

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

Chemikalien wurden von den Firmen Sigma, Fluka, Boehringer Mannheim / Roche Diagnostics, Calbiochem, Pierce, Merck und Molecular Probes bezogen.

Antikörper stammten von Boehringer Mannheim / Roche Diagnostics sowie Pharmingen. Die RAGE-Antikörper wurden von Dr. J. Li (New York) und MSD zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Radionukleotide lieferte Pharmacia Amersham.

Für die Zellkultur wurden Medien und Supplemente der Fa. Gibco verwendet, Verbrauchsmaterial wurde von Greiner, Falcon und Becton-Dickinson bezogen.

Primer für die PCR wurden durch die Fa. Roth synthetisiert, das NfκB-Oligonukleotid wurde von Promega bezogen. Die RAGE-Antisense Oligos stellte Frau Dr. A. Bierhaus, Tübingen, zur Verfügung. Die Sequenzen der verwendeten Primer und Oligonukleotide sind im Folgenden aufgeführt:

PCR - Primer:

Receptor of Advanced Glycation Endproducts (RAGE) :

|        | Basenabfolge in 5'-3'       | Position in der humanen Sequenz |
|--------|-----------------------------|---------------------------------|
| hRAGE1 | GGT GCT CAA AAC ATC ACA GCC | 63-84                           |
| hRAGE2 | TCT CAG GGT GTC TCC TGG TC  | 547-528                         |
| hRAGE3 | GAG CCA GAA GGT GGA GCA GT  | 726-746                         |
| hRAGE4 | GAC TGA TTC AGT TCT GCA CG  | 1153-1172                       |

Kontrollprimer :

|               |   |
|---------------|---|
| β-Aktin sense | 5'- TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA -3' |
| β-Aktin anti  | 5'- CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG -3' |

RAGE-Antisense Oligos:

|         |                             |
|---------|-----------------------------|
| anti:   | 5'- AACTGCTGTTCCGGCTGC - 3' |
| sense : | 5'- GCAGCCGGAACAGCAGTT - 3' |

NF $\kappa$ B - Oligonukleotid für EMSA:

5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCA GGC -3'

Die Peptide  $\beta$ A4 (1-40),  $\beta$ A4 (25-35) und  $\beta$ A4 (25-35) scrambled wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Palm durch Festphasensynthese hergestellt, abgespalten und deprotektioniert. Die Aufreinigung erfolgte durch präparative HPLC über eine RP18 Säule. Reinheit und Molmasse von  $\beta$ A4 (1-40) wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Spengler (Fakultät für Chemie) durch MALDI bestätigt.

Sequenzen der verwendeten Peptide:

|                    |  |
|--------------------|--|
| $\beta$ A4 (1-40)  | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV |
| $\beta$ A4 (25-35) | GSNKGAIIGLM                              |
| scrambled          | KSGNMLGIIAG                              |

Molekulargewichtsstandard für die SDS-PAGE: Color Marker high range, Sigma

DNA-Größenmarker: Gene ruler 1kb Ladder, MBI

## 2.2. Methoden

### 1. Herstellung von AGEs

(nach Brownlee et al., 1988)

#### 1.1. BSA AGE

1mM BSA in 1 x PBS, pH 7,4 werden mit 1M Glukose oder mit 1M Glukose und 1M Fruktose bei 50°C inkubiert.

#### 1.2 Ovalbumin AGE

1mM Ovalbumin in 1 x PBS, pH 7,4 werden mit 1M Glukose oder mit 1M Glukose und 1M Fruktose bei 50°C inkubiert.

Durch die Inkubation der Ansätze bei 50°C wird die AGE-Bildung, die bei niedrigen Temperaturen sehr langsam abläuft, beschleunigt. Die Gefässe werden nur locker verschlossen, um die AGE-Bildung durch Zufuhr von Sauerstoff zu beschleunigen. Verdunstete Flüssigkeit wird von Zeit zu Zeit aufgefüllt. Die AGE-Bildung wird über die Messung der OD bei 360nm und 400nm verfolgt. Nach etwa 6 Wochen ist keine Zunahme der OD mehr zu beobachten, die Proteine werden als maximal AGE-modifiziert angesehen und aufgearbeitet.

Aufarbeitung:

Ungebundener Zucker wird durch 1-wöchige Dialyse der AGEs gegen Wasser bei täglichem Wasserwechsel entfernt. Die AGEs werden lyophilisiert und in 1 x PBS, pH 7,4 aufgenommen. Danach erfolgt die Bestimmung des messbaren Proteins nach Bradford mit BSA als Standard. Weiter wird die OD bei 400nm und 360nm bestimmt sowie die Fluoreszenz (Exc.370nm / Em. 440nm). Mittels DC (s. 2) und GOD-Assay (s. 14) wurden die Präparationen auf die Abwesenheit von ungebundenem Zucker überprüft. Obwohl der hohe Zuckergehalt und die Inkubationstemperatur ein Bakterienwachstum nahezu ausschliessen, werden die verschiedenen AGE-Präparationen regelmässig auf Kontamination mit Endotoxinen getestet. Vor dem Einsatz in der Zellkultur wurden die AGEs ausserdem 20 min. auf 70°C erhitzt.

#### 1.3 Herstellung von $\beta$ A4 - AGE

$\beta$ A4 (1-40) wird als Stocklösung in A.dest eingelöst und entsprechend verdünnt.

Zur Herstellung von  $\beta$ A4-AGE werden 2 mg  $\beta$ A4 / ml mit 50 mM Glukose in PBS bei 50°C für 10 Wochen inkubiert. Flüssigkeitsverlust durch Verdampfen wird durch Auffüllen des Ansatzes mit A.dest ausgeglichen.

### Aufarbeitung

Im Gegensatz zu Protein-AGEs kann ungebundener Zucker bei den  $\beta$ A4-AGEs nur schlecht durch Dialyse entfernt werden, da das aggregierte Amyloid an den Dialysemembranen haftet. Daher wurde das  $\beta$ A4-AGE durch mehrmaliges Waschen der gebildeten Amyloid-AGE Aggregate mit A.dest. aufgearbeitet.

Der Reaktionsansatz wurde 15 min. bei 15000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das  $\beta$ A4-AGE Pellet in Wasser aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde drei Mal wiederholt, nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 1 x PBS aufgenommen. Die Überstände aus den Waschschriften sowie das fertige AGE wurden mittels GOD-Assay (s. 14) und DC (s. 2) auf freien Zucker überprüft. OD, AGE-Fluoreszenz und ThioT Fluoreszenz wurden bestimmt. Die AGE-Bildung wurde ausserdem über die charakteristische Fluoreszenz (Exc. 370nm, Em. 440nm) mit FPLC bestätigt.

