

2. Materialien und Methoden

2.1. Zellkultur

Die humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagles Medium, Cambrex) unter Zugabe von 10% FCS (fetal calf serum) und 0,4 mM L-Glutamin bei 37°C in kontrollierter 5%-CO₂-Atmosphäre angezüchtet. Die sieben humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien MDAH 2774, OVCAR-3, CAOVI-3, SK-OV-3, PA-1, ES-2 und A27/80 wurden verwendet. Mit Ausnahme der Zelllinie A27/80 wurden alle anderen Zelllinien von der ATCC (American Type Culture Collection) bezogen. Ebenfalls unter den oben genannten Bedingungen wurde die humane Melanom-Zelllinie SKMEL 28 gezüchtet. Sie sollte als Positiv-Kontrolle für die *MUC18* Expression dienen. Das Nährmedium für die humane Ovarialepithel-Zelllinie HOSE (human ovarian surface epithelium; Tsao *et al.*, 1995) war eine Zusammensetzung aus MCDB 104 (GIBCO-BRL) und Medium 199 (Sigma) im Verhältnis 1:1 unter Zugabe von 10% FCS und 0,4 mM L-Glutamin.

Die Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen und -schalen der Firma Falcon angezüchtet. Je nach Wachstum wurde das Nährmedium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach Heranwachsen der Zellen zu einer 70%–80%igen Konfluenz erfolgte das Ablösen und Verteilen auf mehrere Kulturflaschen. Hierfür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 2 ml 0,5% Trypsin (BDMA) gewaschen und anschließend mit 2 ml 0,5% Trypsin 5min bei 37°C inkubiert. Die so abgelösten Zellen wurden mit der vierfachen Menge Medium versetzt, um das Trypsin zu inaktivieren und dann auf neue Kulturgefäße verteilt.

Der MEK-Inhibitor PD098059 (Dudley, Pang *et al.*, 1995; Alexis) diente zur Unterbrechung der Signalkaskade RAF/MEK/ERK. Der Inhibitor wurde mit einer Konzentration von 50mM in DMSO gelöst. Alle Zelllinien, mit Ausnahme der HOSE-Linie, wurden für 48h mit gelöstem PD098059 in einer Endkonzentration von 50µM behandelt und anschließend daraus Gesamt-RNA isoliert.

Zur Unterbrechung des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges wurde der PI-3-Kinase-Inhibitor LY294002 (Vlahos *et al.*, 1994; Alexis) verwendet, der in einer Konzentration von 10mM in Ethanol gelöst war. Es wurden ebenfalls alle Zelllinien, mit Ausnahme der HOSE-Linie, für 48h mit gelöstem LY294002 in einer Konzentration von 10µM behandelt und dann daraus Gesamt-RNA isoliert.

2.2. RNA-Präparation

Die Isolation der Gesamt-RNA der Zellen erfolgte nach der sauren Phenol-Methode von Chomczynski (Chomczynski und Sacchi, 1987). Zellen wurden bis zu einer 70%–80%igen Konfluenz angezüchtet, das Medium entfernt, die Zellen mit 5ml 1x PBS gewaschen, anschließend mit 1,8ml Lösung „D“ lysiert und sofort mit einem sterilem Schaber abgekratzt. Das Lysat wurde in ein 13ml Polypropylenröhrchen (Sarstedt) überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Nach langsamen Wiederauftauen wurde zu den ca. 4ml Lysat 400 μl 3M Natrium-Acetat pH 4,0, 4ml wassergesättigtes Phenol und 1,6ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) pipettiert, durch mehrmaliges Schwenken des Röhrchens die Suspension gemischt und anschließend 15min auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung wurde die Probe zentrifugiert (Beckman Avanti J-25, Rotor JS-13.1, 9000rpm, 20min, 4°C). Unter Zurücklassung der Interphase (DNA) wurde die wässrige Oberphase abpipettiert, mit 1 Volumenanteil Isopropanol versetzt, kräftig gemischt (Vortex), 30min bei -20°C gefällt, zentrifugiert (Beckman Avanti J-25, Rotor JS-13.1, 11000 rpm, 20min, 4°C) und der Überstand entfernt. Das entstandene Pellet wurde mit 2ml 80% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (Beckman Avanti J-25, Rotor JS-13.1, 11000rpm, 10min, 4°), 5min getrocknet, in 700 μl Lösung „D“ resuspendiert und in sterile 1,5ml Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend erfolgte eine zweite Isopropanolfällung mit 1 Volumenanteil Isopropanol, 30min bei -20°C , Zentrifugation (Eppendorf 5417R, 14000rpm, 20min, 4°C), Waschen mit 1ml 80% Ethanol und erneute Zentrifugation (Eppendorf 5417R, 14000rpm, 10min, 4°C). Das getrocknete Pellet wurde, je nach Größe, in 50 bis 150 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ gelöst. Hierzu musste die Probe 4min auf 50°C erwärmt, dabei mehrmals gründlich geschüttelt und anschließend auf Eis abgekühlt werden.

