



Abteilung Prof. Dr Dr. h.c. Falk Fahrenholz  
Institut für Biochemie  
Fachbereich für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
Becherweg 30  
D- 55099 Mainz

## Protokoll zum F II – Praktikum



Alois Alzheimer

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	4
1.1. Allgemeine Grundlagen .....	4
1.2. Ziel des Praktikums .....	6
2. Material und Methoden .....	7
2.1. Zelllinien .....	7
2.2. Kultivierung von Zellen und Zellpassage.....	7
2.3. Zellenzahlbestimmung .....	8
2.4. Bradford-Test .....	8
2.5. Chloroform-Methanol-Fällung.....	9
2.6. Luciferase Assay .....	9
2.6.1. Prinzip des Luciferase-Assay .....	9
2.6.2. Probeninkubation und –vorbereitung für den Luciferase Assay (Promotor-Assay)	10
2.7. MTT-Assay .....	11
2.7.1. Prinzip des MTT-Assay .....	11
2.7.2. MTT-Assay zum Nachweis der Serum-Abhängigkeit.....	12
2.7.3. MTT-Assay mit Trichostatin und Somatostatin behandelten SHY- und SKNMC- Zellen.....	14
2.8. Bestimmung des Calciumeinstroms nach Behandlung mit Retinoiden .....	15
2.8.1. Inkubation der Zellen .....	15
2.8.2. Prinzip der Messung.....	16
2.8.3. Fura-Beladung der Zellen und Messung des Calciumeinstroms in die Zellen .....	16
3. Ergebnisse.....	18
3.1. MTT-Assay mit Trichostatin und Somatostatin behandelten SHY- und SKNMC-Zellen .....	18
3.2. MTT-Assay zum Nachweis der Serum-Abhängigkeit.....	20
3.3. Luciferase-Assay mit Trichostatin und Somatostatin behandelten SHY- und SKNMC- Zellen.....	21
3.3.1. Darstellung der Einzelergebnisse.....	21
3.3.2. Darstellung der zusammengefassten Ergebnisse .....	23

---

3.4. Bestimmung des Calciumeinstroms nach Behandlung mit Retinoiden .....	24
4. Diskussion .....	27
4.1. MTT-Assay mit Trichostatin und Somatostatin behandelten SHY- und SKNMC-Zellen .....	27
4.2. MTT-Assay zum Nachweis der Serum-Abhängigkeit .....	28
4.3. Luciferase-Assay mit Trichostatin und Somatostatin behandelten SHY- und SKNMC-Zellen.....	28
4.4. Bestimmung des Calciumeinstroms nach Behandlung mit Retinoiden .....	29
5. Literatur.....	30

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemeine Grundlagen

1,2 Millionen Menschen leiden alleine in Deutschland unter der Alzheimerschen Krankheit (Alzheimer Disease; AD). Diese neurodegenerative Krankheit führt bei den betroffenen Personen zu geistigen Leistungseinschränkungen und zu massiven Einschränkungen für die erkrankten Personen im Alltag. Die Ursachen der Erkrankung können vielfältig sein. In 90% der Fälle spielen eine Vorerkrankung des Gehirns, erbliche Faktoren, Alterungsprozesse des Gehirns und Umwelteinflüsse eine Rolle (vgl. der Deutschen Alzheimer Gesellschaft – „Das Wichtigste 4 – Die Genetik der Alzheimer Krankheit“).

Die Alzheimersche Krankheit wurde erstmals 1906 vom Neurologen Alois Alzheimer (1864 – 1915) beschrieben. Makroskopisch geht die Krankheit mit der Abnahme der Gehirngröße einher (Hirnatrophie), mikroskopisch kann die Verminderung bzw. der Verlust von Nervenzellen und Zellkontakten beobachtet werden. Dabei liegen die betroffenen Regionen nicht in der Hirnrinde, sondern hauptsächlich in tiefer gelegenen Regionen des Gehirns (vgl. der Deutschen Alzheimer Gesellschaft – „Das Wichtigste 2 – Die neurobiologischen Grundlagen der Alzheimer Krankheit“).

Das Absterben der Zellen kann nach bisherigen Untersuchungen verschiedene Gründe haben, die sich gegenseitig allerdings nicht ausschließen.

So wird vermutet, dass eine Hyperphosphorylierung des so genannten Tau Proteins die Stabilitäts- und Transportmechanismen der Zellen negativ beeinflusst. Es bilden sich so genannte Neurofibrillbündel, die zum Absterben der Zelle führen können (Harountunian et al, 2005). Die Verminderung der Zellzahl führt auch zu einer Verminderung der Zellkontakte untereinander, was somit zur Verschlechterung der geistigen Fähigkeiten führt.

Andere Überlegungen gehen davon aus, dass auch eine verminderte Bildung des Botenstoffs Acetylcholins zu einer weiteren Einschränkung der Gehirnleistungen führen kann.

Gegen diesen Aspekt werden zur Zeit Acetylcholinesterase-Hemmer eingesetzt, die dazu führen sollen, dass die verminderte Anzahl an Acetylcholin-Molekülen im synaptischen Spalt langsamer abgebaut werden und somit der verringerten Anzahl von Molekülen entgegenwirken sollen.

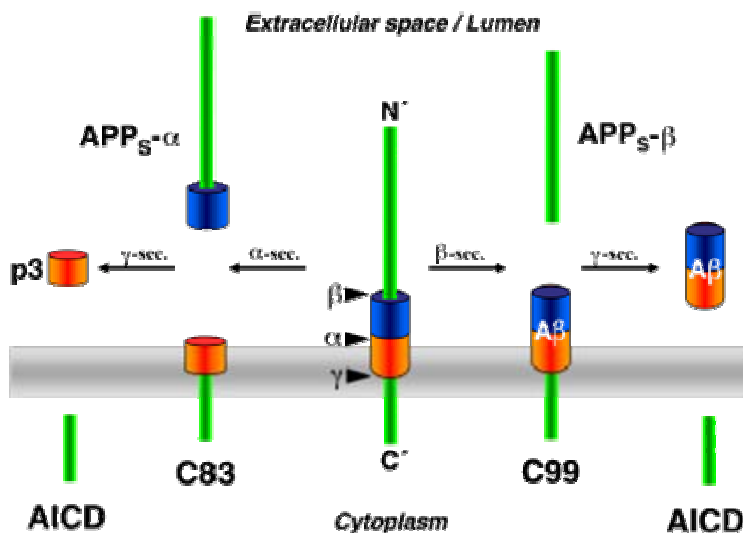
Auch der Neurotransmitter Glutamat kann eine Ursache für AD sein. Eine dauerhafte Ausschüttung des Transmitters führt zu einer Desensibilisierung der Rezeptoren, die Reize werden nicht richtig weitergegeben und dies führt letztendlich zu einem Funktionsverlust der Zelle und schließlich zum Zelltod (<http://www.alzheimerinfo.de>, „Ursachen“).

Eine weitere Erscheinung, auf die hier das Augenmerk gerichtet werden soll, sind die Ablagerungen von extrazellulären Plaques.

Diese amyloiden Plaques entstehen aus dem  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) durch die Spaltung von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Secretasen. Bei diesem Protein handelt es sich um ein membran-durchspannendes Protein, dessen C-Terminus intrazellulär und dessen N-Terminus extrazellulär zu finden ist. Das Protein besitzt Spaltstellen für die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Secretase. Die  $\gamma$ -Secretase Spaltstelle befindet sich in dem membranbefindlichen Bereich des Proteins. Somit muss sich auch das Aktive Zentrum der  $\gamma$ -Secretase im Membranbereich befinden!

Die Spaltstelle der  $\beta$ - Secretase befindet sich auf der extrazellulären Seite des Proteins (N-Terminus).

Es erfolgt zuerst die Spaltung der  $\beta$ -Secretase. Dabei entsteht extrazellulär ein Proteinrest, das so genannte  $\beta$ -APP. Durch die Spaltung der  $\gamma$ -Secretase entsteht intrazellulär das so genannte AICD (APP Intracellular Domain). Des Weiteren ist nun auch die Bildung des A $\beta$ -Proteins abgeschlossen worden. Diese A $\beta$  –Bruchstücke lagern sich in großen Plaques zusammen, deren Konsistenz an Amyloid (Eiweißablagerung mit gewissem Anteil an Stärke, erstmals beschrieben durch Rudolph Virchow (vgl. <http://www.dgak.net/>)) erinnert. Man spricht auch von amyloiden Plaques und bei dem Vorgang der durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Secretase katalysiert wird vom amyloiden Weg.



**Abb. 1: APP-Prozessierung durch Secretasen**

Der nicht-amyloide Weg, der durch die alpha Secretase katalysiert wird, steht dem amyloiden Weg ( $\beta$ -Secretase) gegenüber. Nur der amyloide Weg führt zur Bildung von A $\beta$  und somit von extrazellulären Plaques.

Dem steht der sogenannte nicht-amyloide Weg gegenüber. APP kann auch durch ein weiteres Enzym, die alpha Secretase, gespalten werden. Diese Spaltung führt nicht zur Bildung von A $\beta$ , sondern einem kleineren Peptid, dem so genannten p3 oder sAPP $\alpha$ . Dem sAPP $\alpha$  werden im Gegensatz zu A $\beta$  positive Eigenschaften zugeschrieben,

wie z. B. der Schutz vor Bildung des A $\beta$  (Stein et al, 2004) und der Schutz vor Hypoglykämie (Mattson et al, 1993). Das Resultat der Spaltung durch die  $\alpha$ -Secretase ist eine verminderte Plaquebildung.