## **2. Dünnschichtchromatographie zum Nachweis von Sacchariden**

Um sicherzustellen, dass die fertigen AGE-Präparation keine freien Zucker mehr enthielten, wurden 1 $\mu$ l Aliquots der AGEs auf HPTLC Kieselgelplatten ohne Fluoreszenzindikator (Merck) aufgetragen. Als Laufmittel diente Butanol / Pyridin / A.dest im Verhältnis 6 : 4 : 3 .Die Entwicklung erfolgte durch Eintauchen in 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Ethanol und Erhitzen auf 100°C. Die Nachweisgrenze für Zucker liegt unter 0,1mM.

## **3. Endotoxintest ( LAL-Test)**

Der Limulus-Amöbocytenlysat-Test ist ein sehr sensibler Test auf bakterielle Endotoxine. Endotoxin katalysiert dabei dosisabhängig die Aktivierung eines Proenzym aus Amöbocyten des Pfeilschwanzkrebses und führt in einer Proteasereaktion zum Festwerden des Testansatzes. Endotoxin-negative Proben gelieren nicht. Es wurde der E-Toxate-Test der Fa. Sigma verwendet und nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

## **4. Entfernen von Endotoxin aus AGE-Präparationen mit PolymyxinB**

Zum Entfernen von Endotoxinen wurde Polymyxin B-Agarose der Firma Pierce lt. Vorschrift eingesetzt.

## **5. Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung erfolgt nach Bradford. Coomassie Brilliant Blue komplexiert in saurer Lösung mit Proteinen, vermutlich über die Reaktion mit freien NH<sub>2</sub>-Gruppen von Argininresten. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465nm nach 595nm. Ein Aliquot der Probe wurde mit 500µl Reagenz gemischt, die Messung erfolgt nach 5 min. Inkubation gegen eine Leerprobe. Der Proteingehalt der Probe wurde mit Hilfe eines BSA-Standards errechnet.

### **Bradford - Reagenz**

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Coomassie Brilliant Blue | 100 mg |
| Ethanol abs.             | 50 ml  |
| Phosphorsäure 85%        | 100 ml |
| A.dest.                  | ad 1 l |

## **6. Fluoreszenzmessungen**

### **6.1 AGEs**

AGEs zeigen nach Anregung bei 370nm ein charakteristische Emissionsmaximum bei 440nm (Monnier & Cerami, 1981). Zur Fluoreszenzmessung wurde eine geeignete AGE-Verdünnung in 1 x PBS oder A. dest verwendet. Als Leerwert dienen entsprechend A.dest oder PBS.

### **6.2 Detektion von A4 Fibrillen über Thioflavin T - Fluoreszenz**

Bei der Alterung von  $\beta$ A4 entstehen fibrilläre Aggregate mit  $\beta$ -Faltblattstruktur (Lansbury, 1992). Diese bilden Addukte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T und erhöhen dessen Emissionsmaximum bei 480nm.

### **Testpuffer**

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Phosphatpuffer, pH 6 | 50 mM     |
| Thioflavin T         | 3 $\mu$ M |

Anregungswellenlänge 450 nm, Emissionsmaximum 480 nm

**7. Messung der Radikalproduktion von AGEs durch Reduktion von Cytochrom c**

(Sakurai &amp; Tsuchiya, 1988)

Die Superoxidproduktion der AGEs wurde über die Messung der Reduktion von Cyt c bestimmt. Aliquots der zu testenden AGEs wurden in 1ml Cyt c -Lösung gegeben, gut gemischt und 10min. die Extinktionsänderung bei 550nm, 25°C verfolgt. Die Menge des gebildeten  $O_2^-$  wurde mittels des Extinktionskoeffizienten für Cyt c errechnet (93000  $cm \cdot mol^{-1}$ ) und auf den Proteingehalt der AGEs bezogen.

Testlösung

|   |             |
|---|-------------|
| Cyt c (horseheart)                        | 10 $\mu$ M  |
| EDTA                                      | 100 $\mu$ M |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,8 | 50mM        |

**8. Bestimmung des CML-Gehalts von AGE-Präparationen durch kompetitiven ELISA**

Der CML-Gehalt von AGEs wurde mittels eines kompetitiven ELISAs der Fa. Roche Diagnostics mit einem monoklonalen CML-Antikörper bestimmt. Probe und Antikörper konkurrieren dabei um die Bindung an BSA-AGE, die absolute Menge an CML in der Probe wird anhand einer Eichkurve bekannter Konzentration bestimmt.

**9. Inkubation von  $\beta$ A4 mit Zuckern und / oder Übergangsmetallionen**

1 mg / ml  $\beta$ A4 wurde in A.dest gelöst, der pH wurde mit NaOH neutralisiert. Soweit bei den Einzelexperimenten nicht anders angegeben, wurde für die "Crosslinking"-Experimente folgender Ansatz zusammenpipettiert und bei 50°C inkubiert:

|                     |                          |
|---------------------|--------------------------|
| $\beta$ A4          | 250 $\mu$ l (60 $\mu$ M) |
| Glukose o. Fruktose | 50 mM                    |
| 10x PBS, pH 7,4     | 100 $\mu$ l              |
| Metall-ionen        | 10 $\mu$ M               |
| A.dest              | ad 1 ml                  |

Für die Übergangsmetall-Lösungen wurden verwendet: CuCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 20 $\mu$ l Reaktionsmix, d.h. 5 $\mu$ g  $\beta$ A4, entnommen und für die spätere Analyse im Tricin-Gel eingefroren.

## **10. Einbau von [<sup>14</sup>C]-Zuckern in $\beta$ A4**

Zur Messung der Einbaurate und -Geschwindigkeit von [<sup>14</sup>C]-markierten Zuckern in glykiertes  $\beta$ A4 wurde  $\beta$ A4 entweder mit D-[U-<sup>14</sup>C]Fruktose oder mit D-[U-<sup>14</sup>C]Glukose bei 50°C inkubiert. Dabei betrug das Verhältnis markierten zu unmarkierten Zuckers 1:137.

Nach 48 h wurde ungebundener Zucker durch Zentrifugation über ein Sephadex G10 Säulchen aus dem Reaktionsansatz entfernt und die Ansätze noch weitere 48 h inkubiert. Alle 24 h wurden je 20  $\mu$ l zur späteren Analyse im Tricin Gel entnommen.

