

3. Methoden

3.1. Methoden der Zellkultur

3.1.1. Kulturbedingungen

HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn-Zellen wurden freundlicherweise von Florian Emmerich (MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 30% FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einer CO₂-Sättigung von 5% kultiviert. Um die Zellen in einer logarithmischen Wachstumsphase zu halten, wurden diese alle 2-3 Tage durch Trypsinieren mit 1% Trypsin für 5 min von der Kulturflasche gelöst, in Medium aufgenommen, zentrifugiert und in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt. Alle Suspensionszellen wurden in Anwesenheit von 10 % FKS unter gleichen Bedingungen kultiviert; mit Ausnahme von OCI-AML2, die in α MEM +20% FKS gehalten wurden und KU-812, die in IMEM +20 % FKS kultiviert wurden. Das Verdünnen der Zellsuspension dieser Zellen erfolgte so, daß eine Zelldichte von 1 x 10⁶/ml nicht überschritten wurde.

3.1.2. Aufbereitung von Zellen aus Vollblut

Für die Gewinnung von DNA zur Herstellung spezifischer Gensonden für den Einsatz bei Northern Blots wurden PBMC's (*peripheral blood mononuclear cells*) aus Vollblut gewonnen. 20 – 30 ml Blut eines gesunden Spenders wurden dazu 1 : 2 mit PBS verdünnt und auf eine Ficoll-Lösung einer Dichte von 1.077 g/ml überschichtet. Nach einer Zentrifugation von 1000 x g bei Raumtemperatur (RT) für 20 min (unter Ausschaltung der Rotorbremse) sammelten sich Lymphozyten und Monozyten in der Interphase, während Erythrozyten und die meisten Granulozyten durch den Gradienten sedimentierten und Thrombozyten sich im Überstand befanden. Die Interphase des Ficollgradienten wurde entnommen, mehrfach in RPMI-Kulturmedium gewaschen und diente als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von RNA.

3.1.3. Konservieren von Zellen durch Einfrieren

1 x 10⁶ – 1 x 10⁷ Zellen wurden in 10% DMSO und 40% FKS in entsprechendem Medium zunächst bei –20°C für 30 min und anschließend bei –80°C eingefroren. Langzeitige Lagerung erfolgte bei –190°C in flüssigem Stickstoff.

3.2. Induktion von Apoptose und Zelltod

3.2.1. Behandlung von Zellen mit Zytostatika oder C₂-Ceramid

Für die Behandlung von HD-MyZ zur Induktion von Apoptose wurden Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase in Kulturschalen in einer Dichte von $0.5 \times 10^5/3 \text{ cm}^2$ in Komplettkulturmedium ausgesät. Nach 48h erfolgte die Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ und den Apoptose-Stimuli in Gegenwart von 10 % FKS: Die Zellen wurden mit 1 x PBS gewaschen und mit Medium mit oder ohne $\text{TNF}\alpha$ für 6h inkubiert, um anschließend Zytostatika oder C₂-Ceramid in unterschiedlichen Konzentrationen hinzuzugeben. Bei Verwendung von Substanzen, die in Lösungsmitteln wie Ethanol oder DMSO aufgenommen waren, wurde zuvor eine Toxizität der eingesetzten Lösungsmittel-Konzentration ausgeschlossen. Die Versuche wurden als Triplikate angesetzt. Die Apoptoseinduktion von Suspensionszellen erfolgte ebenfalls in Kulturschalen in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ 3 cm^2 . Die Zellen wurden entweder in Gegenwart von $\text{TNF}\alpha$ oder in Medium für 6h inkubiert, um nachfolgend mit unterschiedlichen Konzentrationen von Etoposid oder Epirubicin behandelt zu werden.

3.2.2. Induktion von Apoptose in HD-MyZ in Gegenwart von Fumonisin B₁

Die Zytostatika-induzierte Apoptose in Kombination mit $\text{TNF}\alpha$ wurde in HD-MyZ in Gegenwart von Fumonisin B₁, einem Mycotoxin, das die Ceramid-Synthase hemmt, verfolgt (232). Hierzu wurden die Zellen in Kulturschalen in einer Konzentration von $0.5 \times 10^5/3 \text{ cm}^2$ ausplattiert und für 2h mit Fumonisin B₁ vorbehandelt. Anschließend wurde ein Teil der Ansätze mit $\text{TNF}\alpha$ behandelt, um nach 6h Zytostatika zuzugeben. Verschiedene Konzentrationen an Fumonisin B₁ wurden zuvor hinsichtlich ihrer Toxizität für HD-MyZ getestet, um einen direkten Einfluß des Hemmstoffes auf die Apoptose auszuschließen.

