



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Evaluation der Zytotoxizität eines Bumetanid-Derivates
(BUM 97) an kolorektalen Tumorzellen“

verfasst von / submitted by

Fatima Betül Tekinel, BEd

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Christian Studenik

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Dr. Mohammed Aufy

*Für die nächste Generation an Wissenschaftlern,
und zwar Bedirhan, Aymira und Ömer Faruk.*

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Diplomarbeit unterstützt und motiviert haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Univ.-Prof. Christian Studenik und Dr. Mohamed Aufy für die Chance, einen derart umfangreichen Einblick in die Forschung zu bekommen. Während der gesamten Zeit standen Sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Die Zellkultur und der Western Blot sind zwei gängige, wissenschaftliche Methoden. Ich schätze es sehr, dass ich im Rahmen meiner Diplomarbeit weitreichende Erfahrungen auf beiden Gebieten machen durfte.

Der größte Dank gilt meiner Familie, die mich in den Jahren des Studiums begleitet, unterstützt, motiviert und erheitert hat.

Vielen Dank liebe Mama und lieber Papa, dass ihr mir das alles ermöglicht habt!

Inhaltsverzeichnis

KAPITEL 1: EINLEITUNG	1
1.1. BUMETANID	1
1.2. APOPTOSE	4
1.3. ZIEL DER ARBEIT.....	8
KAPITEL 2: MATERIALIEN UND METHODEN	9
2.1. TESTSUBSTANZ	9
2.2. ZELLINIE UND KULTURMEDIUM	10
2.3. KULTIVIERUNG VON CACO2-ZELLEN	10
2.3.1. <i>Die Kultivierung der Zellen</i>	11
2.3.2. <i>Zellenbehandlung</i>	13
2.4. DER EZ4U ZYTOTOXIZITÄTSTEST.....	13
2.4.1. <i>Das Prinzip</i>	13
2.4.2. <i>Durchführung</i>	14
2.4.3. <i>Auswertung</i>	14
2.5. DER WESTERN BLOT	16
2.5.1. <i>Prinzip</i>	16
2.5.2. <i>Durchführung</i>	17
Die Proteingewinnung.....	17
Proteinbestimmung nach Bradford.....	18
Das Gießen des Geles.....	20
Die Probenvorbereitung.....	20
Elektrophorese.....	21
Semidry-Blotting.....	22
Immunoblotting.....	24
KAPITEL 3: ERGEBNISSE	27
3.1 ERGEBNISSE DES EZ4U ASSAY	27
3.1.1 <i>Das Ergebnis nach 72 Stunden</i>	28
3.1.2 <i>Ergebnis nach 48 Stunden</i>	30
3.1.3 <i>Ergebnis nach 24 Stunden</i>	32
3.2. ERGEBNISSE DES WESTERN BLOTS.....	36
KAPITEL 4: DISKUSSION	38
ZUSAMMENFASSUNG.....	39
ABSTRACT	40
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	41
TABELLEN	42
LITERATURVERZEICHNIS.....	43

Kapitel 1: Einleitung

1.1. Bumetanid

IUPAC: 3-Butylamino-4-phenoxy-5-sulfamoylbenzoesäure

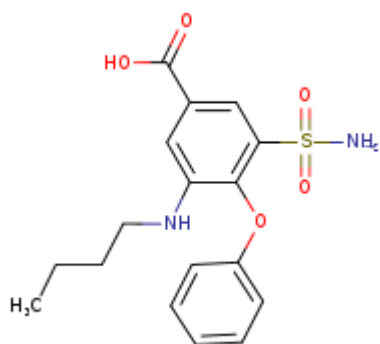


Abbildung 1: Die Strukturformel von Bumetanid (ChemIDplus NIH 2020).

Bumetanid ist ein hochwirksames Schleifendiuretikum. Der Arzneistoff wird bei kardialen Ödemen, akutem Lungenödem, hepatischen Ödemen, wie Aszites, renalen Ödemen, bedingt durch chronische Niereninsuffizienz, und nephrotischem Syndrom angewendet.

Bumetanid kann als Alternativmedikament herangezogen werden, wenn in der Anamnese eine allergische Reaktion auf Furosemid bekannt ist.

Schleifendiuretika können auch zur Behandlung von Hypertonie und akuter Hyperkalzämie eingesetzt werden (Diagnosia 2020).

Bumetanid, Furosemid und Piretanid hemmen reversibel das luminale $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransportssystem im dicken, aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife (Aktories, et al. 2017). Das Diuretikum hemmt die Rückresorption von Natrium- und Chloridionen im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und in den proximalen Nierentubuli. Dadurch wird die erhöhte Ausscheidung von Wasser, Natriumchlorid, Magnesiumphosphat und Calciumionen gewährleistet (Aktories, et al.).

Somit kommt es zur diuretischen und natriuretischen Wirkung des Bumetanid.

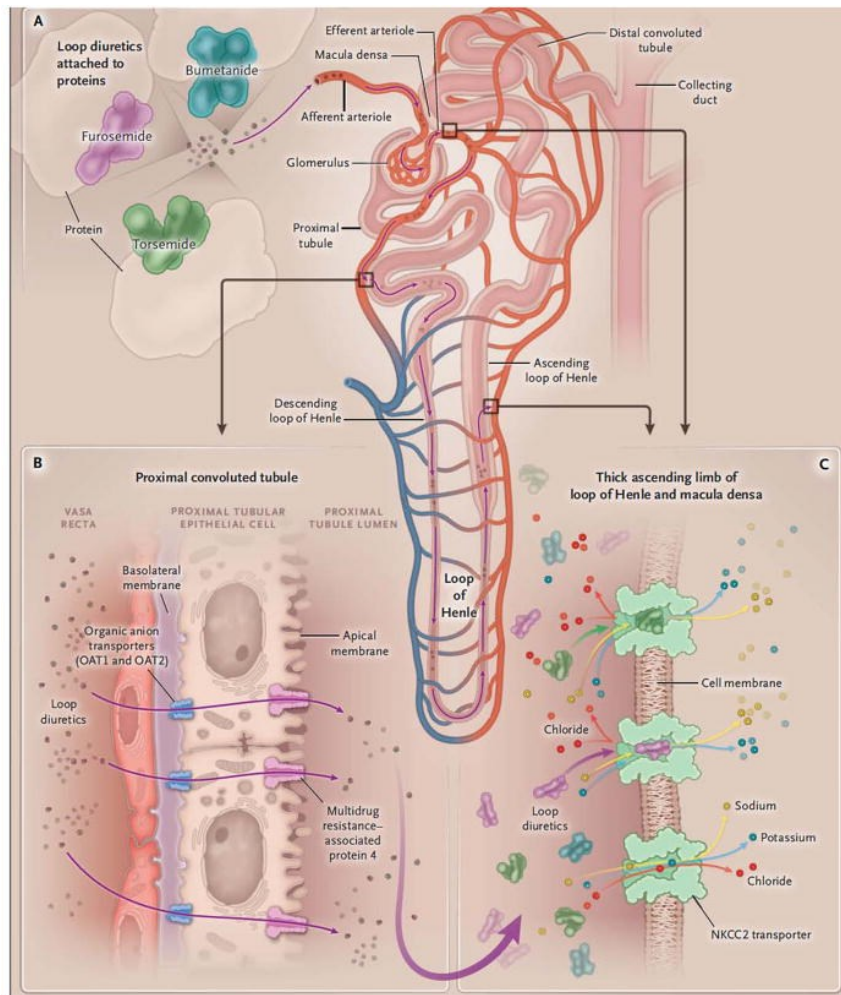


Abbildung 2: Schema des Elektrolyttransportes im dicken, aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife (Ellison & Felker, 2018).

Bumetanid soll bei Krampfanfällen helfen. Die Ursache für Krampfanfälle ist eine erhöhte zytoplasmatische Chloridkonzentration. Diese führt zur Depolarisierung des GABA-Rezeptors und damit zu einer höheren Neigung zu Anfällen. Damit eine Anfallhemmung erreicht werden kann, müssen die aktiven NKCC1-Cotransporter gehemmt werden. Damit würde die intrazelluläre Cl-Konzentration vermindert und bei Öffnung des Cl-Kanals ein hyperpolarisierender, d.h. ein die Erregung hemmender, Chlorid-Einstrom ermöglicht (Kilb, et al. 2007).

Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass das Diuretikum Bumetanid die NKCC1-Kotransporter hemmt und damit die intrazelluläre Chloridkonzentration vermindert (Kilb, et al. 2007).

Laut einer Studie der University of Cambridge wurde Bumetanid bei Autismus-Spektrum-Störungen kleiner Kinder eingesetzt.

Anhand der in „Translational Psychiatry“ veröffentlichten Ergebnissen konnte erstmals nachgewiesen werden, dass das Medikament die Symptome durch das Verringern des Verhältnisses von GABA zu Glutamat im Gehirn verbessert. Denn die erhöhte Chloridkonzentration in den Neuronen des Zentralnervensystems wird für die autistischen Störungen verantwortlich gemacht. Diese hätte zur Folge, dass der Neurotransmitter GABA nicht, wie normalerweise, eine inhibitorische, sondern eine exzitatorische Wirkung im Gehirn entfaltet (Lemonnier, et al. 2017).

1.2. Apoptose

Das Wort Apoptose kommt aus dem Griechischen und bedeutet, „abfallen“, wie die Blätter von einem Baum (Alberts, et al. 2002).

Die Apoptose, eine Form des programmierten Zelltodes, ist ein komplexer biologischer Prozess im Organismus und führt zur Abtötung und Entfernung der unerwünschten Zellen im Körper (Porter, et al. 1999).

Sie kann weiter definiert werden als Zelltod, der mit der Aktivierung von Caspase-Proteasen einhergeht (Galluzzi et al. 2012).

Die Anzahl der Zellen im Organismus ist streng reguliert, nicht nur durch die Kontrolle der Zellteilungsrate, sondern auch durch die Kontrolle des Zelltodes. Werden Zellen nicht mehr benötigt, wird ein intrazelluläres Todesprogramm aktiviert (Alberts, et al. 2002).

Bei einem gesunden erwachsenen Menschen sterben stündlich Milliarden von Zellen im Knochenmark und Darm ab.

Das Verschwinden der Interdigitalhäute, die ein Embryo während der Entwicklung im Mutterleib zwischen den Fingern besitzt, ist ein Prozess der Apoptose (Müller-Esterl, 2011).

Viele externe Faktoren können die Apoptose auslösen, zum Beispiel UV-Strahlung, Cytostatika, Hormone, Wachstumsfaktormangel, Hypoxie und Virusinfektionen. Dabei machen die Zellen eine Reihe von morphologischen Veränderungen durch (Müller-Esterl, 2011).

