

2. Material und Methoden

2.1. Probengewinnung und Asservierung des humanen Nierengewebes

Bevor mit der Sammlung des menschlichen Gewebes begonnen werden konnte, wurde das Studienvorhaben von einer Ethik-Kommission (Antrag-Nr.: 7/2000, Titel der Studie: „Bedeutung des von Hippel-Lindau Gens für die Regulation hypoxieabhängiger Transkriptionsfaktoren in Nierentumoren“) geprüft und die Zulassung erteilt. Es wurden Einverständniserklärungen von den Patienten vor den geplanten Tumornephrektomien eingeholt, um das entnommene Gewebe für weitere wissenschaftliche Zwecke nutzen zu dürfen. Alle Patienten erhielten einen Aufklärungsbogen und wurden über Ziele und Hintergründe der Studie informiert.

Insgesamt wurden von der Arbeitsgruppe 70 Patienten Nierentumoren zusammengetragen, welche sich nach Diagnosestellung einer Raumforderung in der Niere einer radikalen Tumornephrektomie unterzogen hatten.

38 der gesammelten Tumoren stammen aus dem Universitätsklinikum Charite in Berlin, die anderen Proben (32 Tumore) wurden durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gröne aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg zur Verfügung gestellt.

In kürzester Zeit nach Ektomie der Niere (wenige Minuten) wurde sowohl gesundes Gewebe als auch makroskopisch identifizierbares Tumorgewebe von ein und derselben Niere entnommen. Im Anschluß daran erfolgte die sofortige Überführung der Gewebeproben in flüssigen Stickstoff.

Das Nierengewebe wurde unabhängig von dieser Studie histopathologisch in der Pathologie des Universitätsklinikums Charite in Berlin und im Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg analysiert.

2.2. Zellkultur

Als Standards für die hypoxische Induktion von HIF-1 α /HIF-2 α wurden Proteinextrakte der humanen Hepatomzelllinie Hep3B verwendet.

Nach dem Auftauen wurden die gefrorenen Zellen (bei -80°C) mit DMEM-Nährmedium (Gibco) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum und 100 μ g/ml Penicillin/Streptomycin bis zur Konfluenz gezüchtet.

Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden unter entweder normoxischen oder hypoxischen Bedingungen (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) gewaschen und unverzüglich mit einem Zellschaber auf Eis abgelöst.

Um die Proteinextraktion durchzuführen, wurden die Zellen für fünf Minuten bei 4°C und 2000U/min. zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 500 μ l Proteinextraktionspuffer [A] versetzt und elektrisch (s.u.) homogenisiert.

2.3. Proteinnachweis im Immunoblot

2.3.1. Proteinextraktion

Um eine Degradierung der Proteine auf ein Minimum zu reduzieren, erfolgten alle Arbeitsschritte während der Extraktion auf Eis und mit gekühlten Puffern.

Die tiefgefrorenen Gewebestücke wurden mit Hilfe eines Mörsers in flüssigem Stickstoff zerkleinert und abgewogen und ein 20facher Volumenanteil an Extraktionspuffer [A] hinzugefügt. Im Anschluss daran erfolgte das Homogenisieren, mit einem elektrischen Homogenisator (Ultra-Turrax T8) der Firma IKA Staufen.

2.3.2. Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung der Extrakte über die Absorptionsmethode erfolgte mit dem BioRad DC Protein Assay (BioRad, München) nach Anweisung des Herstellers.

Bis zur weiteren Analyse wurden die Extrakte bei -80°C gelagert.

2.3.3. Immunoblotting

Für 10 Minuten wurden die Proteinextrakte bei 70°C denaturiert und durch PAGE-SDS (denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt. Für die beiden Proteine HIF-1 α /HIF-2 α wurde dafür ein 6%iges Acrylamidgel benutzt.

Zusammen mit 5x Ladepuffer **[B]** wurden auf das Gel 60 μ g der Proteinextrakte des menschlichen Gewebes gegeben. Dabei wurde jeweils paarweise das Extrakt des gesunden Teils der Niere und des Tumorgewebes desselben Patienten aufgetragen.

Als Standard der hypoxischen Induktion von HIF-1 α /HIF-2 α dienten Proteinextrakte der humanen Hepatom-Zelllinie, Hep3B (siehe 2.2. Zellkultur). In jedes Gel wurden zum Vergleich 40 μ g des normoxischen und hypoxischen Hep3B-Standards aufgetragen.

Um die Lokalisation der zu untersuchenden Proteine mit dem Molekulargewicht des Proteins vergleichen zu können, wurde auf jedes Gel ein Proteinmarker (Rainbow TM) zusätzlich aufgetragen.

Über ca. zwei Stunden erfolgte bei 12mA pro Gel die Elektrophorese in Elektrophoresepuffer **[C]**. Der Transfer der Proteine in Transferpuffer **[D]** auf eine Immobilon P-Membran aus PVDF fand bei 20 Volt über Nacht statt.

