

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewebe

2.1.1.1 Gefriermaterial

Für die Einzelzellanalyse wurden fünf Fälle des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) ausgewählt. Dabei stammte ein Fall aus dem Archiv des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Benjamin Franklin, vier Fälle wurden freundlicherweise von Prof. P. Möller (Pathologie, Universität Ulm) zur Verfügung gestellt. Die Diagnose eines cHL wurde aufgrund der Kriterien der WHO-Klassifikation von Prof. H. Stein und Prof. Dr. I. Anagnostopoulos bestätigt.

2.1.1.2 Paraffinmaterial, Gewebearrays

Die immunhistologische Untersuchungen mit den Antikörpern gegen *E2F-1*, *Cyclin E*, *Rb*, *p27*, *p21*, *Cyclin D1*, *p53* und *ATM* wurden an Gewebearrays durchgeführt. Die Hodgkin-Gewebeproben für diese Arrays stammten aus dem Archiv des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Benjamin Franklin. Gewebezyylinder aus dem Paraffingewebe dieser primären Tumorblöcke wurde mit Hilfe der Stanztechnik freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Joos und unter Mitwirkung von Dr. Korinna Jöhrens am DKFZ Heidelberg in den entsprechenden „Empfänger“-Paraffinblock übertragen. Aus diesen „Multi-Tissue“-Blocks werden Schnitte angefertigt, die mehrere Hundert verschiedene Tumoren repräsentieren.

2.1.2 Zelllinien

Die für die Arbeit verwendeten Zelllinien sowie ihre zelluläre Herkunft und ihr Verwendungszweck sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Neben verschiedenen von

Hodgkin-Lymphomen abstammenden Zelllinien und den Kontrollzelllinien wurde für die SSCP-Analytik mit ATM-Kontrollzelllinien (siehe Tabelle 2-1) gearbeitet.

Tabelle 2-1: Zelllinie, Zelltyp und Kulturbedingungen.

Zelllinie	Herkunft / Charakteristika / Kultivierung
L428	Hodgkin-Zelllinie vom B-Zell-Typ (cHL, NS) Medium: 90% RPMI 1640, 10% FCS
KM-H2	Hodgkin-Zelllinie vom B-Zell-Typ (cHL, MZ) Medium: 90% RPMI, 10% FCS
L1236	Hodgkin-Zelllinie vom B-Zell-Typ (cHL, MZ) Medium: 90% RPMI, 10% FCS
L591	B-Zelllinie (häufig als Hodgkin-Zelllinie geführt) Medium: 90% RPMI, 10% FCS
L540	putative Hodgkin-Zelllinie vom T-Zell-Typ (cHL, NS) Medium: 90% RPMI, 10% FCS
HDMyz	Myelomonozytische Zelllinie (ursprünglich als Hodgkin-Zelllinie geführt) Medium: 90% RPMI 1640, 10% FCS
EHEB	B-Zelllinie (Chronische Lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ) Medium: 90% RPMI, 10% FCS
Daudi	B-Zelllinie (Burkitt-Lymphom) Medium: 90% RPMI, 10% FCS
Namalwa	B-Zelllinie (Burkitt-Lymphom) Medium: 90% RPMI, 10% FCS
Raji	B-Zelllinie (Burkitt-Lymphom) Medium: 90% RPMI, 10% FCS
Ly3	Diffuses großzelliges B-Zelllymphom (DLBCL) Medium: 80% DMEM, 20% humanes Plasma
Ly10	Diffuses großzelliges B-Zelllymphom (DLBCL) Medium: 80% DMEM, 20% humanes Plasma
SU-DHL4	Diffuses großzelliges B-Zelllymphom (anaplastischer Subtyp) Medium: 90% RPMI 1640, 10% FCS
Molt-4	T-Zelllinie (Akute Lymphatische Leukämie vom T-Zell-Typ) Medium: 90% RPMI, 10% FCS

Peer	T-Zelllinie (Akute Lymphatische Leukämie vom T-Zell-Typ) Medium: 90% RPMI, 10% FCS
Jurkat	T-Zelllinie (Akute Lymphatische Leukämie vom T-Zell-Typ) Medium: 90% RPMI 1640, 10% FCS
Hela *	Adenokarzinom Medium: 90% DMEM, 10% FCS, Monolayerwachstum
MCF-7	Mammakarzinom Medium: 90% RPMI, 10% FCS, Nicht essentielle Aminosäuren, NaPyruvat, 10µg/ml Rinderinsulin, adhärentes Wachstum
GM02782	Lymphoblastische ATM-Zelllinie, <i>Coriell Cell Repositories</i> Medium: 85% RPMI, 15% FCS
GM03189	Lymphoblastische ATM-Zelllinie, <i>Coriell Cell Repositories</i> Medium: 85% RPMI, 15% FCS
GM11261	Lymphoblastische ATM-Zelllinie, <i>Coriell Cell Repositories</i> Medium: 85% RPMI, 15% FCS
GM13328	Lymphoblastische ATM-Zelllinie, <i>Coriell Cell Repositories</i> Medium: 85% RPMI, 15% FCS

Aus: "The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book", **Hans G. Drexler**, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany, **Academic Press**, 2001 (San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo

* : DSMZ Catalogue of Human and Animal Cell Lines, 8. Edition 2001, Editors: H.G.Drexler, W. Dirks, R.A.F. MacLeod, H.Quentmeier, K.G.Steube, C.C.Uphoff

2.1.3 Reagenzien

2.1.3.1 Reagenzien für die Immunhistologie

Tris-Puffer: 50 mM Tris, pH 7,4-7,6
150 mM NaCl (Roth)

Für die Färbung von Paraffinschnitten wird dem Puffer 0,1% Tween 20 zur besseren Schnittbenetzung zugegeben.

Citrat-Puffer: 0,1 M Citronensäure Monohydrat (Merck)

HuSe: 100 ml Biseko Humanserum (Biotest Pharma GmbH)
900 ml RPMI Verdünnungsmedium

RPMI Verdünnungsmedium:	50 ml 10x RPMI 1640 (Biochrom)
	50 ml inaktiviertes Rinderserum (Biochrom oder Invitrogen)
	0,5 g Natriumazid (Merck)
	400 ml Aqua dest.

Der pH-Wert wird mit HCl oder NaOH auf 7,4-7,6 eingestellt und täglich überprüft. Die Lagerung des Mediums erfolgt bei 4°C.

Entwicklerlösung für Gefrierschnitte:	Lösung A: 175 ml Entwicklungspuffer 62,5 ml Propandiol-Lösung 100 mg Levamisol (Sigma)
	Lösung B: 125 mg Naphthol-As-Bi-Phosphat (Sigma) 1,5 ml Dimethylformamid (Merck)
	Lösung C: 50 mg Natriumnitrit (Merck) 1,25 ml Aqua dest. 0,5 ml Neufuchsin-Lösung

Zuerst wird das Natriumnitrit gelöst, dann das Neufuchsin zugegeben und 1 min gemischt. Zum Ansetzen des Entwicklers wird erst Lösung C, dann Lösung B zur Lösung A gegeben. Der pH-Wert wird dann mit HCl auf 8,8 eingestellt. Die Entwicklungslösung wird filtriert und die Präparate in der Küvette anschließend für 20 Minuten auf einem Schüttler in der Entwicklungslösung inkubiert. Die Entwicklungslösung darf nach dem Filtrieren höchstens 10 min stehen (4°C), bevor sie auf die Präparate gegeben wird.

Entwicklungspuffer:	0,15 M NaCl (Merck) 0,01 M Tris-HCl (Sigma) 0,04 M Tris-Base (Roth) 1000 ml Aqua dest.
Propandiol-Lösung:	21 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol (Merck) 1000 ml Aqua dest.

Neufuchsin-Lösung: 5 g Neufuchsin (Merck)
100 ml 2 N HCl (Merck)

Hämalaun-Lösung: 50 g Kalialaun (Merck)
1 g Hämatoxylin (Merck)
0,2 g NaJO₃ (Merck)

In 1 Liter Aqua dest. lösen und über Nacht rühren. Danach 50 g Chloralhydrat (Merck) und 1 g Zitronensäure (Merck) zugeben und wieder über Nacht rühren. Je länger Hämalaun reift, desto besser färbt der Farbstoff.