Der Prozess der Apoptose beginnt mit der Verdichtung bzw. Kondensation des Chromatins. Hierauf folgt die Fragmentierung der DNA im Zellkern und die Fragmentierung des Nucleus, gefolgt von der Zellschrumpfung und dem Zerfall der Zelle in apoptotische Partikel.

Durch die Veränderung der Zelloberfläche werden diese apoptotischen Partikel von Makrophagen erkannt und durch Phagozytose vollständig entfernt (Müller-Esterl, 2011).

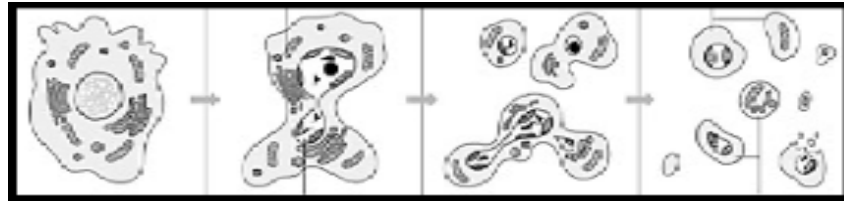


Abbildung 3: Die Morphologie der Apoptose (Busch, 1972).

Es gibt zwei Wege der Apoptose, die durch unterschiedliche Ereignisse ausgelöst werden. Diese beiden Wege laufen an einem gemeinsamen Punkt zusammen und aktivieren die Caspasen (Poreba, et al. 2018).

Caspasen gehören zur Familie der Cysteinyl-Aspartat spezifischen Proteasen, welche in allen Zellen als inaktive Vorläufer, also als Procaspasen, existieren.

Im aktiven Zentrum der Caspasen befindet sich ein Cysteinrest. Die Substrate werden spezifisch am C-Terminus zu Aspartatresten gespalten. (Müller-Esterl, 2011).

Der extrinsische Weg der Apoptose wird durch extrazelluläre Todesrezeptoren, wie die Fas-Rezeptoren, ausgelöst. Die Fas-Rezeptoren gehören zur Familie der TNF-Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche vorkommen.

Nachdem der Fas-Ligand an den Rezeptor bindet, kommt es zur Oligomerisierung des Fas-Rezeptors. Die Todesdomäne DD des Rezeptors wird aktiviert. Durch die Bindung des Adaptorproteins FADD (Fas-assoziiertes DD-Protein) an die Todesdomäne DD, wird ein Komplex gebildet, welcher zwei Moleküle Procaspase-8 und ein Molekül Procaspase-3 binden kann (Müller-Esterl, 2011).

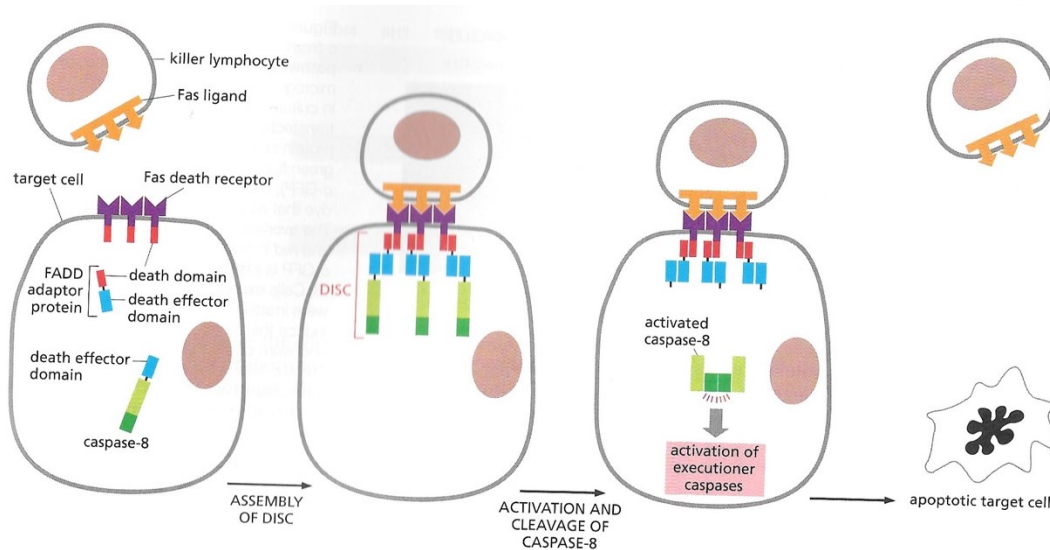


Abbildung 4: Die Fas-vermittelte Apoptose (Müller-Esterl, 2011).

Der mitochondriale Weg der Apoptose reagiert in erster Linie auf zellulären Stress und wird als der intrinsische Weg bezeichnet. Zu den Induktoren des intrinsischen Weges gehört der Tumorsuppressor p53. Wird eine Schädigung der DNA erkannt, wird der Zellzyklus gestoppt. So wird ermöglicht, dass in der G₁-Phase die DNA-Reparaturarbeiten durchgeführt werden (Green & Llamby, 2015).

Alternativ kann p53 bei irreparablen Schäden die Apoptose einleiten, indem das Bax-Gen exprimiert wird. Das Bax-Protein gehört zur Bcl-2-Genfamilie und führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum in das Cytosol (Alberts, et al. 2002).

Dort bildet das Protein einen Komplex mit Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1) und bindet zwei Procaspase-9 Moleküle.

Die Procaspase-9 wird zu Caspase-9 und aktiviert Effektorcaspasen, welche den Zelltod einleiten (Müller-Esterl, 2011).

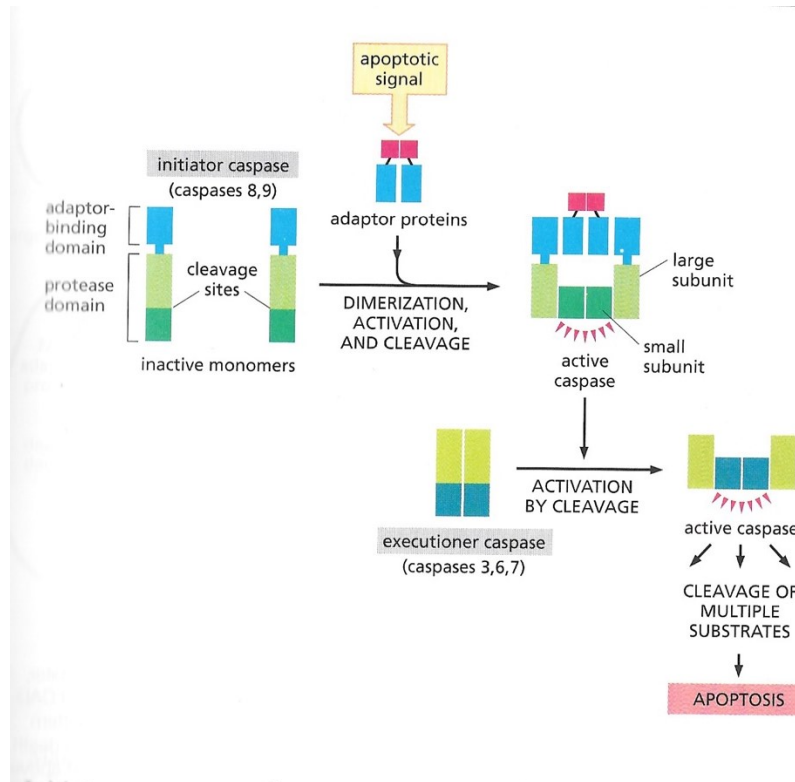


Abbildung 5: Der intrinsische Weg der Apoptose (Alberts, et al. 2008).

1.3. Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen folgende Forschungsfragen beantwortet werden:

Welches zytotoxische Potential hat die Substanz BUM97, ein Bumetanid Derivat, auf die Caco2–Zelllinie?

Erhöht sich die Expression der Apoptose-Proteine Cleaved Caspase-3, Caspase-3, Cleaved Caspase-7, Caspase-7, Cleaved PARP und PARP nach der Behandlung mit der Substanz BUM97?

Kapitel 2: Materialien und Methoden

2.1. Testsubstanz

Die Testsubstanz, welche in den folgenden Methoden verwendet wurde, ist das Bumetanid Derivat BUM97.

BUM: 97

MW: 432,5g/mol

Menge: 31,94mg

Nomenklatur:

3-(Butylamino)-2-phenoxy-5-(2, 2, 2 trifluoroethoxymethyl)benzensulfonamid

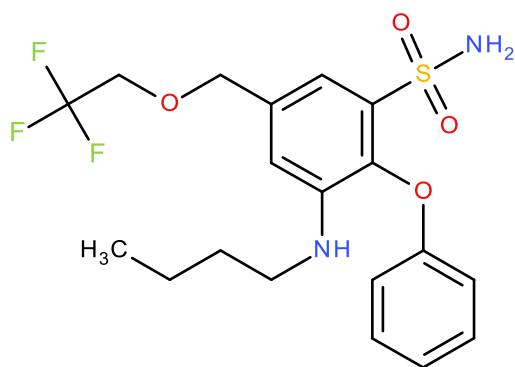


Abbildung 6: Strukturformel von BUM97.

Die Testsubstanz hat sich in DMSO (Dimethylsulfoxid) nicht gelöst und wurde in Ethanol gelöst.

2.2. Zelllinie und Kulturmedium

Die Substanz wurde auf Caco2-Zellen getestet. Die Caco2-Zelllinie (Cancer coli-2) stammt ursprünglich aus einem humanen Kolonadenokarzinom. Caco2 wurde in den 1970er Jahren von Jorgen Fogh am Memorial Sloan Kettering Cancer Centre in New York aus einem menschlichen kolorektalen Adenokarzinom kultiviert. Diese Zellen sind somit humane Epithelzellen und adhärente Zellen (Lea, 2015).

Die Zellen werden in DMEM/F-12 (1X) Medium kultiviert. Dazu werden noch 10% fetal bovine serum (FBS) gemischt. Das FBS ist notwendig, um die Zellen mit Wachstumsfaktoren, Hormonen, Lipiden und Mineralien zu versorgen.

Zusätzlich werden noch 1% PSG (Penicillin-Streptomycin-Glutamin) beigemischt. Das ist ein Antibiotikum, welches das Wachstum von Bakterien und somit eine Kontamination der Zellkultur verringert.

Das Medium wird bei 2-8°C gelagert und vor der Anwendung in einem Wasserbad bei 37°C vorgewärmt.

2.3. Kultivierung von Caco2-Zellen

Um die Proliferation der Zellen aufrechtzuerhalten, ist es wichtig, die Zellen zu verlängern. Zellen verlängern bedeutet, dass die Zellen, welche eine Konfluenz von 70% haben, verdünnt in eine neue Zellkulturflasche übergeführt werden müssen. Denn die Zellen benötigen Platz, um zu wachsen.