### Reaktionsansatz

|                               |             |
|-------------------------------|-------------|
| $\beta$ A4                    | 60 $\mu$ M  |
| Glukose bzw. Fruktose         | 50 mM       |
| D-[U- <sup>14</sup> C] Zucker | 365 $\mu$ M |
| in 1 x PB pH 7,4              |             |

Die Proben wurden im SDS / Tricin-Gel aufgetrennt, gefärbt und 48 h entfärbt, um den [<sup>14</sup>C]-Hintergrund zu minimieren. Das getrocknete Gel wurde 2 Wochen auf einem Röntgenfilm (Kodak) exponiert, die erhaltenen Banden eingescannt und mittels ImageQuant Software ausgewertet.

## **11. Nachweis von $\beta$ A4-AGE und Größenbestimmung von $\beta$ A4 - Oligomeren mit FPLC**

Die Molekulargewichte von  $\beta$ A4-Oligomeren sowie die AGE-Bildung von  $\beta$ A4 mit Glukose wurde durch Gelfiltrationschromatographie über eine Superdex 75 HR 10/30 Säule bestimmt. Die Säule wurde in 1 x PBS äquilibriert, der Lauf erfolgte in 1 x PBS bei einer Flussrate von 0,5 ml / min. Die AGE-spezifische Fluoreszenz sowie die Absorption bei 280nm wurden bestimmt.

## **12. Zellkultur**

### 12.1. Herstellung von Zellkulturmedium

Es wurde ausschliesslich DMEM (Dulbeccos modified Eagles Medium) verwendet, dieses wurde aus Pulvermedium und Natriumcarbonat entsprechend den Anweisungen des Herstellers angesetzt und durch einen 0,2  $\mu$ m Mediumfilter (Spektrum) sterilfiltriert.

vor Gebrauch wurden dem Medium zugesetzt:

|              |             |
|--------------|-------------|
| L-Glutamin   | 2mM         |
| Penicillin   | 100µg/ml    |
| Streptomycin | 100U/ml     |
| FKS          | 10% oder 1% |

FKS : Foetales Kälberserum wurde 30 min. bei 56°C hitzeinaktiviert, aliquotiert und bei -20°C gelagert

### 12.2. Zelllinien

BHK 21 : Baby Hamster Kidney cells, Fibroblastenzelllinie, aus Nierengewebe von *Mesocricetus auratus* abgeleitet

SH-SY5Y : humane, dopaminerge Neuroblastoma Zelllinie (ATCC No.: CRL-2266), keine Mutation in p53, nicht resistent gegen oxidativen Stress (Kitamura et al., 1998)

### 12.3 allgemeine Zellkulturtechniken

Die Zellkultur erfolgt im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, Subkultivierung 1-2 mal die Woche.

Es wurden 10 cm Petrischalen oder Zellkulturflaschen verschiedener Grösse verwendet.

Alle verwendeten Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, auf 37°C erwärmt.

BHK 21 Zellen wurden vorsichtig durch Inkubation mit EDTA-Lösung pH 7,4 abgelöst, in Medium resuspendiert und in entsprechender Verdünnung wieder ausgesät.

SH-SY5Y Zellen wurden mit 1 x PBS gewaschen und mit 1 x Trypsin / EDTA (Gibco) inkubiert. Wenn die Zellen sich ablösten wurde das Trypsin durch Zugabe von Kulturmedium inaktiviert, die Zellen von der Platte gespült, 5 min. bei 4000 rpm pelletiert, in frischem Medium aufgenommen und in der gewünschten Verdünnung ausgesät.

### 12.4. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt entweder mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wobei lebende und tote Zellen durch Trypanblau Färbung unterschieden werden können oder mittels Zellzähler (Casy Coulter Counter). Dabei kommt es beim Passieren einer Kapillare je nach Zellgrösse zu kürzeren oder längeren Unterbrechungen des Stromflusses. Es erfolgt eine Auftrennung der Zellen nach Grösse und Membranintegrität.

Berechnung Neubauer Zählkammer :

Die Zellzahl pro ml errechnet sich aus der Zahl der Zellen in den 4 grossen Quadraten multipliziert mit dem sogenannten Kammerfaktor. Dieser ergibt sich aus dem Volumen der Zählkammer und beträgt  $2,5 \cdot 10^3$ .

### 12.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen können bei  $-80^\circ\text{C}$  einige Monate, in flüssigem  $\text{N}_2$  bei  $-170^\circ\text{C}$  mehrere Jahre gelagert werden. Dazu werden Zellen einer konfluent gewachsenen Petrischale nach dem Splitten in 1,5ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen werden bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren, nach 12 h in eine  $-80^\circ\text{C}$  Gefriertruhe überführt und dann in  $\text{N}_2$  gelagert.

Zum Auftauen werden die Zellen im  $37^\circ\text{C}$ -Wasserbad aufgetaut, in ein Falcon - Röhrchen mit angewärmtem Medium gegeben und pelletiert. Die Zellen werden in frischem Medium aufgenommen und ausgesät.

Einfriermedium: DMEM, 20% FCS, 10% DMSO

## 13. Zytotoxizitätstests

### 13.1. MTT Assay

Dieser Test dient der Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen durch intrazelluläre Reduktion eines Tetrazoliumsalzes (Mosmann, 1983). Dies erfolgt bei intakten Zellen in der inneren Mitochondrienmembran durch Enzyme der Atmungskette, v.a. Succinat-Dehydrogenase und Cytochrom-Dehydrogenase. Die Menge des gebildeten Formazans ist proportional zur Anzahl lebender Zellen.

In 96- well Zellkulturplatten werden  $3 \cdot 10^5$  Zellen/well ausgesät und 2 Tage wachsen gelassen. Das Medium wird gewechselt und die zu testenden Substanzen in Medium (100 $\mu\text{l}$  Endvolumen) zugefügt. Die Testansätze erfolgen im Doppel oder dreifach.

Nach der Inkubation wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und je 100 $\mu\text{l}$  Medium ohne Phenolrot und 25 $\mu\text{l}$  einer MTT Stocklösung (1,5 mg / ml ) zugegeben. Die Verwendung von Medium ohne Phenolrot ist notwendig, da die Eigenfarbe des Mediums die spätere Messung der Absorption bei 550nm beeinträchtigt bzw. Phenolrot selbst als Elektronenakzeptor wirken kann. Nach 4 h Inkubation wird der Überstand vorsichtig abgesaugt und die gebildeten Formazankristalle durch Zugabe einer Lösung aus EtOH / DMSO 1:1 gelöst. Zusätzlich werden die Platten entweder 10 min. geschüttelt oder 3 min. ins Ultraschallbad gestellt. Die Messung des gebildeten Farbstoffes erfolgt im Elisa-Reader bei 550nm mit einer Referenzwellenlänge von 630nm.