2.1.3.2 Reagenzien für die SSCP

Ladepuffer (nach Maniatis): 10 ml Formamid
10 mg Xylencyanol FF
10 mg Bromphenolblau
200 µl 0,5 M EDTA (Merck) pH 8,0

Deionisieren des Formamids auf einem Magnetrührer mit DOWEX XG8 Mixed-bed Resin (Ionenaustauscher, BioRad), mindestens 1h, besser ü.N., danach zweimaliges Filtern durch Whatman No. 1-Papier.

Färbelösungen für SSCP-Gele:

Lösung A: 125 ml Ethanol (J.T.Baker)
(5x) 12,5 ml Essigsäure (J.T.Baker)
auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen

Lösung B: 2,5 g Silbernitrat (AgNO₃, Merck)
(5x)
auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen, dunkel lagern (Alufolie).

Lösung C: 7,5 g NaOH-Plätzchen (Merck)

(1x) 2 ml 37%iges Formaldehyd
(HCHO, J.T.Baker)
2 Skalpellspitzen Natriumbor-
hydrid (Merck).

Die NaOH-Plätzchen in Wasser auflösen und
die ganze Lösung auf 500 ml mit Aqua dest.
auffüllen.

Lösung A und B werden jeweils als 1x-Lösungen verwendet, Lösung C wird für jeden Versuch frisch angesetzt.

2.1.3.3 Reagenzien und Materialien für den Western Blot

Elektrophoresepuffer (10x) 0,5 M 3-(*N*-morpholino) propane sulfonic acid
(MOPS; Sigma)
(denaturierend) 0,5 M Tris Base (Roth)
34,7 mM Sodiumdodecylsulfate (SDS, Merck)
10,3 mM EDTA (Merck)
mit Aqua dest. (Millipore) auf 500 ml auffüllen

Für die Elektrophoresekammer wird der Puffer als 1 x Lösung verwendet.

Probenpuffer (4x) Roti Load 1 (Roth)
(denaturierend, reduzierend) Proben 4:1 mit dem Puffer verdünnen

Probenpuffer (4x) Roti Load 2 (Roth)
(denaturierend, nicht reduzierend) Proben 4:1 mit dem Puffer verdünnen

Transferpuffer (10x) 0,25 M Tris-Base (Roth)
1,92 M Glycin (Roth)
mit Aqua dest. (Millipore) auf 1000 ml auf-
füllen.

Für das Blotting wird zum 1x Puffer 20% Methanol hinzugegeben. Dazu werden für eine Kammerfüllung zu 80 ml 10x Puffer 160 ml Methanol gegeben und auf 800 ml mit Aqua dest. (Millipore) aufgefüllt. Der pH-Wert sollte 8,3 betragen.

PBS-T	100 ml PBS (10x) Dulbeccos's w/o Ca, Mg (Gibco BRL) 0,1% Tween 20 (Serva) mit Aqua dest. (Millipore) auf 1000 ml auffüllen.
Blockierungspuffer/ Verdünnungsmedium für Antikörper	100 ml PBS-T 5% Magermilchpulver (Töpfer GmbH)
Detektionsreagenzien	ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences)
Blotting Membran	Hybond P (Amersham Biosciences)
 <i>2.1.3.4 Puffer</i>	
TBE (20x):	1,8 M Tris-Base (Roth) 1,8 M Borsäure (Roth) 0,05 M Na ₂ EDTA (Gibco BRL)
TAE (50x):	2 M Tris-Base (Roth) 0,05 M EDTA, pH 8,0 5,7 % Eisessig (J.T.Baker)
DNA Probenpuffer: (3x)	900 µl Aqua dest. 500 µl 10x Orange G 100 µl 0,25x Xylencyanol FF
Formamidmix zur Sequenzierung:	5 Teile deionisiertes Formamid (Sigma) 1 Teil 25 mM EDTA (pH 8,0) mit Dextran Blau (50 mg/ml)

2.1.3.5 Gele

Ansatz für Polyacrylamidgele (6%)	5 ml 20x TBE
(ausreichend für ca. 15 Minigele)	15 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, Gibco BRL)
	80 ml Aqua dest.
	0,5 ml 10 % Ammoniumpersulfat (APS, BioRad)
	40 µl TEMED (BioRad)

Nach dem Entgasen der Lösung erfolgt die Zugabe von APS und TEMED. Anschließend werden die Gele zügig gegossen, da das Acrylamid nach Zugabe zu polymerisieren beginnt. Das APS wird jeweils frisch angesetzt.

Ansatz für Agarose-Gele (1%):	100 ml 1x TAE-Puffer
	1 g Agarose (Sigma)

Die Suspension wird in der Mikrowelle erhitzt, bis sie einmal aufgeköcht ist.

2.2 Methoden

2.2.1 Nukleinsäureisolierung

2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus Zelllinien wurde das QIAamp TissueDNA Mini Kit (QIAGEN) entsprechend den Protokollen des Herstellers für kultivierte Zellen verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils ca. $1-5 \times 10^6$ Zellen. Die so aufgereinigte DNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.5) bei 4° C oder bei Lagerung über einen längeren Zeitraum bei -20° aufbewahrt.

2.2.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus Zelllinien wurde mit Hilfe des RNeasy RNA-Isolations-Kits (QIAGEN) entsprechend der Vorgaben des Herstellers gewonnen. Als Ausgangsmaterial dienten 5×10^6 - 1×10^7 Zellen. Das Zellpellet wurde direkt im Lysepuffer gelöst. Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, wurden während der Versuchsdurchführung Handschuhe getragen, der Arbeitsplatz und alle verwendeten Geräte mit RNase Zap (AMBION) dekontaminiert und nur RNase-freie Gefäße verwendet. Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.5) bei -80°C gelagert.

2.2.2 Gelelektrophorese

2.2.2.1 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse von PCR-Produkten > 400 bp erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentlänge in 0,8-2%igen Agarosegelen.

Nach dem Aufkochen der Agarose in 1x TAE-Puffer und anschließendem Abkühlen auf 60°C wurde die Agarose mit Ethidiumbromid (5µl Ethidiumbromidstammlösung [10 mg/ml]) versetzt und in einen Gelschlitten von gewünschter Größe gegossen. Die mit Ladepuffer versetzten Proben und ein DNA Größenstandard (1 µg der 1 kb DNA Leiter, GIBCO BRL) wurden in die Taschen des Gels pipettiert und bei Spannungen zwischen 80 und 160 Volt

aufgetrennt (Power Supply ST 606 T, GIBCO BRL). Die gewählte Spannung und die Laufzeit waren dabei von der Größe der Fragmente abhängig.

2.2.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

DNA-Fragmente unter einer Größe von 400 bp wurden mit Hilfe von 6%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Vor dem Gießen der Gele wurden Platten, Spacer und Kämme intensiv mit 96%igem Ethanol gereinigt, um sie fettfrei zu bekommen. Nach dem Gießen der Polyacrylamidlösung (siehe 2.1.3.5) zwischen die Platten wurden die Gele zum Auspolymerisieren ca. 1-2 h stehen gelassen. Anschließend konnten die Klammern entfernt und das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer (Mini V8, GIBCO BRL) mit 1x TBE Puffer gestellt werden. Die zu analysierenden PCR-Produkte wurden 2:1 mit Probenpuffer versetzt und mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard diente 1 µg einer 1 kb Leiter (GIBCO BRL). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 200 Volt durchgeführt (Power Supply ST 606 T, GIBCO BRL).

2.2.3 Anfärbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Makromolekülen

2.2.3.1 Ethidiumbromidfärbung

Mit Hilfe des Farbstoffes Ethidiumbromid, der in die DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert, können die auf einem Gel aufgetragenen Fragmente sichtbar gemacht werden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden Polyacrylamidgele für ca. 1 min in ethidiumbromidhaltigem 1x TBE Puffer gefärbt (1 µg/ml) und anschließend unter UV-Licht (Geldokumentationsanlage Gel Doc 2000, BioRad) betrachtet und fotografiert.

Aufgrund des bereits im Gel vorhandenen Ethidiumbromids (0,5 µg/ml) brauchten Agarosegele nur noch auf den UV-Tisch gelegt und fotografiert zu werden.

2.2.3.2 Silberfärbung

Im Anschluß an die SSCP-Elektrophorese (siehe 2.2.12) wurde das Polyacrylamidgel zunächst 10 min in Lösung A vorbehandelt und dann 10 min in Lösung B (siehe 2.1.3.2) fixiert. Danach wurde das Gel zweimal mit Aqua.dest. gespült und zum Schluss mindestens 10 min

in Lösung C (siehe 2.1.3.2) inkubiert, um die Silberfärbung zu stoppen. Das Gel wurde in eine 1%ige Glycinlösung überführt und mit einer Digitalkamera fotografiert.