3.2.3. Induktion von Apoptose in HD-MyZ in Gegenwart von Caspase-8-Inhibitor

Für die Hemmung der Caspase-8-Aktivität stand das zellpermeable, spezifische Substrat, Z-IETD-fmk, zur Verfügung. Die irreversible Bindung des Inhibitors an die prozessierte Form von Caspase-8 erfolgt über die Erkennung der Caspase-8-spezifischen Peptidsequenz IETD. Mehrere Methylestergruppen ermöglichen den Eintritt in die Zelle. Zusätzlich verhindern endogene Esterasen durch Abspaltung dieser Methylestergruppen ein Diffundieren des Inhibitors aus der Zelle. Die Fluoromethylketo-Gruppe (-fmk) bindet kovalent an Schwefelgruppen des aktiven Zentrums der Caspase und vermittelt so deren Inhibition. Die

Stabilität des Inhibitors wird durch die Schutzgruppe (Z) gewahrt. Für Inhibitor-Experimente erfolgte eine Vorinkubation für 2h mit 20 μ M oder 50 μ M Z-IETD-fmk (10 mM Stock in DMSO) und anschließend die Behandlung mit TNF α , Zytostatika oder Ceramid.

3.3. Quantifizierung von Zelltod

3.3.1. Trypanblaufärbung

Zur Bestimmung von Zelltod wurden Zellen geerntet und für 2 min mit Trypanblau-Färbelösung angefärbt. Trypanblau wird aus lebenden Zellen aktiv nach außen transportiert, was in toten Zellen ausbleibt. Blaue Zellen konnten deshalb als tot betrachtet werden und wurden mithilfe einer Neubauerzählkammer quantifiziert, wobei pro Experiment mindestens 200 Zellen gezählt wurden.

3.3.2. Bestimmung von Apoptose durch Annexin-V-FITC-Färbung

Ein für Apoptose spezifisches Ereignis ist der Verlust der Asymmetrie der Zytoplasmamembran. In apoptotischen Zellen wird Phosphatidylserin (PS), ein Phospholipid der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran, in die dem äußerem Extrazellarraum zugewandte, äußere Membranschicht transloziert. Diese Translokation von PS ist ein frühes Merkmal für den Prozeß der Apoptose. Annexin-V bindet spezifisch an PS, so daß apoptotische Zellen mittels FITC (Fluorescein-isothiocyanat)-gekoppeltem Annexin-V im FACScan (*fluorescence activated cell sorter*, Becton Dickenson, Heidelberg) von nicht apoptotischen unterschieden werden können (233). Die Gegenfärbung mit Propidiumiodid (PI, 10 μ g/ml) ermöglichte die Unterscheidung von apoptotischen Zellen (Annexin-V-positiv und PI-negativ) von nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen (Annexin-V-positiv und PI-positiv).

Bindungs-Puffer:

10 mM HEPES, pH 7.4

140 mM NaCl

2.5 mM CaCl₂

Geerntete Zellen (1×10^5 – 1×10^6 Zellen) wurden in 1 x PBS und anschließend in Bindungs-Puffer gewaschen, und in 100 μ l Bindungs-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 2.5 μ l Annexin-V-FITC (Pharmingen) wurden die Zellen für 30 min auf Eis und im Dunkeln gefärbt.

Die Detektion von Annexin-V-FITC positiver, also apoptotischer Zellen konnte im FACS anhand der Zunahme der Fluoreszenzintensität im FL-1 Kanal (Emissionsspektrum 520-550 nm) detektiert werden, und wurde durch Vergleich mit unbehandelten Zellen geringerer Fluoreszenz quantifiziert. Die FACS-Analyse erfolgte auf Einzelzellniveau, wobei 10000 Zellen analysiert werden und eine statistische Auswertung mithilfe der Cell Quest Software (Becton Dickenson) erfolgte.