Die Caco2-Zellen sind adhärente Zellen; dies bedeutet, dass sie am Boden der Zellkulturflasche anhaftend wachsen. Somit müssen sie zunächst enzymatisch vom Boden abgelöst werden.

Zuerst wird das alte Medium vorsichtig abgesaugt. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann kommen 0,5-1ml Trypsin, die Protease, dazu und die Zellen werden für maximal 5 Minuten inkubiert, da die Protease sonst die Zellen abtötet.

Anschließend werden die Zellen unter dem Lichtmikroskop beobachtet, und überprüft, ob sie sich vom Boden der Zellkulturflasche gelöst haben.

Sind über 90% der Zellen vom Boden gelöst, wird 5 ml Medium dazugegeben. Damit wird das Trypsin neutralisiert.

Die Zellsuspension wird vorsichtig mit der Pipette auf- und abpipettiert, damit es zu einer guten Durchmischung der Zellsuspension kommt.

Nun werden 3ml dieser Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit 7ml Medium versetzt. Die alte Zellkulturflasche wird der Entsorgung zugeführt.

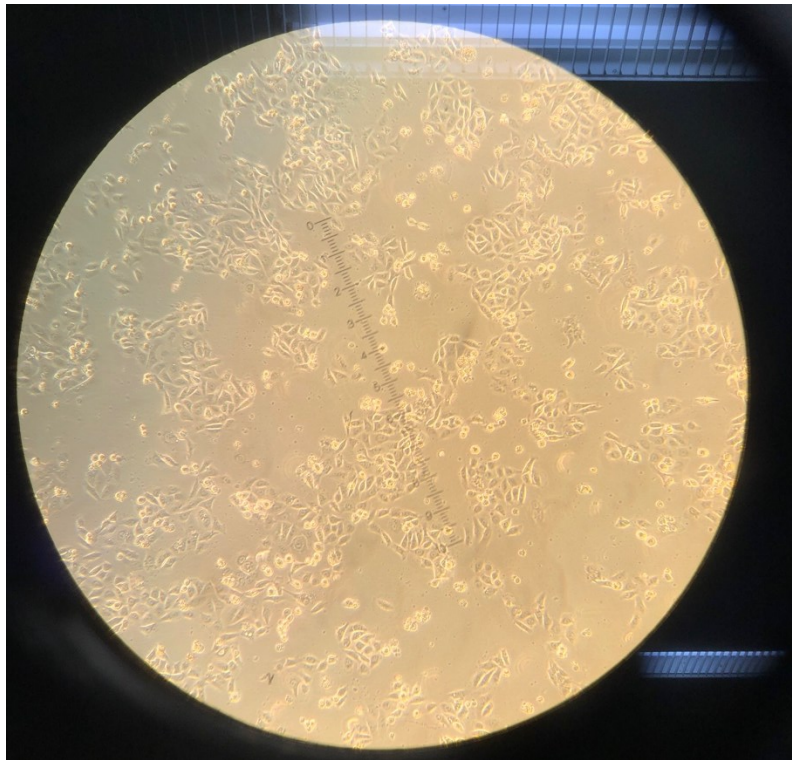


Abbildung 7: Caco2-Zellen unter dem Lichtmikroskop.

2.3.1. Die Kultivierung der Zellen

Die Zellen werden in 96-well Mikrotiterplatten (Well Cell Culture Cluster) kultiviert. Hierzu werden pro well 50.000 Zellen benötigt.

Deshalb muss vorher die Zellzahl bestimmt werden. Hierzu werden 100µl Zellsuspension auf das Hämocytometer aufgebracht.

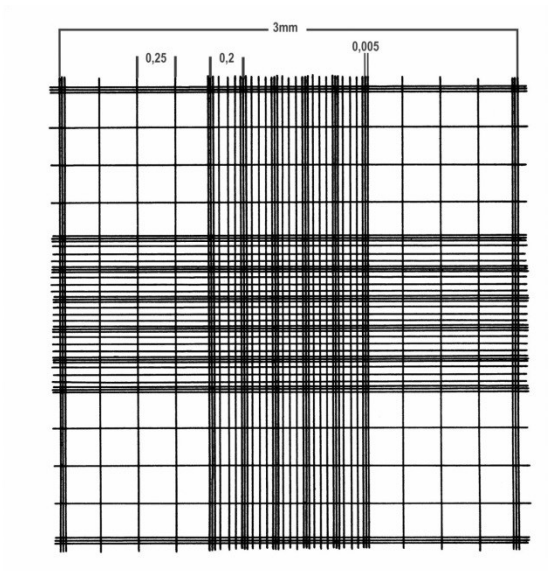


Abbildung 8: „Neubauer improved“ Zählkammer (LO Laboroptik, 2020).

Die vier Quadrate in den Ecken werden zum Zählen der Zellen verwendet. Sie werden unter dem Lichtmikroskop nach dem Muster in obiger Abbildung gezählt. Das große Kreuz in der Mitte wird nicht zum Zählen verwendet.

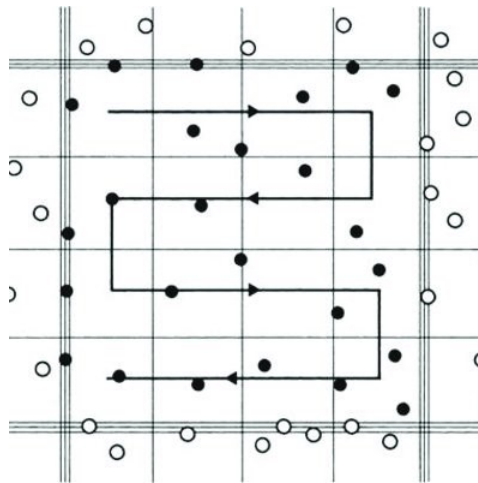


Abbildung 9: Aufbau einer Zählkammer (Schmitz, 2011).

Die Zellsuspension wird soweit mit Medium verdünnt, dass man pro well 50.000 Zellen erhält. In die 96-well Mikrotiterplatte werden nun pro well 100ml Lösung pipettiert. In die wells an den Rändern der Platte wird nur Medium eingetragen, in die restlichen wells 100ml Zellsuspension. Die 96-well Mikrotiterplatte wird über Nacht inkubiert.

2.3.2. Zellenbehandlung

In die wells am Rand der Platte kommen nochmal 100ml Medium, das gilt als Blank. Dann werden weitere 3 wells mit Zellsuspension befüllt; diese dienen als Kontrolle.

Anschließend wird eine Verdünnungsreihe der Substanz BUM97 mit den Konzentrationen 4mM → 2mM → 1mM → 0,5mM → 0,25mM → 0,125mM → 0,0625mM → 0,03125mM, hergestellt.

Es werden jeweils 3 wells pro Verdünnung verwendet. Die Zellen wurden für 72 Stunden, 48 Stunden, 24 Stunden und 12 Stunden inkubiert.

2.4. Der EZ4U Zytotoxizitätstest

2.4.1. Das Prinzip

Der EZ4U-Test ist ein 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Test. Er ist ein nicht-radioaktiver Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest.

Lebende Zellen enthalten farblose oder schwach gelbliche Tetrazoliumsalze. Die Testmethode beruht darauf, dass diese Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate umgewandelt werden. Da dieser Prozess nur von intakten Mitochondrien durchgeführt werden kann, ist dieser Assay eine einfache Methode, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden (Yunbao, Muraleedharan. 2010).

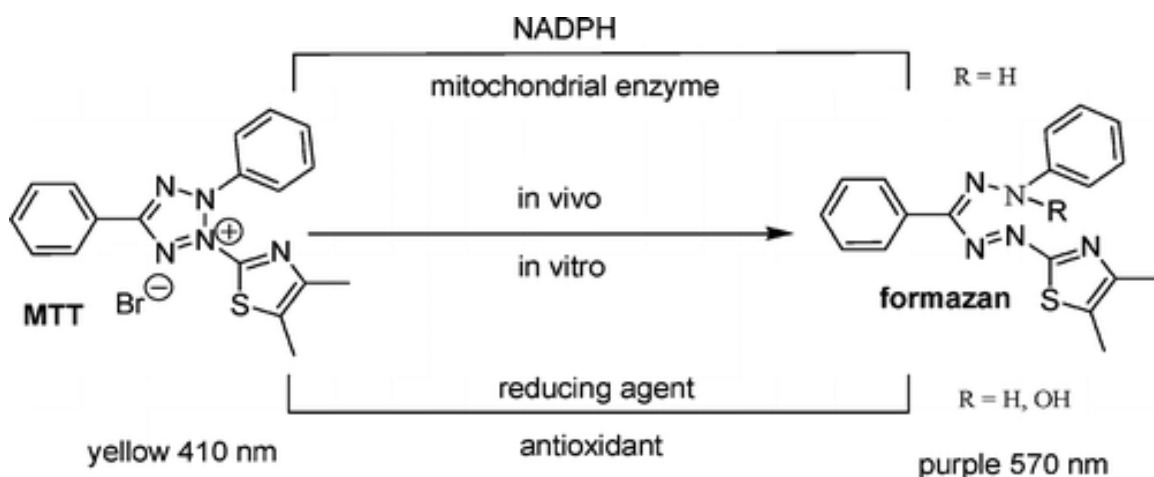


Abbildung 10: Farbreaktion von MTT zu Formazan (Yunbao, Muraleedharan, 2010).

2.4.2. Durchführung

Der EZ4U-Kit besteht aus Fläschchen, die jeweils mit der gleichen Menge des lyophilisierten Substrates gefüllt sind. Der Inhalt eines Fläschchens wird in jeweils 2,5 ml Aktivator-Lösung gelöst.

Dann wird pro well 20ml Reagenzlösung dazugegeben. Anschließend werden die Zellen für 2 Stunden inkubiert.

2.4.3. Auswertung

Nach der 2-stündigen Inkubation der Zellen ist bereits mit bloßem Auge eine Farbveränderung zu sehen. In wells mit einer geringeren Konzentration des BUM97 ist die Färbung stärker als in denen mit höherer Konzentration.



Abbildung 11: 96-well Mikrotiterplatte nach Behandlung mit EZ4U Testlösung.

Die Farbintensität wird mit einem Mikropplatten-Lesegerät, dem Tecan Infinite M200 Pro, bei einer Absorption von 450nm und mit einer Referenz bei 620nm, gemessen.

Die Ergebnisse der Dreifachbestimmung werden in eine Excel -Tabelle eingetragen. Es wird der Mittelwert der Dreifachbestimmung bestimmt und vom Blankwert abgezogen, sodass die Eigenfärbung der Reagenzlösung in den Ergebnissen nicht enthalten wird. Somit erhält man die Menge der lebenden Zellen in % im Vergleich zur Kontrolle.

2.5. Der Western blot

2.5.1. Prinzip

Im Western Blot, auch Immunoblot genannt, werden die Proteine auf eine Trägermembran (engl.: blotting) übertragen. Anschließend kann man sie durch Chemolumineszenz oder Fluoreszenz nachweisen (Müller-Esterl, 2011).

