

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zelllinien und Zellkulturen

2.1.1 Zelllinien

Als Positivkontrollen wurde eine Maus-Nierenzellkarzinom-Zelllinie (RENCA) [Murphy und Hrushesky 1973] verwendet.

2.1.2 Zellkulturen

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte als Monolayer-Kulturen in 75 cm³ Zellkulturflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark) bei 37°C und 5 % CO₂. Als Kulturmedium wurden Minimum Essential Medium Eagle (MEM) mit 10 % fötalem Kälberserum, 2 % L-Glutamin, 7,5 % Natriumbikarbonat und 1 % Penicillin-Streptomycin verwendet (Gibco, Paisley, England).

Die Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz (ein- bis zweimal pro Woche) mit Trypsin-EDTA (0,05 % /0,02 % (w/v)) abgelöst und in einer Ausgangskonzentration von 2-10 x 10⁴ Zellen je ml passagiert.

2.2 Proben von Patienten und Probanden

Gewebeproben von 52 Patienten mit Tumoren im Bereich der Niere und von 52 normalen Nierengeweben wurden aus Operationspräparaten der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin gewonnen. Die normalen Nierengewebe wurden ebenfalls aus den tumorbefallenen Nieren entnommen, jedoch in möglichst großem Abstand vom Tumor.

Die histologische Klassifikation der 52 Nierentumoren ergab 44 maligne und 8 benigne Tumoren. Die untersuchten malignen Nierentumore unterteilten sich in 40 Nierenzell-

karzinome und 4 Urothelkarzinome der Niere. Die untersuchten benignen Nierentumore waren 4 Onkozytome und 4 Angiomyolipome.

Zur Vermeidung von RNA-Degradation und Denaturierung der Telomerase wurden sämtliche Proben innerhalb von 15 Minuten aufgearbeitet. Zur histologischen Kontrolle wurden 6µm-dicke Gefrierschnitte direkt oberhalb und unterhalb der zur Telomerase-Extraktion verwendeten Gewebeanteile angefertigt und histologisch klassifiziert. Um eine eventuelle Heterogenität innerhalb des jeweiligen Tumors zu vermeiden, wurden Proben aus unterschiedlichen Tumorarealen untersucht. Dadurch konnte eine eindeutige Beurteilung der untersuchten Gewebeproben gewährleistet werden.

2.3 Aufarbeitung der Proben

2.3.1 CHAPS-Extraktion

Die 15µm-dicken Gefrierschnitte der Gewebeproben wurden entsprechend der von Kim et al. beschriebenen Methode für 30 Minuten größenabhängig in 200-2000 µl Lyse-Puffer (10mM TrisHCl [pH 7,5]; 1mM MgCl₂; 1mM EGTA; 0,1mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 5mM β-Mercaptoethanol; 0,5 % CHAPS; 10 % Glycerol) inkubiert.

Danach wurde bei 100 000 x g und 4°C 30 Minuten zentrifugiert (Beckman Optima™ TLX Ultrazentrifuge). Das Pellet wurde verworfen. Im Überstand wurde der Proteingehalt bestimmt.

Anschließend wurde das Lysat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert [Kim N.W. et al. 1994].

2.3.2 Proteinbestimmung

In den durch CHAPS-Extraktion gewonnenen Lysaten wurde der Proteingehalt mittels Biuret-Methode bestimmt. Es wurde ein Standard mitgeführt und die Absorption des Standards sowie der Analyseprobe gegen Biuretreagenz gemessen. Diese Biuret-Methode

wurde mittels Bio-Rad Protein DC Protein-Assays (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Die photometrische Messung erfolgte am Gerät Dynatech MR5000 (Dynex, Denkendorf, Deutschland).

