

2. Material und Methoden**2.1. Material**

2.1.1. Geräte

Absauger	P 7010	FALK (Bad Homburg, D)
Brutschrank, begasbar	BB16	Heraeus (Osterode, D)
Densitometer	GS 700	BioRad (Richmond, USA)
Digitalkamera	Olympus color view II	Olympus (Hamburg, D)
Durchflußzytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson (Plymouth, UK)
Eindampfer	Reaktitherm III	Pierce (Rockford, IL, USA)
ELISA-Photometer	Model 550	BioRad (Richmond, USA)
Filmentwicklungskassetten	Quanta III	Du Pont/Cronex (Bad Homburg, D)
	Quanta Detail	
Fluoreszenzphotometer	Spektra MAX Gemini	Molecular Devices (München, D)
Magnetrührer	MR2000	Heidolph (Kelheim, D)
Messwaagen	474	Kern (Albstadt, D)
	1419	Sartorius (Göttingen, D)
Mikroskope	BX 60	Olympus (Hamburg, D)
	DM IL	Leica (Wetzlar, D)
Mixer	Vortex IKA VF2	Jahnke und Kunkel (Staufen i. Br., D)
	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
Netzteile	EPS3500	Pharmacia (Uppsala, S)
Orbitalshaker	WT 17	Biometra (Göttingen, D)
pH-Meter	pH 526 inkl. SenTix 97 T	WTW (Weilheim i. OB, D)
Pipettierhilfen	Pipetus Standard	Hirschmann (Eberstadt, D)
	accu-jet	Brand (Wertheim, D)

2. Material und Methoden

Quecksilberdampfampe	U-RFL-T	Olympus (Hamburg, D)
Sterilbank	BSB 4 A	Gelaire Flow Laboratories (Opera, I)
Trockenschrank	T6	Heraeus (Osterode, D)
Ultraschallbad	Sonorex RK 52	Bandelin (Berlin, D)
Ultraschallstab	Sonoplus	Bandelin (Berlin, D)
Wasserbad	1.002	GFL (Burgwedel, D)
Western-Blot Transferapparat	Mini Trans-Blot	Bio-Rad (München, D)
Zentrifugen	BioFuge fresco	Heraeus (Osterode, D)
	BioFuge pico	Heraeus (Osterode, D)
	Labofuge 400e	Heraeus (Osterode, D)
	Cytospin 3	Shandon

2.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alkylphosphocholin:

Hexadecylphosphocholin: laboreigene Synthese (Geilen et al., 1992b)

Sphingolipidanaloga:

AD2646, AD2663, AD2665, AD2681: Synthetisiert von Dr. rer. nat. Shimon Gatt 2002, Hebrew University - Hadassah School of Medicine, Jerusalem, Israel.

Ceramidanalogen:

N-Acetylshingosin (C₂-Ceramid): Matreya, Köln, D.

Feinchemikalien:

Verschiedene Salze und Puffersubstanzen in analytischer Qualität: E. Merck (Darmstadt, D); Roth oHG (Karlsruhe, D); Serva (Heidelberg, D).

Lösungsmittel (p.A.):

E. Merck (Darmstadt, D); Roth oHG (Karlsruhe, D).

2. Material und Methoden

Weitere Verbrauchsmaterialien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

AnnexinV-Fluos-Staining-Kit	Roche (Mannheim, D)
ApoAlert™ Caspase Profiling Plate	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Bisbenzimid (Hoechst 33258)	Sigma (München, D)
Caspase-8/10 Inhibitor (Ac-IETD-CHO)	Alexis (Grünberg, D)
Caspase-9 Inhibitor (Ac-LEHD-CHO)	Alexis (Grünberg, D)
Caspase-3/7 Inhibitor (Ac-DEVD-CHO)	Alexis (Grünberg, D)
Cell-Death-Detection-ELISA ^{PLUS}	Roche (Mannheim, D)
Cytotoxicity-Detection-Kit (LDH)	Roche (Mannheim, D)
Einmalspritzen	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Fluoromount	Dako (Hamburg, D)
Kristall-Violett	ICN (Eschwege, D)
Leupeptin	Sigma (München, D)
Pepstatin	Sigma (München, D)
Propidiumiodid	Sigma (München, D)
PROTRAN Nitrozellulosetransfermembran	Schleicher & Schüll (Dassel, D)
Proteinbestimmung: BCA-Kit	Pierce (Weiskirchen, D)
RNase	Qiagen (Hilden, D)
SuperSignal Chemiluminiszenzreagens	Pierce (Weiskirchen, D)
Sterican Einmal-Kanülen	B.Braun (Melsungen, D)
T-MAT PLUS DG Filme	Kodak (Berlin, D)
Z-VAD-FMK	Becton Dickinson (Heidelberg, D)

2.1.3. Antikörper

Actin	Sigma (St. Louis, USA)
Bax	Trevigen (Gaithersburg, USA)
Bid	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
Bcl-2 (Anti-Human)	Novo Castra (Newcastle, UK)
Bcl-2 (Anti-Maus)	Upstate (Lake Placid NY, USA)
Caspase-8	Cell Signaling (Frankfurt, D)
Caspase-3	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
CH11	Immunotech (Krefeld, D)
Cytidylyltransferase SA	Eigenproduktion

2. Material und Methoden

Cytochrom C	Pharmingen (Heidelberg, D)
p53	Dako (Hamburg, D)
Sekundärer IgG-AK, Merrettichperoxidase-gekoppelt	Dako (Hamburg, D)

2.1.4. Zellkulturmaterialien

Doxycyclin	Sigma (München, D)
Dulbecco`s modified Eagle`s medium (DMEM)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Falcon Tubes: 50ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Falcon Tubes: 6ml, 15ml	Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes NY, USA)
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom Seromed KG (Berlin, D)
Genetecin G-418-Sulphat	Invitrogen (Karlsruhen, D)
L-Glutamin	Biochrom Seromed KG (Berlin, D)
Hygromycin	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Keratinocyte Basal Medium (KBM)	Cambrex (Apen, D)
Keratinocyte Growth Medium (KGM)	Cambrex (Apen, D)
Keratinocyten-SFM Medium	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Kulturflaschen	Nunc (Wiesbaden, D)
Kulturschalen 6/24-Loch	Costar (Corning NY, USA)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom Seromed KG (Berlin, D)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Biochrom Seromed KG (Berlin, D)
Pipettenspitzen	Sorenson (Salt Lake City, USA)
Roswell Park Memorial Institute 1640-Grundmedium (RPMI 1640)	Biochrom Seromed KG (Berlin, D)
Serologische Pipetten	Nunc (Wiesbaden, D)
Sterilfilter	B.Braun (Melsung, D)
Trypsin	Biochrom Seromed KG (Berlin, D)
Zellschaber	Costar (Cambridge, MA, USA)

2. Material und Methoden

2.1.5. Zelllinien

Die Experimente wurden überwiegend mit den klonierten Zelllinien HaCaT/pIRES und HaCaT/Bcl-2 durchgeführt. Die immortalisierte Kerationozytenzelllinie HaCaT (Boukamp et al., 1988) wurde uns von Prof. Dr. med. N. E. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, D) zur Verfügung gestellt. Von dieser Zelllinie wurden die Klone durch Lipofektion gewonnenen (Müller-Wieprecht et al., 2000).

Weiterhin wurden drei verschiedene humane Melanomzelllinien benutzt, die jeweils von Primärtumoren stammen. Von diesen wurden in unserem Labor stabile Transfektanten gewonnen:

- A375 (Giard et al., 1973), A375/Bcl-2 und A375/pIRES (Raisova et al., 2001)
- Mel-HO (Holzmann et al., 1988), Mel-HO/Bcl-2 und Mel-HO/pIRES (Raisova et al., 2001)
- Bro (Lockshin et al., 1985), Bro/tet-on/Bcl-2 und Bro/tet-on/pTRE (Eberle et al., 2002).