3.3.3. Bestimmung von Apoptose mithilfe der modifizierten Zellzyklusanalyse

Die Bestimmung der Apoptose mithilfe der modifizierten Zellzyklusanalyse basiert auf der Tatsache, daß Apoptose in Zellen DNA-Fragmentierung induziert. Diese DNA-Fragmentierung in apoptotischen Zellen kann durch Färbung mit Propidiumiodid, das in doppelsträngige DNA und RNA interkaliert, als verminderte Fluoreszenz gegenüber Zellen detektiert werden, die sich in der G₁-, der S- oder der G₂/M-Phase des Zellzyklus befinden und einen höheren DNA-Gehalt aufweisen.

Behandelte oder unbehandelte Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 300 x g geerntet. Nach erneutem Zentrifugieren für 3 min bei 300 x g, 4°C wurden die Zellpellets zur Fixierung der Zellen in 150 µl Formaldehyd-Lösung (1.7% in PBS) aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellpellets wurden nach Zentrifugation für 3 min bei 300 x g, 4°C in 60 µl 1 x PBS resuspendiert und nach Zugabe von 120 µl 100% Ethanol für mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Der Verdau der RNA erfolgte nach weiterer Zentrifugation und Zugabe von 40 µg/ml DNase-freier RNase A in 1 x PBS. Pelletierte Zellen wurden anschließend durch Aufnahme in 200 µl Propidiumiodid (50 µg/ml in 1 x PBS) gefärbt. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen konnte dann im FACScan, ausgestattet mit der Cell Quest Software, als Anzahl hypodiploider Zellen (234) quantifiziert werden.

3.3.4. Bestimmung der LDH-Aktivität

Die Induktion von Zelltod führt zu einer Schädigung der Zytoplasmamembran. Die Freisetzung des zytosolischen Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist eine Folge dieser Schädigung und kann im Medienüberstand behandelter Zellen anhand der LDH-Aktivität nachgewiesen werden. Hierzu wurde der „Cytotoxicity Detection Kit“ der Firma Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) im Wesentlichen nach Anweisung des Herstellers verwandt.

Behandelte Zellen von HD-MyZ wurden abtrypsiniert und unter Mitnahme des Überstandes geerntet. Jede Probe wurde geteilt, um einerseits die LDH-Aktivität im Überstand und um

andererseits die maximal aus den Zellen freizusetzende LDH-Aktivität zu bestimmen. Diese Vorgehensweise war notwendig, weil die Behandlung der Zellen mit Zytostatika oder Ceramid zu einem drastischen Abfall der Zellzahl und damit auch fälschlicherweise der LDH-Aktivität gegenüber unbehandelten Zellen im Überstand führt. Die maximal freizusetzende LDH-Aktivität wurde an einem Aliquot nach Lyse der Zellen mit 0.1 % Triton X-100 ermittelt. Mit oder ohne Lyse wurden die Zellen für 5 min bei 300 x g bei RT zentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden mit 80 µl 1 x PBS verdünnt. Die Reaktion startete nach Zugabe von INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid), Laktat, NAD⁺ und Diaphorase. Das Reaktionsprodukt konnte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei RT und im Dunkeln mithilfe eines automatisierten Plattenphotometers bei einer Wellenlänge von 490 nm quantifiziert werden. Die Aktivität wurde als ΔE/min berechnet und als Prozentsatz auf die Kontrolle der Aktivität lysierter Zellen derselben Probe angegeben (235).

3.4. Proteinchemische Methoden

3.4.1. Herstellen von Gesamtzellextrakten

In der Regel wurden 6×10^5 Zellen für proteinchemische Analysen pro eingesetzte Zytostatika- oder Ceramid-Konzentration in einer mittleren Kulturflasche (75 cm²) ausgesät und behandelt. Je nach sich anschließender Analyse kamen nach Ernte der Zellen zwei Verfahren zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten zur Anwendung. Für die Detektion von Caspase-9 bzw. deren Aktivierung im Western Blot wurde Laemmli-Puffer (236) verwendet, der durch seine hohe SDS-Konzentration eine *in-Vitro*-Aktivierung der Caspase-9 verhinderte, die bei der Verwendung von anderen Puffersystemen zur Lyse von Zellen auftrat.

Laemmli-Puffer:

62.5 mM Tris/HCl, pH 6.6
2% SDS
10% Glycerin

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten für alle anderen Western Blot-Analysen wurde Lyse-Puffer A verwendet.