Vor dem Blotting wird das Proteingemisch mit einer Gelelektrophorese, zum Beispiel nach Molekulargewicht, Ladung oder isoelektrischem Punkt, aufgetrennt. Bestimmt wird die Proteinexpression; somit handelt es sich um eine semiquantitative Methode.

Unter Gelelektrophorese wird die Wanderung geladener Moleküle im elektrischen Feld verstanden. Verwendet wird die SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Das Gel hat einen Molekularsiebeffekt. Die großen Proteinmoleküle werden stärker gebremst als kleine, womit die Trennung nach Proteingröße ermöglicht wird (Müller-Esterl, 2011).

Die Membran wird dann mit markierten Antikörpern, die spezifisch für das betreffende Protein sind, inkubiert.

Der ungebundene Antikörper wird abgewaschen und die gebundenen Antikörper durch Entwicklung des Filmes nachgewiesen. Da die Antikörper nur selektiv an das zu untersuchende Protein binden, sollte nur eine Bande sichtbar sein. Die Dicke einer Bande ist proportional der Proteinmenge. So kann durch Vergleich mit einem Marker die Menge des vorhandenen Proteins angezeigt werden (Nowakowski, et al. 2014).

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des Western Blots beschrieben.

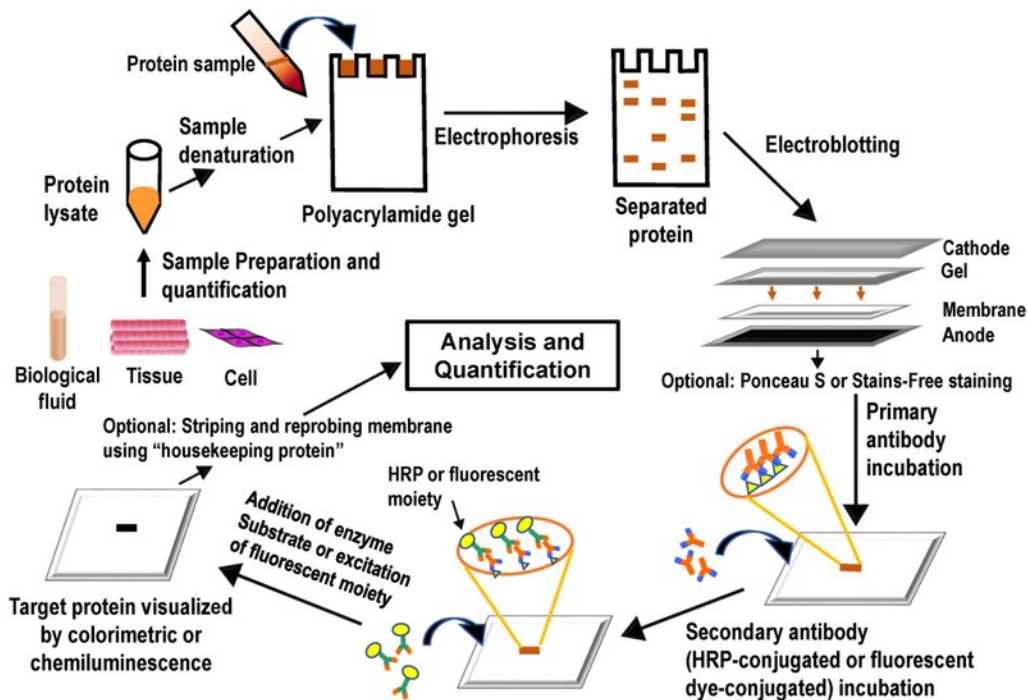


Abbildung 12: Prinzip des Western Blots (Gomes, et al. 2017).

2.5.2. Durchführung

Die Proteingewinnung

Die CaCo2-Zellen werden mit den gleichen Konzentrationen des BUM97 wie im Zytotoxizitätsversuch behandelt.

Hierzu werden insgesamt 6 Zellplatten angesetzt. Eine dient der Kontrolle. Jeweils eine Platte wurde mit 80µM, 40µM, 20µM, 10µM, 5µM BUM97- Lösung behandelt.

Die Zellen werden für 3 Tage inkubiert. Anschließend wird das Medium entfernt und zu jeder Platte 0,9% NaCl-Lösung zugegeben.

Nun werden die Zellen aus den einzelnen wells der Zellkulturplatte abgeschabt und in Mikroreaktionsgefäße überführt.

Für die Proteingewinnung müssen die Zellen lysiert werden. Hierzu wird eine Ultraschallsonde verwendet. Die Zelllysate werden dreimal 10s mit Ultraschall sonifiziert.

Anschließend wird 7µL 10% TritonX100 zugegeben und auf Eis mindestens 30 Minuten inkubiert. Danach werden die Proteinlösungen 10 Minuten bei ca. 11.000U/min unter Kühlung zentrifugiert.

Die Überstände werden in neue Mikroreaktionsgefäße überführt. Die Proben werden, auf Eis gekühlt, bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.



Abbildung 13: Ultraschallsonde, Bandelin electronic.

Proteinbestimmung nach Bradford

Für jede Tasche des Geles werden 20µg Protein benötigt. Daher muss vorher die Proteinkonzentration bestimmt werden.

Jede Probe wird 1:5 mit Wasser verdünnt. In einer 96-well Mikrotiterplatte werden jeweils 10µl Probe zur Dreifachbestimmung pro well pipettiert und mit 190µl Bradford Reagenz versetzt.

Der ungebundene Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 ist braun (Absorptionsmaximum 470nm).

In saurer Lösung bildet er mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe, wodurch der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert und sein Absorptionsmaximum zu 595nm verschoben wird.

Mit bloßem Auge ist der Farbumschlag von braun zu blau zu erkennen. Je höher die Proteinkonzentration, desto intensiver blau wird er.

Die Absorption wird bei 595nm mit einem Mikroplatten-Lesegerät, dem Tecan Infinite M200 Pro, gemessen.

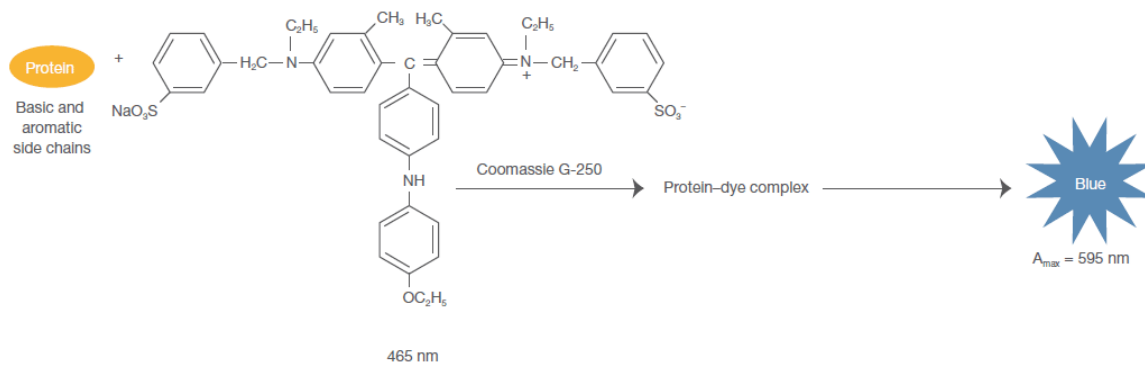


Abbildung 14: Prinzip des Bradford-Essays (Thermo Fisher Scientific, 2020).

Die Ergebnisse des Lesegerätes werden in eine Excel-Tabelle eingetragen und die Proteinkonzentration der Proben mit Hilfe einer BSA-Standardkurve berechnet.

Das Gießen des Geles

Das Gel besteht aus zwei Kompartimenten, einem Sammelgel (engl.: stacking gel) und einem Trenngel (engl.: running gel).

Das Sammelgel enthält Probenaschen, Aussparungen, welche mit Hilfe von Kämmen während der Polymerisation gebildet werden. In diese Taschen werden die Proben pipettiert.

Das Sammelgel ist ein SDS-PAGE 4,5% stacking gel. Hier steht 4,5% für die Maschenweite des Geles. Die Poren sind hier größer als die des Trenngels, da hier die Proteine noch nicht getrennt werden. Das Gel besteht aus destilliertem Wasser, Acrylamid und Tris-HCl Puffer pH6,8. Die genaue Zusammensetzung zeigt Tabelle 3.

Im Trenngel erfolgt die Trennung der Proteine nach ihrer Größe. Das Trenngel ist ein SDS-PAGE 12% running gel und besteht aus destilliertem Wasser, Acrylamid und Tris-HCl Puffer pH8,8. Die genauen Mengenangaben finden sich in Tabelle 2.

Die noch fehlenden Bestandteile der beiden Gele sind APS und TEMED, die die Polymerisation starten. Daher werden sie zuletzt hinzugefügt. Dann muss das Gel sofort zwischen die Glasplatten pipettiert werden.

Hierbei wird zuerst das Trenngel in die Kassette pipettiert. Die Kassette besteht aus zwei Glasplatten. Zwischen diese Glasplatten wird das Gel pipettiert. Die Dicke des Geles beträgt 1,5mm.

Abschließend wird Isopropanol hinzu pipettiert, um eine horizontale Trennlinie zu garantieren und eventuell vorhandene Luftblasen zu entfernen.

Die Polymerisation dauert 45 Minuten. Das Isopropanol wird entfernt und das Sammelgel pipettiert. Nun kommt ein Kamm zwischen die Glasplatten, sodass sich die Probenaschen ausbilden können. Das Sammelgel benötigt ebenfalls 45 Minuten für die Polymerisation.

Die Probenvorbereitung

Es werden pro Tasche 20µg Protein benötigt. Zu jeder Probe wird 4x SDS Probenpuffer pipettiert und dann auf jeweils 120µl mit Wasser aufgefüllt. Der Puffer denaturiert die Proteine. Um die Proben vollständig zu denaturieren werden diese für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und dann sofort auf Eis gekühlt.

Somit kommt es zu einer Entfaltung der Proteine. Das negativ geladene SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine.

Der 4x SDS Probenpuffer enthält den Farbstoff Bromphenolblau. Die Zugabe des Puffers färbt die Probe blau, was das Pipettieren in die Taschen erleichtert. Zusätzlich enthält der Puffer Glycerin. Dieser verleiht den Proben ein zusätzliches Gewicht, so sinken sie leichter in die Probentaschen.

4X Sample buffer	Glycerin 4ml 0,5M TRIS-HCl pH=6,8 4,8ml SDS 0,8g Bromphenolblau 4mg Mercaptoethanol 0,5 ml Aqua dest. 0,7ml
------------------	--

Tabelle 1: Zusammensetzung des 4X Probenpuffers.