Um eine mögliche Degradation und DNA-Verunreinigung der isolierten RNA zu kontrollieren, wurde eine Gel-Elektrophorese mit 1 μl der gelösten RNA durchgeführt (siehe Punkt 2.3.). Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit erfolgte photometrisch bei 260nm und 280nm. Die RNA-Konzentration wurde gemäß $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 40 \mu\text{g/ml}$ berechnet, die Reinheit anhand des Quotienten aus $\text{OD}_{260 \text{ nm}} / \text{OD}_{280 \text{ nm}}$ abgeschätzt, wobei dieser Wert 1,6 nicht unterschreiten sollte. Die isolierten RNA-Proben wurden bis zur weiteren Nutzung bei -80°C gelagert.

$\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$: Aqua bidest mit 0,1% DEPC versetzt, über Nacht stehen gelassen und anschließend autoklaviert

Lösung D:	4M	Guanidiniumthiocyanat
	25 mM	NaCitrat
	0,5%	Sarcosyl
	0,7%	β-Mercaptoethanol (nach dem Autoklavieren jeweils direkt vor Verwendung zugegeben)

Die Lösung D wurde mit H₂O_{DEPC} angesetzt und vor der Zugabe von 0,7% β-Mercaptoethanol 20min bei 120°C autoklaviert.

2.3. Northern Blotting

Es wurden je 10µg der RNA-Proben im Verhältnis 1:3 mit dem Ladepuffer gemischt und 10min bei 65°C denaturiert, 1min auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Nach dem Auftragen der Proben auf das Gel (0,8% Agarose, 1x MOPS, 2% Formaldehyd) wurden diese für 2h bei 50V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend über UV-Licht fotografiert und 10min in 5x SSC equilibriert. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: Eine Glasplatte wurde auf ein mit 20x SSC gefülltes Gefäß gelegt und mit einer Filterpapierbahn bedeckt. Die Enden des Filterpapiers ragten über die Glasplatte hinaus in den Transferpuffer (20x SSC). Darauf wurde das Gel mit den Taschen nach unten platziert. Die in 2x SSC vorgeweichte Nylonmembran (Schleicher & Schell® in Gel-Größe) wurde auf das Gel gelegt, mit 4 Lagen Filterpapier (ebenfalls in Gel-Größe) und einem ca. 7cm hohen Stapel Zellulose überschichtet und beschwert. Die Kontaktflächen zwischen Filterpapier, Gel und Membran wurden gründlich blasenfrei gestrichen. Um eine Kurzschlussdiffusion am Gel vorbei zu vermeiden, wurde es sorgfältig mit Klebefolie rundherum abgedichtet. Die Transferdauer betrug 16h. Anschließend wurde die Nylonmembran kurz in 2x SSC gewaschen und die RNA auf der Membran unter UV-Licht fixiert, dann in Folie eingeschweißt und bei -20°C aufbewahrt.

RNA Ladepuffer (2 ml) :	0.35 ml	H ₂ O _{DEPC}
	0.21 ml	10 x MOPS
	0.35 ml	Formaldehyd
	0.96 ml	deionisiertes Formamid
	0.13 ml	80% Glycerol
	10 µl	gesättigte Bromphenolblau-Lösung

2 µl

Ethidiumbromid

2.4. Nothern Hybridisierung

2.4.1. Gewinnung der cDNA-Sonden

Das cDNA-Fragment der kodierenden Region von *HREV 107-2* (Husmann *et al.*, 1998) stand von Beginn an zur Verfügung und konnte so direkt zur Hybridisierung genutzt werden.

Die 3,58kb große cDNA von *MUC18* stand in Verbindung mit dem Vector PUC18 zur Verfügung. Für die spätere Nothern Hybridisierung musste die *MUC18* cDNA mit dem Restriktionsenzym Eco RI aus dem Vector herausgeschnitten werden (siehe Abbildung 1). Die Restriktionsenzyme und die zugehörigen Puffer wurden von Roche bezogen.