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Zellkulturmedien

A: Für die Anzucht und die Kultivierung der HaCaT-Zelllinien werden folgende Medien und Lösungen benötigt:

- phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2:

Komponenten	Menge
Natriumchlorid	8 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat	1,2 g
Kaliumhydrogenphosphat	0,2 g
H ₂ O bidest.	ad 1 l

- Trypsin-Lösung (0,3% in PBS), die als Aliquots zu 10 ml bei -20°C aufbewahrt werden

2. Material und Methoden

- Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640 Medium):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
RPMI 1640 Grundmedium		500 ml
Fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert, 30 min bei 56°C	10 %	50 ml
10.000 IE Penicillin/10.000 mg/ml Streptomycin- Stammlösung	168 µM 69 µM	5 ml
200 mM L-Glutamin	2 mM	5 ml

-KGM-Medium (Boyce und Ham, 1983):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Keratinocyte Basal Medium (KBM)		500 ml
hEGF	100 ng/ml	0,5 ml
Insulin	5 mg/ml	0,5 ml
Hydrocortison	0,5 mg/ml	0,5 ml
Gentamycinsulfat und Amphotericin-B	50 mg/ml 50 µg/ml	0,5 ml
Rinderhypophysenextrakt	7,5 mg/ml	2 ml

Die Medien werden bei 4°C gelagert.

- Keratinozyten-SFM-Medium mit Supplementierung:

Komponenten	Menge
K-SFM	500 ml
hEGF	2,5 µg
Rinderhypophysenextrakt	25 mg

Nach Supplementierung beträgt die Haltbarkeit 2 Wochen.

2. Material und Methoden

- Stammlösung für das Selektionsmedium von HaCaT/Bcl-2 und HaCaT/pIRES:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Genetecin-Sulphat	87 mM	1 g
PBS		16,6 ml

Die Lösung wird bei 4°C aufbewahrt. Die Endkonzentration im RPMI-Medium beträgt 0,87 mM.

- Einfrierlösung für HaCaT-Zellen:

FCS	4,5 ml
Dimethylsulfoxid (DMSO)	0,5 ml

Lagerung bei -20°C.

B: Medien und Lösungen für die Anzucht und Kultivierung der Melanomzellen:

- phosphatgepufferte Kochsalzlösung s.o.
- Trypsin-Lösung s.o.

- Dulbecco's Modified Eagle-Medium (DMEM):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
DMEM inkl. 4 mM L-Glutamin, 25mM Glucose, ohne Natrium- Pyruvat		500 ml
10.000 IE Penicillin/10.000 IE Streptomycin	168 µM 69 µM	
Stammlösung		5 ml
FCS		50 ml

- Selektionsmedium für Bro/tet-on/Bcl-2 und Bro/tet-on/pTRE

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
DMEM		500 ml
Hygromycin 50 mg/ml Stammlsg	100 µg/ml	1 ml
Genetecin 60 mg/ml Stammlsg.	400 µg/ml	3,3 ml

2. Material und Methoden

- **Selektionsmedium für A375/pIRES, A375/Bcl-2, Mel-Ho/pIRES und Mel-Ho/Bcl-2:**
S.o. unter HaCaT.

- **Einfriermedium für Melanomzellen**

DMEM	2 ml
FCS	2 ml
Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 ml

Lagerung der Lösung bei -20°C.

Alle komplementierten Medien können bei 4°C ca. vier Wochen gelagert werden.

2.2.1.2. Kultivierung der Zellen

A: HaCaT - Zellen

Die verschiedenen HaCaT-Zelllinien sind adhärent wachsende Zellen, die in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von $A = 75 \text{ cm}^2$ in 12 ml supplementierten RPMI-Medium, bei 37°C in gesättigter Wasserdampfatmosphäre unter 5 %iger CO₂-Begasung, als Monolayer kultiviert wurden. In dreitägigen Abständen wurde den Zellen, nach einmaligen Waschen mit 12 ml sterilen PBS, neues Medium zugesetzt, um tote Zellen und saure Stoffwechselprodukte zu entfernen. Die transfizierten Zellen erhielten zusätzlich Genetecin.

Bei maximal 80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Zunächst erfolgte eine Waschung mit 12 ml PBS, danach Zugabe von 2 ml Trypsinlösung und Inkubation bei 37°C für ca. 10 - 15 min. Unter Mikroskopkontrolle konnte die Abrundung und Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturschalen durch Verlust von Zell-Zell-Kontakten beobachtet werden. Bei zu langer Inkubation ist eine zytotoxische Permeabilisierung der Zellmembran möglich. Nach vollständiger Ablösung wurde die Proteolyse durch Zugabe von 10 ml supplementierten RPMI-Medium gestoppt und die Suspension in 50 ml Röhrchen zur Zentrifugation überführt. Die Sedimentation erfolgte bei 900 Upm (200 x g) für 3 min. Das Zellpellet wurde in 10 ml RPMI-Medium resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Um die Zellen in Kultur zu halten, erfolgte die erneute Aussaat so, dass die Zellen nach ca. 5 - 6 Tagen eine Konfluenz von 60 - 80% erreichten, was einer Zelldichte von $2 \times 10^4/\text{ml}$ bei der Aussaat entspricht. Die transfizierten HaCaT-Zellen wurden nach 24 h unter Selektionsdruck gesetzt.

2. Material und Methoden

Entsprechend den experimentellen Anforderungen, wählte man unterschiedliche Zelldichten, die in den jeweiligen Kapiteln beschrieben werden. Bei allen Versuchsansätzen mit HaCaT-Zellen wurden die Zellen zunächst zur Adaptation für 24 h auf RPMI-Medium ausgesät, daraufhin für 24 h entweder auf serumfreies KGM-Medium oder auf das äquivalente K-SFM-Medium (Genetecin-Zusatz nur bei HaCaT-Klone) gesetzt, um dann unter serumfreien Bedingungen und ohne Selektionsdruck die Versuche durchführen zu können. Bei jedem Mediumwechsel wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen.

B: Melanom-Zelllinien

Auch bei den Melanom-Zellen handelt es sich wie bei den HaCaT-Zellen um adhärent wachsende Zellen, die prinzipiell unter gleichen Bedingungen, wie unter A beschrieben, kultiviert und passagiert wurden. Abweichungen bestehen beim Einsatz der Kultur- und Selektionsmedien sowie bei den verwendeten Zelldichten und bei der Versuchsvorbereitung. Die nicht transfizierten Mutterzelllinien und die transfizierten Klone wurden jeweils mit einer Dichte von 2×10^4 /ml ausgesät, sodass sie nach ca. 5 Tagen ebenfalls eine Konfluenz von maximal 80 % erreichten. Gezogen wurden sie in supplementierten DMEM, dem im Falle der Transfektanten 24 h nach Passage das entsprechende Selektionsmedium hinzugefügt wurde. Für die Experimente wurden die Zellen in der jeweils benötigten Dichte in DMEM ausgesät und 24 h ohne Selektionsdruck kultiviert. Bei den schaltbaren Bro-Zelllinien induzierte man während dieser 24 h die Proteinsynthese mit 4 μ M Doxycyclin.

2.2.1.3. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Für das Einfrieren und Auftauen gelten für HaCaT-Zellen und Melanom-Zellen die gleichen Vorschriften. Der Zusatz von DMEM zur *melanoma freezing solution* hat sich bewährt, da die Zellen so die Gefrier- und AuftauprozEDUREN besser tolerieren und die Ausbeute an lebenden Zellen nach dem Auftauen erhöht ist. DMSO dient der Verhinderung von zytotoxischer Kristallbildung während des Einfrierprozesses innerhalb der Zellen. Alternativ zu DMSO könnte - je nach Zelltyp - auch Glycerol eingesetzt werden. Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass das Einfrieren langsam abläuft, das Auftauen jedoch sehr rasch, damit die Zellen so wenig wie möglich durch Kristallisationsprozesse geschädigt werden. Im folgenden werden die einzelnen Schritte kurz beschrieben:

2. Material und Methoden

Zellen aus einer Kulturflasche ($A = 75\text{cm}^2$) wurden einmal mit PBS gewaschen, trypsiniert, in 10 ml Medium überführt und für 3 min bei $200 \times g$ sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Gefrierlösung aufgenommen und in ein Kryo-Gefäß mit Schraubverschluss gegeben. Das Röhrchen wurde mit Zellstoff umwickelt und zunächst bei -80°C für 2 Tage gelagert (bis zu 6 Monate möglich), um danach in flüssigen Stickstoff bei -196°C unbegrenzt aufbewahrt werden zu können.