Elektrophorese

Nun wird das Gel, welches sich in der Kassette befindet, in den Elektrophoresetank gestellt.

Der Tank wird mit 1x Laufpuffer befüllt. Zuerst wird der Raum zwischen den beiden Glasplatten gefüllt. Anschließend werden die Proben in die Taschen eingefüllt.

In die erste Tasche wird 5µl Markerlösung pipettiert. Dieser Marker ist ein sogenannter Molekulargewichtmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 43-315 kDA). In die nächste Tasche wird die Kontrolle eingetragen. Dann werden die Proben, beginnend mit der höchsten Konzentration, pipettiert. Es werden jeweils 40µl Probe aufgetragen.

Anschließend wird die Elektrophorese bei 200V gestartet und nach ca. 60 Minuten, sobald der Probenpuffer aus dem Glas geronnen ist, gestoppt.

Aqua dest.	3,2ml
30% Acrylamid	4ml
1,5 TRIS HCL pH=8,8	2,6ml
10% SDS	0,1ml
10%APS	100µl
TEMED	10µl

Tabelle 2: Zusammensetzung des Trenngeles.

Aqua dest.	2,24ml
30% Acrylamid	0,5ml
1,5 TRIS HCL pH=8,8	0,945ml
10% SDS	37,5µL
10% APS	3,8µL
TEMED	3,76µL

Tabelle 3: Zusammensetzung des Sammelgeles.

Semidry-Blotting

In diesem Schritt erfolgt das eigentliche Blotten. Mittels Semidry-Blotting werden die Proteine, welche nach ihrer Größe getrennt wurden, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

Hierfür werden die Glasplatten vorsichtig vom Gel entfernt. Das Sammelgel wird abgetrennt und verworfen.

Das Filterpapier und die Nitrocellulosemembran werden zuerst mit einem Towbin Puffer getränkt. Anschließend wird das Sandwich, entsprechend der Abbildung 15, erstellt: Filterpapier → Nitrocellulosemembran → Gel → Filterpapier. Es sollten möglichst keine Luftblasen vorhanden sein.

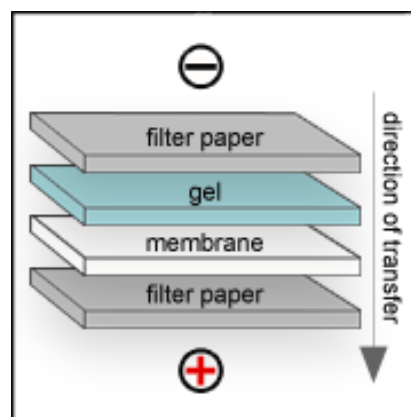


Abbildung 15: Nitrocellulosemembran-Sandwich (the cardio research web project, 2020).

Nun wird das Sandwich in das Mini Trans-Blot-Set der Firma Bio-Rad eingebracht. Das Blotting wird für 30 Minuten bei 200V gestartet.

Zuletzt wird überprüft, ob der Marker vom Gel auf die Membran übertragen wurde und der Vorgang erfolgreich war.



Abbildung 16: Bio-Rad Trans-Blot Turbo.

1X Running buffer	100ml 10X Running buffer 900ml Aqua dest.
10X Running buffer	30,2g TRIS 144g Glycin 10g SDS 815,8g Aqua dest.
1X Towbin buffer	200ml 50X Towbin buffer 800ml Aqua dest.
10X Towbin buffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1% SDS 20% Methanol

Tabelle 4: Zusammensetzung der Puffer für die Elektrophorese und das Semidry-Blotting.

Immunoblotting

Anschließend wird die Membran mit Blockierlösung bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde auf einem Schüttler inkubiert.

Nach einem fünfminütigen Waschvorgang mit 1X PBST wird die Lösung des primären Antikörpers, welcher in Kaninchen produziert wurde, auf die Membran aufgebracht und diese für weitere 3 Stunden auf dem Schüttler inkubiert.

Verwendet werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Antikörper.

Antikörper	Isotyp	Größe	Verdünnung (3% BSA in PBST)	Hersteller
Cleaved Caspase-3	Rabbit IgG	17, 19 kDa	1:1000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
Caspase- 3	Rabbit IgG	17, 19, 35 kDa	1:1000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
Cleaved Caspase-7	Rabbit IgG	20, 35 kDa	1:1000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
Caspase- 7	Rabbit IgG	20, 35 kDa	1:1000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
Cleaved PARP	Rabbit IgG	89 kDa	1:1000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
PARP	Rabbit IgG	24, 89, 116 kDa	1:1000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA

Tabelle 5: Primäre Antikörper, die für die Western Blot Analyse verwendet wurden.

Nach 3 Stunden wird die Membran 3-mal mit 1X PBST gewaschen, bevor man die Lösung des sekundären Antikörpers hinzufügt, und anschließend für 1h auf dem Schüttler inkubiert.

Als sekundärer Antikörper wird Anti-rabbit IgG verwendet, welches mit HRP konjugiert ist. Vor der Detektion wird die Membran fünfmal mit 1X PBST und einmal mit 1X PBS gewaschen. Für die Detektion wird jeweils 1 ml Detektionsreagenz 1 und 2 (Amersham™ ECL™ Western blotting Detection Reagents von GE Healthcare) gemischt und, durch die Bindung an den sekundären Antikörper, das Luminol oxidiert. Somit werden die Proteine sichtbar.

Nach 2 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt die Detektion der Proteine mittels ECL (enhanced chemoluminescence) mit dem ChemiDoc MP Imaging System der Firma Bio-Rad.



Abbildung 17: Das Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System.

Nach dem gleichen Prinzip werden die Membranen mit Anti-Tubulin-Antikörper inkubiert, um Tubulin als Ladekontrolle zu detektieren. Dies dient der Kontrolle, ob in jeder Tasche gleich viel Protein enthalten ist.

Blockierlösung	BSA 1,5g 1X PBAS 50ml NaN ₃ 100µL
10X PBS	NaCl 80g KCl 2g Na ₂ HPO ₄ 14,4g KH ₂ PO ₄ 2,4g
1X PBS	10X PBS 100ml Aqua dest. ad 1000ml
1X PBST	1X PBS 100ml Tween 80 1000µl Aqua dest. ad 1000ml

Tabelle 6: Reagenzien für das Immunoblotting.

Kapitel 3: Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des EZ4U Assay

Die CaCo2-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz BUM97 behandelt. Die Zytotoxizität wurde nach 72 Stunden, nach 48 Stunden, nach 24 Stunden und nach 12 Stunden Inkubation bestimmt. In der Ergebnistabelle sind die ersten Werte die des Leerwertes (Blank) und der Kontrolle (Control).

Der Leerwert ist hierbei der Wert des reinen Mediums. Als Kontrolle dienen nicht behandelte Zellen. Dabei wird für die Kontrolle von 100% lebender Zellen ausgegangen.

Die Zellen wurden, beginnend mit der niedrigsten Konzentration, behandelt. Dabei ist 4mM die höchste Konzentration, mit der die Zellen behandelt wurden.

Die Versuche wurden jeweils viermal wiederholt. Für das Ergebnis wurde der Mittelwert der 4 Versuche genommen.

3.1.1 Das Ergebnis nach 72 Stunden

Das Ergebnis nach 72 Stunden zeigt eine eindeutige Abnahme der lebenden Zellen, je höher die Konzentration der Substanz wird. Ab einer Konzentration von BUM97 von 1mM fällt der Prozentsatz der lebenden Zellen rapide. So sieht man, dass bei einer Konzentration von 0,5mM ca. 91% der Zellen noch leben. Ab 1mM sinkt die Anzahl der lebenden Zellen auf 28%. Und bei einer Konzentration von 4mM sind nur mehr 8,49% der lebenden Zellen vorhanden.

Somit wird gezeigt, dass die Substanz BUM97 auf die CaCo2-Zellen zytotoxisch wirkt.

Zuletzt wurde der LD-50 Wert bestimmt. Der LD-50 Wert liegt bei 0,81mM. Dies bedeutet, dass bei einer Konzentration von 0,81mM die Hälfte der Zellen nicht überleben.

Nach 72 Stunden

Konzentration
BUM97

				Mittelwert	Differenz	lebende Zellen in%
Blank	0,1499	0,1502	0,157	0,1524		
Control	1,4296	1,4332	1,4235	1,4288	1,2764	100
0,03125 mM	1,3871	1,4383	1,4097	1,4117	1,259	98,66
0,0625 mM	1,4158	1,4357	1,3392	1,3969	1,245	97,5
0,125 mM	1,3951	1,4027	1,3924	1,3967	1,244	97,49
0,25 mM	1,3883	1,3283	1,3869	1,3678	1,215	95,23
0,5 mM	1,3633	1,3228	1,2889	1,325	1,173	91,87
1 mM	0,4774	0,5298	0,5126	0,5066	0,354	27,75
2 mM	0,3223	0,3628	0,2963	0,3271	0,175	13,69
4 mM	0,2846	0,2473	0,2503	0,2607	0,1084	8,49

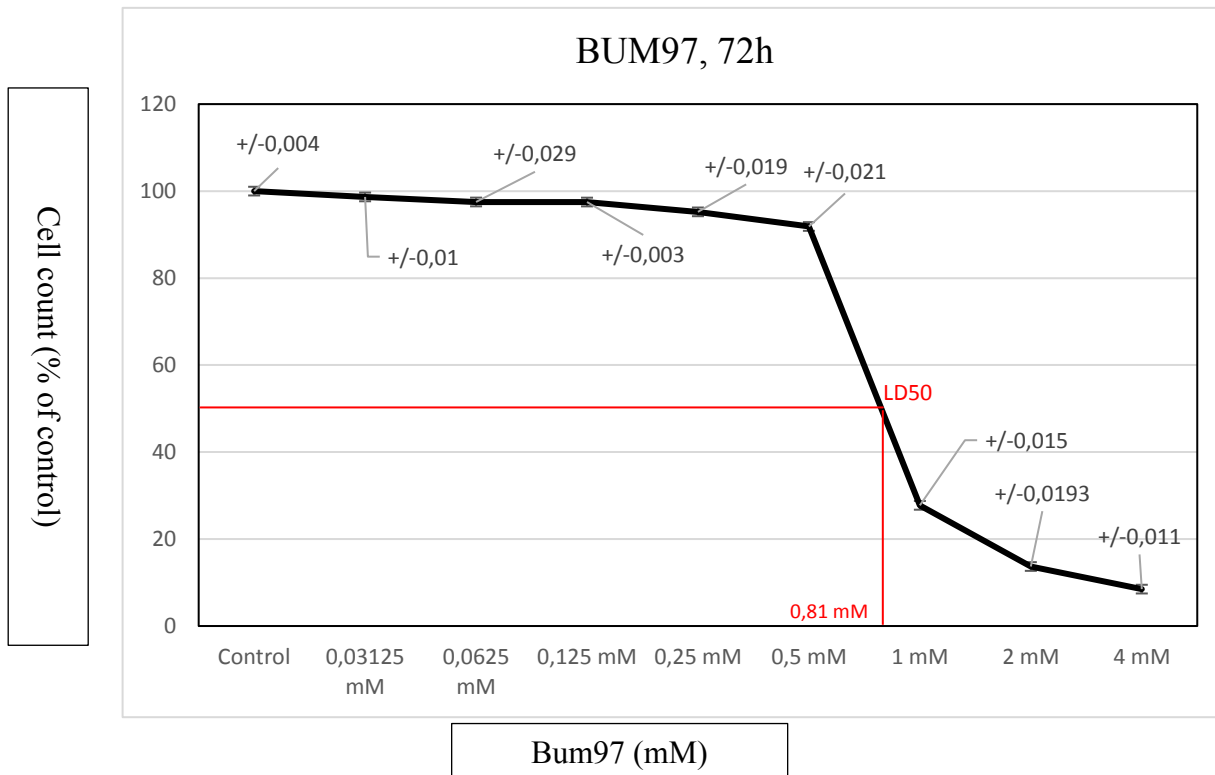


Abbildung 18: Das Ergebnis EZ4U Assay nach 72 Stunden. Dieses Diagramm zeigt den Mittelwert der 3 Parallelbestimmungen des EZ4U Assay nach 72 Stunden. Als statistische Signifikanz wurde $p < 0,05$ gewählt und mit sehr signifikant angegeben.

