurde die 96-well-Platte in den ELISA-Reader eingelegt. Der ELISA-Reader maß die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 750nm und berechnete anschließend die Proteinkonzentrationen.

Für jedes Proteinlysate wurden zwei Werte bestimmt, aus denen der Mittelwert gebildet wurde.

3.2.2 Das Western Blot Verfahren

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis spezifischer Proteine. Dabei werden die Proteinfractionen in einem ersten Schritt mit Hilfe einer Elektrophorese getrennt. Dann werden die Proteine auf eine Membran transferiert. Zum Nachweis des gesuchten Proteins verwendet man Antikörper. Der erste Antikörper bindet spezifisch an das nachzuweisende Protein. Der zweite Antikörper, der mit einem Enzym konjugiert ist, bindet nun an den ersten Antikörper. Der letzte Schritt des Verfahrens besteht darin, dass das Substrat für das Enzym zugegeben wird. Überall dort, wo sich ein Antigen-Antikörper-Komplex bilden konnte, wird das Substrat von dem Enzym umgesetzt. Infolge dieser Interaktion wird Licht abgegeben, das einen Röntgenfilm schwärzt. Auf diese Weise lässt sich das gesuchte Protein nachweisen.

3.2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der Elektrophorese werden die einzelnen Proteinfractionen voneinander getrennt. Es wird eine Spannung an die Elektrophoresekammer angelegt, mit der Folge, dass sich die negativ geladenen Proteine in dem elektrischen Feld bewegen. Je geringer ihr Gewicht ist, desto schneller bewegen sie sich in dem elektrischen Feld und werden so voneinander getrennt.

Zur Trennung werden die Proteine auf ein Gel aufgetragen. Das Gel besteht aus zwei Komponenten, dem Sammel- und dem Trenngel. Es handelt sich um so genannte Laemmli-Gele. In einem ersten Schritt wird die Proteinmenge durch das Sammelgel gebündelt. In einem zweiten Schritt werden die Proteinfractionen mit Hilfe des Trenngels getrennt.

Glasplatten wurden mit einem Abstand von 0,75mm in die Gelgießapparatur eingespannt.

Zur Herstellung des Sammelgels wurden 3ml steriles Wasser, 0,8ml Acrylamid BIS 3% und 1,3ml Sammelgelpuffer angesetzt. Zur Herstellung des Trenngels wurden 3,5ml steriles Wasser, 4ml Acrylamid BIS 30% und 2,5ml Trenngelpuffer benutzt.

Dann wurden, um die Polymerisierung zu aktivieren, 20µl Temed und 40µl APS (10%) zu dem Ansatz für das Trenngel dazugegeben. Darauf erfolgte das Einfüllen des Trenngels zwischen die Glasplatten. Damit das Gel gleichmäßig polymerisierte, wurde Wasser über das Gel geschichtet. Anschließend wurde das Gel zur Polymerisation 30min bei Raumtemperatur inkubiert.

Darauf wurde zu dem Ansatz für das Sammelgel 10µl Temed und 10µl APS (10%) gegeben. Das Wasser wurde aus den Glasplatten entfernt und das Sammelgel über das Trenngel gegossen. Dann erfolgte die Inkubation des Gels für weitere 30min bei Raumtemperatur.

Jede Bahn wurde mit 20µg Protein beladen. Zu jeder Probe wurde Ladepuffer im Verhältnis 1 : 5 zugesetzt. Dann wurden die Proben 5min bei 95° C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Als letzter Schritt wurden die Proben kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt.

Die Gele wurden in die mit 1x konzentriertem Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt. Ein Molekulargewichtsmarker (Tabelle 1) und die Proben wurden nun in die einzelnen Geltaschen pipettiert.

Die Elektrophorese lief 30min bei 15mA und 2h bei 20mA.

Protein	Molekulargewicht in Kilodalton (kDa)
Phosphorylase b	97,4
Albumin (Rinderserum)	66,2
Ovalbumin	45,0
Carboanhydrase	31,0
Trypsininhibitor (Sojabohne)	21,5
Lysozym	14,4

Tabelle 1. Verwendeter Molekulargewichtsmarker für die Elektrophorese

3.2.2.2 Enhanced chemiluminescence Western blotting (ECL Western blotting)

Im Rahmen des Transfers werden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran überführt. Zu diesem Zweck erzeugt man ein elektrisches Feld, in dem die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern können. Deshalb muss das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode ausgerichtet werden.

