

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Nachweis der Chemikalien, Biochemikalien und Reaktionskits

- ALEXIS Deutschland GmbH, Grünberg: AG490, PD95059, SB202190,
- Amgen, München: G-CSF (Neupogen 30®),
- Baker Analyzed Reagent, Phillipsburg, USA: Chloroform,
- Biochrom KG, Berlin: FCS, Ficoll (Seromed®), Gentamycin, Percoll (Seromed®), RPMI 1640, Trypsin-EDTA,
- BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin: Primer,
- Boehringer Ingelheim, Ingelheim: Interferon- γ (Imukin®)
- Chiron Corporation, Emeryville, USA: IL2 (Proleukin®),
- DRK Blutspendedienst, Berlin: Humanalbumin,
- GIBCO BRL, Life Technologies, Eggenstein: Agarose, IMDM, DNA-Leiter, TRIzol® (monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat), Typanblau,
- HAEMONETICS CO., Massachusetts, USA: ACD-A,
- HYBAID-AGS, Heidelberg: Restriktionskit,
- JANSSEN-CILAG, Neuss: EPO (ERYPO®),
- Lidl, Neckarsulm: Pflanzliches Öl (Golden Sun®),
- Merck, Darmstadt: Borsäure, DMSO, Ethanol, HCl, Isopropanol, NaCl, NaOH, Trisbase, TÜRKIS-Lösung,
- Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach: Antikörper, Magnetseparation (MACS MicroBeads CD3, CD4, CD14, CD19, CD34, CD45RO und CD56),
- PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich: PBS,
- QIAGEN GmbH, Hilden: Oligotex Kit (Oligotex®),
- Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim: RT-PCR Kit (Titan® One Tube RT-PCR System),
- Roche Molecular Biochemicals, Mannheim: Interferon- α (Roferon-A3®),
- SERVA FEINBIOCHEMIKA, Heidelberg: Bromphenolblau, Ethidiumbromid,
- SIGMA CHEMICAL CO., St.Louis, USA: BSA,
- SIGMA, Taufkirchen: ATRA, DEPC, EDTA, Kaliumacetat, Mineralöl, pH-Standardlösung,

- Stemcells Technologies Inc., Vancouver, Kanada: Methocult, Myelocult.

3.1.2 Puffer und Medien

- Einfriermedium 1: RPMI1640; 40 % FCS; 100 U/ml Gentamycin.
- Einfriermedium 2: RPMI1640; 20 % DMSO; 100 U/ml Gentamycin.
- Ladepuffer, DNA-Elektrophorese: Aqua dest.; 0,25 % Bromphenolblau; 15 % Ficoll 400.
- Puffer, Magnetseparation: PBS; 0,5 % BSA; 0,6 % ACD-A; entgast; gefiltert (Mikrofilter).
- Puffer, 5xTBE, pH 8,2-8,4: 1l Aqua bidest.; 54 g Trisbase; 27,5 g Borsäure; 4,65 g EDTA.
- Puffer, Bindingbuffer, mRNA-Isolation: 20 mM TrisCl, pH 7,5; 1M NaCl; 2 mM EDTA; 0,2 % SDS.

3.1.3 Lösung und Konzentrationen der eingesetzten Wirkstoffe

| Substanz | Gelöst in | Konzentration in der Kultur |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------|
| G-CSF (Neupogen 30®, Amgen, München) | H ₂ O | 100 ng/ml (Querol et al., 1999) |
| EPO (ERYPO®, JANSSEN-CILAG, Neuss) | H ₂ O | 5 U/ml (Rice et al., 1999) |
| IL2 (Proleukin®, Chiron Corporation, Emeryville, USA) | H ₂ O | 1000 U/ml (Dilloo et al., 1995) |
| IFNα (Roferon-A3®, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) | H ₂ O | 1000 U/ml (Geissler, 1990) |
| IFNγ (Imukin®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim) | H ₂ O | 20 ng/ml (Seliger et al., 1991) |
| ATRA (SIGMA, Taufkirchen) | Pflanzl. Öl | 1 μ M (Matikainen et al., 1996) |
| PD95059 (ALEXIS Deutschland GmbH, Grünberg) | DMSO | 50 μ M (Osborn et al., 1999) |
| SB202190 (ALEXIS Deutschland GmbH, Grünberg) | DMSO | 5 μ M (Osborn et al., 1999) |
| AG490 (ALEXIS Deutschland GmbH, Grünberg) | DMSO | 25 μ M (Nielsen et al., 1997) |

Tabelle 3-1: Aufstellung der in den Experimenten zur Beeinflussung der Tumorsuppressorgenexpression eingesetzten Wirkstoffe, ihrer Lösungsmittel und Konzentrationen in der Zellkultur.