Zur Berechnung der Reduktionsleistung der Zellen wurde die Menge reduziertes MTT der unbehandelten Kontrollzellen gleich 100% gesetzt.

### 13.2. Laktat-Dehydrogenase-Assay ( LDH-Assay )

Dieser Test erfasst die Membranintegrität der Zellen nach Toxin-Behandlung und basiert auf der Bestimmung der LDH Aktivität im Kulturüberstand. Das zytoplasmatische Enzym Laktat-Dehydrogenase gelangt bei Beschädigung der Plasmamembran in den Überstand und kann dort gemessen werden. Die Menge an freigesetztem LDH ist dabei proportional der Zahl der beschädigten oder lysierten Zellen. Es wurde das "Cytotoxicity detection Kit" der Firma Roche Diagnostics verwendet.

Die LDH-Aktivität wird enzymatisch über die Umsetzung von Laktat zu Pyruvat erfasst. Das dabei entstehende NADH H<sup>+</sup> wird zur Reduktion eines Tetrazoliumsalses zu Formazan genutzt. Dies wird im Elisa-Reader bei 490nm gemessen, bei einer Referenzwellenlänge von 630nm.

Die Zellen werden wie beschrieben in 96-well Platten ausgesät, die Inkubation mit AGEs erfolgt in DMEM 1% FKS, um den hohen LDH -Hintergrund des Serums zu minimieren. Je 50µl der zellfreien Überstände werden in eine frische MTP überführt, mit 50µl Reaktionsmix gemischt und zur Farbentwicklung 15-30 min. im Dunklen inkubiert. Die Indikatorreaktion wird durch Zugabe von 10µl HCl 1N pro well gestoppt und gemessen. Hintergrundkontrolle ist Medium. Als Negativkontrolle dienen unbehandelte Zellen, die maximale Menge LDH im Überstand wird durch Lyse von Zellen mit 1% Triton ermittelt.

Um einen evtl. Einfluss der Testsubstanzen auf die LDH-Aktivität auszuschliessen, werden diese direkt in Medium verdünnt und getestet.

Berechnung (alle Werte abzüglich Hintergrund) :

$$\text{Anzahl toter Zellen in \%} = \frac{\text{Probe - Kontrolle}}{\text{Maximalwert - Kontrolle}} \times 100$$

### 13.3. Neutralrot Assay

Dieser Test zur Zellvitalität beruht auf der Fähigkeit lebender Zellen zur aktiven Phagozytose. Das ungeladene, nicht membranpermeable Neutralrot Molekül kann nur aktiv aufgenommen werden und reichert sich in den Lysosomen an. Die Menge an phagozytiertem Neutralrot ist daher proportional zur Anzahl vitaler Zellen (Löwik et al., 1993).

Der Testansatz erfolgt in 96-well Platten wie unter 13.1 beschrieben. Nach Absaugen der Testlösungen und Waschen der Zellen mit PBS erfolgt die Zugabe von 100µl DMEM ohne Phenolrot, auch hier würde die Eigenfarbe des Phenolrot die spätere Messung der Absorption

bei 550nm beeinträchtigen. Pro well wird 10µl einer Neutralrot-Lösung zupipettiert und die Platten erneut 3 h im Brutschrank inkubiert. Danach wird das Medium entfernt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und durch Zugabe von je 100µl EtOH / Essigsäure 1:1 lysiert. Die Absorption bei 550nm wird gemessen, Referenzwellenlänge ist 630nm.

#### Stocklösungen

Neutralrot 1 mg / ml in A.dest

NaCl 1,8 %

Kurz vor Gebrauch werden die Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt.

### **14. Glukose-Bestimmung mittels GOD - PAP - Methode**

Die Glukose-Aufnahme der Zellen wurde indirekt durch Messung der Glukose im Kulturüberstand mit der GOD-PAP-Methode bestimmt. Es wurden Fertiglösungen der Fa. Sigma verwendet.

Testprinzip: Glucoseoxidase (GOD) katalysiert spezifisch die Oxidation von Glukose zu Glukonsäure. Das dabei entstehende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert mit Hilfe einer Peroxidase in einer Indikatorreaktion ein Chromogen, das photometrisch bei 550nm erfasst werden kann.

Je 5µl zellfreier Kulturüberstand wurde in 45µl A.dest verdünnt und mit 50µl Testlösung gemischt. Nach 10 min. Inkubation bei RT wurde die Extinktion im Elisa-Reader gemessen (550nm, Referenzwellenlänge 630nm). Die Glukosekonzentration wurde mittels eines Glukosestandards in A.dest und der Glukosekonzentration im Medium errechnet.

### **15. Laktatbestimmung**

Die Menge Laktat im Kulturüberstand wurde mit einer gekoppelten Enzymreaktion über Laktatdehydrogenase / Glutamat-Pyruvat-Transaminase bestimmt (Dringen & Hamprecht, 1993).

Die Überstände wurden in einer 96-well Platte 1:5 mit A.dest verdünnt, mit gleichen Teilen Reaktionsmix gemischt und sofort der 0-Wert bei 340nm im Elisa-Reader bestimmt. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C wurde erneut die Absorption bei 340nm gemessen und der 0-Wert abgezogen. Die Laktatkonzentration in den Proben wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von Laktat in Medium errechnet.

#### Reaktionsmix

Glutamat / NaOH ph 8,9 500 mM

NAD 5,6 mM

Glutamat-Pyruvat-Transaminase 0,6 U/ml

Laktat-Dehydrogenase 6 U/ml

## **16. Glutathion-Bestimmung**

Der Glutathiongehalt von Zelllysaten wurde nach Baker et. al. (1990) bestimmt. Dabei reagieren 2 GSH mit ihren freien Thiolgruppen mit DTNB zu GSSG und TNB, das photometrisch bei 405nm erfasst werden kann. GSSG wird durch Glutathionreduktase NADPH-abhängig wieder zu GSH reduziert. Der so bestimmte Gesamtglutathiongehalt GSx entspricht  $GSx = GSH + 2 GSSG$ .