2.2.4 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Entstanden nach einer PCR mehrere Produkte, wurde die gewünschte Bande nach der Auftrennung des PCR-Ansatzes auf einem Ethidiumbromid-Agarosegel mit einem sterilen Einmalskalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung unter Verwendung des QIAEX-2-DNA-Isolierungskit (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers. Lag nach der PCR nur ein singuläres Produkt vor (Kontrolle auf Agarose- bzw. Acrylamidgel), wurde der entsprechende PCR-Ansatz unmittelbar mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt (DiodeArray Spectrophotometer/Hewlett Packard). Gemessen wurde die Absorption bei 260 nm. 1 OD_{260nm} entspricht hierbei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA (Schichtdicke der Küvette: 1 cm). Zur Beurteilung von Proteinkontaminationen diene der Quotient OD₂₆₀/ OD₂₈₀. Dieser sollte > 1,6 sein.

2.2.6 Sequenzierung

Die isolierten PCR-Produkte wurden ohne Klonierung einer Sequenzanalyse zugeführt. Die Sequenzreaktion wurde mit dem ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) durchgeführt, der auf einem modifizierten Verfahren der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode [164] basiert. Es wurde ein sogenanntes „Cycle Sequencing“ durchgeführt, bei dem nur ein Primer eingesetzt wird, der sich an das zu sequenzierende DNA-Fragment anlagert und durch die DNA-Polymerase verlängert wird. Wird in die neusynthetisierte DNA ein ddNTP eingebaut, führt dies aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am C3-Atom zum Kettenabbruch. Die eingesetzten ddNTPs sind mit vier

verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, wobei jeder Base ein bestimmter Farbstoff zugeordnet ist. So ist jedes neu synthetisierte DNA-Molekül am Kettenende mit einem Farbstoff markiert, der eine bestimmte Base repräsentiert. Da neben den ddNTPs ein Überschuß an dNTPs im Reaktionsmix vorhanden war, hörte die Synthese immer an unterschiedlichen Stellen auf, so dass am Ende des „Cycle Sequencing“ ein Gemisch aus verschieden langen DNA-Strängen vorlag. Durch die anschließende Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Produkte der Größe nach aufgetrennt. Das Laserlicht regte die Fluoreszenzfarbstoffe an, das so emittierte Licht wurde detektiert und daraus die Basenabfolge des Amplifikats ermittelt. Nach der erfolgten Sequenzierung wurde mit den beiden Sequenzen pro Amplifikat (Strang und Gegenstrang) eine Konsensussequenz erstellt, die für die weitere Auswertung verwendet wurde. Zur Sequenzierung der PCR Produkte wurden pro Ansatz jeweils 50 ng Reamplifikationsprimer verwendet, als Ausgangsmaterial dienten 10-50 ng PCR-Produkt.

2.2.7 Auswertung

Die Sequenzen der komplementären DNA Stränge wurden mit Hilfe der *Sequence Navigator* (Version 1.0) Software (Applied Biosystems) verglichen und wenn möglich, eine Konsensussequenz erstellt, die für die weitere Auswertung verwendet wurde.

Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit vorhandenen Datenbanksequenzen (GenBank) verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>). Zusätzlich wurden die aus der Einzelzell-PCR erhaltenen Sequenzen der mdm2-Exone 3 bis 7 jeweils untereinander und mit der entsprechenden Sequenz des jeweiligen Exons verglichen (*für Exon 3 z.B. intex3int*).

2.2.8 Färbung von Gewebeschnitten

2.2.8.1 Schneiden der Gewebeproben

Um Gefrierschnitte herzustellen, wurden die Gefrierblöcke in flüssigem Stickstoff von der -80°C-Truhe zum Kryostaten (Reichert-Jung, 2800 Frigocut E) transportiert, wo sie bei -20°C geschnitten wurden. Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurde ein Microtom (Microm GmbH, Heidelberg, Typ 4008) verwendet. Alle Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger (DAKO ChemMate™ Code No. S2024) geschnitten.

2.2.8.2 Fixierung und Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Gefrierschnitte

Nach dem Schneiden mit dem Kryostaten wurden die Schnitte 4 bis 24 Stunden an der Luft getrocknet. Dann wurden sie 30 min in Aceton entwässert. Wenn die Schnitte nicht am nächsten Tag gefärbt werden konnten, wurden sie ebenfalls 4 bis 24 Stunden an der Luft getrocknet und nach der Behandlung mit Aceton für 10 min bei -80°C eingefroren. Zur Vermeidung von Kondensat auf dem Schnitt wurde in Filterpapier eingehülltes kristallines Calciumchlorid-2-Hydrat (Merck 2382) mit in die Aufbewahrungsbox gegeben. Eingefrorene Schnitte wurden zum Färben langsam in einer Kartellbox mit kristallinem Calciumchlorid-2-Hydrat aufgetaut und dann nochmals 10 bis 20 min in Aceton entwässert. Sollte direkt nach dem Schneiden gefärbt werden, so wurden die Gefrierschnitte direkt nach der Entwässerung mit Aceton mit dem Antikörper inkubiert.

Paraffinschnitte

Paraffinschnitte wurden nach dem Schneiden für 12 Stunden bei 68°C oder für ca. 2-3 Tage bei 37°C getrocknet. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte in einer Küvette für 2x je 10 min in Xylol gestellt und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe (90%, 80%, 70%, 0% in Tris-Puffer, siehe 2.1.3.1) gestellt. Die Schnitte wurden dann im Spülpuffer bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Tabelle 2-2: Verwendete Antikörper und Vorbehandlung der Schnitte.

Antikörper (Spezifität)	Herkunft	Ausgangsmaterial	Verdünnung	Vorbehandlung der Schnitte
MDM2	Oncogene	Gefrier	1:10	Acetonfixierung
p53	DAKO	Paraffin	1:50	2 min kochen 10 min H ₂ O ₂
Cyclin D1	Novocastra	Paraffin	1:20	5 min kochen 1 h Antikörper
p21	Neomarkers	Paraffin	1:20	5 min kochen
p27 Kip1	Tranduction Laboratories	Paraffin	1:100	2 min kochen
Rb	Pharminen	Paraffin	1:200	2 min kochen Inkubation üN
Cyclin E	Novocastra	Paraffin	1:10	2 min kochen Inkubation 40 min
ATM	Neomarkers	Paraffin	1:10	5 min kochen
E2F-1	Santa Cruz Biotechnology	Paraffin	1:50	5 min kochen

MDM2 wurde mit der APAAP-Methode (siehe 2.2.8.3) gefärbt. Für p53 und p21 wurde der ChemMate™ Detection Kit Peroxidase/DAB Mouse K5001 von DAKO nach Angaben des Herstellers verwendet. Die übrigen Antikörper wurden mit dem ChemMate™ Detection Kit APAAP Mouse K5000 von DAKO nach Angaben des Herstellers gefärbt.

2.2.8.3 Immunhistologische Färbungen von Paraffinschnitten

Vor der Färbung mussten die Paraffinschnitte vorbehandelt werden. Es findet durch diese Vorbehandlung eine Demaskierung von Proteinen statt. Nach einer Demaskierung können die freigelegten Epitope vom Antikörper gebunden werden. Die Demaskierung erfolgte durch Kochen der Schnitte in 0,1 M Citratpuffer (entsprechende Behandlungsdauer siehe Tabelle 2-2). Abschließend wurden die Schnitte unter fließendem Wasser abgekühlt und bis zur weiteren Behandlung in Tris-Puffer stehen gelassen.