Lyse-Puffer A:

50 mM Tris/HCl, pH 7.5
1% SDS
1% Triton X-100
270 mM Saccharose

Für die Preparation wurden die Zellen abtrypsinisiert, abzentrifugiert und gewaschen. Der Zellaufschluß durch Zugabe von 100-200 µl Lysepuffer (oder Laemmli-Puffer) erfolgte in Gegenwart von Proteinase-Inhibitoren, Aprotinin (10 µg/ml), Leupeptin (10 µg/ml) und PMSF (2mM, Phenylmethylsulfonylfluorid). Die Proben wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 4°C bei 500 x g für 10 min konnte das Gesamtzellextrakt als Überstand entnommen werden.

3.4.2. Herstellung von löslichen Extrakten durch Subfraktionierung von Zellen

Zur Bestimmung der Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien in das Zytoplasma wurde Digitonin zum Aufschluß der Zellen verwandt (237). In für die verwendeten Zelllinien optimierter Konzentration permeabilisiert Digitonin die Zytoplasmamembran, während die Mitochondrien intakt bleiben.

<u>Mito-Puffer A:</u>	20 mM MOPS, pH 7.4
	1 mM EGTA
	100 mM Saccharose
frisch hinzugeben:	0.75 mg/ml Digitonin
	1 mM PMSF

Abtrypsinisierte Zellen wurden in 1 x PBS gewaschen und für 20 min auf Eis durch Inkubation in Mito-Puffer A aufgeschlossen. Die Vollständigkeit des Aufschlusses wurde durch Trypanblau-Färbung überprüft. Die Abtrennung der löslichen Fraktion erfolgte durch Zentrifugation für 20 min mit 16 000 x g bei 4°C.

3.4.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen kam der „Bicinchonic Assay Kit“ (Pierce, Weiskirchen) nach Anweisung des Herstellers zur Anwendung. In der Regel wurden die Proben 1 : 5 in Lysepuffer verdünnt und nach Zugabe von 200 µl der BCA-Lösung für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Quantifizierung des Proteingehaltes erfolgte anhand einer BSA-Standardgerade durch Messung der Extinktion bei 590 nm in einem automatisierten Plattenphotometer.

3.4.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen diverser Größe wurden diskontinuierliche SDS-Gele mit unterschiedlicher Porendichte vorbereitet (236).

4% Sammelgel:

625 µl Acrylamid (40%)
 630 µl 0.5 M Tris/Cl,
 pH 6.8
 3.64 ml H₂O
 50 µl 10% SDS
 5 µl TEMED
 50 µl 10% APS

<u>Trenngel:</u>	10%	12%	16%	
	5 ml	6 ml	8 ml	Acrylamid (40%)
	5 ml	5 ml	5 ml	0.5 M Tris/Cl, pH 6.8
	8.6 ml	9.6 ml	6.6 ml	H ₂ O
	200 µl	200 µl	200 µl	10% SDS
	200 µl	200 µl	200 µl	TEMED
	8 µl	8 µl	8 µl	10% APS

Das verwendete Acrylamid/Bisacrylamid lag in einem Verhältnis von 29 : 1 vor.

Die Proben wurden im Verhältnis 1 : 2 mit Probenpuffer versetzt, mit H₂O auf gleiches Volumen eingestellt und für 5 min zum Denaturieren der Proteine bei 96°C aufgeköcht. Wenn nicht anders vermerkt wurden 50 µg Protein geladen.

Proben-Puffer :

100 mM Tris, pH 6.8
 20% Glyzerol
 8% SDS
 10% β-Mercaptoethanol
 0.01% Bromphenolblau

Die Auftrennung der Proteinen erfolgte in einer Gelkammer der Firma Biorad unter Verwendung eines SDS-Laufpuffers bei 120 – 150 mA für ca. 1.5h bis zum Austreten der Lauffront des Bromphenolfarbstoffes.

Lauf-Puffer :

25 mM	Tris-HCl
192 mM	Glycin
0.1%	SDS

Zur Bestimmung der Größe der Proteine wurde ein Protein-Standard (*High range-marker*, Sigma) mitaufgetragen.