Die Stammlösungen der Testsubstanzen wurden im Verhältnis 1:1000 dem Kulturmedium zugesetzt. Falls sie in etwas anderem als destilliertem Wasser gelöst waren, wurde der Kontrollprobe das Lösungsmittel zugesetzt. ATRA (SIGMA, Taufkirchen) wurde dem Labor als lipophiles Pulver geliefert. Weder die vom Hersteller empfohlene Lösung in DMSO, noch die Lösung in Ethanol war möglich, wenn die aus der Literatur bekannten Konzentrationen in Kultur verwendet werden sollten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde handelsübliches pflanzliches Öl (Golden Sun, Lidl, Neckarsulm) benutzt, das zuvor für 10 min auf 90 °C erhitzt wurde. Vor Zusatz zu der Kultur wurde eine Emulsion mit Kulturmedium hergestellt.

3.1.4 Primäres menschliches Material

Die eingesetzten Zellen entstammten Blutentnahmen und Knochenmarkspunktionen, die in der hämatologischen und transfusionsmedizinischen Abteilung der Charité; Berlin, durchgeführt wurden. Weiterhin wurden Zellen aus der kryokonservierten Probensammlung des KMT-Labors der Charité, Berlin, verwendet. Das Blutspendezentrum Marzahn stellte freundlicherweise Buffycoat gesunder Blutspender zur Verfügung.

3.1.5 Zelllinien

Die verwendeten und im Folgenden aufgelisteten menschlichen Zelllinien wurden freundlicherweise von Herrn Dr. B. Flath, Charité, Berlin, zur Verfügung gestellt:

- CEM: Akute T-Zelleukämie (Foley et al., 1965),
- Jurkat: Akute T-Zelleukämie (Schneider et al., 1977),
- HL60: Akute myeloische Leukämie M2 (Collins et al., 1977),
- U937: Histiocytäres Lymphom mit monozytären Eigenschaften (Sundström et al., 1976). Die Linie wird als Modell für eine monoblastische Leukämie genutzt (Dimberg et al., 2000),
- K562: Chronisch-myeloische Leukämie im Blastenschub (Lozzio et al., 1973).

3.2 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter Beachtung der üblichen keimarmen Bedingungen durchgeführt. Arbeitsplätze und Brutschränke (MCO-17AI, SANYO Electric CO., Ltd., München) wurden regelmäßig gereinigt und desinfiziert, die Arbeitsbänke (Herasafe, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) darüber hinaus UV-bestrahlt (Transilluminator T11, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen). Es wurden nur steril gelieferte beziehungsweise autoklavierte Materialien verwendet.

Leukozyten wurden zur Zählung in TÜRKS-Lösung (Merck, Darmstadt) 1:10 suspendiert. In Abhängigkeit von der verfügbaren Zellzahl wurde auch ungefärbt gezählt. Dazu wurde die Neubauer Zählkammer (Neubauer, Bad Blankenburg) verwendet. Vitalitätsbestimmungen wurden routinemäßig mit Trypanblau (GIBCO BRL, Life Technologies, Eggenstein) durchgeführt.

3.2.1 Isolation mononukleärer Zellen

Mononukleäre Zellen (MNC) wurden aus Venenblut, Buffycoat und Knochenmark isoliert. Die Trennung erfolgte nach der Dichtegradientenmethode. Es wurden dafür 50 ml Röhrchen mit einer eingesetzten Filterscheibe in Höhe der 15 ml Markierung verwendet (LeucoSep®, Greiner GmbH, Frickenhausen). Um den zur Trennung nötigen Dichtegradienten zu erzeugen, wurde bei Vollblut und Buffycoat Ficollösung (Biochrom KG, Berlin) mit der Dichte 1,077 kg/l benutzt, bei Knochenmark Percoll (Biochrom KG, Berlin) mit der Dichte 1,077 kg/l. Von der Lösung wurden 15 ml in ein Röhrchen gegeben (Pipetus-akku, Glasgerätebau Hirschmann, Eberstadt) und unter die Filterscheibe zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments GmbH, Hanau). Anschließend wurden jeweils 15-30 ml des Ausgangsmaterials darüber pipettiert, heparinisertes Vollblut unverdünnt, Buffycoat und Knochenmark mit PBS (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) 1:4 verdünnt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 1000 g bildete sich eine spezifische Schichtenfolge (von oben nach unten): Plasma - MNC - Trennlösung - Filterscheibe - Trennlösung - Granulozyten mit Erythrozyten. Die Fraktion über der Filterscheibe mit der Schicht der MNC wurde in 50 ml Waschröhrchen (Falcon, Becton Dickinson Labware, USA) dekantiert und nach Zusatz von ca. 5 ml PBS 10 min bei 250 g zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Zellen gezählt und der Waschschrift mit 10 ml PBS zweimal wiederholt.