2.2.8.3.1 Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode

Die APAAP-Methode ermöglicht einen indirekten Nachweis der Bindung eines Primärantikörpers durch eine Färbereaktion in einem Gewebeschnitt. Nach Zugabe eines Primärantikörpers wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der sowohl an den

Primärantikörper, als auch an den im darauffolgenden Schritt verwendeten anti-Alkalische Phosphatase-Antikörper bindet. Dieser anti-Alkalische Phosphatase-Antikörper ist mit Alkalischer Phosphatase verbunden (APAAP) und nach Substratzugabe entsteht da, wo die Antikörpermoleküle gebunden haben, ein roter Farbniederschlag. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden in einem speziellen Antikörper-Verdünnungsmedium (ChemMate Antibody Diluent, DAKO) verdünnt (optimale Verdünnungen der Primärantikörper siehe Tabelle 2-2). Der Brückenantikörper (Kaninchen anti-Maus, DAKO) wurde 1:20 in einer Mischung aus RPMI und Humanserum (HuSe) verdünnt und der APAAP-Komplex 1:10 in RPMI (2.1.3.1). Benötigt wurden pro Schnitt ca. 100 bis 200 µl der jeweiligen Lösung (Vermeidung von Austrocknung). Bei der Färbung der Gewebearrays mussten aufgrund der größeren Gewebefläche 1 ml der jeweiligen Lösungen eingesetzt werden. Die Inkubationszeiten betragen jeweils 30 min für den Primärantikörper (Abweichungen siehe Tabelle 2-2), 30 min für den Sekundärantikörper bzw. 10 min bei den Wiederholungen der Brücke/APAAP-Schritte. Nach jedem Schritt wurden die Schnitte ausgiebig mit Tris-Puffer gespült. Die Entwicklerlösung für die Farbreaktion wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers angesetzt und verwendet (ChemMate™ Detection Kit APAAP Mouse, DAKO). Zur besseren Darstellung des Gewebes im mikroskopischen Bild wurden die Zellkerne durch Hämalaun blaugefärbt. Hierzu wurden die Schnitte für 1 min in die Hämalaunlösung (2.1.3.1) gestellt. Anschließend wurde der überschüssige Farbstoff mit lauwarmem Leitungswasser entfernt. Die fertigen Schnitte wurden mit 50-60°C warmer Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck) eingedeckt.

2.2.8.4 Immunhistologische Färbungen von Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte, die sich auf beschichteten Objektträgern (ChemMate, DAKO) befanden, wurden vor dem Färben langsam in einer Kartellbox mit Calciumchlorid-2-Hydrat aufgetaut und 10 min in Aceton entwässert. Die Färbung erfolgte wie unter 2.2.8.3.1 beschrieben, allerdings dürfen bei Gefrierschnitten wegen der Empfindlichkeit des Gewebes keine detergenshaltigen Lösungen verwendet werden. Daher wurden die Antikörper in RPMI-Verdünnungsmedium verdünnt und das Waschen der Schnitte wurde in Küvetten mit Tris-Puffer ohne Tween durchgeführt. Zur Entwicklung wurden die Schnitte in einer Küvette für 20 min im Färbereagenz (siehe 2.1.3.1) geschüttelt, mit Leitungswasser gespült und mit Hämalaun gegengefärbt und eingedeckt.

2.2.9 Isolierung von DNA einzelner Zellen aus immungefärbten Schnitten

2.2.9.1 Hydrierung eingefrorener Schnitte

Vor der Isolierung der genomischen DNA einzelner Zellen mussten die immungefärbten Gefrierschnitte rehydriert werden. Hierzu wurden die getrockneten Schnitte aufgetaut und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Die entsprechenden Mischverhältnisse wurden mit Ethanol und 1 x PBS hergestellt.

1.Schritt:	96% Ethanol	10 sec
2.Schritt:	80% Ethanol	2 min
3.Schritt:	50% Ethanol	2 min

Nach der Rehydrierung erfolgte ein Spülen der Schnitte mit 1 x PBS-Puffer, anschließend wurden sie mit 1 x PBS-Puffer überschichtet.

2.2.9.2 Einzelzellisolierung

Die Isolierung einzelner Zellen aus immungefärbten Gefrierschnitten wurde mit Hilfe eines hydraulischen Mikromanipulators (NIKON NARISHIGE) durchgeführt. Die Identifikation der Tumorzellen der cHL-Fälle erfolgte hierbei anhand der Morphologie und der immunhistologischen Darstellung der CD30-Expression der HRS-Zellen.

Mit dem Einspannen des entsprechend immungefärbten Schnittes in die Mikromanipulationsanlage begann der Isolierungsprozeß. Die Freisetzung der durch Morphologie und Immunphänotyp identifizierten Zellen wurde durch eine hydraulische Manipulationskapillare vorgenommen. Dafür wurde die zu isolierende Zelle unter mikroskopischer Kontrolle mit der Manipulationskapillare von umgebenden Zellen freipräpariert und vom Objektträger gelöst und in die offene Spitze einer ebenfalls hydraulisch getriebenen Aufnahmekapillare transferiert. Die Zellisolierung wurde fotografisch durch Aufnahmen vor und nach der Extraktion aus dem Gewebe dokumentiert. Die so freipräparierte Zelle wurde in einem minimalen Volumen an Puffer (etwa 0,1 µl), der den Schnitt während der Prozedur bedeckte, in ein PCR-Röhrchen überführt. In diesem Gefäß befand sich bereits 10 µl vorportionierte Proteinase-K (0,1 mg/ml). Die äußerste Spitze der Kapillare, in der sich die zu analysierende Zelle befand, wurde abgebrochen, um sicherzugehen, dass die Zelle sich im

Röhrchen befand. Zusätzlich zu den isolierten Einzelzellen wurden mit der Aufnahmekapillare Pufferproben gezogen. Die Untersuchung der Pufferproben diente zur Detektion von möglichen Kontaminationen des Überschichtungspuffers durch aus dem Gefrierschnitt herausgelöste DNA.

Wichtige Voraussetzungen für die erfolgreiche Isolierung von Einzelzellen waren neben einer sehr guten Schnitt- und Immunfärbequalität gute morphologische und immunhistologische Kenntnisse. Diese erforderliche Kompetenz auf dem Gebiet der Histologie und Immunhistologie wurde dadurch sichergestellt, dass nur morphologisch geübte Personen wie Prof. Dr. Anagnostopoulos die Zellidentifizierung vornahmten.

2.2.10 Proteinase-K-Verdau isolierter Einzelzellen

Die isolierten Zellen wurden zunächst zur Freisetzung der DNA in Proteinase-K (10 µl; Konz. 0,1 mg/ml) verdaut (1 Stunde bei 50°C). Nach Inaktivierung der Proteinase-K (10 min bei 96°C) erfolgte dann die PCR zum Nachweis von mdm2 (siehe 2.2.11.2).

2.2.11 PCR (Polymerasekettenreaktion)

2.2.11.1 RT-PCR

In einer Reverse-Transkriptase-(RT-)PCR wird mRNA unter Verwendung einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Nach dem Umschreiben wird eine PCR durchgeführt. Sowohl für den RT-Schritt als auch für die anschließende PCR wurde der Thermocycler TC9700 (Applied Biosystems) verwendet.

2.2.11.1.1 RT-PCR zum Nachweis von atm

Die Analyse der Regionen von ATM, in denen gehäuft Mutationen auftreten, wurde mittels SSCP (siehe 2.2.12) durchgeführt. Hierzu wurden kurze DNA-Fragmente (200-300 bp) der entsprechenden Exons mittels PCR analysiert. Die dafür verwendeten Primer sind in Tabelle 2-3 aufgeführt.

Tabelle 2-3: Primersequenzen für die atm-RT-PCR.

Primername	Spezifität	Sequenz
<i>atm1.up</i>	Exon 52-53	5' ACT GAA AGA GGA TCG TAA ACG C 3'
<i>atm1.low</i>		5' CAT CAT CTT GGT CCC CAT TC 3'
<i>atm2.up</i>	Exon 52-54	5' AGA GAG ACG GAA TGA AGA TTC C 3'
<i>atm2.low</i>		5' TGC TTC TTC TGG CTA CCT CTG 3'
<i>atm3.up</i>	Exon 54-56	5' TGC AAA CAG AGA TGA ATT TCT G 3'
<i>atm3.low</i>		5' GGT CTG CTG GAA TAT TTA TGC C 3'
<i>atm4.up</i>	Exon 55-58	5' GTG GAA GAC TCA GAG AAA AGG C 3'
<i>atm4.low</i>		5' GGT CAT CAC GGC CCT TAA C 3'
<i>atm5.up</i>	Exon 57-59	5' AGA ATT TCG CTT AGC AGG AGG 3'
<i>atm5.low</i>		5' TCA AGA ACA CCA CTT CGC TG 3'
<i>atm6.up</i>	Exon 58-60	5' GCA GAG AAA CAC CGA AAC TAG G 3'
<i>atm6.low</i>		5' TGA AAA TTT TGG CAA ACA TCC 3'
<i>atm7.up</i>	Exon 60-61	5' TGA AGT CTT CAT GGA TGT TTG C 3'
<i>atm7.low</i>		5' TCA GGA GTA GGA AGG ATT TTG C 3'

Die Primer wurden mit Hilfe des **HUSAR** (Heidelberg Unix Sequence Analysis Ressource) Programms für die Exons 52 bis 61 der atm-mRNA (Accession-Nr. U33841) ausgewählt.