Es wurden pro Gel zwei Filter in der Größe 8 x 11cm und eine Nitrozellulose-Membran a 6 x 9,5cm benutzt. Die Filter wurden mit Transferpuffer befeuchtet. Die Membran wurde mit destilliertem Wasser abgespült und 10min bei Raumtemperatur in Transferpuffer inkubiert.

Anschließend wurde die Membran auf einen Filter gelegt. Das Gel wurde mit Hilfe des Transferpuffers von den Glasplatten abgespült und auf die Membran platziert. Dann wurde auf das Gel der zweite Filter geschichtet. Mit einer Glasflasche erfolgte das Herauspressen von Luftblasen und überschüssiger Flüssigkeit aus den Filtern. Der Transfer lief 1h bei 0,1A.

Um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper auf der Membran zu blockieren, wurde sie mit Roti-Block behandelt.

Nach Ablauf des Transfers wurde die Membran in Waschpuffer gelegt, um ein Austrocknen zu verhindern. Dieser wurde abgegossen und die Membran mit Ponceau-Rot 1-2min angefärbt. Dieser Schritt diente zur Kontrolle, ob sich Protein auf der Membran befand. Die Proteinbanden färbten sich auf der Membran rot.

Dann wurde die Membran in 1ml Roti-Block (1x konzentriert) über Nacht bei 4° C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Zum Nachweis bestimmter Proteine benötigt man zwei Antikörper. Der erste Antikörper ist spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichtet. Der zweite Antikörper, der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, bindet mit seiner Bindungsstelle an den ersten Antikörper. Als erste Antikörper wurden Anti-Caspase-3 und Anti- β -Tubulin verwendet.

Der erste Antikörper gegen Caspase-3 wurde in Roti-Blocklösung 1 : 500 verdünnt. Der gegen β -Tubulin, ein Protein, das als Bestandteil des Zytoskeletts ubiquitär vorkommt, gerichtete Antikörper war nötig, um die Menge aufgetragener Proteine vergleichen zu können. Er wurde in Roti-Blocklösung 1 : 600 verdünnt.

Das Rotiblock wurde von der Membran abgegossen und die Antikörperlösung zu der Membran gegeben. Die Membran wurde 1h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit den ersten Antikörpern inkubiert.

Dann wurde die Antikörperlösung abgegossen und die Membran drei Mal mit 8ml Waschpuffer für je 5min unter leichtem Schwänken gewaschen. Durch das Waschen sollten überschüssige Antikörper von der Membran entfernt werden.

Der zweite Antikörper wurde 1 : 10 000 verdünnt und zu der Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran wieder 1h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit dem zweiten Antikörper inkubiert.

Lumineszenz ist definiert als eine Emission von Licht, das durch eine Energieabgabe von angeregten Substanzen erzeugt wird. In der Chemilumineszenz wird die Anregung durch eine chemische Reaktion erreicht. Die Meerrettich-Peroxidase des zweiten Antikörpers oxidiert das cyclische Diacylhydrazid Luminol. Das so angeregte Luminol geht in seinen Grundzustand

zurück, indem es Energie in Form von Licht abgibt. Dieses Licht schwärzt nun einen Röntgenfilm. Auf diese Weise können Proteine nachgewiesen werden.

Die Membran wurde vier Mal je 5min mit 8ml Waschpuffer unter leichtem Schwänken gewaschen. Das Waschen sollte überschüssige Antikörper entfernen.

Dann erfolgte die Inkubation der Membran für 1min mit 8ml der Detektionslösung. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran kurz mit destilliertem Wasser abgespült und zwischen zwei Folien gelegt. Mit Hilfe einer Glasflasche ließen sich Luftblasen, die sich eventuell unter der Folie gebildet hatten, entfernen.

Zur Dokumentation sind Röntgenfilme auf die Membran gelegt worden, deren Lichtsignale die Filme schwärzten. Dabei wurden, um ein optimales Ergebnis zu erzielen, unterschiedliche Belichtungszeiten von 5s bis 1min gewählt.