3.4.5. Western Immunoblot-Analyse (modifiziert nach Towbin et al.) (238)

Die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden mittels *semi-dry*-Blot (Transblot SD der Firma Biorad, München) auf eine Nitrocellulosemembran (BA 85, 0.45 µm, Schleicher + Schuell) transferiert. Membran und Filterpapier (Whatman, Schleicher + Schuell) wurden in Blot-Puffer (10 mM CAPS, pH 11, 10% Methanol) equilibriert und getränkt. Ein Sandwich aus zwei Filtern, der Nitrocellulosemembran, dem Gel und weiteren zwei Filtern wurden auf der Anodenplatte aufgeschichtet. Luftblasen wurden entfernt. Der Transfer erfolgte bei RT und 1 mA/cm² für 1h. Die Qualität der elektrophoretischen Auftrennung und die Effektivität des Blotens konnte durch Färbung der Membran mit Ponceaurot-Färbelösung (0.2% (w/v) Ponceau S in 3% Trichloressigsäure) überprüft werden. Die Färbung ist reversibel und wurde durch Schwenken in H₂O entfernt. Die Banden der Standardproteine waren zuvor nachgezeichnet worden.

Für den immunologischen Nachweis der Proteine wurden folgende Lösungen eingesetzt:

Wasch-Puffer (1 x PBST) :

1 x	PBS
0.1%	TWEEN

Block-Puffer :

1 x	PBST
10%	Blocking Reagenz (Roche, Mannheim)
oder	5% Magermilchpulver (fettfrei)

Alle Schritte erfolgten bei RT und unter Schwenken. Die Membran wurde für mindestens 1h bzw. über Nacht in Block-Puffer abgesättigt. Der primäre Antikörper wurde in Blockpuffer verdünnt und mit 0.1% Azid versetzt. Nach 1h Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper wurde die Membran in 1 x PBST gewaschen (3 x 10 min), um anschließend für 45

min in einer Lösung aus 1 x PBST und sekundärem, HRP (*horse radish peroxidase*)-konjugiertem Antikörper inkubiert zu werden. Nach erneuten Waschschritten in PBST (3 x 10 min) wurde ECL-Lösung (enhanced chemoluminescence, Amersham) für 1 min hinzugegeben. Die Exposition der Filme (Hyperfilm, Amersham) für unterschiedliche Zeitpunkte erfolgte in einer Dunkelkammer unter Verwendung von Standard-Filmkassetten. Die Größe der Standard-Proteine wurde anhand der markierten Markerbanden auf die Filme übertragen.

3.4.6. Caspase-Aktivitätsmessung

Zytosolische Extrakte von behandelten und unbehandelten Zellen wurden wie beschrieben hergestellt (239). Zellpellets wurden in 50-100 µl Puffer A (20 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM KCL, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 µM PMSF) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluß der Zellen konnte durch 20fache Passage durch eine Nadel (0.8 mm x 0.4 mm) erzielt werden und wurde durch Trypan-Blau-Färbung kontrolliert. Nach zweimaliger Zentrifugation mit 16 000 x g für 30 min bei 4°C konnte der resultierende Überstand entnommen werden und wurde gegebenenfalls bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung von Caspase-Aktivitäten erfolgte unter Verwendung von spezifischen Substraten für Caspase-3, Ac-DEVD-pNA, Caspase-8, Ac-IETD-pNA, und Caspase-9, Ac-LEHD-pNA. Die Spaltung der spezifischen Aminosäuresequenz durch die spezifische Caspase führt zur Freisetzung des Chromophors, pNA (para-Nitroanilid), und kann bei 405 nm photometrisch detektiert werden. Zu einem Reaktionsgemisch aus 90 µl Puffer B und 2 µl Substrat wurden 10 µl lösliches Extrakt hinzugegeben und über einen Zeitraum von 2-8h bei 37°C inkubiert. Die Extinktion wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten im Plattenphotometer bestimmt. Die Caspase-Aktivitäten berechneten sich als spezifische Enzymaktivität (mU/mg Protein) aus der Extinktionsänderung im linearen Bereich und der Proteinkonzentration.

