

3 METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellmodelle

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden an

- den hepatozellulären Karzinomzelllinien HepG2 und Huh-7,
- den plattenepithelialen Ösophaguskarzinomzelllinien Kyse-30, Kyse-70 und Kyse-140
- sowie Primärzellkulturen aus Biopsaten humaner Ösophaguskarzinome erarbeitet.

3.1.1.1 Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms

Als Modellsysteme des hepatozellulären Karzinoms wurden HepG2 und Huh-7-Zelllinien verwendet. Bei HepG2 handelt es sich um eine mäßig differenzierte humane Hepatomzelllinie mit Wildtyp-p53 (ATCC Nr. HB-8065, Rockville, MD; (Aden *et al.*, 1979) bei Huh-7-Zellen um eine hochdifferenzierte hepatozelluläre Karzinomzelllinie humanen Ursprungs mit p53-Mutation (JCRB Nr. 0403, Tokyo, JPN; (Nakabayashi *et al.*, 1982). Die beiden verwendeten HCC-Zelllinien gelten als besonders gut geeignete *in-vitro*-Modelle des HCC, da sie in vielen Charakteristika, z.B. der Synthese diverser spezifischer Plasmaproteine, dem klinischen HCC besonders ähnlich sind (Aden *et al.*, 1979; Nakabayashi *et al.*, 1982; Nakabayashi *et al.*, 1984)

3.1.1.2 Zelllinien des Ösophaguskarzinoms

Als Modellsysteme des plattenepithelialen Ösophaguskarzinoms wurden humane Kyse-Zellen (Shimada *et al.*, 1992) verwendet: Gut differenzierte Kyse-30 (DSMZ Nr. ACC 351), schlecht differenzierte Kyse-70 (DSMZ Nr. ACC 363) sowie moderat differenzierte Kyse-140-Zellen (DSMZ Nr. ACC 348).

3.1.1.3 Biopsate von Ösophaguskarzinomen

Für funktionelle und immunzytochemische Untersuchungen wurden Primärzellkulturen aus fünf Biopsaten humaner Ösophaguskarzinome etabliert. Die Biopsien wurden im Rahmen von diagnostischen endoskopischen Untersuchungen in der Medizinischen Klinik I der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (CBF) entnommen. Die Verwendung des menschlichen Tumormaterials erfolgte gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

3.1.2 Anzucht von Primärzellkulturen aus Biopsaten von Ösophaguskarzinomen

Die Präparation der Primärzellkulturen aus humanen Gewebeproben erfolgte durch enzymatische Verdauung und mechanische Zerkleinerung (Maaser *et al.*, 2002). Zunächst wurden die Gewebstücke in PBS mit einem Skalpell zerkleinert und mit einer 1%-igen Trypsin/EDTA und Kollagenaselösung für 15 min bei Raumtemperatur enzymatisch verdaut. Danach wurden die Enzyme durch zweifaches Waschen und Zentrifugieren (12000 g, 5 min, 20 °C) entfernt und die erhaltenen Tumorzellpellets in PBS resuspendiert. Die anschließende mechanische Vereinzelung erfolgte mit Hilfe der Medimachine (Becton Dickinson, Heidelberg, D). Nachdem das PBS durch Zentrifugation (12000 g, 5 min, 20 °C) entfernt worden war, wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und zunächst die Zellkonzentration (Zellzählung in der Neubauerkammer) und -viabilität (Trypanblau-Test) bestimmt (**Kap. 3.1.4.2**). Die Zellen wurden daraufhin in einer Dichte von $5 - 10 \times 10^4$ Zellen/Loch in einer 24-Loch-Platte ausgesät und für 24 – 48 h im Inkubator (37 °C, 5% CO₂) angezüchtet. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage ausgetauscht. Die durchschnittliche Lebenszeit der angelegten Kulturen betrug 9 Tage; passagierfähige Dauerkulturen konnten nicht etabliert werden.

3.1.3 Passagieren der Zelllinien

Die Zellen wurden in Plastikkulturflaschen bei 37 °C in 5% CO₂ und gesättigter humider Atmosphäre kultiviert. Zur Passage wurden die maximal 80% konfluent gewachsenen Zellen zuerst mit 5 mL PBS gewaschen und anschließend für 5 - 10 min mit 5 mL Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Nach Ablösung der Zellen wurde das Trypsin durch Zugabe von 10 mL Kulturmedium inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1 : 10 in neue Kulturflaschen ausgesät und mit frischem Kulturmedium versorgt. Zwischen den Passagen erfolgte routinemäßig in 2-tägigem Rhythmus ein Austausch des Kulturmediums.

3.1.4 Proliferationsstudien

3.1.4.1 Kristallviolett-methode

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsstudien erfolgten nach der Kristallviolett-Methode. Diese basiert auf der photometrischen Messung des Triphenylmethanfarbstoffs Kristallviolett, der sich an die DNA der Zellen anlagert (Gillies *et al.*, 1986).