3.3 RNA-Aufarbeitung und RT-PCR

3.3.1 RNA-Aufarbeitung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit RNAzol entsprechend den vom Hersteller gegebenen Empfehlungen. Zur RNA-Extraktion wurde das trockene Zellpellet mit 200µl RNAzol resuspendiert. Dann wurden 50µl Chloroform dazu gegeben und das Zellpellet geschüttelt. Darauf ließ man es 5min auf Eis stehen. Anschließend wurde es 15min bei maximaler g-Zahl und 4° C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildeten sich drei Phasen: die untere Phase bestand aus Zelltrümmern, in der Interphase befand sich DNA und in der oberen wässrigen Phase RNA.

Im weiteren Verlauf wurde die obere Phase mit RNA abpipettiert und in neue Tubes mit 200µl Isopropanol überführt. Anschließend wurden sie kurz geschüttelt und 15min auf Eis stehen gelassen. Die RNA wurde durch die Zugabe von 1,0 fachem Volumen Isopropanol gefällt. Darauf wurde 15min bei maximaler g-Zahl und 4° C zentrifugiert.

Nachdem der Überstand dekantiert und der Tuberrand mit einem Kleenex abgetupft worden war, wurde die RNA mit 75%igem Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde mit 200µl Ethanol (75%) kurz aufgelöst und anschließend 5min bei maximaler g-Zahl zentrifugiert.

Nachdem das Ethanol dekantiert worden war, trocknete das Pellet 20-30min bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die RNA in 30µl DEPC-Wasser über Nacht bei 4° C aufgelöst und bei -80° C aufbewahrt.

Die Proben wurden mit DEPC-Wasser 1 : 50 verdünnt. Mit einem Photometer ließ sich bei einer Wellenlänge von 260nm die RNA-Konzentration messen. Die Qualität der zellulären RNA wurde durch die Integrität der 18 S / 28 S ribosomalen RNA in Ethidiumbromid gefärbtem 1%igem Agarosegel kontrolliert. Dafür wurde die RNA per Elektrophorese, die 1h bei 100V lief, aufgetrennt. Mittels UV-Licht ließ sie sich sichtbar machen und per Foto dokumentieren.

3.3.2 RT-PCR

Die real time RT-PCR erfolgte an einem Roche LightCycler PCR System. Beim RT-PCR-Verfahren wird die RNA durch die reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben und dann unmittelbar durch die DNA-Polymerase amplifiziert. Die Amplifikation lässt sich mit Hilfe von Fluoreszenz detektieren. Zwei kurze Oligonukleotide binden während des Annealings an eine innere Sequenz des zu amplifizierenden Fragments. Das eine Nukleotid ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende (Donor), das andere ist mit dem LightCycler-Red 640 am 3'-Ende (Akzeptor) konjugiert. Die beiden Oligonukleotide sind so beschaffen, dass sie nur durch wenige Basenpaare von einander getrennt an den zu amplifizierenden Strang binden. Durch die Nähe wird es möglich, dass das Donor-Oligonukleotid, das von einer externen Lichtquelle angeregt wird, Energie auf das Akzeptor-Oligonukleotid übertragen kann (Fluorescence Resonance Energy Transfer [FRET]). Diese Energie wird nun von dem Akzeptor-Oligonukleotid in Form eines Lichtblitzes freigesetzt, der von dem LightCycler PCR System detektiert wird.

In allen Proben wurden Caspase-3- und Survivin-mRNA relativ quantifiziert. Die Expression eines Zielgens wurde relativ zur Expression eines Referenzgens gemessen. Als Referenzgen, auf das die Caspase- und Survivinwerte normalisiert wurden, diente die Porphobilinogendeaminase (PBGD), die als Enzym im Hämoglobinabbau eine Rolle spielt und ubiquitär vorkommt. Vorher wurde mit Hilfe von 5 Proben ansteigender RNA-Konzentrationen eine Standardkurve erstellt, nach der die Quantifikation erfolgte. Die Standardkurve basiert auf der Ermittlung der jeweiligen Crossing point-Werte (CP-Werte). Dabei repräsentiert der CP-Wert den Punkt, an dem die DNA-Amplifikation unter der theoretisch optimalen Effektivität ($N = N_0 \times 2^n$) abläuft.