Die Zellen wurden in 6-well Schalen angezogen und mit den zu testenden Substanzen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS 3 x gewaschen und in 500µl 1%-iger Sulfosalicylsäure lysiert. Die Zelllysate wurden von der Platte gekratzt, in Eppendorfgläser überführt und abzentrifugiert (5 min., 13000 rpm, 4°C). Aliquots des Überstandes wurden für die Bestimmung von GSx und GSSG verwendet. Die Menge GSH wurde rechnerisch als Differenz aus GSx-GSSG bestimmt.

Für die Bestimmung des Gesamtglutathions (GSx) wurden die Lysate direkt eingesetzt und in einer MTP im Verhältnis 1:1 mit Reaktionsmix gemischt. Die Extinktion bei 405nm wurde zu den Zeitpunkten 0 min. und 10 min. gemessen und der GSx Gehalt anhand einer Standardkurve GSSG von 0 - 200 pmol errechnet.

Glutathiodisulfid (GSSG) wurde nach Derivatisierung von reduziertem Glutathion mit 2-Vinylpyridin gemessen (Griffith, 1980). Dazu wurden 40µl Lysat mit 2µl Vinylpyridin gemischt und mit 8µl Tris 0,2 M auf einen pH zwischen 5 und 7 eingestellt. Die Standards wurden genauso behandelt. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde wie für GSx beschrieben gemessen, jedoch über einen Zeitraum von 20min.

### Reaktionsmix

|  |            |
|--|------------|
| DTNB                                       | 0,3 mM     |
| NADPH                                      | 0,4 mM     |
| Glutathionreduktase                        | 0,5 U / ml |
| in 0,1 M Natriumphosphatpuffer / 1 mM EDTA |            |

## **17. ATP-Messung**

Der Gehalt an intrazellulärem ATP wurde aus Zelllysaten mittels Luciferase-vermittelter Biolumineszenz bestimmt (ATP Bioluminescence Kit CLS II, Roche Diagnostics).

Luciferase katalysiert die ATP-abhängige Oxidation des Luciferins zu Oxyluciferin. Die Menge des dabei entstehenden Lichts mit einem Emissionsmaximum bei 562nm ist proportional zum ATP-Gehalt der Probe und kann im Luminometer quantitativ erfasst werden

Probenvorbereitung:

In einer 24-well Platte wurden  $3 \cdot 10^5$  Zellen je well ausgesät und zwei Tage wachsen gelassen. Das Medium wurde gewechselt und die Zellen wie bei den jeweiligen Versuchen angegeben behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, durch Trypsinieren geerntet und pelletiert (5 min., 6000 rpm, 4°C). Die Zellpellets wurden in 115µl PBS resuspendiert und ein 10µl Aliquot für die Zellzählung mit dem Coulter Counter entnommen. Die restlichen Zellen wurden durch Zugabe von je 100µl Lysepuffer lysiert. Der Proteingehalt der Proben wurde aus einem 5µl Aliquot bestimmt. Die Proben wurden entweder sofort gemessen oder bei -80°C gelagert.

Messung:

Das Luciferase Reagenz wurde nach Vorschrift eingelöst und nochmals 1:15 mit A.dest. verdünnt. Der ATP Standard wurde nach Vorschrift eingelöst und eine Verdünnungsreihe von  $10^{-6}$  -  $10^{-12}$  M ATP in A.dest hergestellt.

Die Messung erfolgte im Luminometer mit einem konstantem Proben- und Injektionsvolumen von je 200µl. Die Messzeit betrug 10 sec.

Der ATP-Gehalt der Proben wurde anhand der ATP-Standardkurve errechnet und entweder auf die Zellzahl oder das Gesamtprotein der Proben bezogen.

### **18. Nachweis Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBARS )**

(Esterbauer & Cheeseman, 1990)

Die Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen ist ein Maß für den oxidativen Stress, dem eine Zelle ausgesetzt wurde. Lipidperoxidationsprodukte wie Malondialdehyd reagieren im Sauren mit Thiobarbitursäure zu einem pinkfarbenen Produkt mit einem Absorptionsmaximum von 532nm. Die folgende Methode erfasst nicht nur freie sondern auch proteingebundene TBARS.

In einer 6-well Platte werden  $5 \cdot 10^5$  Zellen/well ausgesät und 2 Tage wachsen gelassen. Danach wird das Medium ersetzt und AGE oder Amyloid zugegeben. Nach weiteren 24 h wird das Medium abgesaugt, die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und durch scrapen geerntet. Die Zellen werden pelletiert, in 100µl Wasser lysiert und 1 min. ins Ultraschallbad gestellt. Von den Lysaten wird ein Aliquot zur Proteinbestimmung abgenommen. Die Proben werden durch Zugabe von 600µl 1%  $H_3PO_4$  angesäuert, dann werden 200µl 0,6%ige Thiobarbitursäure zupipettiert und die Proben 60 min. bei 95°C inkubiert. Nach dem Abkühlen werden die TBARS durch Zugabe von 800µl Butanol extrahiert, die Ansätze werden gut gevortext und abzentrifugiert. Die Butanolphase wird abgenommen und bei 532nm gegen einen Leerwert gemessen. Die Menge an TBARS pro mg Protein wird anhand des Extinktionskoeffizienten für MDA (153000  $cm \cdot mol^{-1}$ ) errechnet.

## **19. Gelretardationsexperiment ( Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA )**

Durch EMSA können Protein-DNA Interaktionen nachgewiesen werden. Hierzu wird eine radioaktiv markierte Sonde, die ein spezifisches Proteinbindungsmotiv für einen Transkriptionsfaktor aufweist, mit Kernproteinextrakt inkubiert. Die gebildeten Protein-DNA Komplexe werden anschliessend im nativen PAA Gel aufgrund ihrer geringeren Mobilität von ungebundener DNA abgetrennt und können durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

### **19.1. Herstellung von Kernextrakten zum Nachweis von NFκB (Nancy et al., 1991)**

Die Zellen wurden 3 x mit eiskaltem PBS pH 7,4 gewaschen, nichtenzymatisch durch scrapen geerntet und pelletiert (4 min, 6000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 400µl eiskaltem Puffer A aufgenommen, gut durchmischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschliessend wurde der Ansatz 10sec gevortext und 60sec abzentrifugiert (13000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Kernpellet in 100µl eiskaltem Puffer C aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min., 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand, der die Kernproteine enthält, abgenommen und sofort bei -80°C gelagert.