Zunächst wurden die Zellen auf 96-Loch-Platten in einer Dichte von 2000 Zellen/Loch ausgesät und nach 72 h mit den jeweiligen Substanzen in einer Zehnfachbestimmung inkubiert. Nach Ende der Inkubationsdauer wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 200 μ L PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch 15-minütige Inkubation mit 100 μ L Glutaraldehyd (1% in PBS) fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 100 μ L Kristallviolett (0,1% in PBS). Danach wurde der überschüssige, ungebundene Farbstoff durch 30-minütiges Spülen in einem perfundierten Becherglas (Durchflussrate 500 mL H₂O/min) entfernt. Das verbliebene H₂O wurde entfernt. Anschließend fand eine 24-stündige Inkubation mit 100 μ L Triton X-100 (0,2% in PBS) im Brutschrank statt, um das gebundene Kristallviolett wieder in Lösung zu bringen und somit eine homogene Farbstofflösung zu erhalten. Die Lösung wurde abschließend photometrisch bei 570 nm in einem ELISA-Reader (MRX 2, Dynex Technologies, Denkendorf, D) gemessen. Bei einer Zelldichte von 5000 - 50000 Zellen/Loch ist die Absorption proportional zur Zellzahl (**Abb. 3-1**).

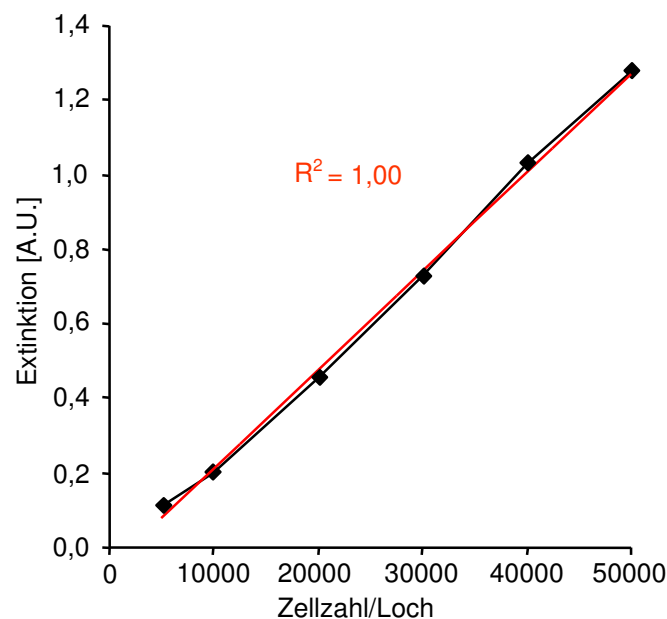


Abbildung 3-1: Darstellung einer repräsentativen Kalibrationsgeraden der Kristallviolett-Methode.

3.1.4.2 Trypanblau-Methode

Anzahl und Vitalität der Primärzellkulturen wurden in einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärbung der Zellen mit Trypanblaulösung (0,4%) bestimmt. Bei dieser Färbung tritt der Farbstoff durch die poröse Membran toter Zellen in das Zytoplasma ein und tote Zellen erscheinen dunkelblau. Der Verdünnungsfaktor von Zellsuspension und Trypanblau betrug

1 : 1 bis 1 : 10 je nach Dichte der Zellsuspension. Alle 4 Großquadrate der Neubauer-Zählkammer wurden ausgezählt um die Gesamtzahl viabler und toter Zellen zu bestimmen.

3.1.5 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Toxische Substanzen schädigen Zellen unspezifisch und bewirken einen Verlust der Integrität der Zellmembran. Dies führt zur Freisetzung des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH), welches im Zellüberstand nachgewiesen werden kann.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 5000 Zellen/Loch in 96-Loch-Platten ausgesät und nach 24 h mit den jeweiligen Arzneistoffen inkubiert. Die Freisetzung von LDH wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Inkubation unter Verwendung des *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche, Mannheim, D) bestimmt. Das Testprinzip ist in **Abb. 3-2** dargestellt. Die minimale LDH-Freisetzung wurde im Überstand unbehandelter Kontrollzellen gemessen, die maximale LDH-Freisetzung wurde durch Zusatz von 100 μ L Triton X-100 (2% in Kulturmedium) zu unbehandelten Zellen erhalten. Zur Durchführung der LDH-Bestimmung im Zellkulturmedium wurden jeweils 100 μ L des Kulturüberstandes in eine 96-Loch-Platte überführt, 100 μ L des LDH-Substratreagenzes wurden zu jedem Ansatz hinzugefügt und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 490 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) im ELISA-Reader (MRX-2, Dynex Technologies, Denkendorf, D) gemessen (Hopfner *et al.*, 2002b).