3.2.2 Einfrieren, Lagern und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen nach der Separation mit dem Einfriermedium 1 resuspendiert und jeweils 1 ml in 2 ml Kryoröhrchen (Greiner GmbH, Frickenhausen) pipettiert. Das Einfriermedium 1 bestand aus RPMI1640 (Biochrom KG, Berlin), 100 U/ml Gentamycin (Biochrom KG, Berlin) und 45 % FCS (Biochrom KG, Berlin). Pro Röhrchen wurden maximal $5 \cdot 10^7$ Zellen verwendet. Das Einfriermedium 2, das nun zugegeben wurde, enthielt RPMI1640, 100 U/ml Gentamycin und 20 % DMSO (Merck, Darmstadt). Die Proben wurden aus der Raumtemperatur in ca. 30 cm X 30 cm X 30 cm Styroporboxen gesetzt, über Nacht bei -80°C (HFU 586 STD-V14, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) gelagert und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden 50 ml Röhrchen mit 10 ml RPMI1640, 20 % FCS vorbereitet, in die der Inhalt der Kryoröhrchen, sofort nach dem Antauen im 37°C Wasserbad (Schüttelwasserbad 1083, GFL, Burgwallstadt), dekantiert wurde, um toxische Effekte des DMSO zu minimieren. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 200 g wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Mit Zellen aus der Transfusionsmedizin, die in Kryobeuteln eingefroren waren, wurde ebenso verfahren. Vitalitätstests und das Verhalten der Zellen, etwa in Kultur, zeigten eine gute Toleranz der Prozedur.

3.2.3 Separation von Subpopulationen

Blutzellpopulationen wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen CD-Molekülexpression separiert (siehe Abschnitt 1.1.2). Dazu wurde das "MiniMACS®"-System und magnetische, CD-spezifische Antikörper benutzt (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach). Frische Zellen wurden bevorzugt verwendet, da insbesondere bei CD34-Anreicherung schlechte Erfahrungen mit zuvor eingefrorenen Zellen gemacht wurden. Die gewaschenen Zellen wurden zunächst in 300 μl Separationspuffer resuspendiert (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg), der zuvor entgast und steril gefiltert (Bottle Top Filter 0.22 μm , Falcon, Becton Dickinson Labware, USA) worden war. Er bestand aus PBS mit 0,5 % BSA (SIGMA CHEMICAL CO., St.Louis, USA) und 0,6 % ACD-A (ACD-A, HAEMONETICS CO., Massachusetts, USA). Den Zellsuspensionen wurden zuerst 100 μl des mitgelieferten humanen IgG zugegeben, um die Fc-Rezeptoren der Zellen zu sättigen und unspezifische Bindungen zu minimieren. Dann wurden 100 μl der CD-spezifischen Magnetantikörper (MACS MicroBeads CD3, CD4, CD14, CD19, CD34, CD45RO und CD56, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) dazupipettiert und die Proben

für 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden sie mit 9 ml Separationspuffer gewaschen, bei 200 g 5 min zentrifugiert, mit 1 ml des Puffers resuspendiert, mittels Nylonfilter (35 µm Cell Strainer, Falcon, Becton Dickinson Labware, USA) von Klumpen befreit und auf die im Kit enthaltenen Säulen (MACS, separation Columns, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) gegeben. Die Säulen wurden zuvor in einen Magneten gespannt und mit 500 µl Separationspuffer ein Vorlauf durchgeführt. Nach Durchlauf der Zellsuspension wurden dreimal 500 µl Separationspuffer zum Waschen der Säulen zugegeben. Die in der Säule durch die Magnetantikörper gebundenen Zellen wurden gelöst, indem die Säulen aus dem Magneten genommen und anschließend mit 1 ml Separationspuffer gespült wurden.