2.4 Nachweis der Telomeraseaktivität

2.4.1 Telomeric repeat amplification protocol (TRAP-Assay)

Zum Nachweis der Telomerase-Aktivität entwickelten Kim et al. ein auf der Polymerase Chain Reaktion (PCR)-basierendes Verfahren, welches als TRAP (telomeric repeat amplification protocol)-Assay bezeichnet wird [Kim N.W. et al. 1994]. Der TRAP-Assay besteht aus zwei Schritten (siehe Abbildung 5):

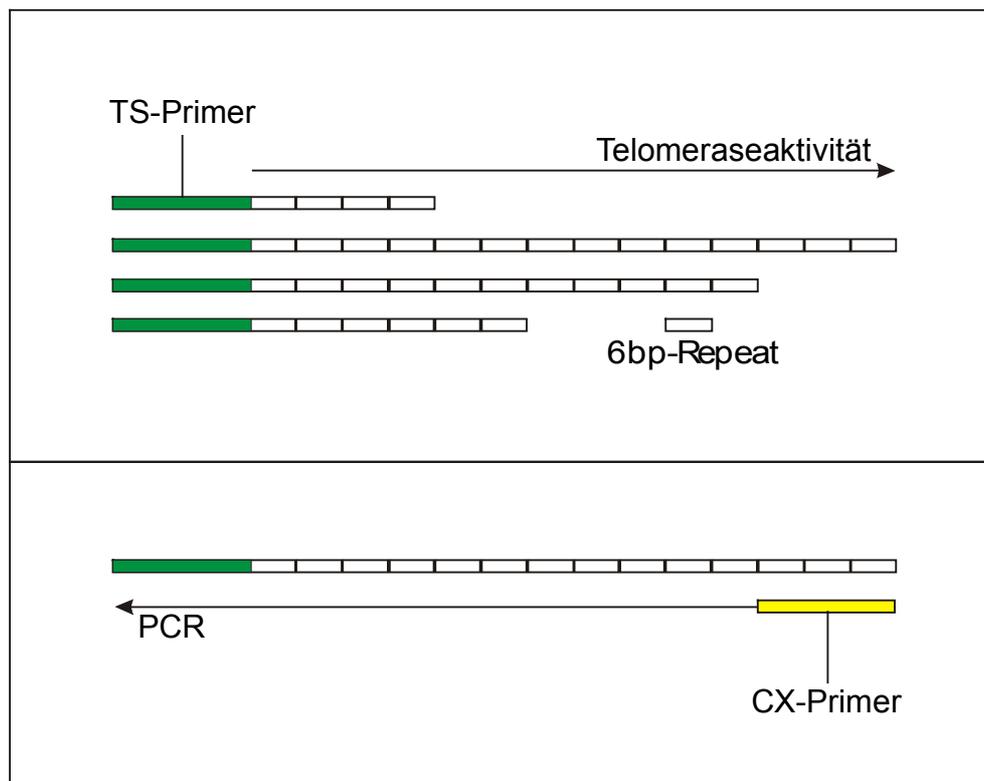
Im ersten Schritt (Elongationsschritt) wird ein künstliches Substrat (TS-Primer: AATCCGTCGAGCAGAGTT), welches homolog zu der an den Telomeren vorliegenden Sequenz ist, bei vorhandener Aktivität des Enzyms Telomerase verlängert (siehe Abbildung 5A). Intakte Enzymaktivität ist also eine Grundvoraussetzung, so daß der TRAP-Assay nur an frischem oder gefrorenem, nicht jedoch an in Paraffin eingebettetem Material durchgeführt werden kann.

Der zweite Schritt wird als Amplifikationsschritt bezeichnet. Dieser umfaßt die PCR zum Nachweis der neusynthetisierten telomerspezifischen Sequenzen durch Zugabe eines zweiten, für die repetitive Telomersequenz spezifischen CX-Primers (CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA) (siehe Abbildung 5B). Die Sequenz des CX-Primers oder von Varianten des CX-Primers [Kim N.W. et al. 1997a; Krupp et al. 1997] sind mit der Telomersequenz nicht vollständig identisch, um u.a. Primer-Dimere zu reduzieren.

Da die Telomerase repetitive Telomersequenzen synthetisiert, hat der CX-Primer mehrere Möglichkeiten der Anlagerung. Je nachdem, an welchem Telomerstück sich der CX-Primer anlagert, werden Fragmente unterschiedlicher Länge amplifiziert. Aufgrund der Repeatlänge von 6 Basen beträgt auch der Längenunterschied der Amplifikate jeweils 6 Basenpaare.