#### **Puffer A**

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Hepes KOH pH 7,9  | 10 mM  |
| MgCl <sub>2</sub> | 1,5 mM |
| KCl               | 10 mM  |
| DTT               | 0,5 mM |
| PMSF              | 0,2 mM |

#### **Puffer C**

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Hepes KOH pH 7,9  | 20 mM  |
| Glycerol          | 25%    |
| NaCl              | 420 mM |
| MgCl <sub>2</sub> | 1,5 mM |
| EDTA              | 0,2 mM |
| DTT               | 0,5 mM |
| PMSF              | 0,7 mM |

### **19.2. Bindungsreaktion**

Die Bindungsreaktion wird wie folgt zusammenpipettiert und 30 min auf Eis inkubiert:

|  |                 |
|--|-----------------|
| BSA                                      | 1 mg / ml       |
| Poly (dI-dC)                             | 1 µg / ml       |
| 3x Bindungspuffer                        | 5 µl            |
| Kernextrakt                              | 8 µg            |
| [α <sup>32</sup> P] markierte NFκB Sonde | 20 - 40 000 cpm |
| A.dest.                                  | ad 15µl         |

Im Anschluss werden die Proben sofort auf ein 5% iges, natives PAA-Gel aufgetragen, parallel zu einer Spur mit 15µl Farbpuffer.

Die Gele wurden 30 min. in 0,5x TBE bei 200 V vorlaufen gelassen. Nach Auftragen der Proben erfolgte die Elektrophorese für 2 h bei 200 - 250 V. Anschliessend wurden die Gele auf Whatmanpapier überführt, mit Folie abgedeckt und im Vakuumtrockner bei 80°C 90 min. getrocknet. Die Exposition der Filme erfolgte über Nacht bei -80°C.

#### 3x Bindungspuffer

|                  |        |
|------------------|--------|
| Hepes KOH pH 7,9 | 60 mM  |
| KCl              | 150 mM |
| EDTA ph 8        | 3 mM   |
| DTT              | 3 mM   |
| Glycerin         | 12 %   |

#### Farbpuffer

|                  |        |
|------------------|--------|
| Hepes KOH pH 7,9 | 10 mM  |
| Glycerin         | 25 %   |
| Bromphenolblau   | 0,01 % |

#### 5 % natives Polyacrylamid Gel

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| 10x TBE                    | 5 ml    |
| 30 % Acrylamid / 0,8 % Bis | 16,7 ml |
| A.dest                     | 77,5 ml |
| APS 10 %                   | 0,7 ml  |
| TEMED                      | 0,1 ml  |

### 19.3. Konkurrenzexperimente

Um die Spezifität der Protein-DNA Bindung zu bestätigen wurde zusammen mit dem markierten Oligonukleotid ein 100-facher Überschuss an "kaltem", nichtmarkiertem Nukleotid zum Bindungsansatz gegeben. Die Bildung markierter DNA-Protein-Komplexe, die auf eine spezifische Wechselwirkung des Proteins mit der Consensussequenz zurückzuführen sind, werden durch den Überschuss an unmarkierter Probe kompetiert.

19.4. Markierung der Sonde

Reaktionsansatz:

|                                     |       |
|-------------------------------------|-------|
| A.dest                              | 11 µl |
| One-for-all Puffer                  | 2 µl  |
| NfκB Oligo (1,75pmol/µl)            | 1 µl  |
| dGTP (2mM)                          | 1 µl  |
| dATP (2mM)                          | 1 µl  |
| dTTP (2mM)                          | 1 µl  |
| [α <sup>32</sup> P]-dCTP (10µCi/µl) | 1 µl  |
| Klenow (1U/µl)                      | 2 µl  |

Nach 60 min. Inkubation bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Zugabe von 1µl 0,5 M EDTA pH 8 gestoppt und der Ansatz auf Eis gestellt. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch Zentrifugation über eine Sephadex-Säule (G25) abgetrennt. Hierzu wird ein 3 ml Sephadex-Säulchen mit STE äquilibriert und trocken zentrifugiert (5 min., 5000 rpm). Der Reaktionsansatz wird mit 39µl STE versetzt, auf die Säule aufgetragen und abzentrifugiert. Die Säule wird nochmals mit 40µl STE gewaschen und beide Eluate vereinigt. Die spezifische Aktivität der Sonde wird im Szintillationszähler bestimmt.

STE-Puffer:

|             |        |
|-------------|--------|
| NaCl        | 100 mM |
| Tris pH 7,5 | 20 mM  |
| EDTA pH 8   | 10 mM  |

20. RNA - Isolation mit Trizol Reagenz

Für die RNA-Präparation werden ca.  $1-2 \cdot 10^7$  Zellen benötigt. Das Kulturmedium wird abgesaugt und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Die Zellen werden in 1 ml Trizol (Gibco) lysiert, von der Platte gekratzt und das Lysat in Eppendorfcaps überführt. Nach 5 min. Inkubation bei RT folgt 10 min. abzentrifugieren bei 4°C, 10000 rpm. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfcap überführt und mit 200µl Chloroform ausgeschüttelt. Aus der oberen Phase wird durch Zugabe von 400µl Isopropanol die RNA ausgefällt und nach 10 min. Inkubation bei RT abzentrifugiert (10 min., 10000 rpm, 4°C). Das RNA-Pellet wird mit 75%-igem EtOH gewaschen, getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst. Verbliebene genomische DNA wird durch DNase Verdau entfernt.

DEPC - Wasser : 1 ml DEPC pro Liter A.dest, über Nacht rühren und autoklavieren

20.1. DNase-Verdau

Im Eppendorfcap wird folgender Reaktionsansatz zusammenpipettiert und 30 min. im Wasserbad bei 37°C inkubiert:

|                  |        |
|------------------|--------|
| RNA              | 175 µl |
| 10x DNase Puffer | 20 µl  |
| DNase (~35U)     | 3-5 µl |

Danach wird der Ansatz über "Qiagen RNeasy mini spin columns" laut Anweisung des Herstellers gereinigt.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgt durch Messung der Extinktion bei 260nm und errechnet sich anhand folgender Formel:

$$1 \text{ OD } 260\text{nm} = 50 \text{ mg RNA / ml}$$

21 RT - PCR

RT-PCR eignet sich zum Nachweis von Transkripten ohne eine cDNA Bibliothek konstruieren zu müssen. Der erste Schritt ist die Synthese einer sog. "first-strand" cDNA, daran schliesst sich eine PCR mit den gewünschten Primern an.

21.1. Reverse-Transkriptase Reaktion (Stratagene)

5 - 10µg RNA werden mit DEPC Wasser auf 38µl aufgefüllt und 3µl Random Primer zugegeben. Der Ansatz wird 5 min. auf 65°C erhitzt und 10 min. abkühlen gelassen.