Zum Auftauen wurde das Röhrchen in ein Wasserbad mit 37°C gegeben und daraufhin die Zellen in 10 ml 37°C warmes Medium suspendiert. Nach Zentrifugation bei $200 \times g$ für 3 min wurde das Pellet in 12 ml Medium aufgenommen, um die Zellen dann auf zwei Kulturflaschen verteilen zu können. Am folgenden Tag wurden die Zellen zur Entfernung der nicht angewachsenen Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

2.2.2. Messung der Zytotoxizität

Typisches Kennzeichen des apoptotischen Zelltodes ist die Integrität der Zellmembran, die im Falle der Nekrose beschädigt und durchlässig wird. Dies kann zur Diskriminierung zwischen Zellnekrose und Apoptose herangezogen werden. Neben verschiedenen Lebendfarbstoffen (z.B.: Trypan Blau, EosinY, Nigrosin, Propidiumiodid, Ethidiumbromid), die nekrotische Zellen anfärben, da nur diese Zellen für den Farbstoff permeabel sind, existiert auch die Möglichkeit der radioaktiven Markierung intrazellulärer Stoffwechselprodukte, deren Aktivität, nach Plasmamembranschädigung, im Kulturüberstand bestimmt werden kann.

In dieser Arbeit wurde die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH), ein ubiquitär exprimiertes, zytoplasmatisches Enzym des Glucosemetabolismus im Kulturüberstand ermittelt. Die LDH wird bei Zellyse leicht in den Überstand abgegeben und ihre Aktivität bleibt stabil. Der kommerziell erhältliche "*Cytotoxicity Detection Kit* (LDH)" der Firma Roche basiert auf dem Prinzip des gekoppelten optischen Tests, der zur Bildung eines Farbstoffes führt, dessen Extinktionszunahme photometrisch bestimmt wird und proportional zur Aktivität des Enzyms ist. Der erste Schritt der Reaktion, der durch die LDH katalysiert wird, reduziert NAD^+ zu NADH/H^+ , während Lactat zu Pyruvat oxidiert wird. Im zweiten Schritt transferiert die Diaphorase H/H^+ von NADH/H^+ auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-Nitrophenyl]-5-Phenyltetrazoliumchlorid), das dabei zu dem roten Farbstoff Formazan reduziert wird. Die Extinktionszunahme wird bei 490 nm im ELISA-Photometer bestimmt.

2. Material und Methoden

Benötigte Lösungen:

- Enzymlösung (Diaphorase) und Färbelösung werden gebrauchsfertig geliefert.

- Reaktionspuffer pro Ansatz:

Enzymlösung	2 µl
Färbelösung	90 µl

Die Zellen wurden in einer Dichte von 8×10^4 /ml (HaCaT-Zellen) bzw. 1×10^5 /ml (Melanom-Zellen) in 24-Loch-Platten ausgesät und die Apoptose induziert. Vor Behandlung wurden die HaCaT-Zellen 24 h serumfrei kultiviert, da HePC sehr stark an Albumin bindet und somit Konzentrationsabweichungen von HePC durch unterschiedliche Albuminkonzentrationen ausgeschlossen wurden. Prinzipiell ist dies auch bei den Versuchen mit Melanom-Zellen zu beachten. Da diese aber nicht im serumfreien Medium kultiviert werden können, musste die Albuminbindung von HePC bei diesen Versuchen vernachlässigt werden. Nach Behandlungsende wurden die Zellen 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und 50 µl des Überstandes in ein Microtiterplatte überführt. Nach Zugabe von 50 µl Reaktionspuffer wurden die Ansätze 10 - 20 min lichtgeschützt inkubiert und dann die Extinktion bestimmt. Die Absorptionswerte der Kontrolle wurden als 100 % gesetzt und die LDH-Freisetzung der behandelten Zellen in Prozent der Kontrolle angegeben.

2.2.3. Proliferationsmessung

Die Beurteilung des Proliferationsverhaltens von Zellen ist mittels verschiedener Methoden möglich. Hierzu gehören die Messung des [^3H]-Thymidin Einbaus in die DNA der Zelle als Maß für die DNA-Synthese und damit für die Zellteilung, Zellzyklusanalysen mittels FACS-Messung, Enzymaktivitätsmessung und die Ermittlung der Zellzahl. Letztere Methode, die von Gillies et al. (1986) beschrieben wurde, kam in dieser Arbeit zum Einsatz.

Bei adhärent wachsenden Zellen, wie Keratinozyten, lösen sich tote Zellen vom Boden der Gewebekulturflaschen ab und werden mit dem Kulturüberstand abgesaugt. Nach Fixierung mit Glutaraldehyd und nachfolgender Färbung der Zellen mit Kristallviolett wird der gebundene Farbstoff mittels Triton X-100 herausgelöst und die Farbstoffmenge in der Lösung im ELISA-Photometer bestimmt.

2. Material und Methoden

Benötigte Lösungen:

- PBS s.o.

- Fixierlösung:

1 % Glutaraldehyd (v/v):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
50 % Glutaraldehyd	1 %	300 µl
PBS		ad 15 ml

Die Lösung wird immer frisch angesetzt.

- Färbelösung:

1 ‰ Kristallviolett-(w/v)-Stammlösung:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Kristallviolett	1 ‰	15 mg
PBS		ad 15 ml

Die Lösung ist bei Raumtemperatur etwa 2 Monate stabil.

0,1 ‰ Kristallviolett:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
1 ‰ Kristallviolett	0,1 ‰	1,5 ml
PBS		ad 15 ml

Die Lösung wird immer frisch angesetzt.

- Entfärbelösung:

1 % Triton X-100-Stammlösung:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Triton X-100	1 %	1 ml
PBS		ad 100 ml

Die Lösung ist bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar.

0,2 % Triton X-100:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
1 % Triton X-100	0,2 %	3 ml
PBS		ad 15 ml

Die angegebenen Mengen reichen jeweils für eine 24-Loch Platte.

2. Material und Methoden

HaCaT-Zellen wurden in einer 24-Loch-Platte in einer Dichte von 30.000 Zellen/ml ausgesät und über Nacht in RPMI 1640 Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurden sie bei einer Dichte von 30 - 40 % einmal mit je 250 µl PBS gewaschen und für weitere 24 h in KGM/K-SFM kultiviert. Nach erneuter Adaptation wurden die Zellen für mindestens 24 Stunden behandelt. Beim Proliferationsvergleich von HaCaT, HaCaT/Bcl-2 und HaCaT/pIRES wurde nach 24 stündiger Ruhepause auf KGM/K-SFM ein erneuter Mediumwechsel durchgeführt, und die Zellen nach weiteren 24 Stunden verarbeitet. Anschliessend wurden sie mit PBS einmal gewaschen und mit je 500 µl 1 % Glutaraldehyd für 30 min unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Die Fixierlösung wurde dann abgesaugt und die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen. Die Färbung der Zellen erfolgte mit 500 µl 0,1 % Kristallviolett pro Loch für 30 min unter leichtem Schwenken bei RT. Unspezifisch gebundener Farbstoff wurde durch untertauchen der 24-Loch-Platte in deionisiertes Wasser für 15 min. herausgelöst. Danach wurde das Wasser abgegossen und die Platte auf einem Zellstofftuch trocken geklopft. Um den an die DNA gebundenen Farbstoff herauszulösen, wurden je 250 µl 0,2 % Triton X-100 auf die Zellen gegeben. Nach 1 Stunde Inkubation unter leichtem Schwenken werden 100 µl der Lösung abgenommen und in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Absorption wurde bei 570 nm im Photometer gemessen. Die Extinktionswerte der Kontrolle wurden als 100 % gesetzt und daraus die Zellzahl der behandelten Zellen in Prozent der Kontrolle bestimmt.

2.2.4. Apoptosebestimmung

2.2.4.1. Messung der DNA-Fragmentierung mittels Apoptose-ELISA

Die Spaltung von chromosomaler DNA in Oligonukleotide wird als Markstein im Apoptoseprogramm gesehen, die am Ende der Signalkaskade durch spezifische Enonukleasen ausgeführt wird. An internukleosomalen DNA-Abschnitten erfolgt die Spaltung in histongebundene Mono- oder Oligonukleosomen mit ca. 180 bp, die daraufhin im Zytoplasma mit Hilfe von Anti-Histon und Anti-DNA Antikörper detektiert werden können (Zhang und Xu, 2000), noch bevor der Zusammenbruch der Plasmamembran stattfindet. Die Reliabilität dieser Methode wird allgemein als sehr hoch eingestuft.