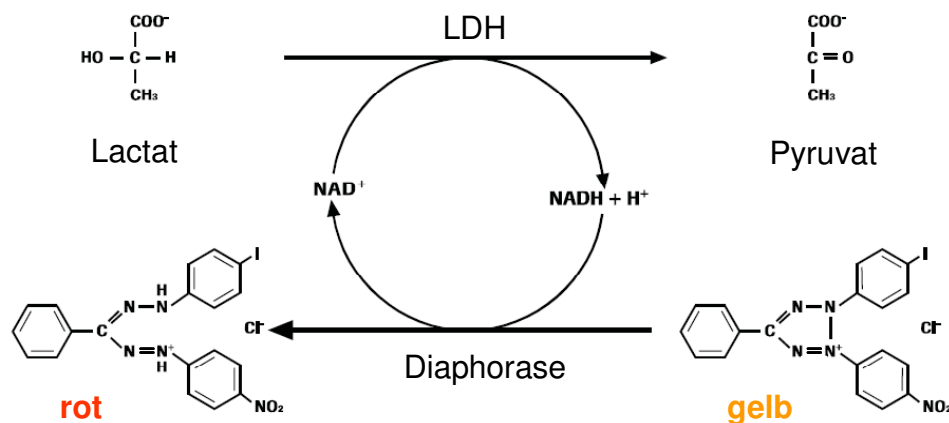


Abbildung 3-2. Testprinzip der LDH-Messung. Die LDH-katalysierte Umwandlung von Lactat zu Pyruvat resultiert in der Reduktion von NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$. In der sich anschließenden durch Diaphorase katalysierten Redoxreaktion wird das schwach gelbe Tetrazoliumsals INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) zu einem roten Formazansalz reduziert, welches photometrisch quantifiziert wird.

3.1.6 Apoptoseuntersuchungen

3.1.6.1 Untersuchung mitochondrialer Veränderungen

Veränderungen des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi_M$) und des Mitochondrienvolumens wurden unter Verwendung des lipophilen, kationischen Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid, Molecular Probes, Eugene, OR) bestimmt. Die Zellen wurden mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ JC-1 15 min lang im Dunkeln bei 37 °C inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, D) analysiert. Bei einem negativen mitochondrialen Membranpotenzial akkumuliert JC-1 in den Mitochondrien und bildet Aggregate, die orangenes Fluoreszenzlicht emittieren. Dessen Intensität wird als die Höhe des mitochondrialen Membranpotenzials interpretiert. Die monomere Form von JC-1 emittiert grünes Fluoreszenzlicht, welches zur Bestimmung des Mitochondrienvolumens herangezogen wird (Mathur *et al.*, 2000).

3.1.6.2 Caspase-3-Aktivitätsbestimmung

Zunächst wurden zytosolische Zellextrakte durch Inkubation (30 min, 4 °C) von ca. 10^6 Zellen pro Ansatz mit 400 μL Lysepuffer (Tris-HCl 10 mM, NaH_2PO_4 10 mM, Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 130 mM, Triton X-100 1%, pH 7,5) gewonnen. Die weitere Aufarbeitung der Lysate erfolgte analog zu **Kap. 3.3.2**. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt (vgl. **Kap. 3.3.3**), und die Lysate wurden auf eine Proteinkonzentration von 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingestellt. Zur semiquantitativen Bestimmung der Caspase-3-Aktivität wurden die Lysate mit 100 μL Substratlösung (Ac-DEVD-AMC 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in HEPES 20 mM, Glycerin 10%, Dithiothreitol (DTT) 2 mM) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Ac-DEVD-AMC (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-methylcumarin) ist ein spezifisches Substrat der Caspase-3. Der Substratumsatz lässt sich durch die Abspaltung der fluorophoren Gruppe 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) von der Peptidkette quantifizieren. Die Fluoreszenzemission des freigesetzten AMC wurde in einem VersaFluor-Fluorometer (BioRad, München, D) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm bestimmt. Die Veränderung der Caspase-3-Aktivität durch eine Behandlung der Zellen wurde durch die Standardisierung auf einen unbehandelten Kontrollansatz ermittelt.

Die Proportionalität von Enzymaktivität und Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe einer Standard-Verdünnungsreihe rekombinanter Caspase-3 für das relevante Fluoreszenzintensitätsintervall überprüft (**Abb. 3-3**).

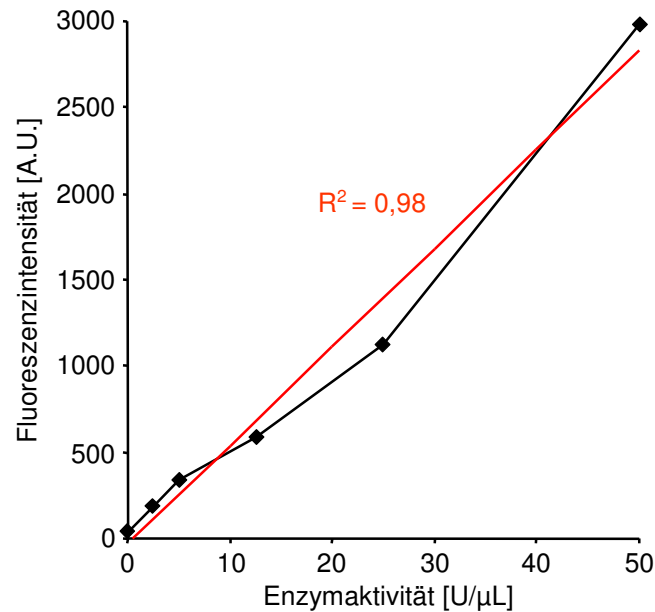


Abbildung 3-3: Darstellung einer repräsentativen Kalibrationsgeraden der Caspase-3-Aktivitätsbestimmung.