Danach werden zupipettiert :

|                                     |      |
|-------------------------------------|------|
| 10x First Strand Buffer             | 5 µl |
| Ribonuclease Inhibitor (40U/µl)     | 1 µl |
| dNTPs (100mM)                       | 2 µl |
| MMLV-Reverse Transkriptase (50U/µl) | 1 µl |

Nach 1 h Inkubation bei 37°C wird die Reaktion 5min. bei 90°C gestoppt.

21.2. PCR

In einem 100µl PCR-Reaktionsgefäß wird folgender Ansatz zusammenpipettiert:

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| cDNA (aus 21.1)           | 5 µl    |
| 10x PCR-Puffer            | 5 µl    |
| sense Primer (10pmol)     | 1 µl    |
| antisense Primer (10pmol) | 1 µl    |
| dNTPs (je 25 mM)          | 1 µl    |
| A.dest                    | ad 50µl |
| Taq Polymerase            | 0,5 µl  |

Zur Vermeidung von unspezifischem Primer-annealing wird der Ansatz vor der Zugabe der Taq-Polymerase 5 min. bei 95°C denaturiert.

Die PCR erfolgt nach folgendem Protokoll (30 Zyklen):

|              |      |        |
|--------------|------|--------|
| Denaturieren | 95°C | 60 sec |
| Annealing    | 55°C | 40 sec |
| Elongation   | 72°C | 60 sec |

Darauf folgt ein 10-minütiger Elongationsschritt bei 72°C.

Je 5µl der Proben wurden mit 2µl Probenpuffer versetzt, auf ein 1,2% iges TAE / Agarosegel aufgetragen, 60 min. bei 100 V aufgetrennt und das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Banden wurden unter UV-Licht fotografiert.

#### 10x PCR - Puffer

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Tris pH 8,3       | 200 mM |
| MgCl <sub>2</sub> | 15 mM  |
| KCl               | 250 mM |
| Tween             | 0,5 %  |

#### Probenpuffer für die Agarosegelelektrophorese

|                |        |
|----------------|--------|
| Bromphenolblau | 0,25 % |
| Xylencyanol    | 0,25%  |
| Glycerin       | 15 %   |

## **22. SDS - Polyacrylamid - Elektrophorese ( SDS-PAGE )**

### 22.1. SDS - PAGE (Lämmli, 1970)

Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch diskontinuierliche Gelelektrophorese. Das Acrylamidgel besteht aus Trenn- und Sammelgel mit unterschiedlichen pH-Werten, die Proteine werden durch Aufkochen und Mercaptoethanolzusatz vollständig denaturiert. SDS führt zur Maskierung der Eigenladung der Proteine, sie liegen als negativ geladene Micellen vor. Die Auftrennung der Proteine erfolgt nach Molekulargewicht in Richtung Anode.

## Pipettierschema für 1 Minigel:

|                    | Trenngel | Sammelgel |
|--------------------|----------|-----------|
| Polyacrylamid 30%  | 1,66 ml  | 417,5 µl  |
| Bisacrylamid 2%    | 325 µl   | 165 µl    |
| Tris 1M, pH 8,7    | 1,86 ml  | -         |
| Tris 250mM, pH 6,8 | -        | 1,25 ml   |
| 20% SDS            | 50 µl    | 25 µl     |
| A.dest             | 708 µl   | 452,5 µl  |
| APS 40%            | 50µl     | 25µl      |
| TEMED              | 10µl     | 5µl       |

10x Laufpuffer, pH 8,4

|        |        |
|--------|--------|
| Tris   | 0,25 M |
| Glycin | 1,92 M |
| SDS    | 1%     |

22.2. Tricine- SDS-PAGE (Schaegger und Jagow, 1987)

Diese 3-Phasen PAGE mit Tricin als Folge-ion erlaubt eine Auftrennung kleiner Proteine und Oligopeptide im Bereich von 1-100 kDa. Besonders gut ist die Auflösung für kleine Peptide von 5-20 kDa bei hohen Acrylamidkonzentrationen.

Anodenpuffer

|             |       |
|-------------|-------|
| Tris pH 8,9 | 0,2 M |
|-------------|-------|

Kathodenpuffer

|        |       |
|--------|-------|
| Tris   | 0,1 M |
| Tricin | 0,1 M |
| SDS    | 0,1 % |

Gelpuffer

|              |       |
|--------------|-------|
| Tris pH 8,45 | 3 M   |
| SDS          | 0,3 % |

Lysepuffer für Zellen

|                                 |               |
|---------------------------------|---------------|
| Triton                          | 0,5 %         |
| Tris pH 7,5                     | 50 mM         |
| NaCl                            | 150 mM        |
| Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> | 1 mM          |
| EDTA                            | 5 mM          |
| PMSF                            | 1 mM          |
| Leupeptin, Aprotinin            | je 10 µg / ml |

## Pipettierschema (2 Minigele):

|                            | Trenngel | Spacergel | Sammelgel |
|----------------------------|----------|-----------|-----------|
| 46,5% Acrylamid/<br>3% Bis | 2,5 ml   | -         | -         |
| 48% Acrylamid/<br>1,5% Bis | -        | 1 ml      | 250 µl    |
| Gelpuffer                  | 2,5 ml   | 1,65 ml   | 750 µl    |
| Glycerin 85%               | 0,8 ml   | -         | -         |
| A.dest.                    | 1,7 ml   | 2,35 ml   | 2,1 ml    |
| APS 40%                    | 10 µl    | 10 µl     | 10 µl     |
| TEMED                      | 4 µl     | 4 µl      | 4 µl      |

Trenn- und Spacergel können gleichzeitig vorbereitet und vorsichtig übereinander gegossen werden. Anschliessend überschichtet man mit Isobutanol. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte mischen sich die Lösungen nicht, das Trenngel polymerisiert schneller und es ergibt sich eine einheitliche Schichtgrenze. Nach dem Auspolymerisieren von Trenn- und Spacergel wird das Butanol entfernt, das Sammelgel gegossen und ein entsprechender Kamm eingesetzt.

Die Proben werden 5 min. bei 95°C in Probenpuffer denaturiert und in die ausgespülten Geltaschen pipettiert. Sie werden bei 50 V 30 min. in das Sammelgel einlaufen gelassen und danach bei 100 V aufgetrennt bis die Blaufront den unteren Gelrand erreicht.

Das Gel wird entweder geblottet oder 30 min. angefärbt. Nicht-proteingebundener Farbstoff wird durch Entfärben in 10% Eisessig über Nacht entfernt. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0,2-0,5 µg Protein pro Bande. Das entfärbte Gel wird auf Whatmanpapier aufgezogen und im Vakuum bei 80°C getrocknet. Die Stärke der Banden wird densitometrisch ausgewertet.