In dieser Arbeit kam der kommerziell erhältliche *Cell Death Detection ELISA*^{PLUS} - Kit zur Verwendung, der auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA basiert und eine semiquantitative Auswertung ermöglicht. Die Zell-Lysate werden in Streptavidin-beschichtete

2. Material und Methoden

Mikrotiterplatten (MTP) gegeben und mit einem Anti-Histon/Biotin-Antikörper sowie mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-DNA-Antikörper inkubiert. Hierbei dient der Biotinanteil des Anti-Histon-Antikörpers zur Fixierung der Histon-gebundenen DNA an die Streptavidin-beschichtete MTP. Der Peroxidase gekoppelte DNA-Antikörper erkennt DNA-Sequenzen, die die Histone umwickeln. Nach Zugabe eines chromogenen Substrats kann die Absorption im ELISA-Photometer bestimmt werden.

Benötigte Lösungen:

- Lysis-Puffer, Inkubationspuffer und Substratlösung liegen gebrauchsfertig vor.
- Immunoreagenzlösung für eine Probe:

Anti-Histon/Biotin-Antikörper	4 µl
Peroxidase-gekoppelter Anti-DNA-Antikörper	4 µl
Inkubationspuffer	72 µl

Die Zellen wurden in einer Dichte von 8×10^4 /ml für HaCaT-Zellen bzw. 1×10^5 /ml für Melanom-Zellen in 24-Loch-Platten ausgesät und die Apoptose wie oben beschrieben induziert. Die HaCaT-Zelllinien wurden vor Behandlung wieder für 24 h auf serumfreies Medium gehalten. Anschliessend wurden die Zellen für 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert, danach der Überstand abgesaugt und 200 µl Lysispuffer pro Loch zugegeben. Unter moderaten Schütteln werden die Zellen 30 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wie oben beschrieben wurden 20 µl des Supernatants in die MTP überführt, 80 µl des Immunoreagenz zugegeben und der Ansatz für 2 h bei Raumtemperatur unter leichten Schütteln inkubiert. Die Vertiefungen wurden dann dreimal mit Inkubationspuffer gewaschen und 100 µl der Substratlösung zugegeben um die POD-Reaktion zu starten. Der kurzen Inkubation im Dunkeln folgte die Messung der Absorption im ELISA-Reader bei 405 nm. Die Absorption der Kontrolle wurde als 100 % gesetzt und die DNA-Fragmentierung der behandelten Zellen als Prozent der Kontrolle angegeben.

2.2.4.2. Detektion der Kernmorphologie mittels Bisbenzimid-Färbung

Um die morphologischen Kernveränderung während der Apoptose sichtbar zu machen, wurde mit dem DNA-bindenden Fluorochrom Bisbenzimid (Hoechst 33258), das mit den A-T-Regionen der DNA interkaliert, gefärbt und die Apoptoserate ermittelt. Hierzu wurden die

2. Material und Methoden

HaCaT-Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät, über Nacht serumfrei kultiviert und Apoptose induziert. Nach Behandlungsende wurde der Überstand abgenommen, und nach Ablösung der Zellen mit Trypsin den Proben wieder hinzugefügt. 80.000 Zellen wurden abgenommen, zentrifugiert und das Pellet in 100 µl PBS wieder resuspendiert. Mittels Zytospin wurden die Zellen bei 500 U/min 5 min auf Objektträger aufgeschleudert. Danach wurden die Zellen 20 min. in Aceton fixiert und anschliessend mit dem Farbstoff Bisbenzimid in einer Konzentration von 1µg/ml in PBS inkubiert. Es wurden Fluoromount-eingebettete Dauerpräparate angefertigt.

2.2.4.3. Annexin V- und Propidiumiodid-Färbung

In frühen Apoptose-Stadien finden Änderungen in der Zellmembran statt. Phosphatidylserin, das in lebenden Zellen nur im zytoplasmatischen Blatt der Plasmamembran lokalisiert ist, wird durch eine Flipase auf die Außenseite der Membran transloziert, während die Zellmembran noch intakt bleibt. Der Verlust der Membranasymmetrie während der Apoptose ist ein ubiquitäres Phänomen, das ebenso bei Pflanzen und Insekten registriert werden kann und unabhängig vom Apoptosestimulus auftritt. Auch an gealterten Erythrozyten und aktivierten Thrombozyten konnte eine Phosphatidylserinexternalisierung beobachtet werden. Makrophagen können anhand dieses Signals apoptotische Zellen erkennen und deren rasche Phagozytose einleiten. Ein Prozess also, der damit zur Wahrung der Gewebshomöostase des Gesamtorganismus beiträgt. Annexin V, ein anionisches Phospholipid-bindendes Protein, wurde zunächst als potentes antikoagulatorisches Protein aus Plazenta und Nabelschnur isoliert, dessen physiologische Bedeutung noch nicht völlig geklärt ist. Beim Antiphospholipid-Syndrom führt eine alterierte Annexin V-Bindung zu thrombotischen Ereignissen mit gehäuften Aborten (Rand, 2000). Mit Hilfe von FITC (Fluoreszin-Isozyanit)- oder Biotin-Konjugierten, rekombinantem Annexin V läßt sich die hochaffine, Calcium-abhängige Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin während der Apoptose visualisieren und quantifizieren. Zur Diskriminierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen wird mit Propidiumiodid (PI) gegengefärbt, das nur bei einer Permeabilisierung der Zellen die DNA anfärben kann (genauer 2.2.6.) (Rasola und Geuna, 2001).

2. Material und Methoden

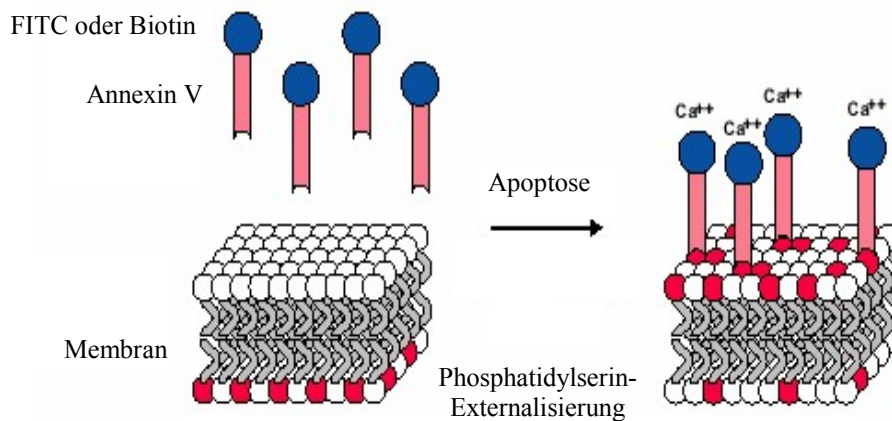


Abbildung 2.1.: Phosphatidylserinexternalisierung und Annexin V-Bindung.

Die Analyse der Proben erfolgt entweder mittels mikroskopischer Auszählung grün fluoreszierender Zellen oder im Durchflußzytometer. In diesem Falle wurde das Durchflußzytometer FACSCalibur von BectonDickinson (D) eingesetzt und die Histogramme mit *Cell Quest™* 3.0 für Macintosh (BectonDickinson) erstellt. Das Durchflußzytometer arbeitet mit einem 15 mW Argon-Ionen-Laser mit einer Exzitationswellenlänge bei 488 nm. Die grüne FITC-Fluoreszenz (FL1) wurde mit einem Bandpass-Filter bei 515 nm registriert. Bei 650 nm wurde mit einem Langpass-Filter die rote PI-Fluoreszenz gemessen. Um Interferenzen der beiden Emissionsspektren auszugleichen, mußte vor jeder Anwendung eine elektronische Kompensation ausgeführt werden. Die X-Achse der logarithmischen Fluoreszenz-Histogramme bezeichnet FL1 und auf der Y-Achse wird FL2 aufgetragen. Durch die Abgrenzung der basalen Fluoreszenz kann das Histogramm in vier Quadranten unterteilt werden. Jede Zunahme der Fluoreszenzintensität im Punkt-Histogramm entspricht einer fluoreszierenden Zelle. Zwei weitere Parameter, die die Morphologie der Zelle bestimmen, wurden ebenfalls abgeleitet. Der *forward light scatter* (FSC-H) und der *side light scatter* (SSC-H) bestrahlt jede einzelne Zelle von zwei Seiten. Das gestreute Laserlicht wird aufgenommen und an Hand des Spektrum kann eine Aussage über die Zellgröße getroffen werden. Im linearen Histogramm wurden so sehr große und sehr kleine Zellpopulationen zur Fluoreszenzmessung ausgeschlossen.