Der amyloide und nicht-amyloide Weg konkurrieren miteinander, wobei das natürliche Gleichgewicht zu 90 % auf der Seite der alpha Secretasewegs liegt.

Ist das Gleichgewicht zum Beispiel durch den Mangel an alpha Secretase gestört, so kann es zur vermehrten Ablagerung der amyloiden Plaques und somit zum erhöhten Risiko zur Erkrankung an der Alzheimerschen Krankheit (AD) kommen.

Die Versuche im Praktikum werden an SH SY5Y (CP56)- und SKNMC CP56-Zellen durchgeführt. Einzelheiten über die Zellen sind im Kapitel 2 „Material und Methoden“ beschrieben.

## 1.2. Ziel des Praktikums

Im Praktikum werden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. Zu Beginn wird festgestellt, ab welchen Konzentrationen von Trichostatin und Somatosatin keine toxische Wirkung auf die eingesetzten Zellen eintritt.

Danach richtet sich das Augenmerk auf die Auswirkungen von Trichostatin und Somatostatin auf die Genexpression von ADAM10. Diese Untersuchungen werden anhand des Luciferase-Assays von Promega (Kat. # E1500) durchgeführt. Ziel ist es zu zeigen, dass die Genexpression positiv beeinflusst wird, ADAM10 mit dem Luciferase-Gen überexprimiert wird und somit eine erhöhte Lichtintensität beim Test eintritt. In vivo würde dies einer erhöhten  $\alpha$ -Secretase-Konzentration entsprechen, die der A $\beta$ -Peptidbildung entgegenwirken könnte.

Neben diesen Versuchen soll festgestellt werden, wie Retinoide, also Vitamin A-Derivate, auf die Zellen wirken. Die Zellen mit verschiedenen Retinsäuren inkubiert und dann anhand des Calciumeinstroms nach Zugabe von Acetylcholin aufgezeigt, ob die Retinsäuren die Anzahl der Acetylcholinrezeptoren auf der Oberfläche der Zellmembranen erhöht haben.

Als letztes werden Versuche zur FCS-Abhängigkeit durchgeführt. Ziel der Untersuchungen ist es, eine Verringerung der FCS-Konzentration im HamF12-Medium zu erreichen, bei der die Zellen trotzdem ohne Einschränkungen proliferieren können. Der Hintergrund für die Durchführung des Versuchs liegt in zukünftigen Versuchen, bei denen das FCS die gewisse Versuchsbedingungen negativ beeinflusst und deswegen eine geringere FCS-Konzentration von Nutzen sein kann. Die Grundlage der Versuche bildet der MTT-Test.

## 2. Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden die im Praktikum genutzten Methoden beschrieben.

### 2.1. Zelllinien

Alle im Praktikum durchgeführten Versuche wurden mit SH SY5Y (CP56)- und SKNMC CP56-Zellen durchgeführt. Die SH SY5Y CP56-Zellen entsprechen SH SY5Y-Zellen mit dem Vektor CP56.6. Dieser Vektor beinhaltet einen humanen ADAM10-Promoter und ein Firefly-Luciferasegen. Auch die SKNMC CP56-Zellen weisen diesen Vektor auf.

Bei den SH SY5Y- und SKNMC-Zellen handelt es sich um humane Neuroblastomazellen, die unter unten beschriebenen Bedingungen kultiviert werden.

### 2.2. Kultivierung von Zellen und Zellpassage

**Tab. 1: Substanzen und Material zur Kultivierung und Zellpassage**

Substanzen und Material	Erläuterung
Ham F12 complete (10 % FCS gold, 1% Glutamin)	Medium für SH SY5Y-Zellen
DMEM farblos (+ 50ml FCS + 5ml Glu + 5ml Na-Pyruvat)	Medium für SKNMC CP56-Zellen
PBS	Phosphate buffered saline; Phosphatpuffer
Trypsin	Endopeptidase → Serinprotease Spaltet nach basischen Aminosäuren. Lösen der Zellen von der Zellkulturplatte
Zellkulturpetrischalen	-
Tischzentrifuge	-
Sterilbank	-

Die Zellen werden auf 10cm Zellkultur-Petrischalen kultiviert. Die SH SY5Y-, SH SY5Y CP56- und SKNMC-Zellen werden jeden vierten Tag passagiert. Für die Kultivierung von SH SY5Y-, SH SY5Y CP56-Zellen wird Ham F12 complete (+ 10% FCS, 5% Glutamin) verwendet. Die SKNMC CP56-Zellen werden auf DMEM (+ 10% FCS + 1% Glutamin + 1% Natrium-Pyruvat) kultiviert.

Für die Zellpassage wird das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 5ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1,5ml Trypsin und einer Inkubation von fünf Minuten werden 3,5ml PBS hinzugegeben und die Zellen in ein Tube mit Medium überführt. Die Zellen werden jetzt bei 1000rpm für 5 Minuten zentrifugiert.

Danach wird der Überstand abgenommen, die Zellen in das Medium aufgenommen und in entsprechender Dichte ausgesät.

Die Bebrütung findet im Brutschrank bei 37°C und einer Kohlenstoffdioxidkonzentration von 5% statt.

### 2.3. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt manuell mit der Zählkammer von NEUBAUER. Dafür werden die Zellen auf ein NEUBAUER-Zelle gebracht und jeweils 4x4 Quadrate ausgezählt. Die Zellzahl entspricht den Zellen pro 0,1µl. So kann man die benötigte Menge anhand der bestimmten Zellzahl berechnen.

### 2.4. Bradford-Test

Der Bradford-Test ist eine Methode zur quantitativen Proteinbestimmung.

Er wurde erstmals von Frau Marion M. Bradford 1976 beschrieben (vgl. [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org), Stichwort „Proteinbestimmung nach Bradford“)

Die Proben werden nach der Behandlung mit Wasser (Mikroporwasser; MP-H<sub>2</sub>O) und 100%iger Ameisensäure (genaue Mengen entnehmen Sie bitte der Tabelle 2) und einer Inkubationszeit von 20 Minuten mit dem Bradford-Reagenz (Coomassie Brilliant Blue-Farbstoff) behandelt. Dieser Farbstoff bildet mit den Proteinen der Probe Komplexe, die bei einer Wellenlänge von 595nm ein Absorptionsmaximum aufweisen. Ist die Absorption der Probe hoch, so handelt es sich um eine hohe Proteinkonzentration. Um welche Konzentration es sich handelt, ermittelt das Photometer anhand einer vorher gemessenen Eichgerade, die durch bekannte Konzentrationen an Protein aufgestellt wurde (siehe Tabelle 1). Dazu verwendet man eine Stammlösung aus Rinderserumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 0,5mg/ml. Nach der Zugabe der Bradford-Reagenz erfolgt eine weitere Inkubationszeit von 20 Minuten. Danach erfolgt die Messung am Photometer in Polystyrolküvetten bei einer Wellenlänge von 595 nm.

**Tab. 2: BSA-Eichgerade für die Proteinbestimmung nach Bradford**

Protein im Test [µg]	BSA (0,5mg/ml) [µl]	H <sub>2</sub> O [µl]	100% Ameisensäure [µl]	1:5 verdünntes Bradford-Reagenz [µl]
0	0	50	50	900
2	4	46	50	900
4	8	42	50	900
6	12	38	50	900
8	16	34	50	900
10	20	30	50	900



**Tab. 3: Pipetierschema der Proben bei der Proteinbestimmung nach Bradford**

	Angaben in $\mu\text{l}$
Probe	x
H <sub>2</sub> O	50 – x (Probe)
100% Ameisensäure	50
Bradford-Reagenz (1:5)	900
Summe	1000

## 2.5. Chloroform-Methanol-Fällung

**Tab. 4: Substanzen und Material für die Chloroform-Methanol-Fällung**

Substanzen
Wasser (H <sub>2</sub> O)
Methanol (MetOH)
Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )
Heizblock
Tischzentrifuge

Ziel der Chloroform-Methanol-Fällung ist es, die Proteinmenge stark zu konzentrieren. Von jeder Probe werden 2 Fällungen durchgeführt.

200 $\mu\text{l}$  der Probe werden gründlich resuspendiert und dann mit 800 $\mu\text{l}$  Methanol versetzt und gevortext. Danach erfolgt die Zugabe von 200 $\mu\text{l}$  Chloroform. Nach weiterem Vortexen wird zu jeder Probe 500 $\mu\text{l}$  Wasser zugegeben. Die Proben werden nun 10 Minuten bei 13.500 rpm zentrifugiert.

Danach wird die obere Phase mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Nach erneuter Zugabe von 800 $\mu\text{l}$  Methanol und erneutem Vortexen werden die Proben für 15 Minuten bei 13.500 rpm zentrifugiert.

Anschließend wird der gesamte Überstand abgenommen und das Pellet auf einem Heizblock ca. 1 Stunde bei ca. 40°C für getrocknet.

Nach dem Trocknen kann das Pellet in 50 $\mu\text{l}$  Ameisensäure aufgenommen werden und die Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Kapitel 2.4.) durchgeführt werden.

## 2.6. Luciferase Assay

### 2.6.1. Prinzip des Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay wird für die Bestimmung der Genexpression oder der Genregulation angewandt. Dazu wird das Luciferase-Gen hinter einen Promotor kloniert, dessen Aktivität

durch den Assay im Luminometer quantifiziert werden kann. Das Luciferase-Gen wird auch als Reporter gen bezeichnet.

Wird nun das Beetle Luciferin als Substrat zugegeben und in Oxyluciferin umgewandelt, so entsteht durch die Luciferase Licht einer bestimmten Intensität, die zur vorher produzierten Menge an Luciferase proportional ist. Die gemessene Lichtintensität ein Maß für die produzierte Menge an Luciferase und somit für die Aktivität des Promotors.