3.1.6.3 Nachweis der DNA-Fragmentation

Die DNA-Fragmentation zu Oligonukleosomen ist ein irreversibler Schritt im apoptotischen Programm. Die am Ende der Apoptosesignalkaskade aktivierte Endonuklease schneidet die DNA an den für das Enzym zugänglichen Linkerregionen der Nukleosomen zuerst in große Fragmente und darauf in kleinere Fragmente, bestehend aus Multimeren von ungefähr 180 Basenpaaren (bp). Methodisch kann Apoptose daher anhand einer charakteristischen DNA-Leiter im Agarosegel nachgewiesen werden.

Die Aufreinigung der DNA der behandelten Zellen erfolgte mit dem *Apoptotic DNA Ladder Kit* (Roche, Mannheim, D). Nach Lyse der Zellen (6 M Guanidinium-HCl, 10 mM Harnstoff, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton-X-100; pH 4,4) wurde das Lysat in ein Filterröhrchen mit Glasfaser-Vlies übertragen und durch Zentrifugation durch das Glasfaser-Vlies getrieben. Nukleinsäuren binden hierbei an die Oberfläche der Glasfasern in Gegenwart eines chaotropen Salzes (Vogelstein und Gillespie, 1979). Verbleibende Verunreinigungen wurden durch einen Waschschriff entfernt (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, EtOH 80%; pH 7,5) und die DNA schließlich mit Puffer (40 mM Tris; pH 8,5) eluiert. Nach photometrischer Gehaltsbestimmung der Proben wurden diese mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (**Kap. 3.2.4**), mit Propidiumiodid angefärbt und unter UV-Licht visualisiert.

3.1.7 Zellzyklusanalysen

Die Zellzyklusanalyse nach Vindelov und Christensen (Vindelov und Christensen, 1990) basiert auf der Isolierung von Zellkernen und der Anfärbung der nukleären DNA mit Propidiumiodid. Der DNA-Gehalt der Zellkerne verdoppelt sich während eines Zellzyklus, so dass je nach DNA-Gehalt eine Zuordnung der Zellen zu einer bestimmten Zellzyklusphase möglich ist.

Die Zellen wurden mit 0,1% Trypsin abgelöst und 5×10^5 Zellen entnommen. Nach Zentrifugation (12000 g, 40 s, 20 °C) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 500 µL Zitrat/Dimethylsulfoxid-Puffer gewaschen. Für die Isolierung und Anfärbung der Zellkerne wurde ein kommerzieller Kit der Firma Beckton Dickinson (Heidelberg, D) verwendet. Die Proben wurden anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurde das Programm ModFit LT2 (Verity Software House, Topsham, ME) verwendet.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Ribonuklease (RNase)-freies Arbeiten

Alle benutzten Rührfische, Glas- und sonstige thermostabile Materialien wurden vor Experimenten durch trockenes Erhitzen auf 220 °C für ca. 16 h von potentieller RNase-Kontamination befreit. Geräte wie Gelkammern oder der pH-Meter-Stab wurden vor der Benutzung mit RNaseZap, einer speziellen Detergenzlösung (Ambion Inc., Austin, TX) gespült. Alle Puffer wurden mit Wasser, das durch Autoklavieren mit 0,05% Diethylpyrocarbonat RNase-frei gemacht worden war (DEPC-Wasser), hergestellt.

3.2.2 Präparation von Gesamt-RNA

Die Präparation der RNA erfolgte nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987) durch Extraktion der RNA mittels saurem Phenol mit einem käuflichen Kit (*RNA-Clean LS*, Hybaid, London, GB). Die Lyse der Zellen erfolgte mit 1 mL *RNAClean LS* pro 35 mm² - Schale. Die lysierten Zellen wurden abgelöst und durch wiederholtes Pipettieren homogenisiert. Anschließend wurden 200 µL Chloroform hinzugegeben und die Lösung erneut homogenisiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde das Gemisch für 15 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Zur Fällung der RNA wurde nun 15 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde nochmals für 15 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 mL 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (8 min bei 7500 g

und 4 °C), um etwaige Phenolreste zu entfernen. Danach wurde die RNA 10 min bei 37 °C getrocknet. Abschließend wurde die RNA in DEPC-H₂O aufgenommen. Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurden isolierte RNAs in einem UV-Spektrometer bei der Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Absorption (A₂₆₀) von 1,00 entspricht einer Konzentration von 40 µg/mL RNA. Durch zusätzliche Absorptionsmessung bei 280 nm (A₂₈₀) wurde über den Quotienten $Q_{NS} = A_{260}/A_{280}$ auf den ungefähren Grad der Verunreinigung mit Protein geschlossen. Die gemessenen Quotienten lagen zwischen 1,8 und 2,0. Dies bedeutet, dass die präparierten RNAs hochrein waren.

3.2.3 Präparation von poly-A⁺-RNA

Die meisten mRNAs besitzen an ihrem 3'-Ende einen sogenannten polyA-Schwanz aus bis zu 200 AMP-Resten. Der polyA-Schwanz sorgt für eine relative Stabilität der mRNA. Die Isolation von polyA⁺-RNA erfolgte mit Hilfe des *Dynabeads-Purification Kit* (Dyna, Oslo, N). Die Dynabeads sind superparamagnetische Polystyrolkugeln, an deren Oberfläche 25-mer Oligo-dT-Reste kovalent gebunden sind. Durch Versetzen der Gesamt-RNA mit Oligo-dT-Dynabeads und anschließende magnetische Abtrennung der Partikel kommt es zur Aufreinigung der mit einem polyA-Signal versehenen mRNA von anderen RNA-Spezies.