2. Material und Methoden

Benötigte Lösungen:

Der Annexin V-FLUOS *Staining Kit* enthält gebrauchsfertig 110 µl Annexin V-FITC, 150 µl Propidiumiodid und 50 ml HEPES-Puffer.

- Färbelösung für 10 Proben:

Annexin V-Fluoreszin	20 µl
Propidiumiodid	20 µl
HEPES-Puffer	1000 µl

Die Zellen wurden nach entsprechender Kultur in 6-Loch-Platten und Induktion der Apoptose trypsiniert und drei Minuten bei 900 upm zentrifugiert. Anschliessend resuspendierte man das Pellet in 1 ml PBS (RT). 1×10^6 Zellen wurden mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und pro Probe abgenommen, die dann bei 200 x g 5 min zentrifugiert wurden. In 100 µl Färbelösung wird das Pellet wieder aufgelöst und 10 - 15 min in Dunkelheit und bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Messung wurde je nach Zelldichte 0,5 - 1 ml HEPES-Bindungspuffer hinzugegeben. Jeweils ca. 10.000 Zellen analysierte das Durchflußzytometer pro Probe.

2.2.5. Protein Analyse

2.2.5.1. Zellpräparation

2.2.5.1.1. Zellfraktionierung

Die subzelluläre Fraktionierung, d.h. die Separation des zytosolischen und des mitochondrialen Kompartiments, wird zum Studium von Apoptosewegen bzw. von Signaltransduktionswegen eingesetzt, um die Translokation verschiedener Faktoren zwischen den Kompartimenten zu untersuchen. Die einzelnen Fraktionen können dann mittels Western Blot oder ELISA-Techniken analysiert werden.

Zur Zellfraktionierung wurde der *Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit* von Oncogene (Boston, USA) nach den Angaben des Herstellers benutzt.

2. Material und Methoden

Benutzte Lösungen:

- Kit Komponenten:
- *Mitochondrial Extraction Buffer*
 - *Cytosol Extraction Buffer (5 x)*
 - Protease-Inhibitor-Cocktail
 - Dithiothreitol (DTT)

Der Hersteller macht keine Angaben über die Pufferkomponenten und Inhaltsstoffe des Proteasen-Inhibitor-Cocktails. Die Puffer werden bei 4 °C gelagert, der Inhibitor Cocktail und DTT bei -20 °C. Der Proteasen-Inhibitor-Cocktail muß zunächst in 250 µl DMSO gelöst werden, DTT wird gebrauchsfertig geliefert.

- Extraktionspuffer für das Zytosol (1 x):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
<i>Cytosolic Extraction Buffer (5x)</i>	1 x	20 ml
H ₂ O		80 ml

- Extraktionspuffermix für die zytosolische Fraktion:

Komponenten	Menge
<i>Cytosolic Extraction Buffer (1 x)</i>	1 ml
Protease-Inhibitor-Cocktail	2 µl
DTT	1 µl

- Extraktionspuffermix für die mitochondriale Fraktion:

Komponenten	Menge
<i>Mitochondrial Extraction Buffer</i>	1 ml
Protease-Inhibitor-Cocktail	1 µl
DTT	1 µl

Zytosolische und mitochondriale Extraktionspufferansätze werden kurz vor Gebrauch zubereitet und während des Experiments auf Eis gelagert.

2. Material und Methoden

Die Zellen wurden in einer Dichte von 1,35 bzw. 1,25 x 10⁵/ml in 150 cm² Kulturflaschen ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen auf serumfreies K-SFM-Medium gesetzt, weitere 24 Stunden später erfolgte die Behandlung mit HePC. Am Ende der Behandlung wurden das Kulturmedium abgenommen und gesammelt, um abgelöste Zellen auch zu berücksichtigen. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, trypsinisiert und in Medium aufgenommen und zusammen mit den Zellen aus dem Überstand bei 600 x g für 5 min zentrifugiert. Nach Resuspension der Zellen in eiskaltem PBS und erneuter Zentrifugation mit 600 x g für 5 min. sowie der Entfernung des Überstandes, wurden die Pellets in jeweils 1 ml *Cytosol Extraction Buffer*-Mix gelöst. Die Proben werden 10 min auf Eis inkubiert, die dann mittels eines Gewebehomogenisators die Zellen aufgeschlossen wurden. Die Quetschung wurde 80 - 100 mal ausgeführt. Dabei muß auf ausreichende Kühlung geachtet werden. Zur Effizienzkontrolle färbte man die Zellen mit Trypan Blau, um dann nötigenfalls weitere Wiederholungen vorzunehmen.

Nachfolgend wurden die Proben in 1,5 ml Röhrchen überführt und bei 700 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen gegeben und bei 10.000 x g für 30 min bei 4°C erneut zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde als zytosolische Fraktion gesammelt. Das verbleibende Pellet wurde in 0,1 ml *Mitochondrial Extraction Buffer*-Mix resuspendiert, für 10 sek geschüttelt und als mitochondriale Fraktion aufbewahrt. Beide Fraktionen können bei -70°C gelagert werden oder sofort mittels Western Blot analysiert werden (s.u.).

2.2.5.1.2. Gesamtproteinextraktion

- Lysispuffer zur Proteinisolierung:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
10 x ExTE	1 x	300 µl
10 x SDS/Na-Cholat/Triton (SCT)	1 x	300 µl
1 mM Phenylmethan-sulfonylfluorid (PMSF)	0,5 mM	15 µl
100 µM Pepstatin	0,1 µM	30 µl
1 mM Leupeptin	0,1 mM	30 µl
H ₂ O		ad 3 ml

Der Lysispuffer wird immer frisch auf Eis angesetzt. Die angesetzte Menge reicht für ca. 10 Proben.

2. Material und Methoden

Die Zellen wurden entsprechend des Protokolls für HaCaT-Zellen bzw. Melanomzellen in 6-Loch-Platten hochgezogen. Die Zellen nach Behandlung mit PBS gewaschen und 300 µl Lysispuffer pro Loch zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat kann für einen Western Blot bei -80°C mehrere Wochen gelagert werden. Zur vollständigen Homogenisierung des Lysates wurden die Proben mit Ultraschall behandelt. Bei 100 % Leistung wurden die Proben drei mal drei Sekunden mit jeweils 10 sek Eispause dazwischen unter einen Ultraschallstab gegeben. Dabei schäumen die Proben stark. Als letzter Schritt wird durch Zentrifugation des Homogenats für 10 min bei 4°C und 400 x g der Zelldebris entfernt. Der Überstand wird zur Proteinbestimmung und Western Blot-Analyse verwendet und kann bei -20°C unbegrenzt aufbewahrt werden.

2.2.5.1.3. Proteinextraktion für Caspase-8-Spaltung

- Extraktionspuffer:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Tris-HCl pH 7,5	0,01 M	400 µl
NaCl	0,144 M	2900 µl
SDS	0,5 %	1000 µl
Nonidet P-40	0,5 %	1000 µl
EDTA	1 mM	40 µl
Leupeptin	10 µg/ml	400 µl
PMSF	2 mM	400 µl
Pepstatin	5 µg/ml	20 µl
Aprotinin	0,5 µg/ml	200 µl
H ₂ O		ad 20.000 µl

Die angesetzte Menge reicht für ca. 100 Proben.

Die HaCaT-Zellen wurden in 6-Loch-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreien Medium gehalten und dann Apoptose induziert. Bei Behandlungsende wurde der Überstand abgenommen und dem Gesamtlisat später hinzugefügt. Nach einmaligem waschen mit PBS wurden je Loch 200 µl Extraktionspuffer zugegeben. Um genügend Proteinmenge zu erhalten, fügte man das Lysat aus drei identischen Ansätzen zusammen. Die lysierten Proben

2. Material und Methoden

können so bei -20°C gelagert werden oder direkt auf Eis weiterverarbeitet werden. Dazu wurde das Lystat 10 mal durch eine braune Kanüle gepresst und im Anschluss 5 min bei $10.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Proteinkonzentration ermittelt. Entsprechende Proteinmengen wurden zur Western Blot-Analyse anschliessend auf ein 15 %iges Gel gegeben.