**Abb. 2: Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin**

Durch die Luciferase wird das Luciferin in Oxyluciferin umgewandelt. Dabei entsteht Licht, dessen Intensität gemessen werden kann (aus „TB #281 der Firma Promega GmbH).

**2.6.2. Probeninkubation und –vorbereitung für den Luciferase Assay (Promotor-Assay)**

**Tab. 5: Substanzen, die für den Promotor-Assay benötigt werden**

Substanzen	Erläuterung
Somatostatin	Bei Somatostatin handelt es sich um ein Neuropeptid, das die Zellproliferation beeinflussen kann. Es soll das Zellwachstum inhibieren und kann zur Apoptose führen. (Kogner et al, 1997)
Trichostatin A (TSA)	Trichostatin kann die Acetylierung von Histonen beeinflussen, in dem es die Histondeacetylase hemmt. Es kommt zu einer Hyperacetylierung, die dazu führt, dass sich die Genexpression verändert. Außerdem könnte Trichostatin zur Apoptose führen.
DMSO	Dimethylsulfoxid ist ein organisches Lösungsmittel
PBS	phosphate buffered saline; Phosphatpuffer
Luciferase	Enzym, das Luciferin in Oxyluciferin umwandelt. Luciferase Assay System, Promega, Cat. # E1500
5 x Lysispuffer	Passive Lysis Buffer, Promega, Cat.# E1941

Auf eine 24-well Platte werden in 12 Wells SH SY5Y CP56-Zellen (1:30) bzw. SKNMC CP56 Zellen (1:50) ausgesät. Nach vier bis fünf Stunden wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Je 3 Wells werden mit Trichostatin (in DMSO) 1:1.000 (SHY) bzw. 1:10.000 (SKN) und je 3 Wells als Kontrolle mit DMSO in gleichen Verdünnungen versetzt und über Nacht (ÜN) inkubiert.

Nach ca. 20 Stunden werden in die noch unbehandelten Wells je 3 Wells Somatostatin (in Wasser) 1:500 und in je 3 Wells Wasser 1:500 als Kontrolle zugegeben. Es erfolgt eine weitere Inkubation von 4 Stunden.

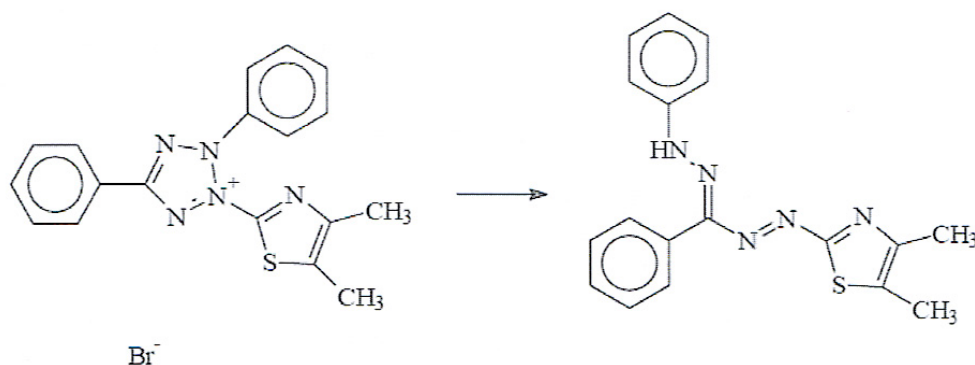
Nach den 4 Stunden erfolgt die Abnahme des Mediums. Die Wells werden mit je 200 bis 300  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen. Nach erneutem Absaugen erfolgt die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  1:5 verdünntem Lysispuffer (Passive Lysis Buffer, Promega, Cat.# E1941). Die Proben werden dann ÜN bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Für die Messung im Luminometer werden Doppelbestimmungen jeder Probe durchgeführt. Dafür werden 5  $\mu\text{l}$  Probe/Well auf ein 96-well Platte aufgetragen. Das Luminometer injiziert automatisch 0,5  $\mu\text{l}$ /Well und mist jedes well vierundzwanzig Mal. Der Mittelwert der gemessenen Lichtintensitäten (Lichtemissionen) wird zur Berechnung genutzt. Der Wert der Proteinkonzentration wird durch den Mittelwert der Lichtintensitäten dividiert. Somit entstehen pro Behandlungsart 3 Werte, deren Mittelwerte in die endgültige prozentuale Berechnung eingehen.

## 2.7. MTT-Assay

### 2.7.1. Prinzip des MTT-Assay

Der MTT-Assay (Tetrazolium-Assay) erfasst die Zellvitalität. Das wasserlösliche, gelbe Tetrazoliumbromid (MTT) wird durch lebende Zellen in die Mitochondrien aufgenommen und durch mitochondriale Dehydrogenasen gespalten. Es entsteht ein wasserunlösliches, stark blaues Produkt, das Formazan. In dieser Form kann es die Zelle nicht mehr verlassen.



**Abb. 3: Reaktion von MTT zu Formazan.**

Das wasserlösliche Tetrazoliumbromid wird in den Mitochondrien durch eine Dehydrogenase zu Formazan reduziert. Diese fällt in einer blauen kristallinen Form aus und kann nach Zellyse und Zugabe eines organischen Lösungsmittels quantitativ bestimmt werden.

Bei der Zellyse durch organische Lösungsmittel (Isopropanol) wird das kristalline Formazan freigesetzt und gelöst. Es kann im Photometer bei 565nm quantifiziert werden. Die Menge des Formazans ist proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

### 2.7.2. MTT-Assay zum Nachweis der Serum-Abhängigkeit

**Tab. 6: Notwendige Substanzen für MTT-Assay**

Substanzen und Material	Erläuterung
Ham F12 complete (10 % FCS gold, 1% Glutamin)	Medium für SH SY5Y-Zellen
Farbloses Ham F12 ohne FCS gold mit 1 % Glutamin	Medium für SH SY5Y-Zellen ohne FCS gold
FCS gold	Fetale Calf Serum, fötales Kälberserum
MTT (5mg/ml)	Tetrazoliumbromid
Lysispuffer	Isopropanol / HCl / Triton X
Photometer	-

Der MTT-Assay zum Nachweis der Serum-Abhängigkeit erstreckt sich über drei Tage. Am ersten Tag werden SH-SY5Y-Zellen in 12 Wells einer 24-well Platte ausgesät. Durch die Bestimmung der Zellzahl (siehe Kapitel 2.3) wird eine gewisse Menge an Zellsuspension ausgesät, so dass sich in einem Well 50.000 Zellen befinden. Liegt die Menge an Zellsuspension unter 200µl, so werden die Wells mit Medium auf 200µl aufgefüllt. In die anderen 12 Wells wird zur Kontrolle 200µl Medium pipettiert.

Nach 4 Stunden (Adhärenz der Zellen) erfolgt ein Mediumwechsel. Das alte Medium wird abgesaugt und in je 2 Wells der Kontrolle und in die Wells, in denen sich Zellen befinden, werden 200µl der in Tabelle 6 genannten Lösungen pipettiert (Pipittierschema siehe Tabelle 7).

Die Medien werden für den nächsten Tag im Kühlschrank gelagert.

**Tab. 7: Verdünnungsreihe des Mediums mit abfallender FCS gold-Konzentration**

Nr.	Ausgangslösung	Ham F12 + 1% Glutamin [ml]	FCS gold [ml]	FCS gold [%]
1	-	3,6	0,4	10
2	2ml Nr. 1	2	-	5
3	2ml Nr.2	2	-	2,5
4	1,6ml Nr. 3	2,4	-	1
5	2ml Nr. 4	2	-	0,5
6	-	2	-	0

**Tab. 8: Pepittierschema**

Zellen + 10% FCS	Zellen + 10% FCS	Zellen + 5% FCS	Zellen + 5% FCS	Zellen + 2,5% FCS	Zellen + 2,5% FCS
Zellen + 1% FCS	Zellen + 1% FCS	Zellen + 0,5% FCS	Zellen + 0,5% FCS	Zellen + 0% FCS	Zellen + 0% FCS
Medium + 10% FCS	Medium + 10% FCS	Medium + 5% FCS	Medium + 5% FCS	Medium + 2,5% FCS	Medium + 2,5% FCS
Medium + 1% FCS	Medium + 1% FCS	Medium + 0,5% FCS	Medium + 0,5% FCS	Medium + 0% FCS	Medium + 0% FCS

Am zweiten Tag wird erneut ein Mediumwechsel durchgeführt. Die dafür notwendigen Lösungen wurden bereits am Vortag in benötigter Menge und Konzentrationen angesetzt.

Nach weiteren 20 Stunden wird das Medium abgesaugt. 800µl der neuen Medien werden mit den entsprechenden Mengen an FCS und MTT laut Tabelle 8 in die Wells pepittiert. Nach vier Stunden werden pro Well 400µl Lysispuffer zugesetzt und durch häufiges Auf- und Abpepittieren die Lyse unterstützt. Es erfolgt nun die photometrische Bestimmung der Zellproliferation bei den Wellenlängen 565nm und 650nm.

Bei 565nm wird die Extinktion des Formazans gemessen, von der später die Extinktion der Nebenprodukte und Störsubstanzen bei 650nm abgezogen wird.

Die Zellen, die mit 10% FCS behandelt werden, werden bei der Auswertung als 100% angesehen.