FACS-Analysen, die bei Einführung der Methode durchgeführt wurden, bestätigten die gewünschte Anreicherung der separierten Zellpopulationen. Diese Analysen wurden mit freundlicher Unterstützung des FACS-Labors der hämatologischen Abteilung der Charité, Berlin, nach dortigem Standard durchgeführt.

Einmalig wurde ein Experiment mit aufgereinigten CD4⁺/CD45RA⁻, CD4⁺/CD45RO⁺, CD19⁺/CD27⁺ und CD19⁺/CD27⁻-Zellen durchgeführt. Die Gewinnung dieser Subpopulationen erfolgte mit freundlicher Unterstützung des Deutschen Rheumaforschungszentrum, Berlin, nach dortigen Standards. Zunächst erfolgte die Separation von CD4⁺ und CD19⁺-Zellen aus MNC mittels der beschriebenen Magnetseparationstechnik. Nach Lösung der Magnetantikörper (MACS MultiSort, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) erfolgte eine Fluoreszenzmarkierung der Zellen mit den genannten Zweitantikörpern und ihre Separation im FACS.

3.2.4 Kurzzeitkultur von MNC und deren Subpopulationen

Alle Kulturen wurden bei einer 5 % CO₂-Atmosphäre und 37 °C durchgeführt. Als Kulturgefäße wurden Platten und Flaschen unterschiedlicher Größe verwendet (Falcon, Becton Dickinson Labware, USA). Das den Medien zugesetzte FCS wurde vor Verwendung durch 30 minütiges Erhitzen auf 56 °C inaktiviert.

Um die Beeinflussbarkeit der Genexpression bei ausgewählten Zellpopulationen zu untersuchen, wurden Kurzzeitkulturversuche mit folgendem Standard entwickelt:

CD34⁺-Zellen wurden nach ihrer Separation in IMDM (GIBCO BRL, Life Technologies, Eggenstein) mit 10 % FCS kultiviert und in der Konzentration von 10⁵ Zellen/ml in passende Kulturschalen gegeben. Nach etwa 14 Stunden wurden die verschiedenen Testsubstanzen (siehe

Abschnitt 1.2.3) zugesetzt und eine Kontrolle ohne Zusatz weitergeführt. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellsuspensionen entnommen und die Vitalität und Zellzahlen bestimmt. Dann wurden sie bei 200 g für 5 min zentrifugiert und das Medium dekantiert. Die verbleibenden Zellpellets wurden nun mit TRIzol (GIBCO BRL, Life Technologies, Eggenstein) lysiert (Querol et al., 1999).

Bei der Kultur von separierten CD3⁺-, CD19⁺- und CD14⁺-Zellen wurde entsprechend verfahren, mit dem Unterschied, dass RPMI1640 (Biochrom KG, Berlin) mit 10 % FCS und 100 U/ml Gentamycin anstatt IMDM mit 10 % FCS als Medium verwendet wurde und die Zellkonzentration bei 3-5x10⁵ Zellen/ml lag.

Weiterhin wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die MNC aus Buffycoat in hoher Zellkonzentration kultiviert wurden und erst nach Inkubation Subpopulationen separiert wurden. Die Zellkonzentration betrug 3x10⁶ Zellen/ml. Als Medium wurde RPMI1640 mit 10 % FCS und 100 U/ml Gentamycin verwendet. Die Testsubstanzen wurden wie oben beschrieben zugesetzt. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen erst separiert und danach lysiert. In den Versuchen wurden CD3⁺- und CD19⁺-Zellen angereichert und die nach der Kulturzeit von etwa 38 Stunden adhärent wachsenden Zellen verwendet. Letztere wurden zur Lösung mit 0,05 % Trypsin (Biochrom KG, Berlin) und 0,02 % EDTA (Biochrom KG, Berlin) versetzt. Sobald die Zellen sich lösten, wurde die Trypsinreaktion mit dem Kulturmedium gestoppt, gezählt, die Suspension zentrifugiert und danach die Zellen lysiert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit RNA wurden, falls nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt. Die üblichen Vorkehrungen zur Vermeidung von RNase-Kontamination wurden getroffen. Es wurden nur sterilisierte und RNase-frei gelieferte beziehungsweise autoklavierte Materialien verwendet. Destilliertes Wasser zur Lösung von RNA wurde mit DEPC (SIGMA, Taufkirchen) behandelt. DNA wurde bei 4 °C gelagert, RNA bei – 80 °C.