Reaktionsansatz:	30µl	PUC18/ <i>MUC18</i>
	9µl	destilliertes H ₂ O
	6µl	Puffer H
	15µl	ECO RI

Der Ansatz wurde 5h bei 37°C inkubiert und dann mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Die 3,58kb große Bande wurde über UV-Licht ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert. Die so erhaltene *MUC18* cDNA ist jedoch für die Hybridisierung zu groß, so dass nachfolgend ein kleineres Fragment aus der cDNA ausgeschnitten werden musste. *MUC18* besitzt insgesamt 4

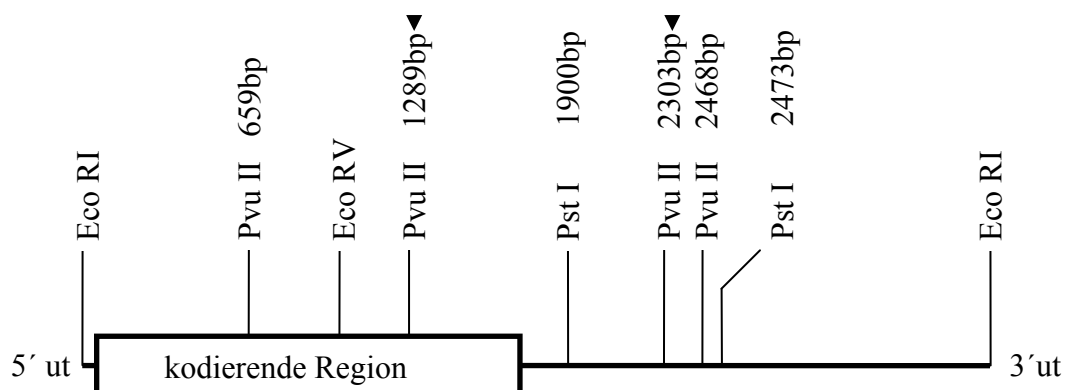


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Restriktionskarte von *MUC18*. Enthalten sind nur die Schnittstellen der Enzyme, die in dieser Arbeit verwendet wurden: Eco RI, Eco RV, PvuII und Pst I. Die Pfeile zeigen die PvuII-Schnittstellen, welche zur Gewinnung der Sonde verwendet wurden. ut = untranslatiert

Schnittstellen für Pvu II, wobei zwischen den Schnittstellen bei 1289bp und 2303bp ein ca. 1kb großes cDNA-Fragment liegt, welches sich zur Hybridisierung eignet. Der Ansatz (siehe unten) wurde 2h bei 37°C inkubiert und anschließend das 1kb große Fragment durch eine Gelextraktion isoliert. Durch einen Test-Verdau des Fragmentes mit Pst I in Puffer H wurde bestätigt, dass es sich um das erwünschte Fragment handelt.

Reaktionsansatz:	10µl	<i>MUC18</i> cDNA
	3µl	destilliertes H ₂ O
	2µl	Puffer M
	5µl	Pvu II

2.4.2. DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Um DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen zu isolieren, wurde ein Gel-Extraktions-Kit von Qiagen verwendet. Das entsprechende DNA-Fragment musste über einer UV-Durchlichtlampe ausgeschnitten und in ein steriles 2ml Eppendorf-Gefäß gegeben werden. Nach genauem Auswiegen wurden 300µl QX1 Puffer pro 100mg Gel in das Gefäß pipettiert und gemischt (Vortex). 30µl Silica-Gel Suspension wurden zugegeben und unter mehrmaligem Mischen 10min bei 50°C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit konnte das Gel schmelzen, die DNA so an die Silica-Kügelchen binden und anschließend bei Raumtemperatur abzentrifugiert (Eppendorf 5415C, 14000rpm, 30sec) werden. Das Pellet wurde dann in 500µl QX1 Puffer resuspendiert, 30sec abzentrifugiert, in 500µl PE Puffer resuspendiert, ebenfalls abzentrifugiert und dann 5min getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 50µl EB Puffer, der die DNA von den Silica-Kügelchen ablöst, gelöst und zentrifugiert. Nun konnte der Überstand, der die DNA enthält, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt werden.