500 µg Gesamt-RNA (c = 1 µg/mL) wurden für 2 min auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurden 500 µL Dynabeads-Suspension (in 2xBindungspuffer) hinzupipettiert und die Suspension 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach zweimaligem Waschen in je 500 µL Waschpuffer wurden die Dynabeads in 8 µL Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl) resuspendiert und die polyA⁺-RNA durch zweiminütiges Erhitzen bei 65 °C von den magnetischen Partikeln eluiert.

3.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente wurden in 2% Agarose-Horizontalgelen in 1xTAE-(Tris-Acetat-EDTA)-Puffer (Zusammensetzung 50xTAE: Tris-Base 2 M, Eisessig 1 M, EDTA 0,05 M pH 8,0) aufgetrennt. DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen 6xLadepuffer mit Bromphenolblau in die Geltaschen aufgetragen. Elektrophoresen wurden mit 100 V durchgeführt, bis die Laufstrecke des Bromphenolblaus maximal 2/3 der Gellänge betrug. Zur Dokumentation und Auswertung wurden die Gele auf einem UV-Durchlichtgerät ($\lambda = 302$ nm) mit Hilfe einer Digitalkamera aufgenommen (Polaroid, Offenbach, D).

3.2.5 Synthese von cDNA

Vor der reversen Transkription (RT) wurde eine Behandlung der RNA mit RNase-freier DNase I durchgeführt, um etwaige Kontaminationen mit genomischer DNA zu entfernen. 1,5 µg RNA wurden mit 1 µL 10xDNase-I-Puffer und 1 µL DNase I (1 U/µL) versetzt, auf 10 µL mit DEPC-Wasser (vgl. **Kap. 3.2.1**) aufgefüllt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zusatz von 1 µL EDTA (25 mM) und zehninütiges Erhitzen bei 65 °C wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt. Die cDNA-Synthese für die semiquantitative RT-PCR erfolgte mit einem kommerziellen Kit (SuperScript™ *Preamplification System*, Gibco BRL, Eggenstein, D). *SuperScript II* Ribonuklease H⁻ (RNase H⁻) Reverse Transkriptase synthetisiert den zur RNA komplementären cDNA-Erststrang. Für die RT wurden Oligo(dT)-Primer verwendet, die an den polyA-Schwanz am 3'-Ende der meisten mRNAs (vgl. **Kap. 3.2.3**) komplementär binden. Zur Denaturierung der RNA und Anlagerung der Primer wurden 500 ng Oligo-dT-Primer zum Reaktionsansatz hinzugefügt, bei 70 °C für 10 min inkubiert und dann auf Eis gestellt. In einem Reaktionsmix wurden pro Ansatz gemischt: 2 µL 10xPCR-Puffer, 2 µL MgCl₂ 25 mM, 2 µL DTT 100 mM, 1 µL dNTP-Mix 10 mM. Je 7 µL des Reaktionsmix wurden zu den RNA-Proben gegeben, vorsichtig gemischt und bei 42 °C für 5 min inkubiert. 1 µL der Superscript™ Reversen Transkriptase (200 U/µL) wurde zu jeder Probe pipettiert und für 1 h bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde je 1 µL RNase H zu jeder Probe gegeben und 1 min bei 4 °C, dann 20 min bei 37 °C inkubiert, um die noch an der cDNA anheftende RNA zu zerstören. Die cDNA wurde danach direkt als Matrize für die PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

3.2.6 Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription von RNA (RT-PCR)

Die PCR wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt (Saiki *et al.*, 1985). Durch Erwärmen wird der DNA-Doppelstrang denaturiert, mit zwei kurzen Oligonukleotiden, welche die gesuchte Sequenz begrenzen, hybridisiert und durch eine thermostabile DNA-Polymerase (in dieser Arbeit: Taq-Polymerase) verlängert. Ein Zyklus eines PCR-Programms beinhaltet: Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer (*annealing*), und DNA-Polymerisation. Die Anzahl der entstehenden DNA-Moleküle wird in jedem durchlaufenen Zyklus verdoppelt. Die PCR wurde in einem Volumen von 50 µL durchgeführt. Für jede Probe wurde der folgende Reaktionsansatz hergestellt: 1 µL cDNA (vgl. **Kap. 3.2.5**), 5 µL 10xPCR-Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris), 4 µL dNTP-Mix 10 mM, je 2 µL *forward*- bzw. *reverse*-Primer 10 µM, 2 µL Taq-Polymerase 0,5 U/µL, und 34 µL DEPC-H₂O. Die PCR wurde in einem Peltier-Thermocycler (PTC-200, MJ-Research Inc., Waltham, MA)

durchgeführt. Das PCR-Programm wurde für das jeweilige Primer-Paar optimiert, um eine maximale Sensitivität und Spezifität der PCR zu erreichen. Die optimierten Bedingungen für die verwendeten Primerpaare (**Kap. 2.3, Tab 2-2**) sind in **Tabelle 3-1** dargestellt.