<u>Puffer B :</u>	50 mM HEPES, pH 7.4
	100 mM NaCl
	1 mM EDTA
	0.1% CHAPS
	10% Saccharose
	5 mM DTT

3.4.7. *In-Vitro*-Aktivierung von Caspasen

Um die durch Induktion des mitochondrialen Apoptose-Weges ausgelöste Aktivierung von Effektor-Caspasen unter *in-vitro*-Bedingungen nachzuvollziehen, wurden lösliche Extrakte wie unter 3.3.6. beschrieben, hergestellt. Diese *in-vitro*-Aktivierung simuliert dabei die Caspase-Aktivierung, die in der Zelle über Freisetzung von Cytochrom C, Rekrutierung eines Komplexes in Anwesenheit von APAF-1 und Aktivierung von Caspase-9 erzielt wird. Hierzu wurde den löslichen Extrakten unbehandelter Zellen 1 mM DTT, 1 μ M Cytochrom C (aus Pferdeherz) und 1 mM dATP zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Extrakte unter denselben Bedingungen in Abwesenheit von Cytochrom C und dATP parallel behandelt. Die Bestimmung und Berechnung der *in-vitro*-Aktivitäten erfolgte wie in Abschnitt 3.3.6.

3.4.8. Bestimmung der Sphingomyelin-Hydrolyse

Die Bestimmung der Sphingomyelin-Hydrolyse diente zum indirekten Nachweis von TNF α -induzierter Ceramid-Bildung in HD-MyZ-Zellen (240). Dabei wurde in Methyl-³H-Cholin markierten Zellen der Sphingomyelin-Gehalt in Totallipidextrakten indirekt über die Freisetzung des markierten Phosphorylcholin (auch Phosphocholin genannt) durch eine bakterielle Sphingomyelinase bestimmt. Die Radioaktivität läßt sich nach Umsatz von Methyl-³H-Cholin in der Zelle im Produkt Phosphorylcholin nachweisen. Phosphorylcholin ist im Gegensatz zum Lipid Ceramid wasserlöslich und konnte deshalb über die Herstellung eines Zweiphasensystems von allen Lipiden getrennt werden.

3.4.8.1. Radioaktives Markieren der Zellen mit Methyl-³H-Cholin

1 x 10⁵ Zellen/3 cm² wurden in Kulturschalen ausplattiert und für 72h in RPMI-Medium mit 3.7 x 10⁴ Bq/ml Methyl-³H-Cholin inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in 1 x PBS erfolgte die Inkubation der Zellen mit TNF α .

3.4.8.2. Totallipidextraktion (modifiziert nach Bligh und Dyer, 1959) (241)

Nach Inkubation der Zellen mit oder ohne TNF α für 0, 5, 15, 30 oder 60 min wurden die Cholin-markierten Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 400 μ l PBS mit einem Zellschaber geerntet. Die Zellen wurden bei 16 000 x g zentrifugiert und anschließend gefriergetrocknet. Das Pellet wurde in 95 μ l eines Methanol/Chloroform/Wasser-Gemisches (10:5:4 (v/v/v)) aufgenommen und 10 min im Ultraschall-Wasserbad behandelt, um die Lipide

3.5. Molekularbiologische Methoden

3.5.1. DNA-Standard-Methoden

Für folgende DNA-Standard-Methoden wurden Protokolle verwendet, die auf Sambrook et al. 1989 (244) basieren:

DNA-Isolierung aus *E. coli*

Restriktion von DNA

DNA-Gelelektrophorese

Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel

Photometrische Quantifizierung von DNA

DNA-Ligation

Herstellen kompetenter Zellen, *E. coli* JM 109

3.5.2. Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von RNA wurde TRIZOL-Reagenz (Life Technologies, Schwalbach) verwendet. Ca. 1×10^6 Zellen wurden pelletiert, in 1 ml TRIZOL-Reagenz resuspendiert und für 15 min unter starkem Schütteln lysiert. Nach Chloroform Zugabe konnte durch Chloroform/Phenol-Extraktion die RNA als Überstand entnommen werden. Nach Überführung in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte die Fällung der RNA mittels 100% Ethanol. Das Gel-artige RNA-Pellet wurde in DEPC-behandeltem ddH₂O aufgenommen und zur vollständigen Resuspension für 10 min bei 65°C inkubiert. RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.5.3. Northern Blot-Analyse

Die Northern Blot Analyse wurde als Nachweis spezifischer Transkripte, also von mRNA, innerhalb eines heterogenen RNA-Gemisches z.B. aus Zellen oder Geweben, verwendet. Die Northern Blot Analyse wurde in Anlehnung an das Protokoll von Kroccek et al. (245) durchgeführt. Dazu wurde Gesamt-RNA isoliert. 15-20 µg jeder RNA-Probe wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt, auf eine Nylonmembran transferiert, und UV fixiert. Die Membranen wurden nun mit einer spezifischen, radioaktiv markierten DNA hybridisiert, und die spezifisch hybridisierenden Signale wurden nach Autoradiographie detektiert.