2.2.5.1.4. Proteinextraktion für Caspase-3-Spaltung

- Extraktionspuffer:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
10 x CHAPS-Puffer	1 x	100 μl
DTT-Stamm 250 mM	5 mM	20 μl
PMSF-Stamm 200 mM	1 mM	5 μl
H ₂ O		900 μl

Die HaCaT-Keratinocyten wurden in 24 ml Flaschen kultiviert, über Nacht auf KSFM gesetzt und dann mit HePC behandelt. Bei Behandlungsende wurden die Zellen trypsiniert, 1 mal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 100 μl Extraktionspuffer resuspendiert. Die Proben wurden dann drei mal ca. 10 sek in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und bei 37°C im Wasserbad jeweils wieder aufgetaut. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 4°C für 5 min und $13.000 \times g$. Die Proteinkonzentration der Proben bestimmte man sodann aus dem Überstand.

2.2.5.2. Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure

Diese Art der Ermittlung der Proteinkonzentration beruht auf der von Smith et al (1985) beschriebenen Methode, deren Prinzip auf der Biuretreaktion beruht. Hierbei reagieren im alkalischen Milieu Cu^{2+} -Kationen mit den Amid-Stickstoffatomen der Peptidbindungen der Proteine zu einem rot- bis blauvioletten Komplex. Die Cu^{2+} -Ionen werden im Kupfer-Proteinkomplex zu einwertigem Cu^{+} reduziert. Ein einwertiges Kupferion bildet mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure einen stabilen Chelatkomplex violetter Farbe, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm besitzt. In Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur besitzt diese Methode unterschiedliche Sensitivität:

2. Material und Methoden

Inkubationsdauer	Temperatur	Konzentrationsbereich
30 min	60°C	5 - 250 µg/ml
30 min	37°C	20 - 1200 µg/ml
2 h	Raumtemperatur	20 - 1200 µg/ml

Die Vorteile gegenüber der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) sind die leichte Handhabung, die Stabilität des Arbeitsreagenz bis zu einer Woche und die fehlende Interferenz von Detergenzien und Salzen.

Die hierfür benötigten Lösungen A und B wurden von Pierce (Weiskirchen, D) bezogen.

- Lösung A:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Dinatriumbicinchoninat	26 mM	10 g
Na ₂ CO ₃ · H ₂ O	161 mM	20 g
Dinatriumtartrat-Dihydrat	7 mM	1,6 g
NaOH	100 mM	4 g
NaHCO ₃	113 mM	9,5 g
H ₂ O		ad 1000 ml

- Lösung B:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
CuSO ₄	160 mM	1 g
H ₂ O		ad 25 ml

Beide Lösungen sind bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar.

Das Arbeitsreagenz wird durch die Zugabe von einem Teil Lösung B zu fünfzig Teilen Lösung A hergestellt. Es ist etwa eine Woche haltbar, wurde jedoch für jede Bestimmung neu angesetzt.

Eine Standardproteinkalibrierung wurde durch sukzessives Verdünnen von bovinen Serumalbumin (BSA) in Lysis-Puffer angefertigt. Der für die Proteinbereitung verwendete Lysis-Puffer enthält Leupeptin und Pepstatin, die als Peptide ebenfalls in die Biuretreaktion eingehen. PMSF und DTT, die als Reduktionsmittel im Lysis-Puffer enthalten sind, interferieren ebenfalls mit der Biuretreaktion. Daher werden alle Proben 1:4 verdünnt, und 10

2. Material und Methoden

µl davon in eine MTP pipettiert. Von der BSA-Kalibrierungsreihe werden auch 10 µl eingesetzt. Durch Zugabe von 200 µl Arbeitsreagenz pro *Well* wurde die Reaktion gestartet und bei angemessener Temperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 570 nm im Photometer bestimmt. Anhand des BSA-Standards läßt sich die Proteinkonzentration berechnen.

2.2.5.3. Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS- PAGE)

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese erfolgt modifiziert nach Laemmli (1970). In der Regel wird die elektrophoretische Proteinanalyse in Polyacrylamidgelen durchgeführt, die eine Auftrennung der Proteine nach deren Molekulargewicht ermöglicht und die Aggregation vermindert. Das Polyacrylamidgel wird durch radikalische Polymerisation von Acrylamid mit N,N'-Methylendiacylamid zur Quervernetzung hergestellt. Hierbei wird Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalbildner und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zur Radikalenstabilisierung eingesetzt. Alle Puffer beinhalten das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), das Proteine denaturiert und mit ihnen Komplexe im Verhältnis von 1,4 g Natriumdodecylsulfat auf 1 g Protein bildet. Es entsteht ein Komplex aus einem Molekül Natriumdodecylsulfat und zwei Aminosäuren. Durch die negative Ladung werden so Komplexe mit konstantem Ladung-zu-Masse-Verhältnis gebildet, wobei die intrinsische Ladung der Proteine vernachlässigbar wird. Die Wanderung der Proteine im Polyacrylamidgel erfolgt daher entsprechend der Molekülgröße (Molekularsiebeffekt). Zur Abschätzung des Molekulargewichtes eines unbekanntes Polypeptids wird ein Marker mit bekannten Molekulargewichten mitgeführt.

Benötigte Lösungen:

- AA-Bis:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Acrylamid	5,44 M	386,6 g
N,N'-Methylendiacylamid	87 mM	13,4 g
H ₂ O		ad 1000 ml

Das Verhältnis Acrylamid : Methylendiacylamid beträgt 29:1 (w/w).

2. Material und Methoden

- 10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
APS	0,44 M	0,1 g
H ₂ O		ad 1 ml

Die Lösung ist bei 4°C für vier Wochen stabil.

- Sammelgelpuffer (4 x):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Tris	175 mM	16,95 g
Natriumdodecylsulfat	3,5 mM	0,8 g
HCl		ad pH 6,8
H ₂ O		ad 200 ml

-Trenngelpuffer (5x):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Tris	375 mM	113,53 g
Natriumdodecylsulfat	3,5 mM	2,5 g
HCl		ad pH 8,8
H ₂ O		ad 500 ml

- SDS-Elektrophoresepuffer (10 x):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Tris	25 mM	60,55g
Natriumdodecylsulfat	3,5 mM	20,19 g
Glycin	190 mM	285,27 g
H ₂ O		ad 2000 m

Der pH-Wert sollte nicht eingestellt werden müssen und bei pH 8,3 liegen.

2. Material und Methoden

- Probenpuffer (5 x):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
1 M Tris/HCl pH 6,8	30 mM	750 µl
Natriumdodecylsulfat	35 mM	0,25 g
Glycerol	0,7 mM	1,25 ml
1,4 Dithiothreitol	0,1 M	0,39 g
1 % Bromphenolblau	0,15 mM	250 µl
H ₂ O		ad 5 ml

-Pipettierschema für zwei Gele der Größe 80 x 60 x 1,5 mm:

Komponenten	Trenngel					Sammelgel
	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	
H ₂ O [ml]	13,4	12,5	10,9	9,65	8,4	-
5 x Trenngelpuffer [ml]	4	4	4	4	4	-
4 x Sammelgelpuffer [ml]	-	-	-	-	-	2,0
Acrylamid (40 %) [ml]	2,5	3,75	5,0	6,25	7,5	0,6
TEMED [µl]	5	5	5	5	5	6
10 % APS [µl]	95	95	95	95	95	55

Der Ansatz für das Trenngel wurde nach Pipettierschema vorbereitet. Die Polymerisation startete mit der Zugabe von TEMED und APS. Nach gründlichem Mischen der Lösung wurde sie mit einer Pipette in eine vorbereitete Gelkammer gegeben und das Gel während der Polymerisation mit n-Butanol vorsichtig überschichtet. Die Polymerisation war nach ca. 30 - 45 min. abgeschlossen. Das n-Butanol wurde abgegossen und verbleibende Alkoholreste mit einem Filterpapier vorsichtig entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel zusammengemischt und über das Trenngel pipettiert und sofort ein Probenkamm eingefügt. Nach ausreichender Polymerisation (mindestens 30 min) wurde der Kamm entfernt und die Gelkammer in eine mit Elektrophorespuffer gefüllte Kammer gesetzt.

Die Proben wurden mit dem entsprechenden Lysispuffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration und Volumina gebracht und mit einem Viertel des Volumens Probenpuffer (5 x) versetzt. Zur Denaturierung wurden die Proteine für 5 min bei 95°C inkubiert und schließlich mit einer Hamilton-Spritze in die Probenaschen überführt.

2. Material und Methoden

Zunächst wurde die Elektrophorese für 15 min mit 30 mA je Gel gestartet, dann wurde mit 20 mA gearbeitet, bis das Bromphenolblau den Unterrand des Trenngeles erreichte und die Elektrophorese somit beendet war. Die Spannung bleibt unverändert bei 150 V. Die Gelkammer wird zerlegt und die Gele für den Western-Blot vorbereitet.