Name des Gens	Denaturierung Temperatur und Zeit	Hybridisierung Temperatur und Zeit	Verlängerung (Temperatur und Zeit)	Zyklenzahl
EGFR-1	94°C (40 s)	63°C (60 s)	72°C (60 s)	30
EGFRvIII	94°C (40 s)	63°C (60 s)	72°C (60 s)	30
IGF-1R- β -Kette	94°C (40 s)	63°C (60 s)	72°C (60 s)	30
β -Aktin	94°C (40 s)	63°C (60 s)	72°C (60 s)	30

Tabelle 3-1: Optimierte PCR-Bedingungen zur Detektion von mRNA von EGFR-1, EGFRvIII, IGF-1R- β -Kette und β -Aktin.

Die jeweiligen Negativkontrollen wurden durchgeführt, indem die cDNA durch Wasser ersetzt wurde. Um die Fragmentlänge der PCR-Amplifikate bestimmen zu können, wurden 125 ng 100 bp-DNA-Marker (Gibco BRL, Eggenstein, D) mit aufgetragen. Im Anschluss an die PCR wurden 9 μ L des Reaktionsansatzes mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese (**Kap. 3.2.4**) analysiert.

3.2.7 Experimente mit Atlas Human Apoptosis cDNA-Arrays

3.2.7.1 Hybridisierung der cDNA-Arrays mit cDNA-Sonden

Mit Hilfe der *Atlas Arrays* der Firma Clontech (Palo Alto, CA) kann man die differentielle Genexpression von Zellen analysieren, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden. Der *Atlas Human Apoptosis cDNA Expression Array* enthält auf Nylonmembranen immobilisierte cDNAs von 205 ausgewählten humanen Genen, die ein breites Spektrum apoptose- und zellzyklusrelevanter Gene abdecken, einige ubiquitär exprimierte (*housekeeping*-) Gene zur Normalisierung der Signale sowie Positiv- und Negativkontrollen. Jede cDNA ist in zwei kreisförmigen Spots nebeneinander auf die Membran aufgetragen. Die cDNA-Fragmente sind zwischen 200 und 600 Basenpaaren (bp) lang und wurden aus Bereichen der mRNA vervielfältigt, die keine poly-A-Sequenzen, repetitiven Elemente oder anderen homologen Sequenzen enthalten. Eine vollständige Liste aller Gene ist im Internet zu finden (http://www.clontech.com/clontech/atlas/genelists/7743-1_HuApop.pdf).

Als Ausgangsmaterial wurde die RNA aus den zu vergleichenden Proben aufgereinigt (**Kap. 3.2.2**). Die Gesamt-RNA wurde einer 30-minütigen DNase-Behandlung (**Kap. 3.2.5**) unterzogen. Anschließend wurde aus 500 µg RNA mit Oligo-dT-Dynabeads (**Kap. 3.2.3**) die mRNA isoliert. Aus jeweils 2 µg mRNA wurden unter Verwendung eines genspezifischen Primergemisches, das speziell auf die Gene des *Arrays* abgestimmt ist, in einer reversen Transkriptionsreaktion mit 35 µCi [α - 32 P]dATP (3000 Ci/mmol, Amersham, Uppsala, S) eine radioaktiv markierte cDNA-Probe hergestellt. Die cDNA wurde anschließend durch Affinitätschromatographie (*NucleoSpin extraction column*, im Kit enthalten) von den noch freien Nukleotiden und kleinen cDNA-Fragmenten (< 0,1 kb) getrennt. Die Gesamtaktivität der cDNA-Proben wurde mit einem Flüssigszintillationszähler (1450 Microbeta Wallac Trilux, Turku, SF) bestimmt und lag bei 2 – 10 x 10⁶ cpm (*counts per minute*). Die beiden Membranen wurden mit Lachssperma-DNA vorhybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, und dann über Nacht mit je einer der beiden radioaktiven cDNA-Proben hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen mehrmals gewaschen und anschließend mit Röntgenfilmen für verschiedene Zeiträume (mehrere Stunden bis Tage) exponiert. Die entwickelten Röntgenfilme wurden mit einem Durchlichtscanner unter Verwendung der Scan-Software Multi-Analyst (BioRad, München, D) eingescannt.

3.2.7.2 Auswertung der cDNA-Arrays

Für die Auswertung der cDNA-Arrays wurden die Signalintensitäten der einzelnen cDNA-Spots auf den Röntgenfilmen zwischen beiden Proben verglichen. Die Schwärzung der einzelnen Punkte (mittlere optische Dichte (OD)/mm²) wurde mit Hilfe des Computerprogramms TINA (RayTest, Straubenhardt, D) ermittelt. Von den Schwärzungen der Punkte wurde der unspezifische Hintergrund in der Umgebung der Punkte abgezogen. Zur weiteren Verarbeitung wurde eine selbstgeschriebene Excel-Auswertungsmaske verwendet, welche die Werte auf die Expression ausgewählter *housekeeping*-Gene (Ubiquitin, Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), Tubulin- α 1-Untereinheit, HLA Klasse I Histokompatibilitätsantigen C-4 α -Untereinheit (HLAC), β -Aktin, 60S ribosomales Protein L13A, 40S ribosomales Protein S9) normalisierte und unter Verwendung verschiedener Filter die in den Versuchsansätzen stärker oder schwächer exprimierten Gene identifizierte. Zur Ermittlung der differentiell exprimierten Gene wurden die Quotienten aus der normalisierten Expression im Versuchs- und im Kontrollansatz gebildet. Als differentiell exprimiert wurde ein Gen angesehen, wenn die beiden Signale mehr als 50% über dem Hintergrundsignal lagen und wenn die Abweichung innerhalb der Doppelbestimmungen die Differenz der

Durchschnittswerte von Versuchs- und Kontrollansatz nicht überschritt (Hopfner *et al.*, 2002a).