3.3.1 Gewinnung von totaler zellulärer RNA

RNA wurde mit Hilfe von TRIzol (GIBCO BRL, Life Technologies, Eggenstein) gewonnen, einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat zur Isolierung von totaler zellulärer RNA. Die Präparation wurde in autoklavierten 2 ml- Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Zur Lyse wurde für je 10^7 suspendierte Zellen 1 ml TRIzol verwendet, bei einlagigem Zellrasen in Kulturschale für je 10 cm^2 1 ml TRIzol. Das Gemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf 1 ml TRIzol und wurden bei abweichender Menge entsprechend angepasst. Die Separation der Phasen wurde durch kräftiges Mischen mit 0,2 ml Chloroform (Baker Analyzed Reagent, Phillipsburg, USA), anschließender 3 minütiger Inkubation und 15 minütiger Zentrifugation bei 11000 g (Biofuge 15, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) erreicht. Die obere wässrige Phase wurde nach Überführung in ein neues Gefäß mit 0,5 ml Isopropanol (Merck, Darmstadt) versetzt und dann zur Fällung der RNA 10 min inkubiert. Um den Überstand abpipettieren zu können, wurde die gefällte RNA für 15 min bei 11000 g auf den Boden des Gefäßes zentrifugiert. Nachdem das Pellet zum Waschen mit 1 ml Ethanol 75 % (Merck, Darmstadt) resuspendiert und für 8 min bei 8400 g zentrifugiert worden war, wurden die Proben bei 50-60 °C auf der Heizplatte (MR 3001 K, Heidolph, Deutschland) getrocknet und anschließend in 250 µl DEPC-Wasser gelöst. Dazu wurden sie für 5 min auf 50-60 °C erhitzt, um eine vollständige Lösung der RNA zu gewährleisten.

3.3.2 Gewinnung von mRNA

Polyadenylierte mRNA wurde unter Verwendung des „Oligotex“-Isolationskits (QIAGEN GmbH, Hilden) aus der zuvor präparierten totalen RNA gewonnen. Das Prinzip beruht auf der Haftung der mRNA an speziellen Partikeln, Reinigung und anschließenden Lösung von den Partikeln. Diese kugelförmigen Partikel bestehen aus Polystyren-Latex, haben einen Durchmesser von 1,1 µm und auf ihrer Oberfläche dC₁₀T₃₀ kovalent gebunden (Oligotex,

QIAGEN GmbH, Hilden). Zur Bindung der mRNA wurden 250 µl RNA-Lösung, 250 µl Bindungspuffer (QIAGEN GmbH, Hilden (20 mM TrisCl, pH 7,5; 1 M NaCl; 2 mM EDTA; 0,2 % SDS)) und 15 µl Partikelsuspension zugesetzt, die zuvor auf 37 °C erhitzt worden waren. Diese Reaktionssuspension wurde 3 min bei 70 °C und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei 15000 g für 2 min wurde der Überstand abgesaugt, die Partikel mit 400 µl Waschpuffer (QIAGEN GmbH, Hilden) resuspendiert und in die Säulenröhrchen (QIAGEN GmbH, Hilden) des Kits übertragen, die einen für die Partikel undurchlässigen Filter enthielten. Die Röhrchen wurden bei 15000 g für ca. 30 s zentrifugiert, der Durchlauf verworfen. Danach wurden noch einmal 400 µl Waschpuffer aufgetragen und durch den Filter zentrifugiert. Zuletzt wurden zweimal 25-100 µl des auf 70 °C erhitzten Elutionspuffers auf die Filter gegeben und zentrifugiert. Die Menge des Puffers und damit des Eluats wurde entsprechend der gewünschten Konzentration an mRNA gewählt. Ausgegangen wurde dabei von der Zahl der eingesetzten Zellen, so dass sich Konzentrationsangaben nach dem Schema Zahl der Zellen/µl ergaben. Die nachfolgende RT-PCR mit GAPDH-Primern zeigte die Zuverlässigkeit dieser Konzentrationsbestimmung. Durch Photometermessungen zur RNA-Konzentrationsbestimmung im Rahmen von Northernblot-Experimenten wurde die Konstanz der RNA-Ausbeute bei dieser Methode bestätigt (Teutsch, 2003).