2.4.3. Radioaktive Markierung der Sonden

Für die radioaktive Markierung der cDNA-Sonden wurde das „Nick Translation System“ von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Zur Konzentrationsbestimmung der Sonden wurde zu Beginn eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dabei erfolgte die Auftrennung der Sonden parallel mit einem „Smartladder“ (Eurogentel, Belgien), der Fragmente in definierten Konzentrationen enthält. Anhand der Helligkeit der einzelnen Banden konnte die Konzentration

der Sonden abgeschätzt werden. Etwa 50ng einer Sonde wurden dann mit $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP radioaktiv markiert.

Reaktionsansatz:	ca. 50ng	Sonde
	10 μl	Nucleotide/buffer solution
	5 μl	Enzym solution
	x μl	steriles H ₂ O bis zu einem Volumen von 45 μl
	5 μl	$\alpha^{32}\text{P}$ dCTP

Der Ansatz wurde 2h bei 15°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit konnten die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide durch Zentrifugation über eine MicroSpin™ G-50 Säule (nach Protokoll des Herstellers) entfernt werden. Die spezifische Aktivität der markierten cDNA lag zwischen 1×10^7 und 8×10^8 cpm/ μg .

2.4.4. Hybridisierung

Zur Hybridisierung der Northern Blots wurde der Puffer ExpressHyb (Clontech) unter Zugabe von 100ng/ml tRNA zur Blockierung unspezifischer Bindungen verwendet. Der zu hybridisierende Blot wurde aufgetaut, mit destilliertem H₂O angefeuchtet und in eine Hybridisierungsflasche (NeoLab) überführt. Je nach Flaschengröße wurden 15 bzw. 30ml des auf 64°C vorgewärmten ExpressHyb Puffers in die Flasche gegeben. Die Blots wurden so unter Rotation 1h vorhybridisiert. Die markierte Sonde wurde 5min bei 95°C denaturiert, 2min auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und anschließend direkt in die Hybridisierungsflasche gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 64°C unter ständiger Rotation.

Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Filter 2x 20min mit 2x SSC / 0,5% SDS bei Raumtemperatur und dann 2x 30min mit 0,1x SSC / 0,5% SDS bei 60°C gewaschen. Anschließend wurden die Filter in Folie eingeschweißt und in einer Kassette mit einem Röntgenfilm (Kodak TS) bei -80°C für 3h bis zu 12 Tagen exponiert.

2.5. Herstellung der Expressionsvektoren

Für die Herstellung der Expressionsvektoren eines bestimmten cDNA-Fragmentes sind folgende Arbeitsschritte notwendig: Linearisierung und Dephosphorylierung des Vektors, Ligation des Vektors mit dem entsprechenden cDNA-Fragment, Transformation in Bakterien zur Amplifizierung und schließlich die Isolierung des Konstrukts aus den Bakterien. Der für die unter Punkt 2.7.1. beschriebenen Transfektionen von humanen Ovarialkarzinom-Zellen verwendete Vektor pcDNA3 wurde von Invitrogen bezogen. Dieser Vektor ist 5,4kb groß und enthält neben einem CMV-Promotor ein Neomycin-Transferase-Gen, dessen Genprodukt Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418 verleiht. Das Konstrukt pcDNA3/*H-REV107-2* (*pcH-REV107-2*) stand bereits zu Beginn des Projektes zur Verfügung (Husmann *et al.*, 1998), so dass es direkt zur Transformation der Bakterien genutzt werden konnte. *MUC18* hingegen wurde für die weiteren Experimente aus PUC18 in pcDNA3 umkloniert (siehe Abbildung 2).