**Tab. 9: Verdünnungsreihe des Mediums mit MTT und abfallender FCS gold-Konzentration**

Nr.	Ausgangslösung	Ham F12 + 1% Glutamin + 10% MTT [ml]	FCS gold [ml]	FCS gold [%]
1	-	6,3	0,7	10
2	3,5ml Nr. 1	3,5	-	5
3	3,5ml Nr. 2	3,5	-	2,5
4	4,2ml Nr. 3	4,2	-	1
5	3,5ml Nr. 4	3,5	-	0,5
6	-	3,5	-	0

### 2.7.3. MTT-Assay mit Trichostatin und Somatostatin behandelten SHY- und SKNMC-Zellen

**Tab. 10: Substanzen und Material**

Substanzen und Material	Erläuterung
Ham F12 complete (10 % FCS gold, 1% Glutamin)	Medium für SH SY5Y CP-Zellen
DMEM farblos (+ 50ml FCS + 5ml Glu + 5ml Na-Pyruvat)	Medium für SKNMC CP56-Zellen
MTT (5mg/ml)	Tetrazoliumbromid
Lysispuffer	Isopropanol / HCl / Triton X
Photometer	-
Trichostatin in DMSO	Siehe Kapitel 2.2.2.
Somatostatin in H <sub>2</sub> O	Siehe Kapitel 2.2.2.
Zählkammer nach NEUBAUER	-

Ziel des Versuchs ist herauszufinden, ab welcher Trichostatin- bzw. Somatostatinkonzentration die Behandlung für die Zellen nicht mehr toxisch ist.

Auf zwei 24-well Platten werden pro Well 50.000 SHY-Zellen bzw. 25.000 SKN-Zellen ausgesät (Zellzahlbestimmung siehe Kapitel 2.3). 10 Wells einer Platte dienen der Untersuchung mit Trichostatin bzw. Somatostatin, weitere 10 Wells der Untersuchung mit den jeweiligen Kontrollen DMSO bzw. Wasser (keine Zellen).

**Tab. 11: Pepittierschema am Beispiel einer Platte mit Trichostatin in der Konzentration 1:200 und 1:1000**

Zellen + Medium	Zellen + Medium:	Zellen + Tricho 1:200	Zellen + Tricho 1:200	Zellen + DMSO 1:200	Zellen + DMSO 1:200
Zellen + Tricho 1:1000	Zellen + Tricho 1:1000	Zellen + DMSO 1:1000	Zellen + DMSO 1:1000	—	—
Medium	Medium	Medium+ Tricho 1:200	Medium + Tricho 1:200	Medium + DMSO 1:200	Medium + DMSO 1:200
Medium + Tricho 1:1000	Medium + Tricho 1:1000	Medium + DMSO 1:1000	Medium + DMSO 1:1000	—	—

Der Versuch erstreckt sich über 2 Tage, wobei am ersten Tag die Zellen ausgesät werden. Nach 4 Stunden (Adhärenz der Zellen) erfolgt ein Mediumwechsel. Die neuen Medien werden mit den im Pepittierschema angegebenen Konzentrationen an DMSO und Trichostatin in die Wells pepittiert und ÜN inkubiert. Die Platte für die Untersuchung mit Somatostatin wird keinem Mediumwechsel unterzogen.

Nach weiteren 20 Stunden wird das Medium abgesaugt. 800µl MTT-Medium (1:10 verdünnt) werden mit den entsprechenden Konzentrationen an Trichostatin, Somatostatin, DMSO bzw. Wasser in die Wells pepittiert. Nach vier Stunden werden pro Well 400µl Lysispuffer zuge-

setzt und durch häufiges Auf- und Abpipettieren die Lyse unterstützt und die Formazan-Kristalle gelöst. Es erfolgt nun die photometrische Bestimmung der Zellproliferation bei den Wellenlängen 565nm und 650nm.

Bei 565nm wird die Extinktion des Formazans gemessen, von der später die Extinktion der Nebenprodukte und Störsubstanzen bei 650nm abgezogen wird.

Zur Auswertung werden die Kontrollen von den Ergebnissen der behandelten Wells subtrahiert und die Wells mit der Kontrolle und der stärksten Verdünnung an zugegebener Substanz als 100% gesetzt.

## 2.8. Bestimmung des Calciumeinstroms nach Behandlung mit Retinoiden

Tab. 12: Substanzen und Materialien für die Calcium-Bestimmung

Substanzen und Material	Erläuterung
Ham F12 complete (10 % FCS gold, 1% Glutamin)	Medium für SH SY5Y (CP56)-Zellen
1mM Fura-2-AM in DMSO	In Verbindung mit Calcium zeigt Fura eine Fluoreszenz bei 340nm, ohne Calcium bei 380nm
Imagingpuffer	10mM Glucose 145mM NaCl 10mM Hepes (pH 7,4) 4,5mM KCl 1,2mM MgCl <sub>2</sub> 1,2mM CaCl <sub>2</sub>
30mM Acetylcholin	
PBS / 0,5mM EDTA	Phosphate buffered saline; Phosphatpuffer
Retinoide in EtOH	ATRA, 9-cis, 13-cis, EtOH (Kontrolle)
Fluoreszenzmeßgerät	-
Zellkulturpetrischalen	-
Tischzentrifuge	-
Sterilbank	-
Wasserbad	-
Zellschaber	Zum Ablösen der Zellen von der Kulturplatte
Brutschrank	-

### 2.8.1. Inkubation der Zellen

Die SH SY5Y- und SH SY5Y CP56-Zellen werden auf 6cm Zellkulturpetrischalen kultiviert und mit den Retinoiden (all-trans-Retinsäure (ATRA), 13-cis-Retinsäure (13cis) und 9-cis-Retinsäure (9-cis)) bzw. einer Ethanolkontrolle inkubiert. Die Inkubation erfolgt über vier Tage, wobei täglich ein Mediumwechsel durchgeführt wird. Die Retinoide und das Ethanol (EtOH) werden in einer Konzentration von 1µM eingesetzt.

Bei den SH SY5Y CP56-Zellen erfolgte außerdem eine Inkubation mit Somatostatin und als Kontrolle mit Wasser (beides 1:500 verdünnt) vier Stunden vor der Messung. Das Somatostatin und das Wasser wurden in einer Konzentration von 2mM eingesetzt, die Endkonzentration lag ebenfalls bei 1µM.

### 2.8.2. Prinzip der Messung

Fura-2-AM ist ein EGTA-Derivat, das verestert ist und somit die Membran von Zellen durchdringen kann. Im Zellinneren wird das Fura-2-AM durch Esterasen gespalten. Dadurch zeigt es hydrophile Eigenschaften, die einen Transport aus der Zelle unmöglich machen.

Das Fura-2 kann mit Calcium in der Zelle komplexieren und weist bei 340 nm eine Fluoreszenz auf. Ohne Calcium als Zentralatom zeigt Fura-2 eine Fluoreszenz bei 380nm. Bei der Messung werden die Fluoreszenzen bei 340nm und 380nm gemessen und der Quotient gebildet, der zur weiteren Auswertung genutzt werden kann.

### 2.8.3. Fura-Beladung der Zellen und Messung des Calciumeinstroms in die Zellen

Bei der Furabeladung der Zellen ist es zuerst wichtig, dass im Dunkeln gearbeitet wird, da das Fura sehr lichtempfindlich ist.

Zu Beginn wird aus den Petrischalen das Medium abgenommen und 1,5 ml neues Medium auf die Platte gegeben. Das Medium enthält keinerlei Retinoide, da davon ausgegangen werden kann, dass bei 30 Minuten Inkubation ohne Retinoide, die Effekte, die durch die vier-tägige Inkubation entstanden sind, nicht rückgängig gemacht werden. Danach erfolgt die Zugabe von 2,5 µl Fura -2-AM pro Platte. Die Platten werden nun für 30 Minuten in den Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) gestellt.

Anschließend wird das Medium abgesaugt (falls sich die Zellen gelöst haben, wird nicht abgesaugt, sondern die Zellen mit Medium in 2 ml Eppis überführt, dann zentrifugiert, danach mit PBS / EDTA gewaschen und dann wie unten beschrieben weiter verfahren).

Auf die Platten werden nun 750 µl warmes PBS / EDTA gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und mit einer Pipette in 2 ml Eppi überführt.

Eine erneute Zugabe von 750 µl auf die Platte sorgt für eine restlose Überführung der Zellen in das Eppi. Die Zellen werden für 5 Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 1 ml warmer Imagingpuffer zugegeben. Es erfolgt keine Resuspension der Zellen.

Nach einer weiteren Zentrifugation der Zellen für 5 Minuten bei 1.500 rpm wird der Überstand verworfen und die Zellen in 1,5 ml Medium aufgenommen. 200 µl der Zellsuspension werden für Proteinbestimmung (Chloroform- Methanol-Fällung siehe Kapitel 2.5 und Protein-

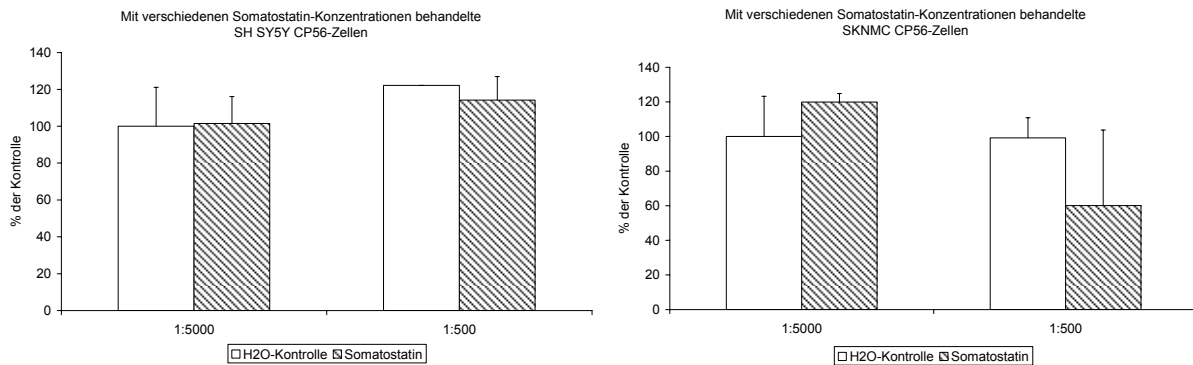


bestimmung nach Bradford siehe Kapitel 2.4) in neues Eppi überführt. Der Rest der Probe wird zur Bestimmung am Fluoreszenzmeßgerät verwendet.