3.3.3 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Das verwendete Verfahren ermöglichte die reverse Transkription und die Polymerasekettenreaktion in einem Ansatz. Der benutzte "Titan® One Tube RT-PCR"-Kit (Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) enthielt alle benötigten Komponenten bis auf DEPC-H₂O, DMSO und Mineralöl (SIGMA, Taufkirchen). Gearbeitet wurde mit Reaktionsgesamtvolumen von 50 µl in einzelnen 0,2 ml-Röhrchen (Multi Ultra Tubes, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt).

Zunächst wurde ein Ansatz pipettiert, der mRNA, DEPC-H₂O und Primer (BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin) des zu untersuchenden Gens enthielt (Tabelle 3-2). Dieser erste Ansatz wurde geschlossen für 10 min auf 95 °C (UNO-Thermoblock, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) erhitzt, anschließend im Eisfach (-18 °C) abgekühlt und dann bei max. 800 g kurz zentrifugiert, um Kondenswasser aus dem Deckel zu entfernen. Das Erhitzen sollte Sekundärstrukturen der RNA auflösen. Währenddessen wurde der zweite Ansatz mit RT-PCR-Puffer, MgCl₂, DTT, DNTPs, RNase-Inhibitor und der Enzymmischung vorbereitet. Die beiden Ansätze wurden vereinigt und eine Schicht Mineralöl darüber gelegt (Tabelle 3-2). Danach

wurde die Reaktion im Thermocycler (UNO-Thermoblock, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) gestartet (Tabelle 3-4).

Bei jeder RT-PCR wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die alle Reaktionskomponenten enthielt. Außerdem wurden immer Positivkontrollen durchgeführt. Hierzu wurde mRNA aus Fibroblasten und CEM-Zellen verwendet, in denen die Gene H-rev107.1 und H-rev107.2 exprimiert waren. Die Länge der Amplifikationsprodukte (Tabelle 3-2) wurde bei jeder Elektrophorese mit Hilfe einer DNA-Leiter überprüft. Bei der Entwicklung der Versuchstandards wurden gereinigte Amplifikationsprodukte mit Restriktionsverdau überprüft und Proben jedes Gens zur Sequenzanalyse gegeben, die ihre jeweilige Spezifität bestätigte. Um eine semiquantitative Vergleichbarkeit der Expression zu ermöglichen wurde immer eine RT-PCR des Houskeeping-Gens GAPDH durchgeführt (Bustin, 2000).

GAPDH-Primer:

fw 5'-GGGGCGATGCTGGCGCTGAGT; rev 5'-GGGGACACGGAAGGCCATGCC;

Annealing-Temperatur: 70 °C; PCR-Produkt: 451 bp

H-rev107.1-Primer:

fw 5'-CTACGCAGCGAAATCGAGCC; rev 5'-GTCATCGCTGACAGACAGTC;

Annealing-Temperatur: 56 °C; PCR-Produkt: 566 bp

H-rev107.2-Primer:

fw 5'-GAGATGGCTTCGCCACACC; rev 5'-CAGTCTTGTTTCAATTAGATC;

Annealing-Temperatur: 56 °C; PCR-Produkt: 669 bp

Tabelle 3-2: Darstellung der Gene mit den verwendeten Primersequenzen, den jeweiligen Annealing-Temperaturen und der Länge der PCR-Produkte. Alle Primer wurden von der BioTeZ Berlin-Buch GmbH bezogen.

| Komponente: | Konzentration: | Menge: |
|----------------------------|--------------------------------|---------------|
| Primer fw | 0,5 μ M | 2,5 μ l |
| Primer rev | 0,5 μ M | 2,5 μ l |
| RNA | Nach gewünschter Zellzahl | variabel |
| DEPC-H₂O | | variabel |
| DNTPs | 500 μ M | 2,5 μ l |
| MgCl₂ | 3 mM | 3 μ l |
| DTT | 5 mM | 2,5 μ l |
| RNase-Inhibitor | 4 U | 0,1 μ l |
| RT-PCR-Puffer | 1x | 10 μ l |
| Enzymmischung | Vom Hersteller nicht angegeben | 0,5 μ l |
| Gesamtmenge: | | 50 μ l |
| Mineralöl | | 50 μ l |

Tabelle 3-3: Gesamtdarstellung des Reaktionsansatzes der RT-PCR, zum praktischen Vorgehen, siehe Lauftext.

| | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Schritt 1 | 45 °C, 30 min => Reverse Transkription |
| Schritt 2 | 94 °C, 2 min |
| Schritt 3 | 94 °C, 40 s |
| Schritt 4 | 56 °C bzw. 70°C; Annealing-Temperatur (siehe Primer), 30 s |
| Schritt 5 | 68 °C, 90 s, Aufschlag/Zyklus 2 s |
| Schritt 6 | 32 Schleifen der Schritte 3 bis 5 (Schritte der Polymerasekettenreaktion) |
| Schritt 7 | 68 °C, 10 min |

Tabelle 3-4: Schritte des Thermocyclers, mit den jeweiligen Temperaturen und Zeiten der RT-PCR.

3.3.4 Elektrophorese

Es wurden 1 % Agarosegele (GIBCO BRL, Life Technologies, Eggenstein) mit TBE (1l Aqua bidest.; 54 g Trisbase (Merck, Darmstadt); 27,5 g Borsäure (Merck, Darmstadt); 4,65 g EDTA) als Puffer verwendet. Den Gelen wurde Ethidiumbromid (SERVA FEINBIOCHEMIKA, Heidelberg) zugesetzt, um die DNA unter UV-Beleuchtung sichtbar zu machen. Die verwendeten Kammern (Electrophoresis Power Supply EPS200, Pharmacia Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) und Schlitten erforderten eine Menge von 37,4 ml des Gels; entsprechend wurde 1 µl Ethidiumbromid benutzt. Es wurden Käme mit Zahnmaßen von 1 mm X 3 mm verwendet. Beladen wurden die nach der Aushärtung entstandenen Kammern mit entsprechenden Mengen eines Gemisches von DNA aus RT-PCR und Ladepuffer (Aqua dest.; 0,25 % Bromphenolblau(SERVA FEINBIOCHEMIKA, Heidelberg); 15 % Ficoll 400), 2 µl Ladepuffer auf 5 µl DNA. Von der DNA-Leiter (GIBCO BRL, Life Technologies, Eggenstein) zur Überprüfung der RT-PCR-Produktlänge (Tabelle 3-2) wurden 0,3 µg pro Spur eingesetzt. Zur Elektrophorese wurde eine Spannung von 65 V über 90 min angelegt. Die Gele wurden UV-beleuchtet, um die DNA sichtbar zu machen, und fotografiert (Polaroid MP 14+, Polaroid, Cambridge, MA, USA; Instant pack Film 8,5x10,8cm, Polaroid, Offenbach).

3.3.5 Reinigung von RT-PCR-Produkten

RT-PCR-Produkte wurden aufgereinigt, indem man ihre spezifische Bande nach der Elektrophorese aus dem Gel schnitt. Das Gelstück mit der Bande wurde tiefgekühlt und dann ausgedrückt. Die Flüssigkeit mit dem RT-PCR-Produkt wurde mit DEPC-Wasser auf 250 µl aufgefüllt und anschließend 1/10 des Volumens Kaliumacetat (SIGMA, Taufkirchen) zugegeben. Zum Ausfällen wurde Isopropanol in mindestens 2,5-facher Menge verwendet. Nach Zentrifugation über 30 min bei 9000 g und Absaugen des Isopropanols wurde das DNA-Pellet nochmals mit Ethanol 75 % gewaschen und anschließend getrocknet.

3.3.6 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau diente der Herstellung von Bruchstücken der amplifizierten Genabschnitte mit spezifischer Länge. Das getrocknete DNA-Material wurde in 20 µl DEPC-Wasser gelöst und 15,5 µl davon mit 0,5 µl Restriktionsenzym (HYBAID-AGS, Heidelberg) und 4 µl Puffer (HYBAID-AGS, Heidelberg) versehen. Das Gemisch wurde 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Analyse wurde eine Elektrophorese durchgeführt.

3.3.7 Darstellung der RT-PCR-Ergebnisse

Bei den Ergebnis-Tabellen im anschließenden Kapitel wird folgender Symbolschlüssel verwendet:

- Negativ: -
- Positiv: +
- Stark positiv: ++

Dargestellt werden die Ergebnisse darüber hinaus durch Ausschnitte von Fotos, die zur Dokumentation im Labor gemacht wurden. Die Polaroidfotos wurden in 300 dpi Qualität eingescannt. Die wiedergegebenen Ausschnitte sind als negativ in Originalgröße abgebildet und als Ausschnitte erkennbar.