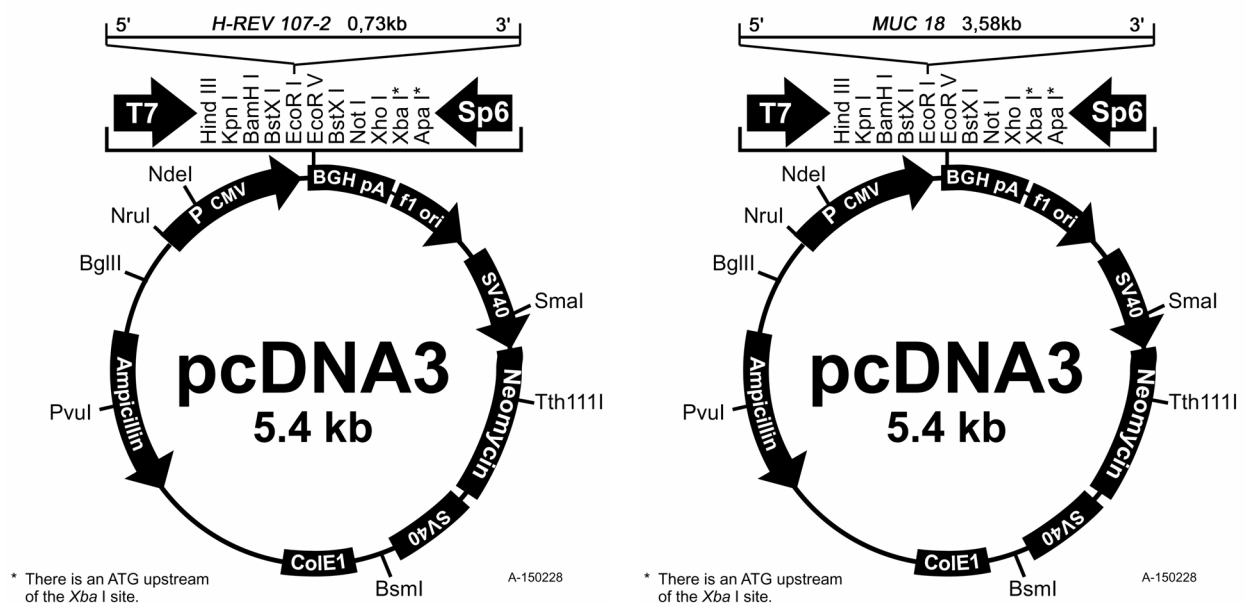


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren *pcH-REV107-2* und *pcMUC18*.

2.5.1. Linearisierung

20µg des Vektors pcDNA3 wurden mit Eco RI verdaut. Die Schnittstelle für Eco RI liegt bei diesem Vektor zwischen dem CMV-Promotor und dem Neomycin-Transferase-Gen (siehe Abbildung 2). Der so linearisierte Vektor wurde anschließend mittels Gel-Elektrophorese

aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und über Nacht mit einer Natriumacetat/Ethanol-Fällung gereinigt. Die Konzentration wurde mit Hilfe eines Testgels abgeschätzt (siehe Punkt 2.4.3.).

2.5.2. Dephosphorylierung

Bei der Dephosphorylierung des linearisierten Vektors wird vom 5' Ende der Vektor-DNA der Phosphatrest abgespalten. Somit wird eine Rückligation des linearisierten Vektors ohne das entsprechende cDNA-Fragment verhindert. Zum Einsatz kam die HKTM „thermolabile Phosphatase“ von Biozym.

Reaktionsansatz:	50µl	pcDNA3 linearisiert (=500ng)
	6µl	10x TA Puffer (Endkonzentration 1x TA)
	3µl	0,1 mM CaCl (Endkonzentration 5 mM)

Der Ansatz wurde insgesamt 65min bei 30°C inkubiert. Nach 5min und 35min erfolgte die Zugabe von je 0,5µl „thermolabile Phosphatase“. Anschließend wurde der gesamte Ansatz für 15min auf 65°C erhitzt, um so die „thermolabile Phosphatase“ zu inaktivieren. Der linearisierte und dephosphorylierte Vektor wurde dann mittels einer Chloroform/Isoamylalkohol-Fällung gereinigt und die Konzentration mit einem Testgel abgeschätzt.

2.5.3. Ligation

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Ligation des Vektors mit einem cDNA-Fragment sind neben Linearisierung und Dephosphorylierung des Vektors kompatible Enden der beiden Reaktionspartner. Sowohl pcDNA3 als auch die *MUC18* cDNA haben an ihren Enden ECO RI Schnittstellen (siehe Punkt 2.4.1. und Punkt 2.5.1.) und konnten somit problemlos ligiert werden. Die Menge des einzusetzenden Fragmentes bei einer gegebenen Menge an Vektor lässt sich wie folgt bestimmen:

$$([\text{y ng Vektor} \cdot \text{Kb Fragment}] / \text{Kb Vektor}) \cdot 3 = \text{x ng Fragment}$$

Für die *MUC18* cDNA, mit der zuvor bestimmten Konzentration und einen Einsatz von 30ng Vektor, ergibt sich folgende Berechnung:

$([30\text{ng pcDNA3} \cdot 3,585\text{Kb MUC18}] / 5,4\text{Kb pcDNA3}) \cdot 3 \approx 60\text{ng MUC18}$

Die Ligation wurde mit einem Fast-Link™ DNA Ligation Kit von Biozym durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 15µl.