Die RT-PCR wurde unter Verwendung des GeneAmp[®] RNA-PCR-Kits (Roche) wie folgt durchgeführt: Zu 19 µl Mastermix (siehe Tabelle 2-4) wurden 1 µl Gesamt-RNA (1 µg) gegeben. Der RT-Schritt zur Umschreibung der mRNA wurde mit dem nachfolgend beschriebenen Temperaturprofil durchgeführt:

<i>1.Schritt:</i>	10:00 min	25 °C	
<i>2.Schritt:</i>	30:00 min	42 °C	<i>RT-Schritt</i>
<i>3.Schritt:</i>	5:00 min	95 °C	<i>Deaktivierung der Reversen Transkriptase</i>
<i>4.Schritt:</i>	5:00 min	5 °C	
<i>5.Schritt:</i>	∞	4 °C	

Nach der Umschreibung der mRNA wurde eine PCR durchgeführt, deren Komponenten in Tabelle 2-4 beschrieben sind. Hierbei wurden 80 µl PCR-Mastermix zu den 20 µl RT-Mix gegeben. Die Amplifikation erfolgte mit dem nachfolgenden Temperaturprofil:



1.Schritt:	1:30 min	96 °C	Denaturierung	 40 x
2.Schritt:	0:30 min	94 °C	Denaturierung	
3.Schritt:	0:30 min	60 °C	Primeranlagerung	
4.Schritt:	1:00 min	72 °C	Synthese	
5.Schritt:	10:00 min	72 °C	abschließende Synthese	
6.Schritt:	∞	4 °C		

Tabelle 2-4: PCR-Bedingungen für die atm-RT-PCR.

RT-Schritt	
MgCl ₂ (25 mM)	40 µl
10xPuffer	20 µl
4xdNTPs (10 mM), je 20 µl	80 µl
Aqua dest.	20 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	10 µl
MuLV Reverse-Transkriptase (50 U/µl)	10 µl
Random Hexamers (50 µM)	10 µl
Summe (10fach-Ansatz)	190 µl
+ Zugabe von je 1 µl Gesamt-RNA (1 µg) pro Ansatz	
PCR-Schritt	
MgCl ₂ (25 mM)	40 µl
10xPuffer	80 µl
Aqua dest.	655 µl
atm 1-7.up Primer (10 µM)	10 µl
atm 1-7.low Primer (10 µM)	10 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	5 µl
Summe (10fach-Ansatz)	800 µl

2.2.11.1.2 RT-PCR zum Nachweis von *mdm2*

Zum Nachweis des vollständigen *mdm2*-mRNA-Transkripts in Hodgkin-Zelllinien wurde eine RT-PCR durchgeführt. Nach der Durchführung des RT-Schrittes (Temperaturprofil siehe 2.2.11.1.1, RT-Mix (siehe Tabelle 2-6) wurde mit den entsprechenden Primern (Tabelle 2-5) und optimierten PCR-Bedingungen (Tabelle 2-6) die PCR angeschlossen. Es wurden wiederum 80 µl PCR-Mastermix zu den 20 µl RT-Mix gegeben und die PCR nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

1.Schritt:	2:00 min	96 °C	Denaturierung	 40 x
2.Schritt:	0:30 min	95 °C	Denaturierung	
3.Schritt:	0:30 min	55 °C	Primeranlagerung	
4.Schritt:	4:50 min	68 °C	Synthese	
5.Schritt:	8:00 min	68 °C	abschließende Synthese	
6.Schritt:	∞	4 °C		

10 µl des Amplifikates wurden auf einem Agarosegel (siehe 2.2.2.1) aufgetragen. Die zu erwartende Fragmentgröße betrug 1607 bp.

Tabelle 2-5: Primersequenzen für die mdm-RT-PCR.

Primername	Sequenz
<i>exmdm.up</i>	5' CTG GGG AGT CTT GAG GGA CC 3'
<i>exmdm.low</i>	5' TTT CAG GTT GTC TAA ATT CCT 3'

Die Primersequenz stammte aus: **Matsumoto, R. et al.:** „Cancer Research“, Vol.58, No 4, 609-613, „Short alternative splice transcripts of the mdm2 oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms“.

Tabelle 2-6: PCR-Bedingungen für die mdm-RT-PCR.

RT-Schritt	
MgCl ₂ (25 mM)	40 µl
10xPuffer	20 µl
4xdNTPs (10 mM), je 20 µl	80 µl
Aqua dest.	20 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	10 µl
MuLV Reverse-Transkriptase (50 U/µl)	10 µl
Random Hexamers (50 µM)	10 µl
Summe (10fach-Ansatz)	190 µl
+ Zugabe von je 1 µl Gesamt-RNA (1 µg) pro Ansatz	
PCR-Schritt	
MgCl ₂ (25 mM)	40 µl
10xPuffer	80 µl
Aqua dest.	655 µl
exmdm.up Primer (10 µM)	10 µl
exmdm.low Primer (10 µM)	10 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	5 µl
Summe (10fach-Ansatz)	800 µl

2.2.11.1.3 RT-PCR zum Nachweis von p14^{ARF}

Bei p14^{ARF} handelt es sich um ein Tumorsuppressorprotein, das einer der „Gegenspieler“ von mdm2 und p53 ist. Zur Untersuchung eines Teilbereichs der p14^{ARF}-mRNA auf Mutationen wurden verschiedene Hodgkin-Zelllinien mittels RT-PCR analysiert. Der RT-Schritt mit dem RT-Mix (Tab.2-8) wurde wie unter 2.2.11.1.1 beschrieben durchgeführt. Die anschließende PCR wurde mit den entsprechenden Primern (Tabelle 2-7) und optimierten PCR-Bedingungen (Tabelle 2-8) nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

1.Schritt:	10:00 min	96 °C	Denaturierung	
2.Schritt:	0:45 min	95 °C	Denaturierung	
3.Schritt:	1:00 min	65 °C	Primeranlagerung	5 x
4.Schritt:	1:00 min	72 °C	Synthese	
5.Schritt:	0:45 min	95 °C	Denaturierung	35 x
6.Schritt:	1:00 min	60 °C	Primeranlagerung	
7.Schritt:	1:00 min	72 °C	Synthese	
8.Schritt:	10:00 min	72 °C	abschließende Synthese	
9.Schritt:	∞	4 °C		

Zur Analyse wurden 8 µl des Amplifikates auf einem Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe 2.2.2.2). Die erwartete Fragmentgröße betrug 259 bp.

Tabelle 2-7: Primersequenzen für die p14^{ARF}-RT-PCR.

Primernamen	Sequenz
<i>p14arf.up</i>	5' AGT GGC GCT GCT CAC CTC 3'
<i>p14arf.low</i>	5' CTA GGA AGC GGC TGC TGC 3'

Die Primersequenz stammte aus: **Pinyol, M.** et al.: "American Journal of Pathology" Vol.156, No.6, 1987-1996, „Ink4A/ARF locus alterations in human non-Hodgkin's lymphomas mainly occur in tumors with wildtype p53-gene".

Tabelle 2-8: Bedingungen für die p14^{ARF}-RT-PCR.

RT-Schritt	
MgCl ₂ (25 mM)	40 µl
10xPuffer	20 µl
4xdNTPs (10 mM), je 20 µl	80 µl
Aqua dest.	20 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	10 µl
MuLV Reverse-Transkriptase (50 U/µl)	10 µl
Random Hexamers (50 µM)	10 µl
Summe (10fach-Ansatz)	190 µl
+ Zugabe von je 1 µl Gesamt-RNA (1 µg) pro Ansatz	
PCR-Schritt	
MgCl ₂ (25 mM)	40 µl
10xPuffer	80 µl
Aqua dest.	655 µl
p14arf.up Primer (10 µM)	10 µl
p14arf.low Primer (10 µM)	10 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	5 µl
Summe (10fach-Ansatz)	800 µl

2.2.11.2 *mdm2*-Multiplex-Einzelzell-PCR

Für die Amplifikation genomischer DNA-Sequenzen aus einer einzelnen *mdm2*-Genkopie war entscheidend, dass einerseits die fünf Primerpaare für die jeweiligen Exons hochspezifisch an die entsprechenden Targetsequenzen binden und andererseits im heterogenen Primergemisch keine Wechselwirkungen untereinander ausüben, die die Amplifikation der gewünschten Genabschnitte verhindern. Da die Etablierung der Primär- und Reamplifikationen direkt an Einzelzellen nicht möglich ist, wurde diese mit der DNA der Zelllinie L540 an verschiedenen Verdünnungen bis zu 10 pg (entspricht etwa dem Äquivalent an genomischer DNA einer einzelnen Zelle) durchgeführt. Die genomische DNA wurde dann unter den ermittelten optimalen Bedingungen einer zweistufigen PCR unterworfen. Aus jeder amplifizierbaren Zelle entstehen nach der Reamplifikation fünf verschiedene Amplifikate für die Exons 3 bis 7, entsprechend den jeweils amplifizierten Exonabschnitten. Die Lage der Primär- bzw. Reamplifikationsprimer ist exemplarisch für Exon 3 dargestellt (Abbildung 2-1). In Abbildung 2-2 ist der Aufbau der *mdm2*-Multiplex-PCR und der entsprechenden „semi-nested“ bzw. „full-nested“-PCRs dargestellt.