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Immunzytochemischer Nachweis der Wachstumsfaktorrezeptoren

Immunzytochemische Untersuchungstechniken ermöglichen die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen in Zellen. Primärantikörper binden zunächst spezifisch an zelluläre Proteine. Von den Ziel-Proteinen gebundene Primärantikörper werden anschließend an Sekundärantikörper gebunden, die ihrerseits mit einem Fluoreszenzfarbstoff (indirekte Immunfluoreszenz) konjugiert sind.

Zum Nachweis der entsprechenden Rezeptoren wurden die Tumorzellen nach Waschen mit PBS zunächst mit einem kommerziellen Kit permeabilisiert (*Fix and Perm Cell Permeabilization Kit*, Caltag Laboratories, D). Anschließend wurden die Zellen 1 h mit den entsprechenden Primärantikörpern (Verdünnungen siehe **Kap. 2.2, Tab. 2-1**) oder der Isotypenkontrolle (Dako, D) und anschließend eine weitere Stunde mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper (Molecular Probes, OR) inkubiert. Die Fluoreszenzintensitäten wurden in anschließenden Messungen mit dem FACSCalibur (Becton Dickinson, D) bestimmt und mittels CellQuest Software (Becton Dickinson, D) ausgewertet (Hopfner *et al.*, 2004; Sutter *et al.*, 2005).

3.3.2 Gewinnung von Proteinlysaten

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurden die Zellen mit 500 µL TEN-Puffer (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7,5) versetzt und mit Hilfe eines Schabers abgelöst. Die Proben wurden dann in 1,5 mL Eppendorff-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation (12000 g, 40 s, 4 °C) wurden die Überstände abgenommen und die Zellpellets in 100 µL RIPA-Puffer (*Radio-Immunoprecipitation-Assay-Puffer*; 1% Nonidet P-40, 0,5% Natriumdesoxycholsäure, 0,1% SDS, 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1 µg/mL Aprotinin, 1 µg/mL Pepstatin A in PBS) resuspendiert. Die Zellyse wurde auf Eis (15 min Inkubation) durchgeführt. Dabei wurden zelluläre Proteine in Lösung gebracht. Durch anschließendes Zentrifugieren (12000 g, 15 min, 4 °C) wurden unlösliche Bestandteile wie z.B. Zellkern, Zytoskelett und Zellmembranen abgetrennt. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt.

3.3.3 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt einer Probe wurde mit dem BCA-Test bestimmt (Smith *et al.*, 1985). Diese Methode basiert darauf, dass die Aminogruppen der Proteine in alkalischem Medium Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren. Cu^+ reagiert dann mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid* = BCA) zu einem violetten Komplex, der photometrisch bestimmt wird.

Zunächst wurde eine Proteinstandardreihe (0 – 1500 $\mu\text{g/mL}$) aus einer BSA-Stammlösung (2 mg/mL) hergestellt. Je 20 μL der zu untersuchenden Proben und der Standardreihe wurden zur Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Die Reagenzlösung (Pierce, Weiskirchen, D) wurde frisch angesetzt und je 100 μL auf die Proben gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die Proben bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen und nach Erstellen einer Kalibrationsgeraden die Proteinkonzentrationen der Proben mit Hilfe der Gleichung der Regressionsgeraden errechnet.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

In der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wandern die Proteine durch ein elektrisches Feld in einem Polyacrylamid-Netzwerk (Acrylamid/Bisacrylamid), das als Molekularsieb fungiert. Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich Proteine auf Grund ihrer Masse trennen. Die Zugabe des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) führt zur Lösung nichtkovalenter Bindungen in nativen Proteinen. Die SDS-Anionen binden an die Hauptketten der Proteine, und der gebildete Komplex aus SDS und denaturiertem Protein wird dann der Elektrophorese unterworfen. Zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken wird β -Mercapthoethanol oder Dithiothreitol eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurden käufliche Polyacrylamidgele der Firma BioRad (München, D) verwendet. Protein-Proben wurden mit Lysepuffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und mit 5xProbenpuffer (Tris-HCl 312,5 mM, Glycerol 50%, SDS 5%, β -Mercaptoethanol 12,5%, Bromphenolblau 0,00625%) versetzt. Die Proben wurden bei 95 °C für 5 min denaturiert und anschließend in die Probentaschen pipettiert. Als Größenstandard diente der *All Blue Molecular Weight Marker* (BioRad, München, D). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bis zum Verlassen des Sammelgels bei 100 V, anschließend bei 200 V. Beim Erreichen des unteren Gelrandes durch die Bromphenolblaubande wurde die Elektrophorese beendet.