Reaktionsansatz:	1,5µl	Fast-Link Ligation Buffer
	1,5µl	10mM ATP
	1µl	pcDNA3 linearisiert und dephosphoryliert (30ng/µl)
	8µl	<i>MUC18</i> (7,5ng/µl) entspricht ca. 60ng <i>MUC18</i>
	2µl	destilliertes H ₂ O
	1µl	Fast-Link DNA Ligase

Der Ansatz wurde 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Inaktivierung der Ligase wurde der Ansatz für 15min auf 70°C erhitzt und anschließend kurz abzentrifugiert. Der so erzeugte Expressionsvektor pcDNA3/*MUC18* (pc*MUC18*) konnte dann durch Transformation in kompetente Bakterien eingebracht werden.

2.5.4. Transformation

Für die Transformation fanden One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. Coli* Bakterien von Invitrogen Verwendung. Bis zu ihrer Nutzung erfolgte die Lagerung bei –80°C. Die Bakterien wurden sowohl mit pc*H-REV107-2* als auch mit pc*MUC18* transformiert. Für eine Transformation wurden 100µl der Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz (pc*MUC18*; siehe Punkt 2.5.3.) bzw. 25ng pc*H-REV107-2* versetzt. Unter gelegentlichem vorsichtigen Mischen wurde der Ansatz 30min auf Eis gehalten. Dann wurde diese Mischung für genau 30sec in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt und anschließend für 2min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 900µl vorgewärmtem SOC Medium und einer Inkubationszeit von 1h bei 37°C im Schüttler wurde 10min bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 100µl SOC Medium resuspendiert und anschließend die Bakteriensuspension mit einem sterilen Spatel auf LB-Agar-Schalen ausplattiert. Zur Selektion wurde der LB-Agar mit dem Antibiotikum Ampicillin (Amp) in einer Konzentration von 75µg/ml versetzt. Die Platten wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Heranwachsen der transformierten Bakterien zu einzelnen Kolonien wurde von 15 verschiedenen Kolonien je

eine Kultur in 4ml LB-Medium+Amp angelegt, wieder über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert und dann mit 2ml einer jeden Kultur eine Plasmid-DNA-Mini-Präparation (siehe Punkt 2.6.2.) durchgeführt. Um sicherzustellen, dass die Proben auch die gewünschte Plasmid-DNA enthalten, wurden sie nach ihrer Gewinnung einem Verdau unterzogen und anhand der Restriktionsmuster überprüft. Mit den Bakterien, die die richtige Plasmid-DNA enthielten, wurden Kulturen für die DNA Maxi Präparation (siehe Punkt 2.6.1.) angeimpft.

2.6. Plasmid-DNA-Präparation

2.6.1. Plasmid-DNA-Maxi-Präparation

Die Plasmid-DNA-Maxi-Präparation dient dazu, große Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien zu gewinnen. 500ml LB-Medium+Amp (75µg/ml) wurden mit zuvor transformierten Bakterien (siehe Punkt 2.5.4.) angeimpft. Die Kultur wurde dann bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert, am nächsten Tag in 250ml Portionen abzentrifugiert (Beckman J2-MC, Rotor JA 14, 4000rpm, 10min, 4°C), der Überstand entfernt, das Pellet mit 10ml Lösung I resuspendiert und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 1ml (10mg/ml) Lysozym und 20ml Lösung II zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5min bei Raumtemperatur wurden 15ml Lösung III zugegeben und die genomische DNA 10min auf Eis gefällt, abzentrifugiert (Beckman J2-MC, Rotor JA 14, 4000rpm, 10min, 4°C) und filtriert. Das Filtrat, welches die Plasmide enthält, wurde mit 27ml Isopropanol versetzt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (Beckman J2-MC, Rotor JA 14, 5000rpm, 15min, 12°C). Das so entstandene Pellet wurde mit 2ml 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert (Beckman J2-MC, Rotor JA 14, 3500rpm, 5min, 12°C) und in 2,8ml 1x TE resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 3,2g CsCl in ein Polypropylen-Röhrchen (Sarstedt) gegeben, mit 320µl Ethidiumbromid und 40µl Triton versetzt, fest verschlossen und zentrifugiert (Beckman Avanti J-25, Rotor JS-13.1, 9000rpm, 5min, 25°C). Anschließend wurde der rot gefärbte Überstand mittels einer Pasteurpipette in Beckmann-Quickseal-Röhrchen überführt, ausgewogen, austariert und verschweißt. Die Zentrifugation erfolgte über Nacht (Beckmann Optima TL, Rotor TLA 100.3, 100 000rpm, 18°C). Durch das Zentrifugieren entsteht ein CsCl-Gradient, in dem sich die Plasmid-DNA ihrer Dichte entsprechend einlagert. Durch das Ethidiumbromid sieht man die Plasmid-DNA als rot angefärbte Bande. Am nächsten Tag wurde das Röhrchen vorsichtig aus dem Rotor genommen und mit einer Kanüle am oberen Ende punktiert. Mit einer weiteren Kanüle wurde dann kurz unterhalb der roten Bande ein zweites Mal punktiert. So konnte über