3.5.3.1. Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

<u>MOPS-Puffer (10x):</u>	0.2 M MOPS, pH 5.5 – 7.0
	0.05 M Na-Acetat
	0.01 M EDTA
<u>RNA Gel:</u>	1.2 % Agarose
	1.1 % Formaldehyd
	1 x MOPS
<u>Premix:</u>	3 M Formaldehyd
	64 % Formamid
	1.3 x MOPS
<u>Proben-Puffer:</u>	62.5% Formamid
<u>RNA-loading buffer (Sigma)</u>	1.14 M Formaldehyd
	1.25 x MOPS-Puffer
	200 µg/ml Bromphenolblau
	200 µg/ml Xylencyanol
	50 µg/ml Ethidiumbromid

Zur Auflösung von Sekundärstrukturen erfolgte die elektrophoretische Trennung der RNA in einem denaturierenden 1.2% Agarosegel. 15 – 20 µg RNA (in 11 µl ddH₂O) wurden in 39 µl denaturierendem Premix und 5 µl Ladepuffer sowie 2 µl Ethidiumbromid (0.5 mg/ml) aufgenommen. Die Proben wurden bei 55°C für 15 min denaturiert und auf Eis gestellt. Nach Beladen des Geles erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in 1 x MOPS Puffer bei 80 V. Da die Ionenkapazität des Puffers sehr niedrig ist, wurde der Puffer ständig mit einer Pumpe umgewälzt. Die getrennte RNA konnte unter UV-Licht visualisiert werden und wurde mit einem Lineal als Größenstandard mittels eines Videodokumentationssystems (Appligene) dokumentiert. Die 28 S, 18 S und 5 S rRNA sind dabei als deutliche Banden bei 5.0, 1.87 und 0.16 kb zu sehen und dienten als Größenstandard.

3.5.3.2. Kapillartransfer von RNA auf eine Nylonmembran

Um einen besseren Transfer zu erreichen wurde das Gel zunächst in 0.05 M NaOH für 20 min behandelt. Das Gel wurde anschließend 30 min in 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Tri-Na-Citrat) äquilibriert und in einer Naßblotkammer über Nacht auf eine Nylonmembran transferiert. Hierzu wurde ein Sandwich bestehend aus 3 Lagen Filterpapier (Whatman, Schleicher + Schuell), dem RNA-Gel, einer Nylonmembran, 3 befeuchteten Filterpapieren, 3 trockenen Filterpapieren und ca. 10 cm Papiertücher aufgeschichtet und mit einer Glasplatte und einem Gewicht von ca. 500 g beschwert. Die unterste Lage an Filterpapieren hatte dabei Kontakt zum Transfer-Puffer (20 x SSC). Es wurde darauf geachtet, daß alle verwendeten Filter sowie die Membran exakt die Größe des Geles hatten. Die RNA wurde durch UV-crosslinking (Strata-linker) mit 1200 kcal auf der Membran fixiert. Der Transfer der RNA wurde anhand der 28 S und 18 S rRNA Banden unter UV-Licht und durch Kontrolle des Geles nach dem Blotten überprüft.

3.5.3.3. Northern Blot Hybridisierung

<u>Prähybridisierungs-</u>	50 mM PIPES (Pipes-azin-N/N'-bis-2-
<u>/Hybridisierungspuffer:</u>	ethansulfonsäure)
pH 6.5	100 mM NaCl
	50 mM Natriumhydrogenphosphat,
	pH 7.2
	1 mM EDTA
	5 % SDS

Die Nylonmembran mit der transferierten RNA wurden für mindestens 1 h bei 68°C in Prähybridisierungspuffer inkubiert. Die spezifische, radioaktiv markierte, denaturierte DNA-Sonde wurde in einer Konzentration von 1-3 x 10⁶ cpm/ml Hybridisierungspuffer eingesetzt und über Nacht bei 68°C hybridisiert.

Nach der Hybridisierung wurde die Nylonmembran für 2 x 10 min bei RT in Waschlösung (0.1 x SSC, 5% SDS) und für weitere 30-60 min bei 68°C gewaschen und die spezifischen Signale durch Autoradiographie detektiert.