Für die Messung werden 5 ml Imagingpuffer in eine Küvette vorgelegt. Es werden 500 µl Probe und ein Rührfisch hinzugeben. Nachdem die Küvette in die Messvorrichtung gestellt wurde, wird die Probe für 60 Sekunden bei „Shutter close“ auf die Meßtemperatur von 37°C gebracht. Danach wird die Messung gestartet und nach 100 Sekunden 10 µl 30mM Acetylcholin in die Küvette gegeben. Die Daten und die Grafik werden für die Auswertung gespeichert.

### 3. Ergebnisse

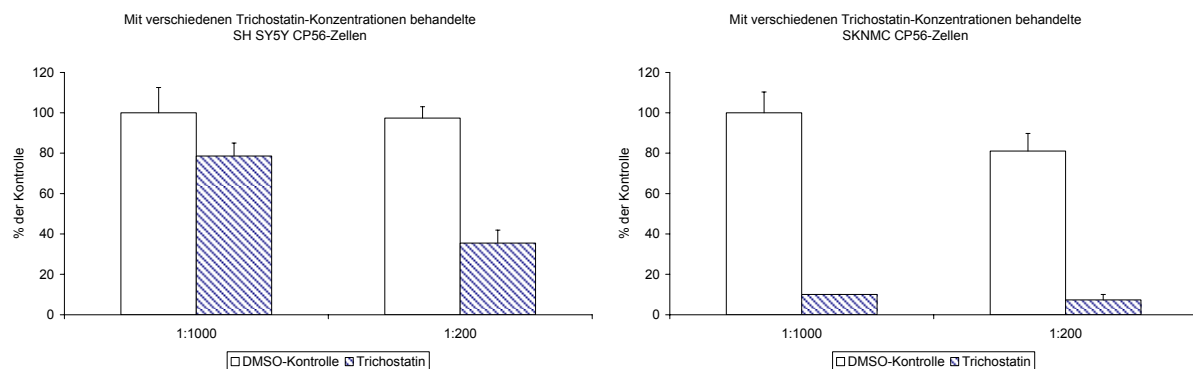
#### 3.1. MTT-Assay mit Trichostatin und Somatostatin behandelten SHY- und SKNMC-Zellen



Die Abbildungen zeigen SH SY5Y CP56- und SKNMC CP56-Zellen, die mit Konzentrationen von 1:500 und 1:5.000 Somatostatin behandelt wurden.

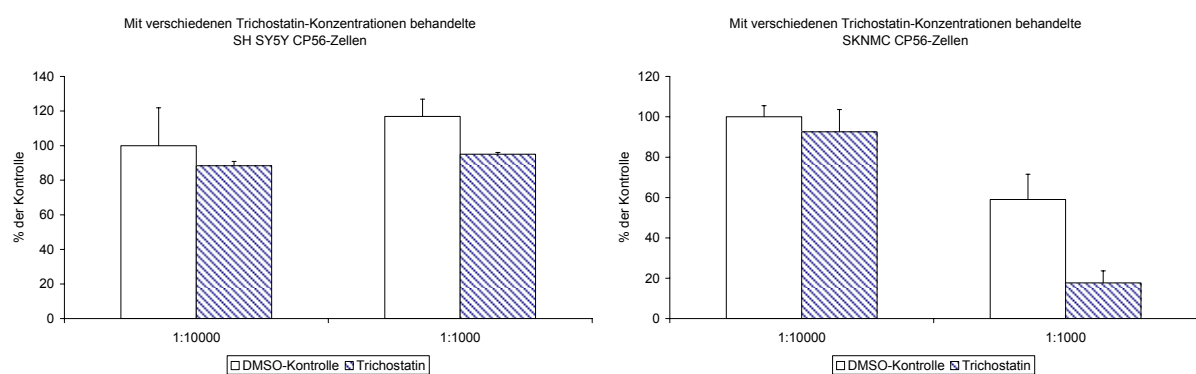
Betrachtet man die Ergebnisse der SH SY5Y CP56-Zellen auch unter Rücksichtnahme der Fehlerbalken, so kann man feststellen, dass die Behandlung keinerlei Auswirkungen haben. Die behandelten Zellen (102%) zeigen bei 1:5.000 Verdünnung von Somatostatin kaum Unterschiede zur Kontrolle (100%).

Auf den ersten Blick scheinen die SKNMC CP56-Zellen auf die 1:500 Somatostatin-Konzentration zu reagieren (Wert liegt bei 60%), betrachtet man allerdings den Fehlerbalken (~40%), so ist es wahrscheinlich, dass auch die SKNMC CP56-Zellen nicht wesentlich auf Somatostatin in einer 1:500 Verdünnung reagieren. Der Versuchsansatz mit 1:5.000 Somatostatin zeigt unter der Betrachtung der Fehlerbalken keinerlei Wirkung auf diese Konzentration an Somatostatin.



Wenn Trichostatin in der Verdünnung 1:1.000 eingesetzt wird, überleben dies 78,6% der SH SY5Y CP56-Zellen. Bei Betrachtung der Fehlerbalken kann man zur Kontrolle keinen signifikanten Unterschied feststellen. Setzt man Trichostatin allerdings in einer Verdünnung von 1:200 ein, so überleben dies nur 35,4% der Zellen.

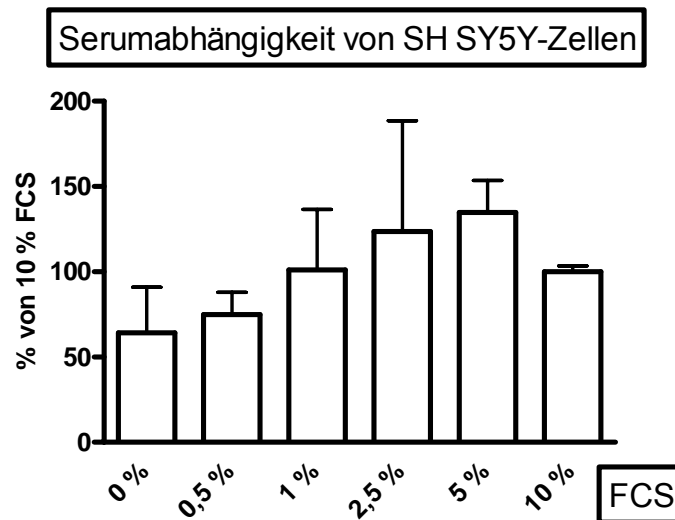
Die SKNMC CP56-Zellen zeigen eine stärkere Reaktion auf die eingesetzten Trichostatin-Konzentrationen. Schon bei der 1:1.000 Verdünnung überleben nur 10% der Zellen. Bei der höheren Konzentration an Trichostatin liegt der Wert bei 7,33%. Die DMSO-Kontrolle in einer 1:200 Verdünnung zeigt trotz Berücksichtigung des Fehlers fast 100% der 1:1.000 Verdünnung.



Weitere Versuche mit Trichostatin in 1:1.000 und 1:10.000 Verdünnungen zeigen, dass die Überlebensrate der SH SY5Y CP56-Zellen annähernd der der DMSO-Kontrolle gleicher Verdünnungen entsprechen. Der prozentuale Wert bei einer 1:10.000 Verdünnung liegt bei 88,4%, der bei einer 1:1.000 Verdünnung bei 95,1%.

Die SKNMC CP56-Zellen weisen bei einer 1:10.000 Verdünnung des Trichostatins eine Überlebensrate von 92,6% auf. Bei einer Verdünnung von 1:1000 sinkt die Rate auf 17,7%. Auch die DMSO-Kontrolle bei einer Verdünnung von 1:1.000 zeigt einen geringeren Wert von 59%.

### 3.2. MTT-Assay zum Nachweis der Serum-Abhängigkeit



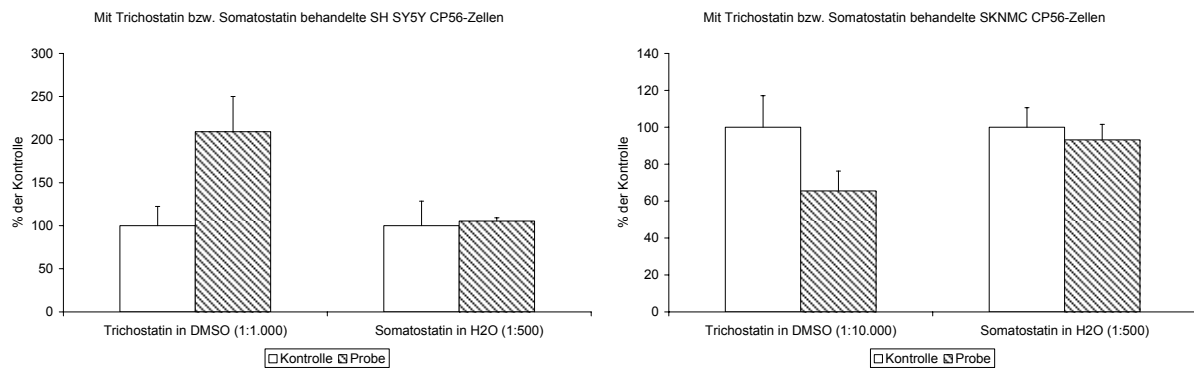
Diese Grafik fasst drei Versuche bzgl. der Abhängigkeit der SH SY5Y-Zellen von Fetal Calf Serum zusammen. Die Daten lassen vermuten, dass zumindest die Zellen, die mit 0% bzw. 5% FCS behandelt wurden, schlechter bzw. besser wachsen als die Zellen des 10%igen Mediums. Führt man allerdings den „Bonferroni's Multiple Comparison Test“ im GraphPad Prism (siehe Tabelle 13) durch, so lässt sich eine Signifikanz nur im Vergleich der 0% und 5% FCS-Proben ( $P < 0,05$ ) feststellen.