3.1.2 Ergebnis nach 48 Stunden

Das Ergebnis nach 48 Stunden zeigt eine eindeutige Abnahme der lebenden Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der Substanz. Bei einer Konzentration größer als 1mM fällt der Prozentsatz der lebenden Zellen rapide. Während bei einer Konzentration bis 0,5mM noch ca. 90% der Zellen am Leben sind, sinkt bei 1mM die Anzahl der lebenden Zellen auf 45 %. Bei einer Konzentration von 4mM sind nur noch 10,90% der lebenden Zellen vorhanden.

Nach 48 Stunden

Konzentration
BUM97

				Mittelwert	Differenz	lebende Zellen in%
Blank	0,1379	0,139	0,1415	0,1395		
Control	1,5931	1,677	1,6111	1,6271	1,4876	100
0,03125 mM	1,5879	1,598	1,617	1,601	1,4615	98,25
0,0625 mM	1,5904	1,615	1,5985	1,6013	1,4618	98,27
0,125 mM	1,6137	1,6191	1,5236	1,5855	1,446	97,2
0,25 mM	1,5335	1,4662	1,4333	1,4777	1,3382	89,96
0,5 mM	1,3173	1,3663	1,4809	1,3882	1,2487	83,94
1 mM	0,9598	0,6905	0,777	0,8091	0,6696	45,01
2 mM	0,5341	0,4814	0,329	0,4482	0,3087	20,75
4 mM	0,3542	0,3131	0,2375	0,3016	0,1621	10,9

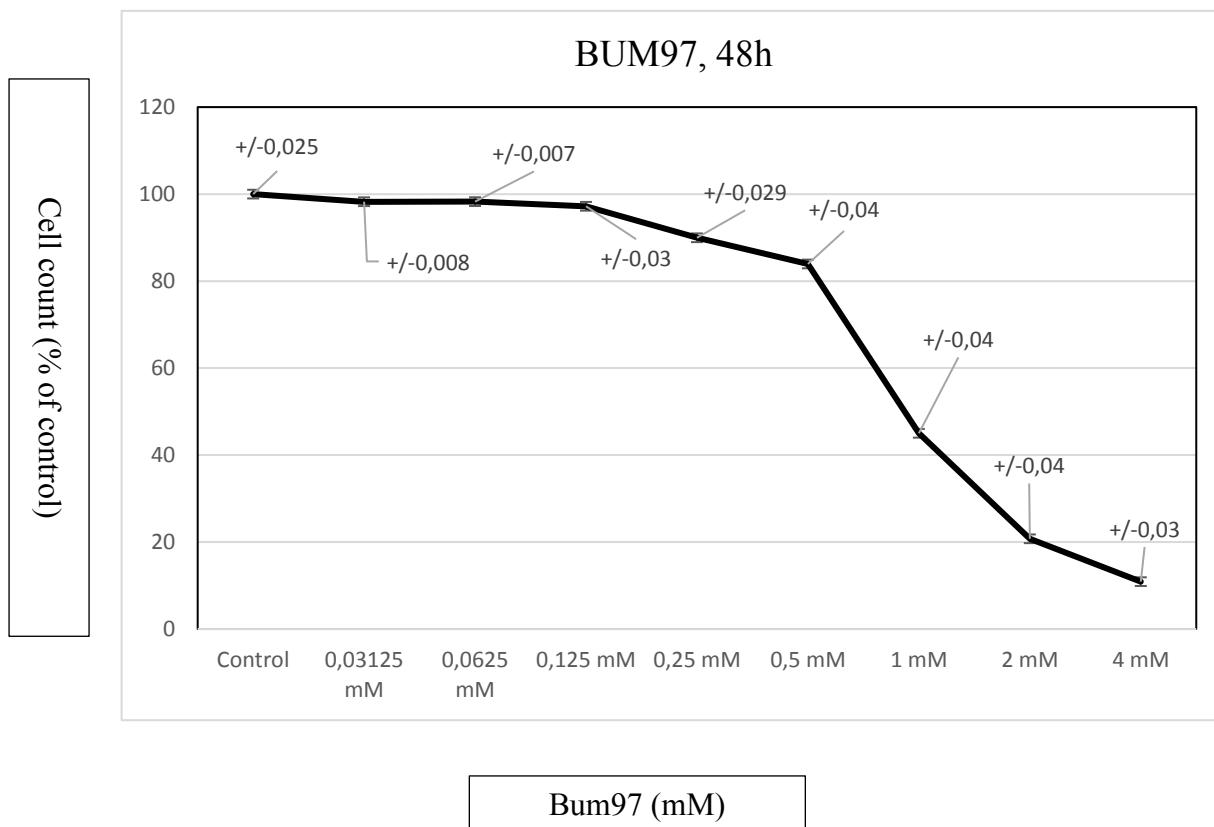


Abbildung 19: Das Ergebnis EZ4U Assay nach 48 Stunden. Dieses Diagramm zeigt den Mittelwert der 3 Parallelbestimmungen des EZ4U Assay nach 48 Stunden. Als statistische Signifikanz wurde $p < 0,05$ gewählt und mit sehr signifikant angegeben.

3.1.3 Ergebnis nach 24 Stunden

Das Ergebnis nach 24 Stunden zeigt auch eine Abnahme der lebenden Zellen. Diese ist jedoch nicht so signifikant wie nach 72 Stunden oder 48 Stunden. Hier überlebten bei der höchsten Konzentration (4mM) 52,66% der Zellen.

Es überlebten also deutlich mehr Zellen als nach 72 und 48 Stunden.

Nach 24 Stunden

Konzentration

BUM97

				Mittelwert	Differenz	lebende Zellen in%
Blank	0,1279	0,1282	0,1284	0,1282		
Control	0,8658	0,8266	0,7978	0,8301	0,7019	100
0,03125 mM	0,7988	0,8114	0,7915	0,8006	0,672	95,8
0,0625 mM	0,7991	0,8102	0,7985	0,8026	0,674	96,09
0,125 mM	0,7523	0,6985	0,7618	0,7375	0,609	86,82
0,25 mM	0,6555	0,6841	0,6899	0,6765	0,548	78,12
0,5 mM	0,6011	0,5446	0,6063	0,584	0,456	64,94
1 mM	0,5074	0,5292	0,5098	0,5155	0,387	55,18
2 mM	0,5212	0,4855	0,4988	0,5018	0,374	53,24
4 mM	0,4802	0,4932	0,5199	0,4978	0,3696	52,66

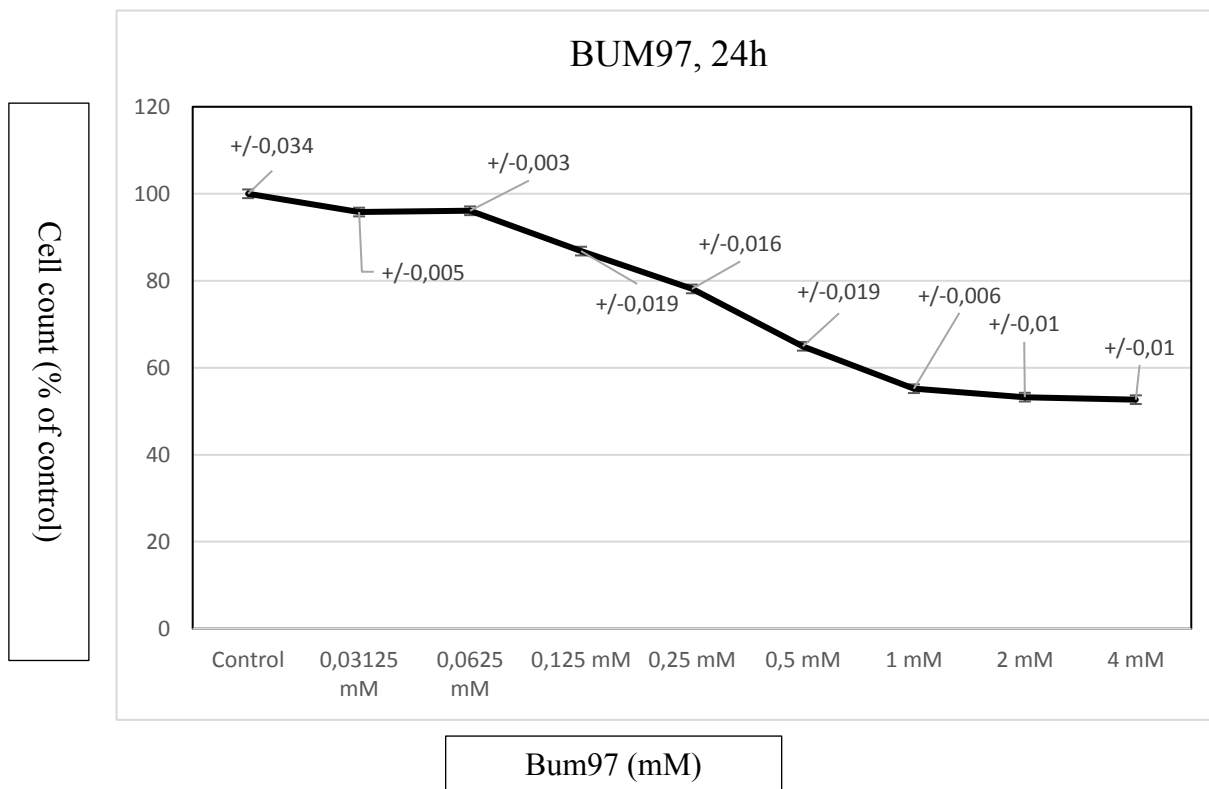


Abbildung 20: Das Ergebnis EZ4U Assay nach 24 Stunden. Dieses Diagramm zeigt den Mittelwert der 3 Parallelbestimmungen des EZ4U Assay nach 24 Stunden. Als statistische Signifikanz wurde $p < 0,05$ gewählt und mit sehr signifikant angegeben.