Abbildung 5: TRAP-Assay

- A (oben): Erster Schritt, bei dem bei vorhandener Telomeraseaktivität telomer-spezifische Sequenzen an den TS-Primer synthetisiert werden.
- B (unten): Zweiter Schritt, bei dem die telomerspezifischen Sequenzen mittels PCR amplifiziert werden.



Zur Durchführung des TRAP-Assays wurden 10 μg , 1 μg und 0,1 μg Proteinkonzentrationen der Proben aus der CHAPS-Extraktion in 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,3), 1,5 mM MgCl_2 , 63 mM KCl, 0,0005 % Tween-20, 1 mM EGTA, 50 μM dNTPs, 0,1 μg TS Oligonukleotid, 1 μg T4g32 Protein (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) und 0,1 mg/ml BSA bei 25°C für 30 Minuten inkubiert. Als Negativkontrollen wurde jeweils eine entsprechende Probe mit 1 μg RNase inkubiert sowie Leerproben mit Lyse-puffer bzw. H_2O untersucht. Zur Amplifikation wurden danach pro 50 μl Probenvolumen 2,5 U Taq-DNA-Polymerase (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland) und 0,1 μg CX

Oligonukleotide hinzugefügt und 30 PCR-Zyklen (94°C für 30 sek., 50°C für 30 sek. und 72°C für 90 sek.) in einem Thermocycler (TC9600, Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt.

Zum Nachweis von möglichen Inhibitoren der Taq-Polymerase wurde je Probe 5 pmol eines 200 Basenpaare langen, internen Standards (ITAS) verwendet. Dieser ITAS wurde von Dr. Thomas Emrich (Roche Biochemicals, Penzberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt und besteht aus der Sequenz des CAT Gens nt(4620-4790), die wiederum aus pSV2CAT erhalten wurde. Die flankierenden Enden des ITAS entsprechen den von Kim et al. publizierten Primern [Kim N.W. et al. 1994]. In seiner Funktion entspricht der ITAS dem von Wright et al. publizierten 150 Basenpaare umfassenden internen Standard [Wright et al. 1995].

Kim et al. verwendeten zum Nachweis der Amplifikate eine radioaktive Methode. Durch Einsatz von α -³²P markierten dGTPs bzw. dCTPs erfolgte die Detektion mittels Elektrophorese auf einem 15 % Polyacrylamidgel und Phosphorimager [Kim N.W. et al. 1994].

Zum nicht-radioaktiven Nachweis der TRAP-Produkte wurde die Methode modifiziert und die Primer mit Fluorochromen endmarkiert. Zwei nicht-radioaktive Nachweismethoden wurden etabliert. Zum einen die Analyse mittels 6-FAM CX-Primer und Auswertung mittels eines automatischen Sequenzierers, zum anderen mittels Biotin-markiertem TS-Primer und Auswertung mittels Telomerase-PCR-ELISA. In ihrer Sensitivität und Spezifität entsprechen die nicht-radioaktiven Nachweismethoden der radioaktiven Methode [Müller et al. 1996; Ohyashiki et al. 1996].

2.4.2 Detektion der TRAP-Produkte

2.4.2.1 Detektion der TRAP-Produkte mit GeneScan-Fragmentanalyse

Zum nicht-radioaktiven Nachweis der PCR-Produkte mittels GeneScan-Fragmentanalyse wurde ein mit 6-FAM (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland) markierter CX-Primer verwendet. 6-FAM ist ein fluoreszierendes Amidit. Die fluoreszenz-markierten Amplifikationsprodukte wurden auf einem Sequenziergel eines ABI PrismTM 377 DNA Sequenzierers (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland) mittels Elektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde ein 4,5 % iges Polyacrylamidgel / 6M Harnstoff verwendet.