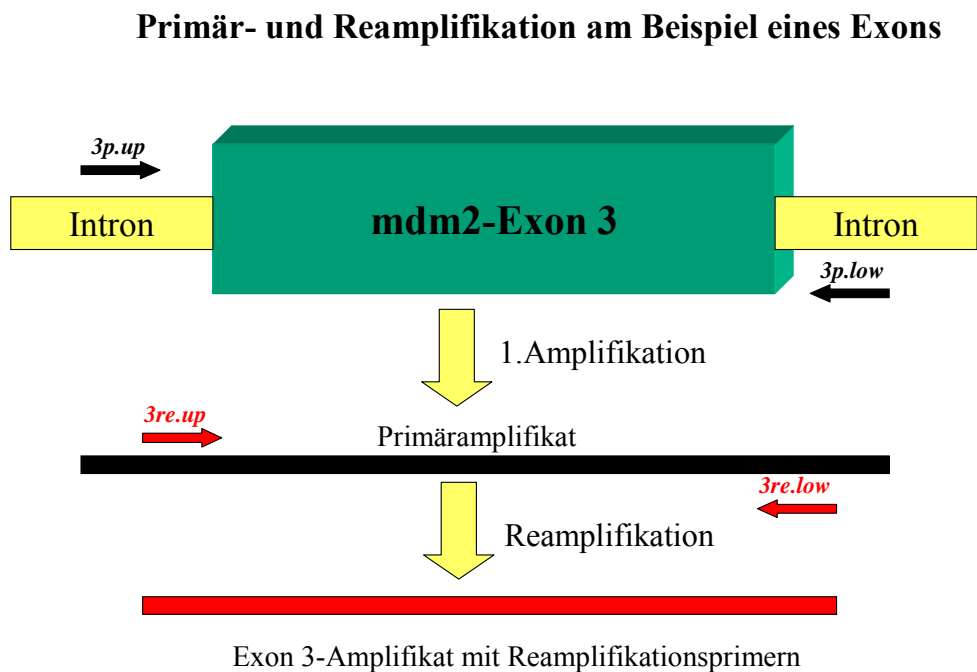
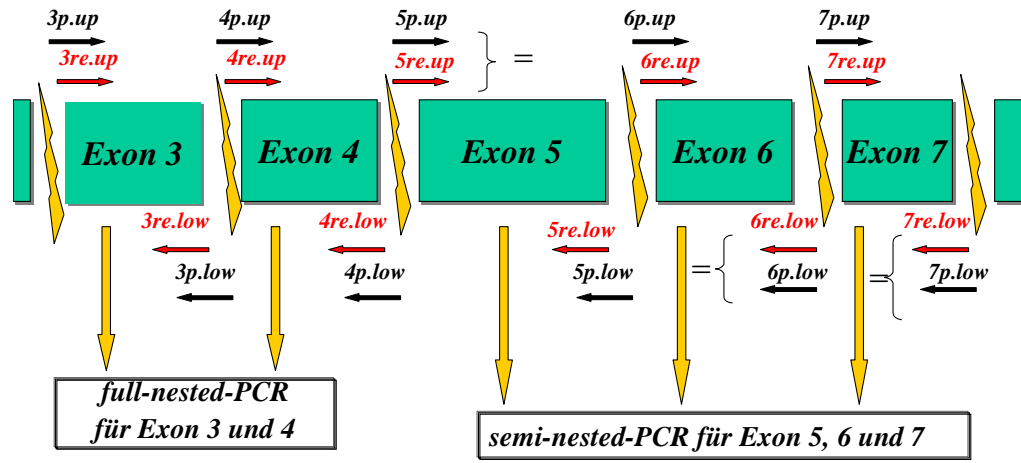


Abbildung 2-1: Beispiel für eine „full-nested“-PCR am Beispiel von *mdm2*-Exon 3.

mdm2-Multiplex-PCR



Legende:




Abbildung 2-2: Verteilung der Primär- und Reamplifikationsprimere für die mdm2-Multiplex-PCR.

Bei der Untersuchung einzelner Zellen aus Schnittpräparaten lässt sich nur ein Teil der Zellen mittels PCR positiv darstellen. Viele Zellen liefern kein PCR-Produkt, da sich der zu amplifizierende Anteil des Genoms in einer anderen Schnittebene befindet. Deshalb war es erforderlich, weitaus mehr Zellen zu isolieren und der zweistufigen „nested PCR“ zu unterwerfen, als rein theoretisch notwendig sind.

Zum Nachweis einer möglichen Amplifikation von aus beschädigten Zellen freigesetzten DNA-Fragmenten wurde nach jedem Zellisolierungsvorgang zusätzlich eine Probe des Puffers, mit dem die immungefärbten Schnitte während des „Zellpickens“ überschichtet sind, entnommen und ebenfalls der zweistufigen mdm2-PCR unterworfen. Sämtliche PCRs wurden mit den Thermocyclern TC9600 bzw. TC9700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Primäre Amplifikation für die Exone 3-7 wurde mit den entsprechenden Primern (Tabelle 2-9) und unter den zuvor mit Zelllinien-DNA optimierten PCR-Bedingungen (Tabelle 2-10) mit folgendem Temperaturprofil entsprechend durchgeführt:

Temperaturprofil für die Primäramplifikation der Exons 3-7 und die Reamplifikation der Exons 3-5:

1.Schritt:	10:00 min	95 °C	Denaturierung		40 x
2.Schritt:	0:30 min	95 °C	Denaturierung		
3.Schritt:	0:40 min	57 °C	Primeranlagerung		
4.Schritt:	0:30 min	72 °C	Synthese		
5.Schritt:	10:00 min	72 °C	abschließende Synthese		
6.Schritt:	∞	4 °C			

Die Reamplifikationen für die Exons 3 bis 5 wurden mit den jeweiligen Primern (Tabelle 2-9) und unter den entsprechenden PCR-Bedingungen (Tabelle 2-10) nach dem gleichen Temperaturprofil wie die Primäramplifikation durchgeführt (s.o.).

Die PCR-Bedingungen für die Reamplifikation der Exons 6 und 7 sind in Tabelle 2-10 aufgeführt, die entsprechenden Primer in Tabelle 2-9. Hier wurde die Reamplifikation mit einem gegenüber der Primäramplifikation veränderten Temperaturprofil durchgeführt:

Temperaturprofil für die Reamplifikation der Exons 6 und 7:


1.Schritt:	10:00 min	95 °C	Denaturierung		35 x
2.Schritt:	0:30 min	95 °C	Denaturierung		
3.Schritt:	0:40 min	54 °C	Primeranlagerung		
4.Schritt:	0:30 min	72 °C	Synthese		
5.Schritt:	10:00 min	72 °C	abschließende Synthese		
6.Schritt:	∞	4 °C			

Tabelle 2-9: Primersequenzen für die mdm2-Multiplex-PCR an Einzelzellen.