diese Kanüle die Plasmid-DNA langsam aspiriert und in ein 2ml Eppendorf-Gefäß überführt werden. Die Plasmid-DNA wurde nun mit gesättigter CsCl/Isopropanol-Lösung mehrmals gewaschen, um das Ethidiumbromid zu entfernen. Nach jedem Waschvorgang erfolgte das Abpipettieren und Entsorgen der oberen roten Phase. Dies wurde so lange wiederholt, bis die untere Phase völlig klar war. Um das CsCl aus der Plasmid-DNA-Lösung zu entfernen, wurde diese in eine Slide-a-Lyser Dialysekammer (Pierce) überführt und über Nacht in 2,5l 1x TE unter ständigem Rühren bei 4°C dialysiert. Nach Entfernen der Plasmid-DNA aus der Dialysekammer erfolgte die Bestimmung der Konzentration und Reinheit photometrisch bei 260nm/280nm. Die Plasmid-DNA Konzentration wurde gemäß $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$ berechnet, die Reinheit anhand des Quotienten aus $\text{OD}_{260 \text{ nm}} / \text{OD}_{280 \text{ nm}}$ abgeschätzt, wobei dieser Wert zwischen 1,6 und 1,8 liegen sollte. Die Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Nutzung bei -20°C aufbewahrt.

Lösung I:	0,05M	Glucose
	0,025M	Tris-HCl pH 8,0
	0,001M	EDTA
Lösung II:	0,2M	NaOH
	1%	SDS
Lösung III (100ml):	60ml	Kaliumacetat 5M
	11,5ml	Eisessig
	28,5ml	destilliertes H ₂ O

2.6.2. Plasmid-DNA-Mini-Präparation

Um schnell geringe Mengen Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde ein Plasmid MiniPrep System von Qiagen verwendet. Zu Beginn wurden 4ml LB-Medium+Amp ($75\mu\text{g/ml}$) mit entsprechend transformierten Bakterien angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,5ml der Bakteriensuspension in sterile Eppendorf-Gefäße überführt, abzentrifugiert (Eppendorf 5415C, 3000rpm, 8min), der Überstand verworfen, nochmals 1,5ml Bakteriensuspension zugegeben, erneut abzentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Aus dem entstandenen Pellet wurde die Plasmid-DNA nach Protokoll des Herstellers isoliert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie unter Punkt 2.6.1. beschrieben.

2.7. Koloniewachstums-Assay

2.7.1. Transfektionen

Die Überexpression von Genen nach Transfektion in geeignete Zellen ist ein wichtiges Mittel zur Untersuchung der Funktion dieser Gene. Für die im Folgenden beschriebene Transfektion wurden die Expressionsvektoren *pcH-REV107-2*, *pcMUC18* und *pcEGFP* (Vektor mit dem fluoreszierendes Protein EGFP [Enhanced Green Fluorescent Protein]) verwendet. Die Vektoren enthielten alle einen CMV-Promotor zur Expression des Testgens und einen SV40 Promotor für die Expression des zur nachfolgenden Selektion notwendigen Neomycin-Transferase-Gens. Durchgeführt wurde die Transfektion mit dem FuGENE™ 6 Transfection Reagent (Roche). Die zu transfizierenden Zellen wurden bis zu einer 60–70%igen Konfluenz angezüchtet, 24h vor der eigentlichen Transfektion abgelöst, in 15ml Röhrchen (Falcon) überführt, abzentrifugiert (MLW TS4 700rpm, 8min, bei Raumtemperatur), in 10ml Medium resuspendiert und anschließend mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl pro ml bestimmt. Dann wurden je Transfektionsansatz 1×10^5 Zellen in T25 Kulturflaschen ausgesät.