**Tab. 13: Bonferroni's Vergleichstest der Proben mit unterschiedlichen FCS-Konzentrationen**

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value
0% vs 0,5%	-10,54	0,4518	$P > 0.05$
0% vs 1%	-36,83	1,683	$P > 0.05$
0% vs 2,5%	-59,32	2,543	$P > 0.05$
<b>0% vs 5%</b>	<b>-70,38</b>	<b>3,374</b>	<b><math>P &lt; 0.05</math></b>
0% vs 10%	-35,68	1,711	$P > 0.05$
0,5% vs 1%	-26,29	1,085	$P > 0.05$
0,5% vs 2,5%	-48,78	1,909	$P > 0.05$
0,5% vs 5%	-59,85	2,566	$P > 0.05$
0,5% vs 10%	-25,15	1,078	$P > 0.05$
1% vs 2,5%	-22,49	0,9278	$P > 0.05$
1% vs 5%	-33,55	1,534	$P > 0.05$
1% vs 10%	1,145	0,05232	$P > 0.05$
2,5% vs 5%	-11,06	0,4744	$P > 0.05$
2,5% vs 10%	23,63	1,013	$P > 0.05$
5% vs 10%	34,7	1,663	$P > 0.05$

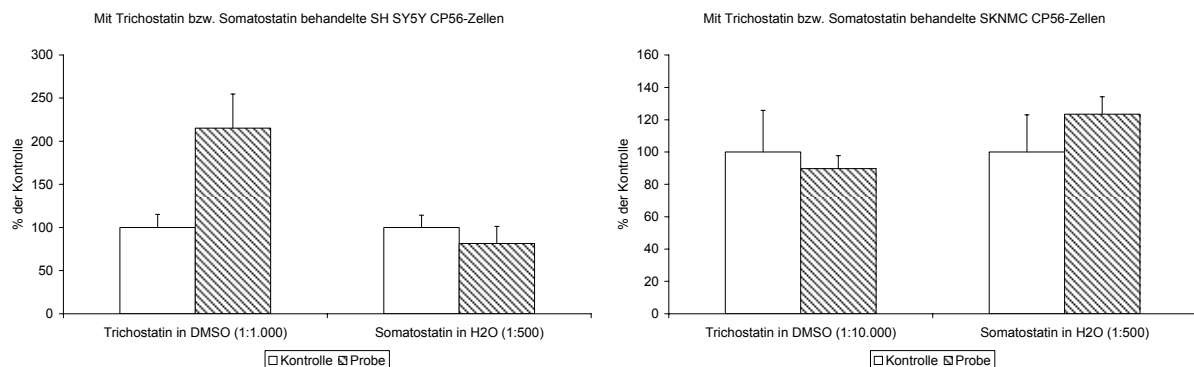
### 3.3. Luciferase-Assay mit Trichostatin und Somatostatin behandelten SHY- und SKNMC-Zellen

#### 3.3.1. Darstellung der Einzelergebnisse



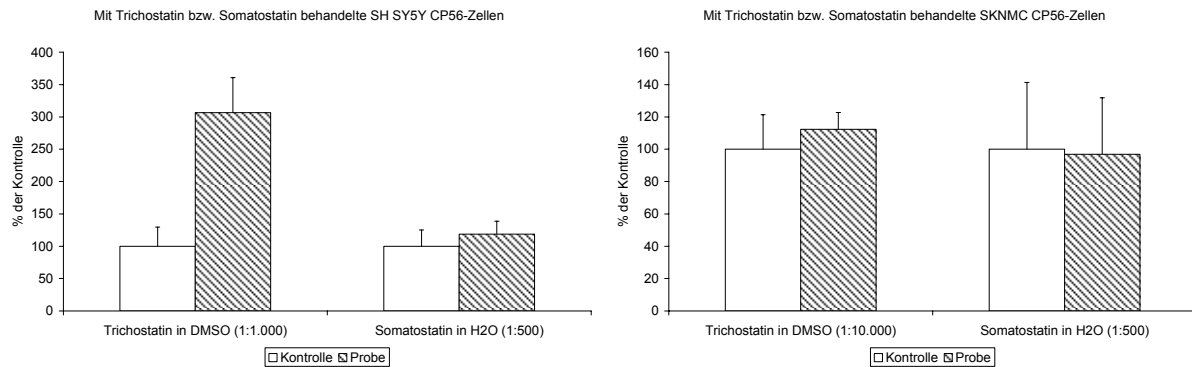
Die mit Trichostatin behandelten SH SY5Y CP56-Zellen zeigen eine 209%-ige Lichtemission bei dem Luciferase Test zur DMSO-Kontrolle in gleicher Verdünnung. Die Behandlung mit Somatostatin hat bei diesem Test und unter Beachtung des Fehlers keinerlei Wirkung gezeigt. Der prozentuale Wert der Lichtemission der Probe liegt bei 105,5%.

Im Gegensatz zu den SH SY5Y-CP56-Zellen zeigen die SKNMC CP56-Zellen nach der Behandlung mit Trichostatin eine erniedrigte Lichtemission. Sie liegt bei 65,5%. Bei der Probe, die mit Somatostatin behandelt wurde, kann wiederum kein Einfluß auf die Lichtemission festgestellt werden. Der Wert liegt bei 93,2%.



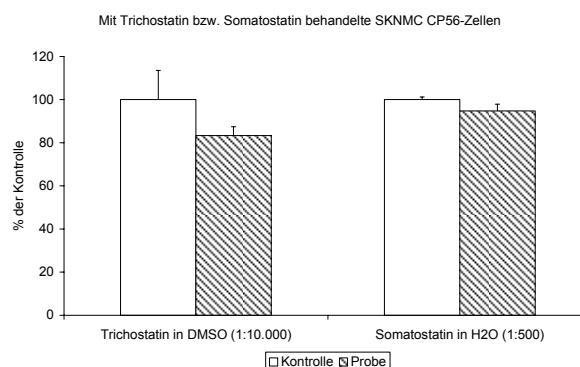
Auch beim zweiten Versuch zeigt sich bei den mit Trichostatin bzw. Somatostatin behandelten SH SY5Y CP56-Zellen das gleiche Bild. Die gemessene Lichtemission ist bei den mit Trichostatin behandelten Zellen wieder doppelt so hoch wie die der DMSO-Kontrolle (sie liegt bei 215,2%). Die Behandlung mit Somatostatin zeigt trotz der Beachtung des Fehlers (20%) keinen Unterschied (Lichtemission liegt bei 81%) gegenüber der H<sub>2</sub>O-Kontrolle.

Bei den Versuchen mit den SKNMC CP56-Zellen zeigen sich leicht veränderte Ergebnisse. Die Proben, die mit Trichostatin behandelt wurden, zeigen mit 89,8% und Einbezug des Fehlers annähernd die Werte der Kontrolle. Die gemessenen Lichtemissionen der Proben, die mit Somatostatin inkubiert wurden, sind leicht erhöht. Bei Betrachtung der Fehler sind die gemessenen Lichtintensitäten von Probe und Kontrolle annähernd gleich ( $123\% \pm 10,8\%$  und  $100\% \pm 23\%$ ).



Die Tendenz dieser Ergebnisse der SH SY5Y CP56-Zellen ist gleich. Die Lichtemission bei den mit Trichostatin behandelten Zellen liegt sogar bei 306,6%. Die mit Somatostatin behandelten Zellen zeigen eine Lichtemission, die sich wiederum kaum von der Kontrolle unterscheidet. Sie liegt bei 118%, wobei ein Fehler von 20,1% zu erkennen ist.

Die SKNMC CP56-Zellen zeigen wie auch im zweiten Versuch keinerlei Reaktion auf Trichostatin bzw. auf Somatostatin. Die Werte sind unter Beachtung der Fehler mit den der Kontrollen gleichzusetzen.

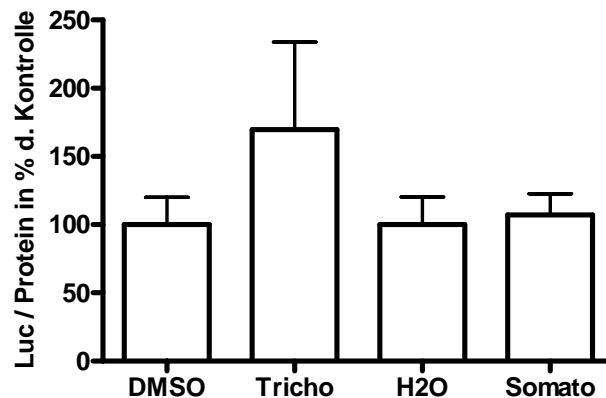


Die erneute Durchführung des Versuchs mit SKNMC CP56-Zellen brachte wiederum gleiche Ergebnistendenzen hervor. Die Behandlungen mit Trichostatin bzw. Somatostatin zeigen unter Beachtung der Fehler keinerlei Veränderungen in der Lichtemission der Proben. Bei Trichostatin liegt der Wert bei  $83,4\% \pm 4,1\%$  (die Kontrolle weist einen Fehler von  $13,6\%$

auf), bei Somatostatin liegt der Wert bei  $94,8\% \pm 3,1\%$  (Fehler der Kontrolle entspricht  $1,2\%$ ).