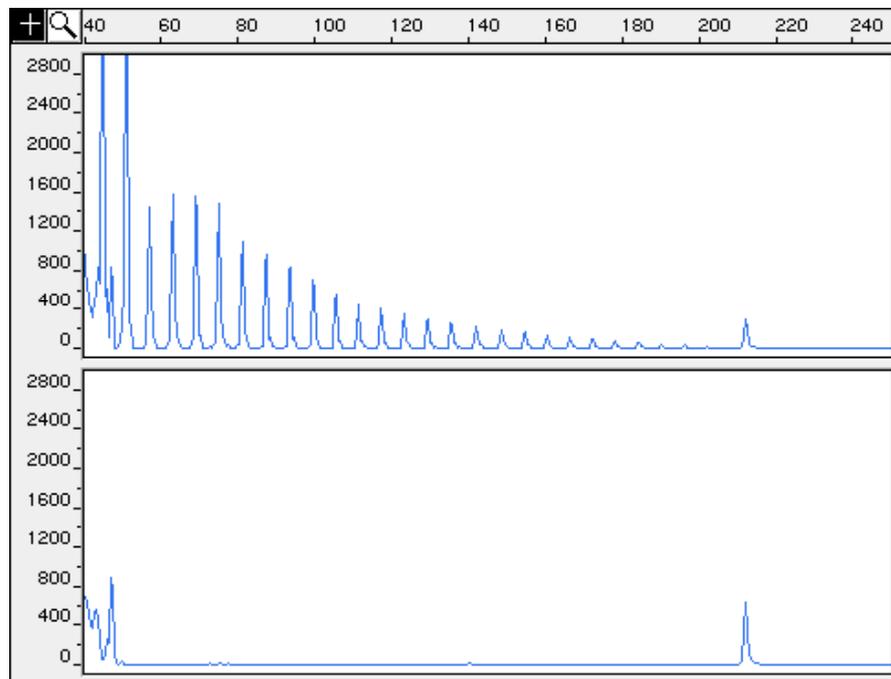
Die anschließende Auswertung erfolgte durch die GeneScan Analyse Software (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland).

Telomerase-positive Proben zeigten bei der GeneScan-Analyse die charakteristische 6 bp-Leiter (Abbildung 6A). Die mit RNase behandelten Proben und die verwendeten Leerproben (Lysierpuffer bzw. H₂O) zeigten keine 6 bp-Leiter (Abbildung 6B).

Der verwendete interne Standard diente als Kontrolle der PCR-Reaktion und führte zu einer Bande bei 200 Basenpaaren. Bei Vorliegen von Taq-DNA-Polymerase-Inhibitoren werden weder die Telomerase-Elongationen noch der Standard amplifiziert. Nur Proben mit korrekt amplifiziertem internen Standard und ohne 6 bp-Leiter wurden als Telomerase-negativ gewertet.

Abbildung 6: GeneScan-Fragmentanalyse der TRAP-Produkte

- A (oben): Repräsentative Probe mit nachweisbarer Telomeraseaktivität. Die Fluoreszenzkurve zeigt die typische 6 bp-Leiter zum Nachweis der Telomeraseaktivität. Die Bande bei 200 bp stellt den internen Standard (ITAS) dar.
- B (unten): Probe ohne nachweisbare Telomeraseaktivität. Es liegt ein korrekt amplifizierter interner Standard (ITAS) bei 200 bp vor. Es gibt daher keinen Anhaltspunkt für mögliche Inhibitoren der Taq-Polymerase.



2.4.2.2 Detektion der TRAP-Produkte mit Telomerase-PCR-ELISA

Ebenfalls zum nicht-radioaktiven Nachweis der PCR-Produkte wurde der Telomerase-PCR-ELISA (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) verwendet. Dazu wird ein Biotin-markierter TS-Primer eingesetzt. Ein Aliquot des PCR-Amplifikates wird durch Zugabe von Denaturierungsreagenz denaturiert und mit einer Digoxigenin-markierten Sonde hybridisiert, die spezifisch für die Telomerasequenzen ist. Während einer zweistündigen Inkubationszeit bindet das entstehende Produkt über die Biotin-markierten Primer an eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte und läßt mit Hilfe eines Peroxidase-konjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörpers über eine Substratreaktion (TMB) ein farbiges Produkt entstehen. Dieses wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen (Dynatech MR5000, Dynex, Denkendorf, Deutschland).

Telomerase-positive Proben und Positivkontrollen zeigten im Telomerase-PCR-ELISA eine Absorption [$A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$] zwischen 50 und 2500. Die Telomerase-negativen Proben und die Negativkontrollen ergaben eine Absorption [$A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$] von unter 30.