2.2.5.4. Western-Blot

Nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE lassen sich einzelne Proteine durch Bindung eines spezifischen Antikörpers nachweisen. Innerhalb des Gels ist keine optimale Antigen-Antikörperreaktion zu erzielen, sodass die Proteine mittels eines elektrischen Feldes, das vertikal zum Gel angeordnet ist, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden. (Towbin, 1979). Aufgrund der negativen Ladung der Proteine (s.o.) wandern sie von der Kathode in Richtung Anode auf die Membran. Auf ihr kann nun die Antigen-Antikörperreaktion stattfinden. Mit einem sekundären, enzymgekoppelten Antikörper, der an den primären, spezifischen Antikörper bindet, läßt sich das gesuchte Protein visualisieren.

Benötigte Lösungen:

- Transferpuffer (2 x):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Tris	25 mM	12,11 g
Glycin	192 mM	57,65 g
Methanol	4,9 mM	800 ml
H ₂ O		ad 2000 ml

Der pH Wert liegt ohne Adjustierung bei etwa 7,4.

- PBS (10 x):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
KCl	2,68 mM	4 g
KH ₂ PO ₄	1,47 mM	4 g
NaCl	137 mM	160 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8,09 mM	28,8 g
H ₂ O		ad 2000 ml

Der pH Wert liegt ohne Adjustierung bei etwa 8,3. Die Osmolarität beträgt etwa 300 mosmol.

2. Material und Methoden

- Färbelösung:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Ponceau S	13 mM	10 g
Trichloressigsäure	0,9 M	50 ml
H ₂ O		ad 1000 ml

Das Blotting sollte sofort nach der SDS-PAGE erfolgen, da die Proteine im Gel diffundieren können. Whatman-Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran wurden in Größe des Gels vorbereitet und zusammen mit den Elektrodenschwämmen für 5 min in Transferpuffer equilibriert. Dabei ist die Nitrocellulosemembran nur mit Handschuhen zu berühren. Die Transfereinheit wurde in Transferpuffer zusammengestellt: in Richtung der Anode bzw. des schwarzen Transfergitters wurde zunächst ein Elektrodenschwamm, dann ein Whatman-3MM-Filterpapier, darauffolgend das Gel, dann die Membran und erneut ein 3MM-Papier gelegt. Um Luftblasen zu entfernen wurde einige Male mit einem Zentrifugenröhrchen die Anordnung ausgerollt. Schließlich wurde ein weiterer Schwamm aufgelegt, das Gitter zusammengeklappt und in die mit Transferpuffer gefüllte Blot-Kammer eingesetzt. Der Transferpuffer sollte die gesamte Transfereinheit bedecken. Der Transferpuffer wurde während des Blot-Vorganges gemischt und die Apparatur zur Kühlung auf Eis gestellt. Der Transfer erfolgt mit 250 mA und 100 V für 1 h. Nach dem Blotting wurden die Proteine transient mit Ponceau gefärbt, um den Erfolg des Transfers zu prüfen und um die Markerbanden mit Bleistift zu markieren. Die Membran wird dazu 2 - 5 min in der Färbelösung geschwenkt. Nachdem die Proteinbanden sichtbar geworden sind, wird die Membran in destilliertem Wasser wieder ausgespült.

2.2.5.5. Immunodetektion der Proteine

Nach dem Transfer der Proteine können diese nun mit dem spezifischen, primären Antikörper nachgewiesen werden. Nachfolgend wird ein sekundärer Antikörper zugegeben, der gegen das allgemeine Fc-Fragment des primären Antikörpers gerichtet ist. Er ist mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert und der Luminol als Reduktionsmittel dient. Der oxidierte Zustand entspricht einem höheren Energieniveau von Luminol, das beim Übergang in den Grundzustand Licht emittiert und Röntgenfilme schwärzen kann.

2. Material und Methoden

Benötigte Lösungen:

- PBS-T (1 x):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Tween-20	0,1 %	500 µl
PBS 10 x		50 ml
H ₂ O		ad 500 ml

- Blockierungs-Puffer:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Magermilchpulver	1 %	1 g
PBS-T (1 x)		100 ml

- Super Signal Chemiluminiszenzlösung (Pierce):

Komponenten	Menge
Luminol/ Enhancer Lösung	3 ml
Peroxidlösung	3 ml

- Stripping-Puffer:

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
Glycin	0,2 M	15 g
SDS	35 mM	10 g
Tween 20	0,1 %	1 ml
HCl		ad pH 2,3
H ₂ O		ad 1000 ml
Natriumazid 5 M	10 mM	2 ml

Das Natriumazid wird vor Gebrauch zugegeben. Der Puffer ist bei Raumtemperatur 1 Monat stabil.

Nachdem die Ponceau-Färbelösung ausgespült wurde, inkubierte man die Membran für eine Stunde in Blockierlösung (10 ml) bei RT unter leichtem Schütteln. Danach wird der jeweilige primäre Antikörper in frischer Blockierlösung (10 ml) verdünnt und die Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert.

Darauffolgend wurde die Membran zwei mal 10 min in PBS-T gewaschen und der sekundäre Antikörper in frischer Blockierungslösung mit einer einheitlichen Verdünnung von 1:10.000 zugegeben. Nach 1 h Inkubation wurde die Membran drei mal mit PBS-T und zweimal mit

2. Material und Methoden

PBS gewaschen, um störendes Tween zu entfernen. Abschließend wurde die Membran mit der Chemilumineszenzlösung 5 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Membran wurde, durch eine Plastikfolie geschützt, abgelegt und überschüssige Lösung und Luftblasen unter leichtem Druck ausgestrichen. Zur Belichtung wurde ein Röntgenfilm und die Membran in einer Filmkassette exponiert, wobei die Expositionsdauer je nach Intensität des Signals variieren kann. Vor der Detektion weiterer Proteine mit ähnlicher Größe muß die Membran gestrippt werden. Dazu wurde die Membran in 10 ml Stripping-Puffer für mindestens 2 h geschüttelt, danach kurz in PBS-T gewaschen und eine weitere Proteinanalyse kann dann mit einem anderen primären Antikörper wie oben beschrieben durchgeführt werden.

Primärer Antikörper	Verdünnung
Anti- β -Actin	1:100.000
Anti-Bax	1:200
Anti-Bcl-2 (Maus)	1:1000
Anti-Bcl-2 (Human)	1:1000
Anti-Bid	1:250
Anti-Caspase-3	1:500
Anti-Caspase-8	1:500
Anti-CH11	1:250
Anti-Cytidylyltransferase	1:500
Anti-Cytochrom C	1:500

2.2.6. Zellzyklusanalysen

2.2.6.1. Methodenprinzip

Der DNA-Gehalt der Zelle ist ein Reifungsmarker im Zellzyklus. Am Anfang des Zellzyklus, also in der G1-Phase, haben die meisten Zellen einen diploiden DNA-Gehalt (2n). Während der S-Phase replizieren die Zellen die DNA und der DNA-Gehalt erhöht sich proportional zur Progression der S-Phase, an deren Ende sie den doppelten DNA-Gehalt aufweisen (4n) und

2. Material und Methoden

die Zellen in die G₂-Phase eintreten. Schließlich gehen die Zellen in die Mitose, um sich zu teilen und der Zellzyklus beginnt erneut. Daher gestattet die Messung des DNA-Gehaltes der Zelle die Zuordnung zu den einzelnen Zellzyklusphasen.

Die univariante Analyse des zellulären DNA-Gehaltes ist deshalb die einfachste und allgemein gebräuchlichste Methode, um die Verteilung der Zellen im Zellzyklus zu ermitteln. Sie ist eine Hauptanwendung der Durchflußzytometrie. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes muß mit einem für Nukleinsäuren spezifischen Fluorochrom wie z.B. 4'6'-Diamino-2-phenylindole (DAPI) und Propidiumiodid (PI) gefärbt werden. PI ist hierbei der am weitesten verbreitete Farbstoff (Darzynkiewich, 1994). Es bindet stöchiometrisch an die DNA und nach Exzitation mit blauem Licht (488 nm) emittiert PI rotes Licht (650 nm). Intakte Zellmembranen lebender Zellen verhindern die Aufnahme des Farbstoffes, daher müssen die Zellen zunächst fixiert und/oder permeabilisiert werden. Da PI auch an doppelsträngige RNA bindet, werden die Proben gleichzeitig mit RNase inkubiert, um die RNA vollständig aus der Zelle zu eliminieren.