### 3.3.2. Darstellung der zusammengefassten Ergebnisse

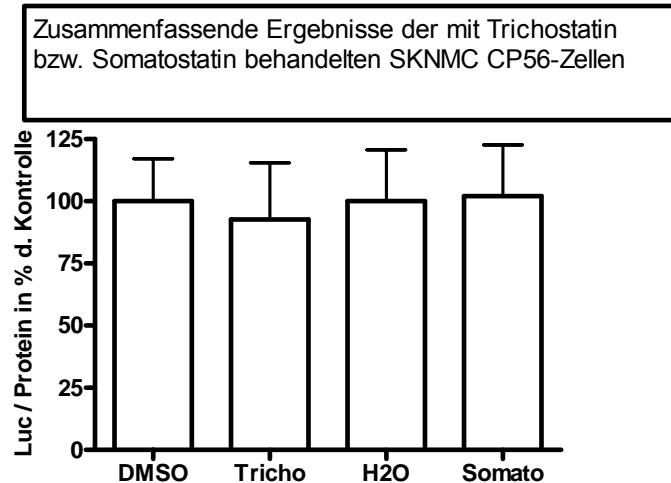
Zusammenfassende Ergebnisse der mit Trichostatin bzw. Somatostatin behandelten SH SY5Y CP56- Zellen



**Tab. 14: Bonferroni's Vergleichstest der mit Trichostatin bzw. Somatostatin behandelten SH SY5Y CP56-Zellen**

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
DMSO vs Tricho	-69,73	4,094	<b>P &lt; 0.001</b>	-109.9 to -29.54
H2O vs Somato	-7,254	0,4259	<b>P &gt; 0.05</b>	-47.44 to 32.94

Die im Programm GraphPad Prism zusammengefassten Ergebnisse der SH SY5Y CP56-Zellen entsprechen den Tendenzen der Einzelergebnisse. Die Ergebnisse der Trichostatinproben zeigen eine Lichtintensität von 169,2%, die der Somatostatinproben von 107,3%. Auffällig ist der Fehlerbalken bei den Ergebnissen der Trichostatinproben. Betrachtet man dagegen die Werte des P value in Tabelle 14 ( $P < 0,001$ ), so zeigt sich, dass die Ergebnisse der Trichostatin-Behandlung absolut signifikant sind und somit wohl als richtig anerkannt werden müssen. Dagegen ist der Vergleich zwischen Somatostatin und Wasser nicht signifikant, da der  $P < 0,001$  ist.



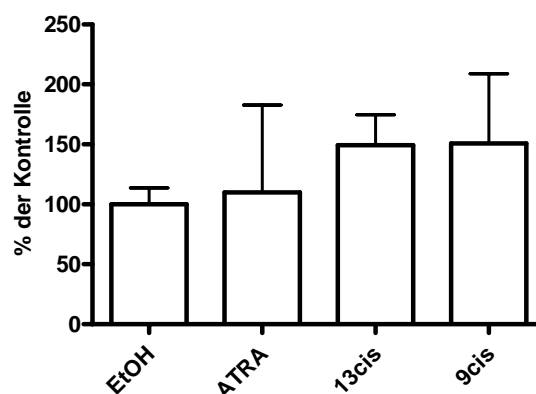
**Tab. 15: Bonferroni's Vergleichstest der mit Trichostatin bzw. Somatostatin behandelten SKNMC CP56-Zellen**

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
DMSO vs Tricho	7,35	0,8663	P>0,05	-12.36 to 27.06
H2O vs Somato	-2,083	0,251	P>0,05	-21.36 to 17.19

Die im Programm GraphPad Prism zusammengefassten Ergebnisse der SKNMC CP56-Zellen entsprechen den Tendenzen der Einzelergebnisse. Die Ergebnisse der Trichostatinproben zeigen eine Lichtintensität von 92,6% , die der Somatostatinproben von 102,1%. Bei den mit Trichostatin wie auch bei den mit Somatostatin behandelten Zellen ist der P value größer als 0,05 (P>0,05). Dies zeigt, dass die Ergebnisse nicht signifikant sind.

### 3.4. Bestimmung des Calciumeinstroms nach Behandlung mit Retinoiden

Zusammenfassende Ergebnisse für den Calciumeinstrom nach Behandlung mit Retinoiden bei SH SY5Y-Zellen





**Tab. 16: Bonferroni's Vergleichstest der verschiedenen SH SY5Y-Proben**

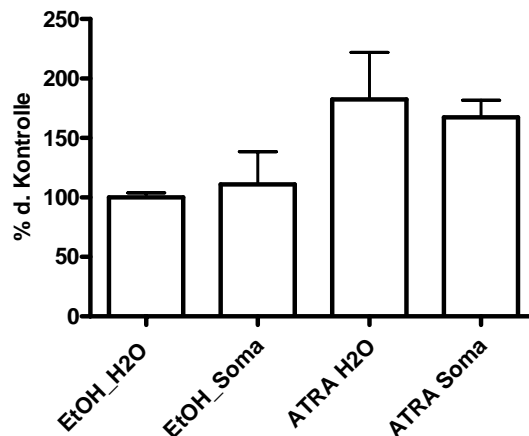
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
EtOH vs ATRA	-9,903	0,3893	P > 0.05	-77.04 to 57.23
EtOH vs 13cis	-49,36	1,711	P > 0.05	-125.5 to 26.76
EtOH vs 9cis	-50,78	1,760	P > 0.05	-126.9 to 25.35

Die Ergebnisse in der Grafik zeigen, dass der Calciumeinstrom nach 4 Tagen Inkubation mit verschiedenen Retinoiden in die Zellen erhöht ist. Bei den Messungen mit ATRA inkubierten Zellen liegt der Einstrom in die Zelle bei rund 110%. Allerdings zeigen die Messungen einen großen Fehler. Auch der P value liegt über 0,05, was aufzeigt, dass die Ergebnisse nicht als signifikant betrachtet werden können.

Am höchsten ist der Calciumeinstrom bei den mit 9-cis-Retinsäure behandelten Zellen, wobei auch hier der Fehler bei über 50% liegt. Der P value liegt auch hier über 0,05.

Unter Betrachtung des Fehlers und des Calciumeinstroms führt die Behandlung mit 13-cis-Retinsäure zum besten Ergebnis. Der Fehler liegt bei ~20%, der Calciumeinstrom bei 149,4%. Allerdings ist auch hier der P value über 0,05 und somit ist auch dieses Ergebnis nicht signifikant!

Zusammenfassende Ergebnisse für den Calciumeinstrom nach Behandlung mit Retinoiden und Soma bei SH SY5Y CP56-Zellen



**Tab. 17: Bonferroni's Vergleichstest der verschiedenen SH SY5Y CP56-Proben**

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P value	95% CI of diff
EtOH_H2O vs EtOH_Soma	-11,00	0,6165	P > 0.05	-60.59 to 38.59
EtOH_H2O vs ATRA_H2O	-82,30	4,612	P < 0.01	-131.9 to -32.70
EtOH_H2O vs ATRA_Soma	-67,39	3,777	P < 0.01	-117.0 to -17.80

Als Kontrolle dienen die Proben, die vier Tage mit EtOH und vier Stunden mit Wasser inkubiert wurden. Der Fehler der Messungen ist minimal. Inkubiert man die mit EtOH behandelten Zellen vier Stunden mit Somatostatin so zeigen sich unter Berücksichtigung des Fehlers kaum Auswirkungen. Auch ist in den Ergebnissen wieder keine Signifikanz zu erkennen ( $P > 0,05$ ).

Eine gewisse Signifikanz zeigen allerdings die Ergebnisse der mit ATRA behandelten Zellen (siehe Tabelle 17). Werden die Zellen vier Stunden vor der Messung zusätzlich mit Wasser inkubiert, zeigt sich ein erhöhter Calciumeinstrom, der bei 182,3% liegt. Vergleicht man die Ergebnisse mit den ATRA behandelten Zellen, die zusätzlich vier Stunden mit Somatostatin inkubiert wurden, zeigt sich bei letzteren ein geringerer Calciumeinstrom (167,4%). Mit Blick auf den Fehler ist das Ergebnis nicht mehr so deutlich, läßt sich aber dennoch aufgrund des P value vertreten.

## 4. Diskussion

### 4.1. MTT-Assay mit Trichostatin und Somatostatin behandelten SHY- und SKNMC-Zellen

Die im Kapitel 3.1. gezeigten Ergebnisse der Behandlung von SH SY5Y CP56- und SKNMC CP56-Zellen mit Somatostatin in den eingesetzten Konzentrationen von 1:500 und 1:5.000 haben gezeigt, dass Somatostatin in der Konzentration 1:500 für weitere Versuche eingesetzt werden kann. In dieser Konzentration scheint das Somatostatin keine toxische Wirkung auf beide Zelllinien zu haben.

Bei der Behandlung mit Trichostatin zeigen sich andere Ergebnisse. Die SH SY5Y CP56-Zellen zeigen in ihrer Proliferation unter Behandlung mit DMSO-Kontrolle keine nennenswerten Einbußen. Zusammengefasst kann man feststellen, dass die SH SY5Y CP56-Zellen weniger anfällig auf die höhere Konzentration von Trichostatin reagieren. Zwar liegt die Überlebensrate der Zellen bei der 1:200 Verdünnung bei 35,4%, aber dennoch zeigt sich, dass die SKNMC CP56-Zellen nur eine Überlebensrate von 7,33% aufzeigen.