Zu 1ml serumfreiem Medium (DMEM) wurden 12,5µl 1M HEPES Puffer pipettiert, dies entspricht einer Endkonzentration von 12,5mM HEPES. Davon wurden pro Transfektionsansatz 100µl in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und 6µl FuGENE™ 6 Transfection Reagent direkt, ohne die Wand des Gefäßes zu berühren, zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5min bei Raumtemperatur wurden 1,5µg Plasmid-DNA dazupipettiert. Durch vorsichtiges Antippen des Gefäßes mit dem Finger wurde der Ansatz vermischt und anschließend 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Medium der 24h zuvor ausplattierten Zellen erneuert. Danach wurde der Transfektionsansatz mit dem FuGENE™ 6 Transfection Reagent vorsichtig in die Kulturflaschen gegeben und 48h bei 37°C in kontrollierter 5%-CO₂-Atmosphäre inkubiert.

2.7.2. Selektion

48h nach der Transfektion wurde mit der Selektion begonnen. Dazu wurden die Zellen der einzelnen Ansätze abgelöst, abzentrifugiert und in jeweils 10 ml Medium resuspendiert. Von jedem Ansatz wurde 1ml Zellsuspension in je eine neue T75 Kulturflasche überführt und mit weiteren 9 ml Medium versetzt. Dies entspricht einer Verdünnung von 1:10. Zur Selektion wurde jeder Ansatz mit G418 (Calbiochem) in einer Konzentration von 600µg/ml behandelt. Die

Selektionsdauer betrug je nach Zellwachstum zwei bis drei Wochen. Während der Selektion wurde das Nährmedium alle drei Tage gewechselt und erneut mit G418 versetzt.

2.7.3. Färbung, Auszählung und Auswertung

Nach Beendigung der Selektion erfolgte die Färbung der Kolonien in den Kulturflaschen mit Methyleneblau. Dazu wurden das Medium entfernt, die Kolonien mit 5ml 1x PBS gewaschen und mit 5ml Methanol 10min bei Raumtemperatur fixiert. Das Methanol wurde entfernt, 10ml Methyleneblau in die Kulturflasche gegeben und die Kolonien so 30min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach Entfernen des Farbstoffes erfolgte die zweimalige Spülung der Kulturflaschen mit H₂O und anschließend die Trocknung.

Bei der anschließenden Auszählung der Kolonien wurden nur solche ab einer Größe von einem Millimeter berücksichtigt. Für die einzelnen Transfektionsreihen (*pcH-REV107-2* und *pcEGFP* [9 Experimente], *pcMUC18* und *pcEGFP* [8 Experimente]) wurden im Anschluss die Mittelwerte sowie die Standardabweichung berechnet. Als statistisches Prüfverfahren für die Wahrscheinlichkeit P der Nullhypothese (kein Unterschied zwischen Transfektion und Kontrolle) wurde mit Hilfe der Software „GraphPad“ (<http://graphpad.com>) und den errechneten Mittelwerten und Standardabweichungen ein gepaarter t-Test durchgeführt. Ein $P < 5\%$ erlaubt es die Nullhypothese signifikant zurückzuweisen (Harten, Nägerl und Schulte, Statistik für Mediziner, S. 126, 1993).

2.8. Gewinnung stabil exprimierender Klone

Ein Teil der durchgeführten Transfektionen von *H-REV107-2* und *MUC18* in den A27/80 Zellen wurde zur Gewinnung stabil exprimierender Klone verwendet. Dazu wurden einzelne Kolonien isoliert vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und weiter expandiert. Zu diesem Zweck wurde das Medium entfernt, die Kolonien mit sterilem 1x PBS gewaschen, die ausgewählten Kolonien mit einem Stift von außen auf der Flasche markiert und anschließend die Deckel der T75 Kulturflaschen mit einem Lötkolben aufgeschweißt. Der Boden eines abgeflamnten Klonierungsringes wurde eingefettet und dann auf eine markierte Kolonie aufgesetzt und angedrückt. Mit einer Pasteurpipette wurde ein Tropfen Trypsin in den Klonierungsring auf die Kolonie gegeben und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die so abgelösten Kolonien wurden in Medium resuspendiert und in eine T25 Kulturflasche gegeben. Die Expansion der isolierten Kolonien erfolgte wie unter Punkt 2.1. beschrieben.