3.1.3 Ergebnis nach 12 Stunden

Das Ergebnis nach 12 Stunden zeigt nur eine geringe Abnahme der lebenden Zellen. Bei der höchsten Konzentration von 4mM überlebten 82,50% der Zellen. Nach 12 Stunden hat die Substanz BUM97 nur einen geringen toxischen Effekt auf die CaCo2- Zellen.

Es kann daraus gefolgert werden, dass die Substanz deutlich länger auf die Zellen wirken muss, um eine effektive zytotoxische Wirkung zu erzielen.

Nach 12 Stunden

Konzentration

BUM97

				Mittelwert	Differenz	lebende Zellen in%
Blank	0,1216	0,1313	0,1281	0,127		
Control	0,4622	0,4814	0,4939	0,4792	0,3522	100
0,03125 mM	0,4622	0,4814	0,4439	0,4625	0,336	95,27
0,0625 mM	0,4622	0,4354	0,4568	0,4515	0,324	92,13
0,125 mM	0,4575	0,4477	0,4424	0,4492	0,322	91,49
0,25 mM	0,4425	0,4493	0,4588	0,4502	0,323	91,77
0,5 mM	0,4425	0,4511	0,4481	0,4472	0,32	90,93
1 mM	0,4028	0,3949	0,4196	0,4058	0,279	79,16
2 mM	0,433	0,4357	0,3991	0,4226	0,296	83,94
4 mM	0,4224	0,4106	0,4196	0,4175	0,2905	82,5

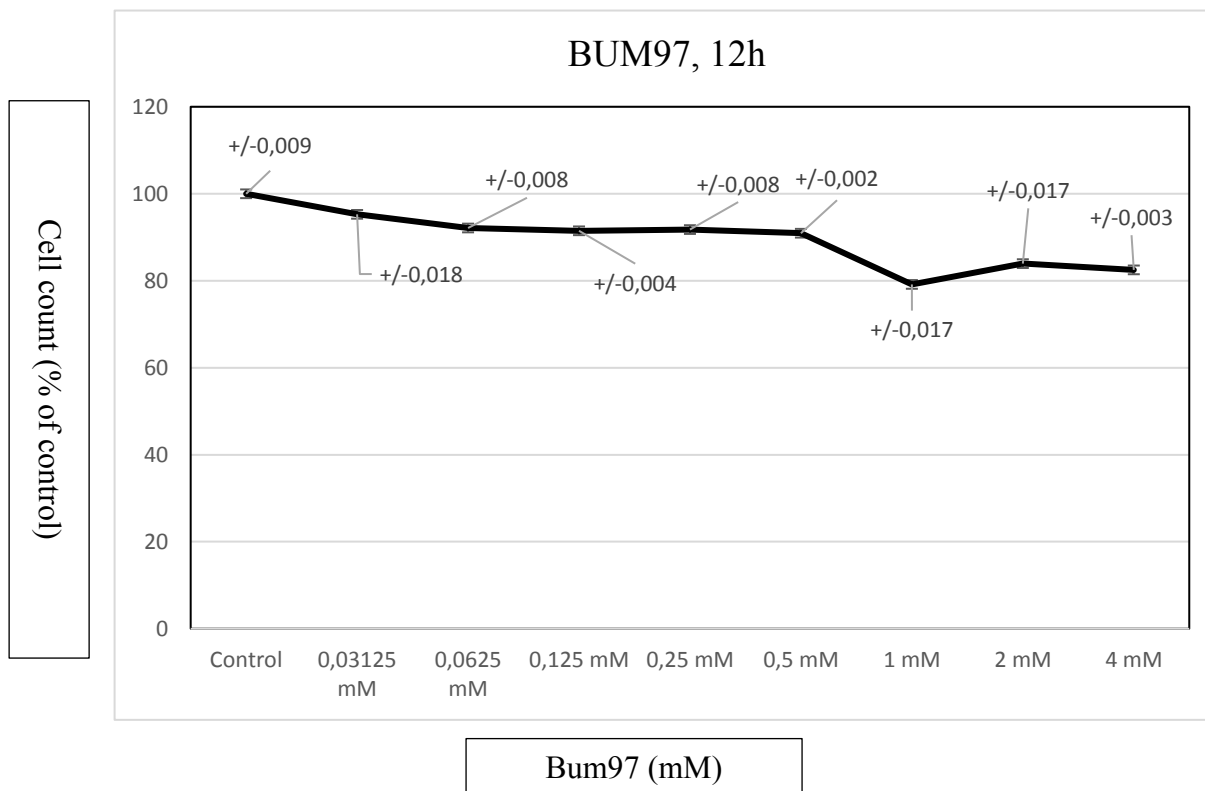


Abbildung 21: Das Ergebnis EZ4U Assay nach 12 Stunden. Dieses Diagramm zeigt den Mittelwert der 3 Parallelbestimmungen des EZ4U Assay nach 12 Stunden. Als statistische Signifikanz wurde $p < 0,05$ gewählt und mit sehr signifikant angegeben

3.2. Ergebnisse des Western Blots

Mittels Western Blots wurde die Expression der Apoptose-Proteine analysiert.

Um die Expressionsniveaus der inaktiven und aktiven Caspasen in mit BUM97 behandelten CaCo2-Zellen zu untersuchen, wurden nachfolgend beschriebene Western Blot Analysen durchgeführt.

Die Apoptose-Proteine sollen, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, in den Proben mit behandelten Zellen erhöht exprimiert sein.

Die Western Blot Experimente werden so durchgeführt, dass zuerst die Kontrolle und dann die jeweilige Konzentration aufgetragen wird. Die Reihenfolge ist folgendermaßen: Kontrolle → 80µL → 40µL → 20µL → 10µL.

Bei den Western Blot Ergebnissen ist deutlich zu sehen, dass die Bande der unbehandelten Zellen wesentlich schwächer ist. Bei Caspase 3, Cleaved Caspase 7, Caspase 7, PARP und Cleaved PARP sind bei den unbehandelten Zellen kaum Banden zu sehen. Die Banden für die behandelten Zellen sind deutlich stärker zu sehen.

Die Apoptose-Proteinexpression der behandelten Zellen ist deutlich erhöht im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die Banden der inaktiven Caspasen, wie Cleaved Caspase 3, Cleaved Caspase 7 und Cleaved PARP-Antikörper waren stärker als die der aktiven Caspasen, wie Caspase 3, Caspase 7 und PARP-Antikörper.

Interessanterweise gibt es kaum einen Unterschied zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des BUM97. Dies zeigt sich bei allen 6 Antikörpern.

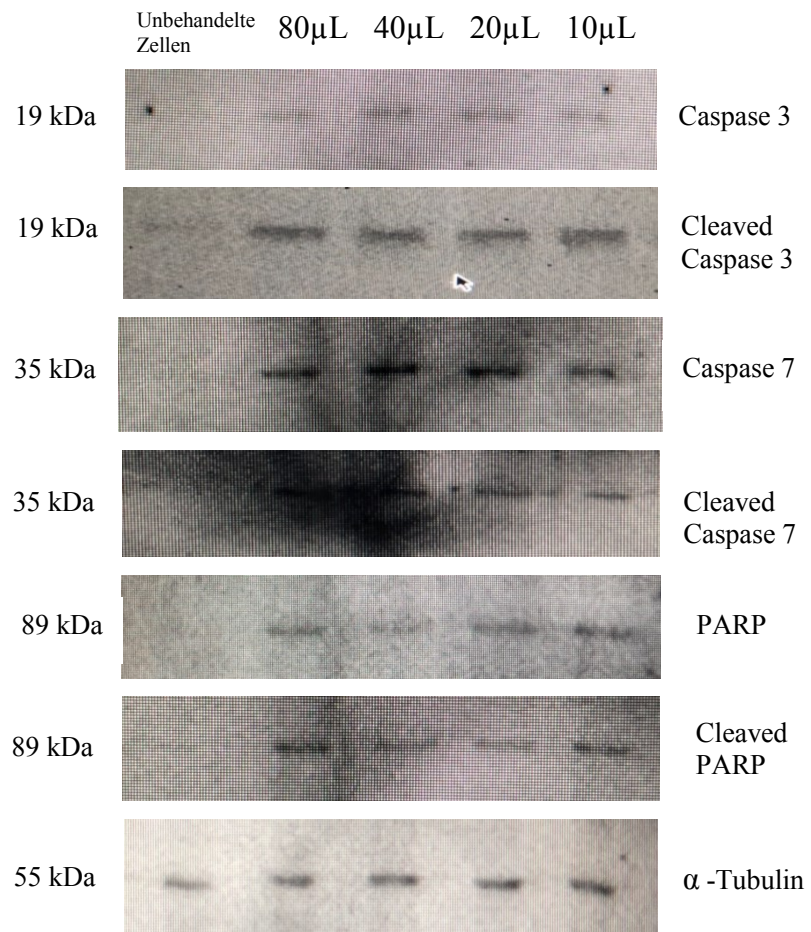


Abbildung 22: Western Blot Analyse der behandelten und unbehandelten CaCo2-Zellen.

Kapitel 4: Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den zytotoxischen Effekt der Testsubstanz BUM97 auf CaCo2-Zellen zu untersuchen. Dafür wurden die behandelten Zellen mittels Western Blots auf die Expressionserhöhung der Apoptose-Proteine überprüft.

Die Zytotoxizität der Substanz wurde mittels EZ4U-Assay analysiert. Hierzu wurde die Auswirkung der verschiedenen Konzentrationen der Substanz nachgewiesen. Nach 72 Stunden, 48 Stunden, 24 Stunden und nach 12 Stunden Kontakt der Substanz mit den CaCo2- Zellen wurde die Auswirkung der Zytotoxizität der Substanz untersucht.

Das Ergebnis nach 72 Stunden zeigt eine eindeutige Abnahme der lebenden Zellen, je höher die Konzentration der Substanz wird. Auch nach 48 Stunden konnte schon eine deutliche Abnahme an lebenden Zellen beobachtet werden.