Die weiteren Versuche mit Verdünnungen von 1:1.000 und 1:10.000 bekräftigen die gemachten Aussagen. Die SH SY5Y CP56-Zellen zeigen eine sehr hohe Überlebensrate bei einer Trichostatin-Verdünnung von 1:1.000. Warum der Wert sogar über dem der 1:10.000 Verdünnung liegt, lässt sich hier nicht feststellen oder erklären. Weitere Untersuchungen wurden für nicht erforderlich gehalten und deswegen nicht durchgeführt.

Die SKNMC CP56-Zellen zeigen bei einer 1:1.000 Verdünnung des Trichostatin wiederum eine große Sterblichkeit (82,3%). Erst bei einer Verdünnung von 1:10.000 kann gegenüber der DMSO-Kontrolle unter Berücksichtigung des Fehlers kein nennenswerter Unterschied festgestellt werden.

Warum die SKNMC CP56-Zellen sensibler auf das Trichostatin reagieren als die SH SY5Y CP56-Zellen lässt sich nur vermuten. Da Trichostatin als Deacetylase-Inhibitor auf die Acetylierung der Histone Einfluß nehmen kann, und die Acetylierung ein wichtiger Faktor bei der Regulation der Genexpression ist, kann man annehmen, dass durch die höhere Teilungsaktivität der SKNMC-Zellen schon durch geringere Trichostatin-Konzentrationen mehr Zellen absterben, da die DNA-Replikation gestört wird. Ob es weitere Gründe gibt, warum die SKNMC CP56-Zellen sensibler wirken, kann hier nicht eindeutig beantwortet werden.

Das Ziel des Versuchs aufzuzeigen, mit welchen Verdünnungen von Somatostatin und Trichostatin in weiteren Experimenten gearbeitet werden kann, wurde hier allerdings erfüllt. Die weiteren Versuche mit Somatostatin werden bei beiden Zelllinien in einer Verdünnung von 1:500 durchgeführt, die mit Trichostatin in 1:1.000 (SH SY5Y (CP56)-Zellen) und 1:10.000 (SKNMC CP56-Zellen) Verdünnungen.

## 4.2. MTT-Assay zum Nachweis der Serum-Abhängigkeit

Die Ergebnisse zum Nachweis der FCS-Abhängigkeit der SH SY5Y-Zellen lassen keine eindeutigen Aussagen über die notwendige Konzentration von FCS zu.

Der „Bonferroni's Multiple Comparison Test“ (Tabelle 13) zeigt ausschließlich beim Vergleich der 0% FCS-Proben mit den 5% FCS-Proben eine Signifikanz. Somit kann hier die Aussage getroffen werden, dass die Zellen auf Medien mit 5% FCS-Anteil besser wachsen als auf Medien ohne jegliches Serum.

Bei weiteren Vergleichen der Ergebnisse ist eine Aussage, welche Konzentration ausreichend für das Zellwachstum ist, nicht möglich. Man kann aber vermuten, dass eine gewisse Konzentration an FCS für das Wachstum der Zellen besser ist, als eine absolute Abwesenheit.

Für genauere Aussagen über die Serum-Abhängigkeit von SH SY5Y-Zellen müssen erneut Versuche durchgeführt werden.

## 4.3. Luciferase-Assay mit Trichostatin und Somatostatin behandelten SHY- und SKNMC-Zellen

Die Ergebnisse des Luciferase-Assays der SH SY5Y CP56-Zellen zeigen, dass die Ergebnisse mit Somatostatin behandelten Zellen keinen Unterschied zur H<sub>2</sub>O-Kontrolle aufweisen. Durch die Ergebnisse anderer Studien, bei denen die Somatostatin-Konzentration bei Alzheimer Patienten geringer ist als bei gesunden Personen wurde angenommen, dass das Somatostatin die Genexpression des ADAM10-Promotors erhöht. Auch die verminderte Bildung von A $\beta$ -Protein beim Einsatz höherer Somatostatin-Konzentrationen sprechen für einen positiven Einfluss des Somatostatins.

Hier konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, dass durch eine Somatostatinbehandlung die Genexpression des ADAM10-Promotors erhöht werden kann.

Trotz eines großen Fehlerbalkens läßt sich vermuten, dass durch die Behandlung mit Trichostatin eine erhöhte Genexpression stattgefunden hat. Auch die Signifikanz des Vergleichs zwischen der DMSO-Kontrolle- und der Trichostatin-Ergebnisse sprechen für die Wirkung des Trichostatin.

Ob diese leicht erhöhte Genexpression an der Veränderung der Acetylierung der Histone durch Trichostatin als Histondeacetylase-Inhibitor liegt, wurde hier nicht nachgewiesen. Außerdem ist nicht bekannt, auf welche Zell- bzw. DNA-Komponenten Trichostatin in der Zelle zusätzlich wirkt und welche Komponenten vielleicht sogar negativ beeinflusst werden. Weitere Untersuchungen und Ergebnisse von der Wirkung des Trichostatins auf den ADAM10-Promotor sind nach den hier dargestellten Ergebnissen zwingend notwendig.

Die Ergebnisse des Luciferase-Assays der SKNMC CP56-Zellen zeigen, dass die Ergebnisse mit Somatostatin und Trichostatin behandelten Zellen keinen Unterschied zu den Kontrollen aufweisen.

Somit kann man schlussfolgern, dass Trichostatin und Somatostatin bei den SKNMC CP56-Zellen keinerlei Einfluß auf den ADAM10-Promotor nehmen. Man könnte annehmen, dass der ADAM10-Promotor bei den SKNMC-Zellen an einer Stelle im Genom eingebaut wurde, deren Genexpression sowieso äußerst hoch ist und somit ein Unterschied zwischen einer weiteren Erhöhung der Expression nicht auffällt. Allerdings ist dies eine reine Vermutung, die durch keinerlei Versuchsergebnisse verifiziert werden kann.

Auch hier sind weitere Versuche notwendig, um eine Aussage treffen zu können, ob die Substanzen Trichostatin und Somatostatin einen Einfluß auf die Genexpression des ADAM10-Promotors bei SKNMC CP56-Zellen zeigen.

#### **4.4. Bestimmung des Calciumeinstroms nach Behandlung mit Retinoiden**

Trotz der großen Fehlerbalken kann eine Wirkung der Retinoide auf die Zelle nicht abgestritten werden.

Besonders die 13-cis-Retinsäure scheint die Anzahl der Acetylcholinrezeptoren auf der Oberfläche erhöht zu haben. Die Wirkung von all-trans- und 9-cis-Retinsäure ist nicht eindeutig zu klären, da die Standardfehler sehr hoch sind.

Der Calciumeinstrom in die Zelle erfolgt durch die Bindung von Acetylcholin an den nicotinen Acetylcholin-Rezeptoren. Durch die Bindung öffnen sich Calcium- und Natriumionenkanäle, Kaliumionen strömen im geringeren Ausmaß aus der Zelle und es kommt zur Depolarisation. Die Menge an Calciumionen wird durch die Reaktion mit Fura-2 quantifiziert.

Wird vier Stunden vor der Messung mit Somatostatin vorinkubiert, so kann man erkennen, dass der Calciumeinstrom geringer geworden ist. Das Somatostatin wirkt somit dem Calciumeinstrom entgegen, indem es durch Bindung an den Somatostatinrezeptor unter anderem die Ionenkanäle beeinflusst (Benali et al, 2000) und die Calciumantwort der Acetylcholinrezeptoren abschwächt.

Jedoch sind wiederum weitere Versuche notwendig, um die großen Standardfehler zu beheben und eine eindeutigere Aussage bezüglich der Wirkung von Retinsäuren treffen zu können.

## 5. Literatur

**Benali, N et al (2000):** Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation: - Journal of Physiology-Paris, Vol 94, Issues 3-4, pp. 205-210

**Haroutunian et al (2005):** Tau protein abnormalities associated with the progression of Alzheimer disease type dementia – Neurobiology of Aging

**Kaether, C und Haass, C. (2004):** A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid  $\beta$ -peptide generation. – JCB, Vol. 167, No. 5, pp. 809 – 812

**Kogner et al (1997):** Somatostatin in Neuroblastoma and Ganglioneuroma: - European Journal of Cancer, Vol. 33, No. 12, pp. 2084-2089

**Lichtenthaler, S und Haass, C (2004):** Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model: - The Journal of Clinical Investigation, Vol. 113, No. 10, pp. 1384-1387

**Sjogren, M und Blennow, K (2005):** The link between cholesterol and Alzheimer´s disease: - World J Biol Psychiatry, Vol. 6, No. 2, pp. 85-97

**Walter, J et al (2001):** The cell biology of Alzheimer´s disease: uncovering the secrets of secretases: - Current Opinion in Neurobiology, Vol. 11, Issue 5, pp. 585-590

### Internetquellen:

<http://www.wikipedia.de>; Suchbegriff: Proteinbestimmung nach Bradford, nachgeschlagen 07.01.2006

<http://www.dgak.net>; Deutsche Gesellschaft für Amyloid-Krankheiten eV., nachgeschlagen am 26.12.2006

<http://www.alzheimerinfo.de>; → "Ursachen", nachgeschlagen 28.12.2005

<http://www.deutsche-alzheimer.de>; Deutsche Alzheimer Gesellschaft: Das Wichtigste - Informationsblatt 2, Seite 1

**<http://www.deutsche-alzheimer.de>**; Deutsche Alzheimer Gesellschaft: Das Wichtigste - Informationsblatt 4, Seite 1

**<http://www.promega.de>**; Promega GmbH Technical Bulletin #281