Die Membranen wurden anschließend für circa drei Stunden in einer PBS/Tween enthaltenen Milch (Blockingpuffer, **[E]**) geblockt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Nachdem wurden sie mit einem anti-HIF-1 α monoklonalen Antikörper (für HIF-1 α , **[F]**) bzw. einem anti-HIF-2 α polyklonalen Antikörper (für HIF-2 α , **[G]**) über 90 Minuten in einer Lösung von 1 μ g/ml (für HIF-1 α) bzw. in einer Lösung von 1:1000 (für HIF-2 α) inkubiert.

Vor Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte eine sorgfältige Reinigung der Membranen in PBS/Tween um anschließend für 60 Minuten mit HRP-konjugierten („horseradish peroxidase“) Antikörper, „Mouse-anti-Goat-HRP“ für HIF-1 α **[H]**, bzw. „Swine-anti-Rabbit-HRP“ für HIF-2 α **[I]** inkubiert zu werden.

Nach weiterhin gründlich durchgeführten Waschvorgängen konnten die Signale mittels eines Chemilumineszenznachweises (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate) nach Anweisung des Herstellers auf Röntgenfilmen dargestellt werden.

2.3.4. Auswertung der Signale im Immunoblot

Die Auswertung der Expression der Proteine HIF-1 α und HIF-2 α wurde semiquantitativ durchgeführt. Als Positivkontrolle war für beide die hypoxische Standardinduktion, das Hep3B-Proteinextrakt, maßgeblich. So wurde die Expression im Tumorgewebe auf der einen Seite semiquantitativ mit Hilfe des hypoxischen Hep3B-Zellextrakts verifiziert und auf der anderen Seite mit dem gesunden Nierengewebe desselben Patienten verglichen.

Erwiesen die aufgetragenen Proben keine Expression so wurden sie mit (-) bewertet. Die Extrakte, welche eine schwache, aber dennoch signifikante Expression, verglichen mit dem gesunden Gewebe zeigten, wurden mit (+) gekennzeichnet, eine sehr starke Expression, vergleichbar mit dem hypoxischen Hep3B-Standard mit (+++). Mit (++) wurden die Tumorextrakte gekennzeichnet, welche dazwischen lagen.

2.4. RNA Analyse im RNase Protection Assay

2.4.1. RNA-Extraktion

Mit Hilfe von RNAzol B wurde, nach Anweisung des Herstellers, die RNA aus dem Gewebe extrahiert. Dazu wurden die gefrorenen Gewebestücke zerkleinert, gewogen und in einen zehnfachen Volumenanteil RNAzol B aufgenommen. Anschließend erfolgte die elektrische Homogenisierung für 30 Sekunden.

Im darauf folgenden Schritt wurde den Proben ein Zehntel Volumenanteil Chloroform hinzugegeben und sorgfältig gevortext. Danach erfolgte eine Zentrifugation des Materials für weitere 15 Minuten bei 4°C und 13000 U/min. Nach Beendigung wurde die obere wässrige Phase, mit der darin gelösten RNA abgenommen und die äquivalente Menge an Isopropanol hinzugefügt. Die Proben verblieben, nach gründlichen Vortexen, zur Präzipitation für mindestens eine Stunde bei 4°C.

Im Anschluß wurde eine erneute Zentrifugation bei 4°C und 15 Minuten vorgenommen, der Überstand abgenommen und verworfen und das Pellet nochmals mit 70%igen Ethanol unter Zentrifugation aufgereinigt.

Das weitgehend trockene RNA-Pellet wurde, je nach Größe, in 50 bis 100µl Hybridisationspuffer [J] aufgenommen und für 10 Minuten bei 95°C erhitzt, um in Lösung gebracht zu werden.

2.4.2. Quantifizierung der RNA-Extrakte

Um die Konzentration des RNA-Gehaltes zu analysieren, wurde die RNA 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend der Gehalt photometrisch ermittelt. Bei einer Wellenlänge von 260 und 280nm wurde die Absorption im Photometer bestimmt.

Der Quotient aus A₂₆₀:A₂₈₀ diene zur Beurteilung eventueller Proteinkontaminationen der extrahierten RNA und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Anhand der Absorption bei 260nm wurde die RNA-Konzentration gemessen. A₂₆₀=1 entsprechen 40µg RNA/ml.

2.4.3. Herstellung der radioaktiven Sonden

Im nephrologischen Forschungslabor lagen die benötigten Plasmide der verschiedenen Gene vor. Die integrierten Genabschnitte weisen unterschiedliche Längen auf:

- 151 Basenpaare für EPO (Accession Nr.: X02157, geschütztes Fragment Nukleotid: 358-508)
- Carboanhydrase 9 (Accession Nr.: Z54349, geschütztes Fragment Nukleotid 3631-3777)
- 107 Basenpaare für U6sn (Accession Nr.: X01366, geschütztes Fragment Nukleotid: 1-107)

U6sn (small nuclear RNA) fungierte als interne Kontrolle jeder einzelnen Probe. Es ist ein in der Evolution hochkonserviertes Strukturgen.