Die Normalisierung fand nach folgender Formel statt:

$$\text{relative Genexpression} = \frac{\text{Expression des Zielgens}}{\text{Expression des Referenzgens}} \times 100$$

Unter sterilen Bedingungen wurde jeweils ein Mastermix für die Amplifikation von Caspase-3- und Survivin-mRNA angesetzt:

2,4µl MgCl₂

4,0µl LightCycler RT-PCR Reaction Mix

0,4µl LC Red640

0,4µl Flurescein (3FL)

0,4µl Primer 1

0,4µl Primer 2

0,4µl LightCycler RT-PCR Enzyme Mix

9,6µl Wasser

Der Mastermix zur Amplifikation der PBGD-mRNA ließ sich aus folgenden Substanzen erstellen:

2,4µl MgCl₂

4,0µl LightCycler RT-PCR Reaction Mix

2,0µl PBGD-Primer-Mix

0,4µl LightCycler RT-PCR Enzyme Mix

9,2µl Wasser

Anschließend wurden sie kurz durchmischt, zentrifugiert und in die LightCycler-Glaskapillaren pipettiert. Dann erfolgte das Pipettieren von jeweils 200ng RNA der Proben in die Glaskapillaren. Gleichzeitig wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, um eine eventuelle Kontamination unter den Proben zu registrieren.

Die RT-PCR umfasste folgende Schritte: mRNA wurde in 10min bei 55° C mit der reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben. Anschließend denaturierte die entstandene cDNA in 10s bei 95° C. Dann wurde die cDNA in 40 Zyklen (15s bei 57° C und 15s bei 72° C) amplifiziert. Die spezifischen Primer für Survivin (Survivin Genbank accession number: U75285) hatten die Sequenz 5' AAA GAG CCA AGA ACA AAA TTG C (forward) und 5' GAG AGA GAA GCA GCC ACT GTT AC (reverse). Die Hybridisierungsproben hatten die Sequenz 5' - LC Red640 – CCA GAG GTG CTT CTG CCT GTG C--PH und 5' - TGC TCT TGT TTT GTC TTG AAA GTG GC – FL.

Die spezifischen Primer für Caspase-3 (Caspase-3 Genbank accession number: U13738) hatten die Sequenz 5' AGG GGA TCG TTG TAG AAG TCT AA (forward) und 5' GCC AAG AAT AAT AAC CAG GTG CT (reverse). Als Hybridisierungsproben wurden verwendet: 5' LC

Red640 – TTC TGT ACC ACG GCA GGC CTG AA--PH und 5' CTG TCT GTC TCA ATG CCA CAG TCC A--FL.

3.4 Acridinorange/Ethidiumbromid-Assays

Um apoptotische und nicht apoptotische Zellen von einander zu unterscheiden, wurden die Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Acridinorange und Ethidiumbromid, die an die DNA binden können, gefärbt. Aufgrund veränderter Membraneigenschaften nehmen apoptotische im Vergleich zu nicht apoptotischen Zellen unterschiedlich Mengen der einzelnen Farbstoffe auf. Dabei können die Zellen folgendermaßen reagieren. Lebendige Zellen haben einen strahlend grünen Nukleus, dessen Struktur intakt ist. Zellen, die sich in der frühen Phase der Apoptose befinden, zeigen einen hellen, strahlend grünen Nukleus mit dichten grünen Arealen, die aus kondensiertem Chromatin bestehen. Während der späten Apoptose werden der Nukleus und das kondensierte Chromatin orange. Dagegen zeigen nekrotische Zellen nur noch einen orangen Nukleus. Um semiquantitative Vergleiche zwischen behandelten Zellen und der unbehandelten Negativkontrolle durchführen zu können, wurde ein Apoptose-Score eingeführt (Tabelle 2).

apoptotische Zellen	apoptotische Aktivität
<25%	keine apoptotische Aktivität (Score: 0)
25-49%	schwach (Score: +)
50-74%	mittel (Score: ++)
>75%	stark (Score: +++)

Tabelle 2. Apoptose-Score

Zur Durchführung des Assays wurde eine Lösung aus 100µg/ml Acridinorange und 100µg/ml Ethidiumbromid in PBS angesetzt. Die Inkubation der Zellen, die in 6-well-Platten ausgesät und mit Butyrat, Valproat und TSA über 24 bzw. 48h behandelt worden waren, erfolgte mit 500µl der Lösung für 5min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen sofort unter einem Fluoreszenzmikroskop mit 480 und 530nm Filtern beurteilt und per Foto dokumentiert.