Primername	Spezifität	Sequenz
Primäramplifikation		
<i>mdmex3p.up</i>	Exon 3	5' CCA CAG ATG TTT CAT GAT TTC C 3'
<i>mdmex3p.low</i>		5' AAG CAA ATG TGG CAA ATG G 3'
<i>mdmex4p.up</i>	Exon 4	5' TTG ATG ATT CCA TGA TAC TTG C 3'
<i>mdmex4p.low</i>		5' CAA ACG ACC ACA AAA TTA AAT G 3'
<i>mdmex5p.up*</i>	Exon 5	5' TAT GGT TCC TGG TTG TTT ACC C 3'
<i>mdmex5p.low</i>		5' ATG CCA GAG CTC AGG TTC TC 3'
<i>mdmex6p.up</i>	Exon 6	5' GGG GTC TTC TGG TAA AGT CC 3'
<i>mdmex6p.low*</i>		5' GGT ATT TAT CCA TGA TGC TC 3'
<i>mdmex7p.up</i>	Exon 7	5' TAT CTA CTG AGT AGC GCC CC 3'
<i>mdmex7p.low*</i>		5' GTA AAT AAC CTT TCC AAT TTG C 3'

Reamplifikation			
<i>mdmex3re.up</i>	Exon 3	5'	TCA TGA TTT CCA GTT TTC ATC G 3'
<i>mdmex3re.low</i>		5'	GCA GTT ACG CCA GAG GTA GC 3'
<i>mdmex4re.up</i>	Exon 4	5'	TAA TGA TTA GAT CCT CCC CAG C 3'
<i>mdmex4re.low</i>		5'	GCC AAT TTC TCC ACA TGG TC 3'
<i>mdmex5re.up*</i>	Exon 5	5'	TAT GGT TCC TGG TTG TTT ACC C 3'
<i>mdmex5re.low</i>		5'	TCA AAT AAT ATG CCG CAG AGC 3'
<i>mdmex6re.up</i>	Exon 6	5'	GTG CTT TTA AGT GCC TAC AAG C 3'
<i>mdmex6re.low*</i>		5'	GGT ATT TAT CCA TGA TGC TC 3'
<i>mdmex7re.up</i>	Exon 7	5'	CAC CAC CAA GTT TCT GAT CC 3'
<i>mdmex7re.low*</i>		5'	GTA AAT AAC CTT TCC AAT TTG C 3'

*: Primer wurden sowohl für Primär- als auch für Reamplifikation verwendet („semi-nested“-PCR)

Tabelle 2-10: PCR-Bedingungen für die mdm2-Multiplex-PCR.

Primäramplifikation		
Reaktionsansatz	Zelllinien¹	Einzelzellen²
MgCl ₂ (25 mM)	80 µl	80 µl
10xPuffer	100 µl	100 µl
4xdNTPs (100 mM)	8 µl	8 µl
Aqua dest.	757 µl	657 µl
mdmex3-7p.up-Primer (10 µM)	20 µl	20 µl
jeweils pro Primer 4µl		
mdmex3-7p.low-Primer (10 µM)	20 µl	20 µl
jeweils pro Primer 4µl		
Taq Gold Polymerase (5 U/µl)	5 µl	5 µl
Summe (10fach-Ansatz)	990 µl	890 µl

¹:+ Zugabe von je 1 µl Gesamt-DNA (100 ng bis 10 pg für die Verdünnungsreihe) pro Ansatz

²: Zugabe des PCR-Ansatzes zu den mit Proteinase-K behandelten Zellen (siehe 2.2.10)

Reamplifikation			
Reaktionsansatz	Exon 3-Exon5	Exon 7	Exon 6 *(mit Pfu Polymerase)
MgCl ₂ (25 mM)	80 µl	100 µl	20 µl
10xPuffer	100 µl	100 µl	100 µl
dNTPs (100 mM)	8 µl	8 µl	8 µl
Aqua dest.	777 µl	757 µl	832 µl
mdmex3-7re.up-Primer (10 µM)	10 µl	10 µl	10 µl
mdmex3-7re.low-Primer (10 µM)	10 µl	10 µl	10 µl
Taq Gold Polymerase (5 U/µl)	5 µl	5 µl	10 µl
Summe (10fach-Ansatz)	990 µl	990 µl	990 µl

Es wurden für jedes Exon die entsprechenden Reamplifikationsprimer eingesetzt.

In der Reamplifikation pro Ansatz jeweils Zugabe von 1 µl Amplifikat aus der Primäramplifikation.

* Bei Exon 6 wurde statt der Taq Gold Polymerase eine **Pfu Polymerase (2,5 U/µl)** mit dem entsprechenden 10x Puffer verwendet.

2.2.11.3 Realtime-PCR zum quantitativen Nachweis von *mdm2*

Mit Hilfe der Realtime-PCR, die mit Hilfe des TaqMan 7000 von Applied Biosystems durchgeführt wurde, ist ein spezifischer und quantitativer Nachweis von Zielsequenzen möglich. Im Vergleich zur Endpunkt-PCR, bei der DNA-Produkte nur qualitativ nachgewiesen werden können, ermöglicht die quantitative Realtime-PCR auch Aussagen über die Ausgangs-DNA-Mengen.

Das Prinzip der Quantifizierung bei der Realtime-PCR beruht darauf, dass ein fluoreszierender Reporterfarbstoff, in diesem Fall SYBR[®]Green, verwendet wird. Der Vorteil von SYBR[®]Green liegt in der universellen Verwendbarkeit, da es sich wie EtBr in Doppelstrang-DNA einlagert und in jeder beliebigen PCR eingesetzt werden kann. Hierbei verhält sich die Fluoreszenzintensität proportional zur gebildeten DNA-Menge bzw. Sequenzlänge.

Die Quantifizierung der PCR basiert hierbei auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten „Threshold Cycle“ oder C_T -Wert. Der C_T -Wert ist dabei derjenige Wert, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Da die Anzahl der Zyklen, die bis zum Überschreiten des Schwellenwertes benötigt werden (C_T -Werte) direkt proportional zur Anzahl der Anfangskopien in der Probe sind, kann durch einen Vergleich mit Proben bekannter Konzentration die Kopienzahl einer Zielsequenz in der Ausgangslösung ermittelt werden.


Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primerdimeren ist im Anschluss an die PCR mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse möglich. Aufgrund der Schmelztemperaturen kann man zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren unterscheiden, da Primerdimere bei geringeren Temperaturen schmelzen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte.

Mit Hilfe der Realtime-PCR sollte analysiert werden, in welcher Kopienzahl das *mdm2*-Gen in verschiedenen Zelllinien vorlag. Neben dem zu untersuchenden *mdm2*-Primer wurde von jeder Zelllinien-DNA-Probe auch eine PCR mit einem sog. „single copy gene“ durchgeführt. Dabei handelte es sich um das *gapdh*-Gen. Die Quantifizierung erfolgte, indem die Differenz aus dem C_T -Werte des *gapdh*-Gens und dem C_T -Wert des zu untersuchenden *mdm2*-Gens gebildet wurde.

Für die Realtime-PCR wurde ein SYBR[®]Green-Kit (Applied Biosystems) verwendet. Die Primer wurden mit Hilfe der *Primer Express 2.0* Software (Applied Biosystems) ausgewählt (Tabelle 2-11). Pro Zelllinien-DNA wurde mit Dreifachansätzen gearbeitet, zusätzlich wurde

sowohl für die *mdm*-Primer als auch für die *gapdh*-Primer eine Negativkontrolle („no-template-control“, NTC) angesetzt, die als Kontrolle für Primerverunreinigungen diente.

Zuerst wurde in Eppendorf Reaktionsgefäßen jeweils ein **mdm2**-bzw. **gapdh-Mastermix** aus allen Reagenzien mit Ausnahme der DNA erstellt (siehe Tabelle 2-12). Dieser wurde gevortext und abzentrifugiert. Anschließend wurde für jede Zelllinie die entsprechende Menge DNA für den Dreifachansatz ebenfalls in Eppendorfgefäße gegeben (Submastermix), gevortext und abzentrifugiert. Pro Ansatz wurden dann jeweils 50 µl in ein Well der „96-Well Optical Reaction Plate“ (Applied Biosystems, Nr. 4306737) pipettiert. Die Platte wurde mit einer optischen Folie verschlossen (Applied Biosystems) und in einer Heraeus Minifuge RF bei 3000 U/min für 5 min zentrifugiert. Die Platte wurde dann in den Heizblock des ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) gestellt. Das Programm der zweistufigen PCR lief nach dem nachfolgenden Temperaturprofil ab:

1.Schritt:	10:00 min	95 °C	Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA Polymerase	
2.Schritt:	0:15 min	95 °C	Denaturierung	
3.Schritt:	1:00 min	60 °C	Primeranlagerung und Verlängerung	 40 x
4.Schritt:	∞	4 °C		

Nach dem Ablauf des Programms wurden die von der Software aufgezeichneten Daten wie oben beschrieben ausgewertet. Zusätzlich wurde der Versuch durch die mitlaufenden Leerwerte (NTC) kontrolliert.

Tabelle 2-11: Primersequenzen für die *mdm2*-Realtime-PCR.