3.3.5 Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf Membranen (*Western Blot*)

Innerhalb eines Gels wäre die Detektion von Proteinen mit Antikörpern nur unter Verlust der Auflösung oder meist gar nicht zu erreichen. Daher werden die im Gel aufgetrennten Proteine nach Abschluss der SDS-PAGE durch ein vertikal zum Gel angeordnetes elektrisches Feld auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert (*geblottet*).

Elektrodenschwämme, Filterpapiere (Schleicher & Schüll, D) und PVDF-Membran (Perkin-Elmer, MA) wurden 5 min in Transferpuffer (Tris 25 mM, Glycin 50 mM, Methanol 20%) equilibriert. In einem Gittereinsatz wurde die PVDF-Membran anschließend auf das Gel gepresst. Bei der Zusammensetzung wurde auf Luftblasenfreiheit geachtet, da diese den Proteintransfer stören. Der Gittereinsatz wurde anschließend in die mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer eingesetzt und die Apparatur zur Kühlung auf Eis gestellt. Der Transfer erfolgte je nach Größe der Proteine für 90 – 120 min bei 100 mA unter kontinuierlichem Rühren des Puffers.

3.3.6 Immundetektion immobilisierter Proteine

Dieser Schritt dient der Visualisierung des nachzuweisenden Proteins mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion und Detektion über ein geeignetes Substrat. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wurde zunächst 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungslösung (0,1% Tween 20, 2,5% BSA in TBS) inkubiert. Auf der Membran kann anschließend die Antigen-Antikörper-Reaktion stattfinden. Die Membran wurde mit dem ersten Antikörper (Verdünnung siehe **Kap. 2.2, Tab. 2-1**) in Blockierungspuffer über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Dann wurde die Membran zweimal für 15 min mit 0,1% Tween 20 in TBS gewaschen. Daraufhin wurde mit dem Meerrettich-Peroxidasegekoppelten sekundären Antikörper (Verdünnung 1 : 10000) 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert und die Membran anschließend erneut gewaschen. Zusätzlich wurde zweimal für 3 min mit TBS gewaschen, um das die Detektion störende Tween 20 zu entfernen. Zur Detektion der Immunreaktion diente ein Chemilumineszenz-Substrat (ECL, Amersham, Uppsala, S), in dem die Membran für 1 min unter leichtem Schwenken inkubiert wurde. Überschüssiges Reagenz wurde durch Abstreifen entfernt. Anschließend wurde die Membran in einer Röntgenkassette zusammen mit einem Fluorografiefilm (Hyperfilm ECL, Amersham, Uppsala, S) exponiert. Die Expositionszeit betrug in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper 10 s – 60 min.

3.3.7 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Zellviabilität

Die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Viabilität der Primärkulturzellen erfolgte mittels eines Viabilitäts- und Zytotoxizitäts-Assays (*LIVE/DEAD*-Assay; Molecular Probes, NL). Der *LIVE/DEAD*-Assay beruht auf einer Zwei-Farben-Fluoreszenz-Messung, wodurch simultan die Anzahl toter und lebender Zellen bestimmt werden kann. Der zellpermeable Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) wird im Zytoplasma lebender Zellen durch die Aktivität ubiquitärer Esterasen gespalten, wobei grün fluoreszierendes Calcein entsteht ($\lambda_{Em} = 530 \text{ nm}$). Dieses wird im Zytoplasma lebender Zellen zurückgehalten. Der rote Fluoreszenzfarbstoff, Ethidium-homodimer-1 ($\lambda_{Em} = 645 \text{ nm}$), bindet an Nukleinsäuren. Er wird von Zellen mit intakter Zytoplasmamembran nicht aufgenommen, dringt jedoch in tote Zellen schnell ein. Somit fluoreszieren nach Doppelfärbung lebende Zellen grün und tote Zellen rot.

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit Calcein-AM/Ethidium-Homodimer (80 nM / 2 μM) 1 h im Brutschrank (37°C, 5% CO_2) inkubiert. Mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop-2, Fa. Zeiss, Deutschland) wurden Bilder der untersuchten Zellen aufgenommen. Anschließend wurden die beiden Fluoreszenzbilder überlagert und der Anteil der grünen und roten Zellen bestimmt. Die quantitative Bestimmung lebender und toter Zellen erfolgte durch Auszählung von jeweils vier zufällig gewählten Bildausschnitten, aus denen der Mittelwert berechnet wurde.

3.4 Statistik

Alle Experimente wurden als Dreifachbestimmung oder häufiger durchgeführt. Die Berechnung der statistischen Parameter erfolgte unter Verwendung des MS-DOS-Programms InStat (Version 2.05a; GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Alle Versuchsansätze waren voneinander unabhängig und wurden unter Annahme einer Normalverteilung der Messergebnisse mit dem ungepaarten, zweiseitigen *Student*-t-Test verglichen. Prüfung auf Varianzhomogenität wird bei der t-Test-Berechnung durch InStat standardmäßig mit dem *F*-Test durchgeführt. Die Unterschiede zwischen zwei Versuchsansätzen wurden als signifikant betrachtet, wenn die p-Werte kleiner als 0,05 waren.