3.5.3.4. Herstellung radioaktiv-markierter DNA-Sonden

Doppelsträngige DNA wurde nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (246) radioaktiv markiert. Dazu wurden 1.8 kb große DNA-Fragmente durch Inkubation bei 95°C für 5 min denaturiert und mit einem Gemisch von Nonanukleotiden hybridisiert, die als Primer für die Synthese durch das Klenow –Enzym in Gegenwart von $\alpha^{35}\text{P}$ -dCTP dienten. Für die Herstellung der Sonden wurde Megaprime (Amersham) verwandt.

25-50 ng DNA wurden in 28 μl H_2O in Anwesenheit von 5 μl Primer-Mix denaturiert (5 min, 95°C). Bei RT wurden 10 μl *labelling-buffer* (130 mM KHPO_4 , 6.5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT) mit 2 μl Klenow-Enzym und 5 μl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP hinzugegeben und anschließend bei 37°C für 60 min inkubiert. Nicht eingebaute, radioaktiv markierte Nukleotide wurden über Sephadex *Nick spin columns* (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Die spezifische Aktivität dieser radioaktiv markierten DNA-Sonde wurde im Szintillationszähler bestimmt und lag zwischen bis $1\text{-}3 \times 10^6$ cpm/ μg und wurde vollständig im Hybridisierungspuffer nach Denaturierung für 5 min bei 95°C eingesetzt.

3.5.4. Herstellung von cDNA durch RT-PCR

Ausgehend von Gesamt-RNA erfolgte die Generierung von cDNA durch reverse Transkription (RT) unter Verwendung von Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/ μl , Life Technologies). 10 μg RNA wurden in 10 μl ddH_2O aufgenommen und in Gegenwart von 1 μl OligodT-Primer-Mix (0.1 mg/ml) für 10 min bei 70°C inkubiert (*Annealing*). Die Reaktion wurde dann nach folgendem Schema vervollständigt:

4 μl 5 x Puffer	(250 mM Tris, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2)
1 μl dNTP's	(je 10 mM)
2 μl DTT	(0.1 M)
1 μl RNasin	
0.5 μl Superscript II Reverse Transkriptase	200 U/ μl

Die Proben wurden mit 30 μl ddH_2O auf 50 μl aufgefüllt und bei -80°C gelagert. Die Verwendung von Oligo-dT-Primern ermöglichte die Amplifizierung von mRNA (Poly-A-Ende).

3.5.5. PCR zum Nachweis spezifischer Transkripte

Für die Amplifikation von cDNA wurden 10 µl cDNA bzw. 5 µl (βAktin) des oben beschriebenen Ansatzes (3.4.4.) unter Verwendung von spezifischen Primern (Synthese durch Biotex, Berlin) und Taq-Polymerase (Perkin Elmer) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl angesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler (Perkin Elmer) nach folgendem Programm:

	2 min	94°C	(Denaturierung)
30 Zyklen:	45 sec	94°C	(Denaturierung)
	45 sec	55°C-56°C	(Annealing)
	1 min	72°C	(Synthese)
	10 min	72°C	

3.5.6. Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten

Für die automatische Sequenzierung wurde ein Sequenzer der Firma Applied Biosystems (ABI 310) verwendet. Die Sequenzreaktion mithilfe des „*Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*“ (Perkin Elmer) basiert auf dem Einbau fluoreszenz-markierter Stopnukleotide (ddNTP), die zum statistisch-verteilten Abbruch der Amplifikation und damit zu unterschiedlich langen Fragmenten führen, deren 3'OH-Base durch den Farbstoff detektiert und unterschieden werden kann. Die Verwendung des Kits erfolgte nach den Angaben des Hersteller, wobei 0.5 µg DNA, 3.2 pmol Primer und 2 µl Premix eingesetzt wurden. Die Sequenzreaktion erfolgte in einem Thermocycler (Perkin Elmer; Mannheim) nach folgendem Programm:

	2 min	96°C	(Denaturierung)
30 Zyklen:	30 sec	96°C	(Denaturierung)
	15 sec	55°C	(Annealing)
	4 min	60°C	(Synthese)

Die Proben wurden anschließend mit Ethanol /Na-Acetat gefällt, in 20 µl TSR-Reagenz aufgenommen und vor dem Sequenzlauf bei 96°C für 3 min denaturiert. Zur Auswertung der Sequenzen wurde die Sequencer 3.0 Software (Rainbow Technologies) verwendet.