Primernamen	Sequenz
<i>mdmtaq.up</i>	5' TAG CAG TTC TTT TCT CTT TAT AGG TTA GAC C 3'
<i>mdmtaq.low</i>	5' TGC ACC AAC AGA CTT TAA TAA CTT CAA 3'
<i>gapdh.up</i>	5' GAC CAC TTT GTC AAG CTC ATT TCC 3'
<i>gapdh.low</i>	5' GAC CCT GCA CTT TTT AAG AGC C 3'

Tabelle 2-12: PCR-Bedingungen für die für die mdm2-Realtime-PCR.

PCR-Mix		
Reaktionsansatz	mdm2-Mix	gapdh-Mix (Kontrolle)
SYBR [®] Green-Mastermix	250 µl	250 µl
mdmtaq.up-Primer (5 µM)	30 µl	-
mdmtaq.low-Primer (5 µM)	30 µl	-
gapdh.up-Primer (5 µM)	-	30 µl
gapdh.low-Primer (5 µM)	-	30 µl
H ₂ O	180 µl	180 µl
Summe (10fach-Ansatz)	490 µl	490 µl
	+ Zugabe von je 1 µl Gesamt-DNA (100 ng) pro Ansatz	

2.2.12 Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP)-Analyse

Die Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (single-stranded conformation polymorphism)-Analyse ist charakterisiert durch den Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität zwischen einem mutierten und einem unmutierten Fragment in neutralen Polyacrylamidgelen. Die veränderte elektrophoretische Mobilität entsteht durch eine Konformationsänderung eines einzelsträngigen DNA-Fragmentes bedingt durch einzelne Basenaustausche.

Für die SSCP-Analytik wurden 8%ige nicht-denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Vor der Auftragung aufs Gel wurden die doppelsträngigen Fragmente 5 min bei 94°C erhitzt, um die Stränge voneinander zu trennen. Aufgetragen wurden jeweils 2µl Amplifikat der entsprechenden atm-PCR (siehe 2.2.11.1.1) und 5µl Ladepuffer (siehe 2.1.3.2). Die Elektrophorese erfolgte für 2,5-3 Stunden bei 600 V in einer vertikalen Elektrophoresekammer (PROTEAN II von Biorad). Anschließend erfolgte die Silberfärbung der Gele (siehe 2.1.3.2), um die DNA sichtbar zu machen.

2.2.13 Zellkultur von humanen Zelllinien

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37°C, 5% CO₂-Konzentration in der Luft und 90% Luftfeuchtigkeit im Inkubator (Heraeus) kultiviert. Als Nährmedien dienten je nach Zelllinie (siehe 2.1.2) Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)-1640 und Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM). Diesen Grundmedien wurden je nach den Ansprüchen der Zelllinien 10 bis 15% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS, Biochrom oder Invitrogen) zugesetzt. Die Zellen wurden dem Medienvolumen und der Zellzahl

entsprechend in Kulturgefäßen unterschiedlicher Größe inkubiert: 25 cm² Flaschen (EasY Flask, Nunc) für ein Volumen von 5-8ml, für größere Zellmengen erfolgte die Kultivierung in 75 cm² (EasY Flask, Nunc) bzw. 185 cm² Schräghalsflaschen (Nunclon Flask, Nunc), deren Deckel zum Gasaustausch leicht geöffnet wurden.

Das Medium wurde je nach Proliferation bzw. Stoffwechselaktivität der Zellen nach 2 bis 5 Tagen erneuert. Um die Zellzahl bei Suspensions-Zelllinien konstant zu halten, wurde der gut gemischten Zellsuspension ein Teil entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Zur Expansion der Zellkultur ließ man die Zellen sedimentieren, entfernte vorsichtig verbrauchtes Medium und ersetzte es durch frisches Medium oder man überführte die Zellen in ein größeres Kulturgefäß.

Auf dem Kulturgefäßboden adhärierende Zellen wurden unter Einwirkung von Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA) abgelöst. Das Medium wurde aus der Kulturflasche abgesaugt und die konfluent gewachsenen Zellen wurden zweimal mit PBS (BioWhittaker) gewaschen. Dann wurde eine entsprechende Menge (0,5 ml bei einer 25 cm²-Kulturflasche) auf die Zellen gegeben und deren Ablösen unter dem Mikroskop verfolgt. Durch vorsichtiges Schlagen der Flasche an eine Kante wurden die Zellen vollständig von der Oberfläche abgelöst. Danach wurde das Trypsin durch Zugabe von PBS verdünnt und die Zellen bei 1000 U/min für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in neuem Medium aufgenommen und in ein neues Kulturgefäß entsprechender Größe überführt.

2.2.14 Western Blot

Beim Western Blot werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran überführt, immobilisiert und dort einer Nachweisreaktion unterzogen. Die Methode wurde entwickelt, um den Nachweis eines gewünschten Proteins (Antigens) mit dem zugehörigen Antikörper zu ermöglichen [165].

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gelelektrophoresis) angewandt. Durch den Zusatz des anionischen SDS zum Probenpuffer wird gewährleistet, das aufgrund seiner denaturierenden Wirkung Konformationsunterschiede zwischen den Proteinen aufgehoben werden und alle Proteine eine negative Nettoladung erhalten. In den Experimenten wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen gearbeitet, so dass im Auftragspuffer für die Proben kein 2-Mercaptoethanol enthalten war.

Es wurden jeweils 50 µg Zelllysate mit einem nicht reduzierenden 4fach Probenpuffer (Roti Load 2, Roth) versetzt, die Proben 5 min bei 95°C denaturiert und mit Hilfe einer Hamilton Spritze in die Geltaschen eines 10% NuPage Bis-Tris Gels (Invitrogen) pipettiert. Zusätzlich zu den Proben wurde ein geeigneter Größenstandard auf das Gel aufgetragen (Full Range Rainbow Marker RPN 800 von Amersham Biosciences). Die Elektrophorese fand bei 150 V im Eisbad in einer mit Elektrophoresepuffer (siehe 2.1.3.3) gefüllten XCell *SureLock* Elektrophoresekammer (Invitrogen) statt (Power Supply ST 606 T, Gibco BRL). Nach erfolgter Elektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Proteinmembran (Hybond P, Amersham Biosciences). Der Transfer mit dem entsprechenden Transferpuffer (siehe 2.1.3.3) erfolgte in der XCell *SureLock* Blot Unit von Invitrogen für eine Stunde bei 30V im Eisbad. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer (2.1.3.3) geschüttelt. Dadurch wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Membran mit dem Milchpulver gesättigt, um eine Bindung der Nachweisreagenzien zu vermeiden. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Anti-mdm2-Antikörper (MDM2 SMP14; Santa Cruz, Verdünnung 1:50) bzw. gegen das p53-Protein als Kontrolle (Do7; Dako, Verdünnung 1:750) bei 4°C über Nacht im entsprechenden Antikörperverdünnungsmedium (siehe 2.1.3.3). Anschließend wurden die Membranen dreimal für 10 Minuten mit PBS-T (siehe 2.1.3.3) gewaschen, bevor die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus-IgG, Amersham Bioscience, Verdünnung 1:10.000) für eine Stunde bei Raumtemperatur erfolgte. Abschließend wurden die Membranen noch für dreimal 10 Minuten in PBS-T gewaschen.

Die Detektion der Banden erfolgte über eine Chemolumineszenzreaktion mit den ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers. Die Exposition der Membranen erfolgte für einige Minuten bis zu mehreren Stunden mit dem HyperFilmTMECLTM (Amersham Biosciences).

2.2.15 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford-Assay)

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde der Standard Assay von Bradford [166] angewandt. Als Standard diente eine Konzentrationsreihe von BSA (0,1-1 mg/ ml) in dem Lysispuffer (Promega), in dem auch die Proben vorlagen. Als Nullwert diente Puffer. Alle Ansätze wurden doppelt hergestellt. Je 10 µl Puffer, Probe oder Standard wurden zu 200 µl Bradford Reagenz (1:5 verdünnt mit Aqua dest., BioRad) gegeben. Die Ansätze wurden gut durchmischt, 5-60 min stehen gelassen und dann luftblasenfrei in die Vertiefungen einer

Mikrotiterplatte (NUNC) mit planarem Boden überführt. In einem ELISA Reader (MRX, Dynex Technologies) wurde die OD bei 580 nm gemessen und die Proteinkonzentrationen anhand der Standardreihe ermittelt (Revelation Software von Dynatec Corporation).