Innerhalb des Durchflußzytometers wird der Farbstoff in jeder einzelnen Zelle durch einen Laserstrahl angeregt. Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional zum Gehalt an Farbstoff und daher auch an DNA in der Zelle. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung werden als Histogramme des zellulären DNA-Gehaltes angegeben. Die Histogramme zeigen die Verteilung der Zellen im Zellzyklus, entsprechend der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten. Zur Berechnung der aktuellen prozentualen Anteile werden die Flächen unter der Funktion mit Hilfe von kommerziell erhältlicher Software integriert.

2.2.6.2. Vorbereitung der Proben

Die Zellen wurden in einer Dichte von 8×10^4 /ml für HaCaT/pIRES bzw. 9×10^4 /ml für HaCaT/Bcl-2 in 6-Loch-Platten ausgesät. Vor der Behandlung wurden die Zellen über Nacht auf serumfreies Medium gesetzt. Am Ende der Behandlung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und, wie unter 2.2.1.2. beschrieben, mit Trypsin geerntet. Die Zellsuspension wurde bei $200 \times g$ für 5 min zentrifugiert, danach der Überstand abgenommen und in 1 ml PBS resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei $200 \times g$ für 5 min. Das verbliebene Pellet wurde vorsichtig in 70 %igem eiskalten Ethanol in PBS (v/v) resuspendiert und mindestens 2 h bei -20°C fixiert und permeabilisiert.

2. Material und Methoden

2.2.6.3. Messung des DNA-Gehaltes

Die Proben wurden auf RT erwärmt, bei 400 x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet einmal in 1 ml PBS gewaschen und die Zentrifugation wurde wiederholt. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 1ml Propidiumiodid-Lösung resuspendiert und ca. 30 min in Dunkelheit inkubiert. Die Messung erfolgte in 5 ml Polystyren-Röhrchen und die Proben wurden mit einem FACSCalibur-Durchflußzytometer (BectonDickinson, D) analysiert. 20.000 Ereignisse/Probe wurden jeweils ausgewertet und die DNA-Histogramme mittels *Cell Quest™* 3.0 für Macintosh (BecktonDickinson) erstellt. Die prozentuale Zellzyklusverteilung wurde mit ModFit LT 2.0 für Macintosh (B&D) errechnet.

Benutzte Lösungen:

- Propidiumiodid Lösung (für 4 Proben):

Komponenten	Arbeitskonzentration	Menge
PBS		ad 5 ml
10 % Triton X-100 in PBS	0,1 %	50 µl
RNase A (DNase frei) 10 mg/ml	20 %	100 µl
Propidiumiodid 10 mg/ml	2 %	10 µl

2.2.7. Caspasen-3/7-Aktivitäts-Assay

Die Ausführung der Apoptose beruht auf der Aktivierung von Caspasen. Da zu deren Aktivierung nicht in allen Fällen die Spaltung der Caspasen erforderlich ist, kann man auf Proteinebene eine Aktivierung unter Umständen nicht dokumentieren. Die Erhebung der Enzymaktivität, d.h. die Spaltung von Substraten, ist unabhängig von der Frage, ob tatsächlich das Enzym zur Aktivierung gespalten werden musste und eignet sich daher zur Überprüfung der Caspasen-Kaskade. Zu diesem Zweck kam in dieser Arbeit der kommerziell erhältliche *Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assay* (Promega, D) zum Einsatz, dessen Prinzip sich auf die Messungen fluoreszierender Spaltprodukte stützt. Er zeichnet sich durch eine leichte Handhabbarkeit aus, und ist einsetzbar bei kultivierten Zellen oder gereinigten Enzympräparationen. Das rotfluoreszierende Substrat Rhodamin 110,-bis-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-L-Aspartamid) (Z-DEVD-R110) wird von Caspase-3 gespalten und setzt den fluoreszierenden Farbstoff Rhodamin 110 frei, der nach Exzitation bei

2. Material und Methoden

499 nm ein Emissionsmaximum bei 521 nm aufweist. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu vektorbehandelten Zellen ist proportional der Caspasenaktivierung.

Benötigte Lösungen:

Nach Angaben des Herstellers werden die mitgelieferten Komponenten 1:100 verdünnt.

- Caspase-3/7-Reagenz:

Substrat Z-DEVD-R110	100 µl
<i>Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Buffer</i>	9900 µl

Die angesetzte Menge reicht für 100 Proben. Sie ist unter Lichtschutz 24 h stabil.

Auf einer 96-Loch-Platte wurden die HaCaT/Bcl-Zellen in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml bzw. bei HaCaT/pIRES zu 4×10^4 Zellen/ml in einem Volumen von 100 µl ausgesät. Nach 24 h wurden serumfreies Medium hinzugefügt und nach weiteren 24 h erfolgte die Behandlung über 2 h, 4 h und 6 h mit 7,5 µM HePC. Es wurden 100 µl Reagenz ohne Entfernung des Mediums hinzugefügt, sodass das Reaktionsvolumen 200 µl beträgt. Die Platte wurde abgedeckt und je nach Intensität des zu erwartenden Signals mindestens 30 min aber bis zu 18 h unter leichtem Schütteln (500 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messungen wurden an einem Fluoreszenz-ELISA-Reader durchgeführt. Die Fluoreszenzzunahme, die proportional zur Caspasenaktivierung ist, wurde in Prozent der Kontrolle angegeben.

2.2.8. Lichtmikroskopie

Zur Anfertigung von lichtmikroskopischen Dauerpräparaten kultivierte man die Zellen auf Kammerobjektträgern in 500 µl Medium nach dem bekannten Protokoll. HaCaT/Bcl-2 wurden in einer Dichte von 7×10^4 Zellen/ml ausgesät, entsprechend dazu die HaCaT/pIRES zu 6×10^4 Zellen/ml. Nach Behandlungsende wurden die Objektträger mit PBS gespült und die Zellen 20 min in Acteon fixiert. Die Zellen wurden anschliessend mit Fluoromount eingebettet und mit Deckgläschen belegt.

2. Material und Methoden

2.2.9. Statistik

A: Students-t-Test

Zum Vergleich von Mittelwerten zweier Messungen auf signifikante Unterschiede wurde der Students-t-Test verwendet. Dieser Test findet Anwendung, wenn die Varianz s^2 der Stichprobe als gleich angenommen werden kann, wobei ausgenutzt wird, dass die Differenz zweier normverteilter Variablen, x und y , selbst wieder normalverteilt ist. Dazu wird die beobachtete Abweichung zwischen den Stichprobenmitteln in Einheiten der Standardabweichung ausgedrückt und es wird geprüft, ob dieser Wert größer oder kleiner als der Wert ist, den man bei einer t-verteilten Variablen nach Zufall gerade noch erwarten kann. Der Wert für t errechnet sich aus dem Quotienten der Differenz der Mittelwerte und dem Punktschätzwert der Standardabweichung der Stichprobenmittel:

$$t = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{s \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}}, \text{ wobei sich } s \text{ errechnet aus:}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^n x_i - \frac{1}{n} \left(\sum_{i=0}^n \bar{x} \right)^2 + \sum_{i=0}^m y_i - \frac{1}{m} \left(\sum_{i=0}^m \bar{y} \right)^2}{n - 1 + m - 1}}$$

Hierbei bedeuten:

s^2 = Varianz der messungen X und Y

x_i = Messwerte der Messung X

y_i = Messwerte der Messung Y

\bar{x} = Mittelwert aller x_i

\bar{y} = Mittelwert aller y_i

n = Anzahl der Messwerte x_i

m = Anzahl der messwerte y_i

2. Material und Methoden

Die Nullhypothese wird verworfen, wenn der Betrag von t größer als ein Schwellenwert bei einem Niveau von P ist. Als ein Maß für die Signifikanz der Unterschiede von zwei Messungen wird P in Prozent angegeben.

B: Standardabweichung

Im Ergebnisteil dieser Arbeit werden für alle Meßwerte (im Falle von Drei- oder Mehrfachbestimmungen) der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Der Berechnung der Standardabweichung liegt folgende Formel zugrunde:

$$s_{n-1} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Hierbei bedeuten:

s_{n-1} = Standardabweichung

n = Anzahl der Messungen

x_i = Meßwerte der Messungen X

\bar{x} = Mittelwert