Das Ergebnis nach 24 Stunden zeigt zwar auch eine Abnahme der Zellen, jedoch nicht so effektiv wie nach 72 Stunden oder nach 48 Stunden. Das Ergebnis nach 12 Stunden zeigt nur noch eine geringe Abnahme der Zellen. Nach 12 Stunden hat die Substanz BUM97 also kaum noch einen Effekt auf die CaCo2- Zellen.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Substanz BUM97 auf die CaCo2-Zellen, in Abhängigkeit von der Konzentration und der Einwirkungszeit, zytotoxisch wirkt.

Die Expressionserhöhung der Apoptose-Proteine der behandelten CaCo2-Zellen wurde mittels Western Blots analysiert. Hierbei wurden Zellen verwendet, welche 72 Stunden Kontakt mit der Testsubstanz BUM97 hatten.

Dann wurden unbehandelte Zellen mit behandelten Zellen verglichen. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Expression der Apoptose-Proteine, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, erhöht war. Für die unterschiedlichen Konzentrationen, mit denen die CaCo2-Zellen behandelt wurden, konnte kein Effekt entdeckt werden.

In Rahmen dieser Diplomarbeit konnte experimentell gezeigt werden, dass die Testsubstanz BUM97 eine zytotoxische Wirkung auf die CaCo-2 Zellen hat und die Expression der Apoptose-Proteine der CaCo2- Zellen nach der Behandlung erhöht ist.

Zusammenfassung

In vitro Zytotoxizitätstests neuer potentieller Wirkstoffe gewinnen immer mehr an Bedeutung. Einer der wichtigsten Gründe ist, dass sie eine Alternative zu Tierversuchen darstellen.

Der Zytotoxizitätstest ist die erste Prüfung für neue Substanzen im Rahmen einer Biokompatibilitätsbewertung und liefert innerhalb weniger Tage (tierversuchsfrei) eine Aussage.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das zytotoxische Potential der Substanz BUM97, eines Bumetanid Derivates, auf die CaCo2- Zelllinie zu überprüfen.

Hierzu wurde die Zytotoxizität der Substanz mittels EZ4U-Assay analysiert. Dabei konnte die Auswirkung der verschiedenen Konzentrationen der Substanz nachgewiesen werden. Nach 72, 48, 24 und 12 Stunden Kontakt der Substanz mit den CaCo2- Zellen wurde die Auswirkung der Zytotoxizität der Substanz mittels EZ4U-Assay analysiert.

Die Vitalität der Zellen wurde photometrisch erfasst.

Abschließend wurden Western Blot Experimente durchgeführt, um herauszufinden, ob nach der Behandlung mit der Substanz BUM97 die Apoptose-Proteine erhöht exprimiert wurden.

Abstract

In-vitro cytotoxicity tests of new active substances gain ever more importance. One of the most important reasons is that they constitute an alternative to animal testing.

A cytotoxicity test is the first trial in the context of a biocompatibility assessment of new substances, and yields a result within a few days without animal testing.

The objective of this work was to examine the cytotoxicity potential of the substance BUM97, a Bumetanid derivate on the CaCo2 cell line. For this purpose, the cytotoxicity of the substance was analysed with the aid of EZ4U-Assay. This experimentally verified the effect of various concentrations of the substance.

After 72, 48, 24, and 12 hours of contacting the substance with the CaCo 2 cells, the effect of the cytotoxicity of the substance was analysed using EZ4U-Assay.

The vitality of the cells was recorded photometrically.

Finally, Western Blot Experiments were performed to find out if, after the treatment with the substance BUM97, the apoptosis proteins were expressed at a higher level.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Strukturformel von Bumetanid (ChemIDplus NIH 2020).

Abbildung 2: Schema des Elektrolyttransportes im dicken, aufsteigenden Ast der Henle-Schleife (Aktories, et al. 2017).

Abbildung 3: Die Morphologie der Apoptose (Müller-Esterl, 2011).

Abbildung 4: Die Fas-vermittelte Apoptose (Müller-Esterl, 2011).

Abbildung 5: Die p53-vermittelte Apoptose (Müller-Esterl, 2011).

Abbildung 6: Strukturformel von BUM97.

Abbildung 7: Caco2-Zellen unter dem Lichtmikroskop.

Abbildung 8: „Neubauer improved“ Zählkammer (LO Laboroptik, 2020).

Abbildung 9: Aufbau einer Zählkammer (Schmitz, 2011).

Abbildung 10: Farbreaktion von MTT zu Formazan (Yunbao, Muraleedharan, 2010).

Abbildung 11: 96-well Mikrotiterplatte nach Behandlung mit EZ4U Testlösung.

Abbildung 12: Prinzip des Western Blots (Gomes, et al. 2017).

Abbildung 13: Ultraschallsonde, Bandelin electronic.

Abbildung 14: Prinzip des Bradford-Essays (Thermo Fisher Scientific, 2020).

Abbildung 15: Nitrocellulosemembran-Sandwich (the cardio research web project, 2020).

Abbildung 16: Bio-Rad Trans-Blot Turbo

Abbildung 17: Das Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System.

Abbildung 18: Das Ergebnis EZ4U Assay nach 72 Stunden.

Abbildung 19: Das Ergebnis EZ4U Assay nach 48 Stunden.

Abbildung 20: Abbildung: Das Ergebnis EZ4U Assay nach 24 Stunden.

Abbildung 21: Das Ergebnis EZ4U Assay nach 12 Stunden.

Abbildung 22: Western Blot Analyse der behandelten und unbehandelten CaCo2-Zellen.

Abbildung 23: Western Blot Analyse, Tubulin als Ladekontrolle.

Tabellen

Tabelle 1: Zusammensetzung des 4X Probenpuffers.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Trenngeles.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Sammelgeles.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Puffer für die Elektrophorese und das Semidry-Blotting.

Tabelle 5: Primäre Antikörper, die für die Western Blot Analyse verwendet wurden.

Tabelle 6: Reagenzien für das Immunoblotting.

Literaturverzeichnis

Abrams, J M.; Alnemri, E S.; Baehrecke, E H.; Blagosklonny, M V.; Dawson, V L.; Dawson, T M.; El-Deiry, W S.; Fulda, S.; Galluzzi, L.; Vitale, I; et al. 2012. *Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. doi:10.1038/s41418-017-0012-4

Aktories, Klaus; Förstermann, Ulrich; Hofmann Franz; Starke Klaus. 2017. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 12. Auflage, Deutschland: Elsevier Verlag.

Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. 2002. *Programmed Cell Death (Apoptosis)*.

Anderson, S.; Brater, DC.; Burdette, A.; Day, B. 1984. *Bumetanide and furosemide in heart failure*. doi:10.1038/ki.1984.153

Asberg, J.; Ben-Ari, Y.; Gillberg, C.; Hadjikhani, N.; Hippolyte, L.; Lassalle, A.; Lemonnier, E.; Zürcher, N. 2018. *Bumetanide for autism: more eye contact, less amygdala activation*. doi:10.1038/s41598-018-21958-x

Ben-Ari, Y.; Brosset, P.; Bernoux, D.; Lemonnier, E.; Rondeau S.; Rosier, A.; Roue M.; Ravel D.; Serret, S.; Sonie S.; Thummler S.; Viellard, M.; Villeneuve, N. 2017. *Effects of bumetanide on neurobehavioral function in children and adolescents with autism spectrum disorders*. doi:10.1038/tp.2017.10

Biomedica. EZ4U – Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay | BI-5000. <https://www.bmgrp.com/product/cell-proliferation/ez4u-cell-proliferation-assay-and-cytotoxicity-test-biomedica/> (Zugegriffen: 20.09.20).

Busch, Jörg Hans. 1972. *Apoptosemarker in Kardiomyozyten; Eine immunhistochemische Studie an Myokardbiopsien von Patienten mit Enterovirus-assoziiierter dilatativer Kardiomyopathie*. Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Diagnosia. <https://premium.diagnosia.com/index/drug/53a6b36776bfd070665d72e30a4595c3.pdf> (Zugegriffen: 20.09.20).

Drag, Marcin; Groborz, Katarzyna; Marcin Poreba, Marcin; Navarro, Mario; Salvesen, Guy S.; Snipas, Scott J. 2019. *Caspase selective reagents for diagnosing apoptotic mechanisms*. doi: 10.1038/s41418-018-0110-y

Ellison, David; Felker, G.Michael. 2018. *Diuretic Treatment in Heart Failure--from Physiology to Clinical Trials*. doi:10.1056/NEJMr1703100

Gomes, Aldrin V.; Mishra Manish; Tiwari Shuchita. 2019. *Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques*. doi:10.1080/14789450.2017.1388167

Green, R Douglas; Llambi Fabien. 2015. *Cell Death Signaling*. doi:10.1101/cshperspect.a006080

Kilb, W.; Luhmann, H J.; Sinning, A. 2007. *Model-specific effects of bumetanide on epileptiform activity in the in-vitro intact hippocampus of the newborn mouse*. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.06.015

Labor Optik. Zählkammer Neubauer-Improved. <http://zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html> (Zugegriffen: 20.09.20).

Lea Tor. 2015. *Caco-2 Cell Line*. doi:10.1007/978-3-319-16104-4_10

Müller-Esterl, Werner. 2011. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 2. Auflage, Frankfurt: Spektrum Akademischer Verlag.

Nowakowski, Andrew B.; Petering, David H.; Wobig, William J. 2015. *Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions*. doi:10.1039/c4mt00033a

Porter, Alan G.; Jänicke, Reiner U.; 1999. *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*. doi:10.1038/sj.cdd.4400476

Research Gate. Aufbau eines Zählkreuzes. https://www.researchgate.net/figure/Abbildung-46-Aufbau-eines-Zaehlkreuzes-Schmitz-2011-Dargestellt-ist-eines-der-vier_fig1_328653877 (Zugegriffen: 20.09.20).

Sidhu, Gursharan; Puckett, Yana. 2020. *Bumetanide*.

The Cardio Research Web Project. Western blot. <http://www.cardio-research.com/protocols/western-blot> (Zugegriffen: 20.09.20).

Thermo Fisher Scientific. Bradford Assay. https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bradford-assays.html?gclid=EAIaIQobChMIIsuxnIGT6wIVBc13Ch1naQR6EAAYASAAEgK_iPD_BwE&ef_id=EAIaIQobChMIIsuxnIGT6wIVBc13Ch1naQR6EAAYASAAEgK_iPD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!436793335112!e!!g!!bradford%20assay&cid=bid_pca_sbu_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con (Zugegriffen: 20.09.20).

U.S.National Library of Medicine. ChemIDplus. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/28395-03-1> (Zugegriffen: 20.09.20).

Volodymyr, Dzhalal; Staley, Kevin J. 2015. *Acute and chronic efficacy of bumetanide in an in vitro model of posttraumatic epileptogenesis*. doi:10.1111/cns.12369

Yunbao Liu; Muraleedharan G. Nair. 2010. *An Efficient and Economical MTT Assay for Determining the Antioxidant Activity of Plant Natural Product Extracts and Pure Compounds*. doi:10.1021/np1000945