Auftragspuffer

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Tris ph 6,8              | 50 mM  |
| Glycerin                 | 15 %   |
| SDS                      | 4 %    |
| Mercaptoethanol          | 2 %    |
| Coomassie Brilliant Blue | 0,01 % |

Färbelösung

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Methanol                | 500 ml |
| A.dest                  | 500 ml |
| Eisessig                | 125 ml |
| Coomassie Brillant Blue | 2,5 g  |

**23. Westernblot**

Die zuvor über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden im sog. "Nassblot" auf Nitrozellulose (Protran, Schleicher & Schüll) übertragen.

Die Nitrozellulose kann in PonceausS gefärbt werden, um den Proteintransfer zu überprüfen.

Die Reaktion wird mit A.dest. gestoppt, der Filter kann direkt weiterverwendet werden.

Um unspezifische Bindungen abzusättigen wird die Membran über Nacht bei 4°C oder 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Die Membran wird 4 x 5 min gewaschen. Der erste Antikörper wird in TBS / 0,1 % Tween zugegeben und 90 - 120 min. inkubiert. Es folgen erneut 4 Waschstschritte. Der zweite Antikörper in TBS / 0,1% Tween wird 90 min. inkubiert. Nach erneutem Waschen des Filters folgt die Detektion des gebundenen, POD-gekoppelten Zweitantikörpers über Chemilumineszenz (ECL, Amersham).

**Transferpuffer pH 8,3**

|          |         |
|----------|---------|
| Tris     | 24,8 mM |
| Glycin   | 192 mM  |
| Methanol | 10 %    |

**PonceauS**

|          |       |
|----------|-------|
| MOPS     | 3 %   |
| Eisessig | 3 %   |
| PonceauS | 0,2 % |

**Blockpuffer**

|             |     |
|-------------|-----|
| Milchpulver | 3 % |
|-------------|-----|

in 1x TBS / Tween 0,2 %

**Waschpuffer**

1x TBS / Tween 0,05 %

**24. Digitoninlyse von Zellen zum Nachweis von Cytochrom c**

(Single et al., 1998)

SH-SY5Y Zellen werden in 6-well Platten oder 5 cm Petrischalen angezogen und mit AGEs und / oder Antioxidantien behandelt. Die Zellen werden geerntet und pelletiert und die Pellets in 250µl 1 x PBS aufgenommen. Danach werden die Zellen durch Zugabe von 250µl Digitonin / Saccharose unter kräftigem Vortexen lysiert. Nach 30 sec. bei RT werden die Zelltrümmer abzentrifugiert (13000 rpm, 1 min., 4°C) und der Überstand für die Analyse im Westernblot eingesetzt.

Lysepuffer

|            |                               |
|------------|-------------------------------|
| Saccharose | 500 mM                        |
| Digitonin  | 10µg / 10 <sup>6</sup> Zellen |

**25. FACS-Färbungen**

Für die Detektion apoptotischer Zellen wurde Annexin-Fluorescein verwendet (Annexin-V-Fluos, Roche Diagnostics). Tote Zellen wurden mit 7-Aminoactinomycin angefärbt (Molecular Probes). Je 3·10<sup>5</sup> Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät, 2 Tage wachsen gelassen und mit den zu testenden Substanzen inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von je 500µl Accutase (PAA) abgelöst, mit PBS gewaschen und in einer Konzentration von je 1·10<sup>6</sup> Zellen / ml in 100µl Bindepuffer aufgenommen. Es wurden je 2µl Annexin-Fluorescein und 3µl 7-AAD (100µg/ml) zugegeben und die Zellen 10 min. im Dunkeln gefärbt.

Zur Analyse im FACS wurden weitere 400µl Bindepuffer zupipettiert.

Einstellungen: Anregungswellenlänge 488nm für Annexin-V-Fluos; Filter 525,575,675nm ; Argon-Laser für 7-AAD

Bindepuffer

|                   |        |
|-------------------|--------|
| HEPES, pH 7,4     | 10 mM  |
| NaCl              | 140 mM |
| CaCl <sub>2</sub> | 5 mM   |

**26. Sonstige Puffer und Lösungen:**EDTA Lösung pH 7,4 für die Zellkultur

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| EDTA                             | 0,54 mM |
| NaCl                             | 137 mM  |
| KCl                              | 2,7 mM  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 2,5 mM  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1,5 mM  |

10x PBS pH 7,4

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 80 g   |
| KCl                              | 2 g    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 14,4 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 2,4 g  |
| ad 1l A.dest.                    |        |

100mM Phosphatpuffer, pH 7,4

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M | 77,4 ml |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M | 22,6 ml |
| A.dest.                             | ad 1l   |

10x TAE:

|             |       |
|-------------|-------|
| Tris-Acetat | 0,4 M |
| EDTA pH 8   | 20 mM |

10x TBE, pH 8,4

|       |       |
|-------|-------|
| Tris  | 0,9 M |
| Borat | 0,9 M |
| EDTA  | 25 mM |

10x TBS

|                  |        |
|------------------|--------|
| Tris HCl, pH 7,5 | 500 mM |
| NaCl             | 1,5 M  |

## **2.3. Geräte**

|                      |                              |
|----------------------|------------------------------|
| Analysenwaage        | Sartorius                    |
| Grobwaage            | Sartorius                    |
| Brutschrank          | Heraeus                      |
| Cleanbench           | Heraeus                      |
| Zellzähler           | Casy Coulter Counter         |
| Blotkammer           | BRL                          |
| Gelkammern           | Werkstatt                    |
| Netzgeräte           | Consort; Pharmacia           |
| Luminometer          | Bertold                      |
| Elisa Reader         | Labsystems, Multiscan Ascent |
| FPLC                 | BioRad BioLogic              |
| Spektrophotometer    | Spex Fluoromax               |
| pH-Meter             | Hanna Instruments            |
| Photometer           | Varian Cary                  |
| Pipetten             | Gilson; Brand                |
| Thermocycler         | Techne ProGene               |
| Tischzentrifuge      | Eppendorf                    |
| Zentrifugen          | Hettich; Sorvall             |
| Szintillationszähler | Wallace System, Pharmacia    |
| Vakuumtrockner       | BioRad                       |

## **2.4. Software**

MS-Office Paket  
Corel Photo Paint, Corel Draw  
Image Quant  
Grafit  
WinMDI  
SPSS