Der Transkriptionsansatz wurde für die radioaktive Markierung der Gensonden in einem Volumen von 20µl [K], 4µl P32 GTP, 1µg des als Matritze dienenden Plasmids und entweder 20 Einheiten SP6 Polymerase oder, für die U6sn, T7 Polymerase zur Generierung von RNA-Strängen für 90 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert.

Um eine Eliminierung der DNA zu erlangen, wurden 20 Einheiten DNase I appliziert und anschließend für weitere 30 Minuten inkubiert. Durch Zugabe des vierfachen Volumens an Säulenpuffer [L] wurde die Reaktion beendet.

Das Gemisch wurde im Anschluß zur Aufreinigung mit G-50 Sephadex Säulen filtriert, um nicht inkorporierte Nukleotide zu eliminieren.

Aus dem durch die Säule aufgereinigten Volumen wurden die Nukleinsäuren durch Zugabe einer 2,5-fachen Menge absoluten Ethanol und 1/10 Volumenanteils 3M Natriumazetat pH 5,5, Gefrieren auf Trockeneis, Auftauen bei -20°C und anschließendem Zentrifugieren (15 Minuten bei 15000U/min., 4°C) gefällt. Je nach Größe wurden die RNA-Pellets in 50-80µl Hybridisationspuffer [J] aufgenommen und durch 10 minütiges Erhitzen auf 95°C und wiederholtem vortexen in Lösung gebracht.

Nach Abkühlung wurde, mit Hilfe eines Szintillationszählers, die Radioaktivität der Sonden bestimmt.

2.4.4. RNase Protection Assay

Die Hybridisierung der RNA-Extrakte mit den radioaktiven Sonden stellt den ersten Arbeitsschritt im Protection Assay dar. Für die Hybridisierung mit der EPO-Sonde wurden insgesamt 50µg, für die CA9 Sonde 20µg und für U6sn 1µg totaler RNA eingesetzt. Zur Kontrolle des vollständigen RNase Verdau der ungebundenen radioaktiven Sonde wurde jeweils ein Ansatz aus purem Hybridisationspuffer ohne RNA mitgeführt und im weiteren Verfahren identisch mit den anderen Proben behandelt.

Im nächsten Schritt wurden ca. 5×10^6 cpm („counts per minute“) radioaktiv markierter Sonde hinzugefügt. Die Methode setzt einen deutlichen Sonden-Überschuss voraus, so dass alle zu detektierenden Genabschnitte von den Sonden gebunden werden können.

Um eine Denaturierung der RNA zu erreichen, wurde der Hybridisationsansatz für 15 Minuten bei 95°C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Wasserbad für ca. 16 Stunden bei 55°C für U6sn und bei 58°C für EPO und CA9.

Um noch vorhandene einzelsträngige mRNA zu verdauen bzw. um überschüssige Sonden zu entfernen, wurde RNase A (40µg/ml) und T1 (2µg/ml) in 350 µl RNase Puffer [M] hinzugegeben, anschließend gründlich gevortext und für 30 Minuten bei 25°C im Wasserbad inkubiert.

Um die RNasen zu verdauen, wurde im folgendem jeder Probe 50µg Proteinase K (Ansatz in 50µl RNase Puffer/1%SDS) hinzugefügt und eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei 37°C schloss sich an.

Zur internen Kontrolle wurde 1/10 des Kontrollansatzes (entsprechend 100ng totaler RNA) aus dem Gemisch mit der U6sn RNA entnommen und zu dem äquivalenten Ansatz des Zielgens gegeben.

Mittels Chloroform/Phenol, das zu dem Ansatz in einer äquivalenten Menge zur Extraktion beigefügt wurde, erfolgte die Aufreinigung. Es kam nach sorgfältigen Vortexen und Zentrifugieren (bei 4°C, für 15 Minuten mit 13000U/min.) zur Ausbildung von drei Phasen:

- obere Schicht: wässrige Phase mit RNA
- mittlere Schicht: Proteine
- untere Schicht: organische Phase mit Chloroform/Phenol.

Die obere Schicht wurde behutsam abpipettiert und in ein neues Zentrifugenröhrchen (Eppendorf) überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der RNA durch Zugabe eines 2,5-fachen Volumenanteils von absoluten Ethanol und 40µg tRNA und Gefrieren auf Trockeneis. Die Proben wurden aufgetaut und die RNA durch Zentrifugation, für 15 Minuten bei 4°C mit 13000U/min., pelletiert. Jedes Pellet wurde in 5µl Ladepuffer [N] aufgenommen und dann auf 95°C erhitzt. Damit sich die RNA löst und vor Auftragen auf das Polyacrylamidgel als Einzelstrang vorliegt, musste zwischendurch gründlich gevortext werden.

Im Anschluss wurden die Proben auf ein 8%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. In die erste Bahn wurde der radioaktive Marker (pBR322 DNA-Mspl Digest) aufgetragen, um später die Position der Banden bestimmen zu können. In weitere Bahnen wurden die radioaktiven Sonden alleine gegeben. Die denaturierende Elektrophorese fand über ca. zwei Stunden bei 65 Volt statt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf Filterpapier für mindestens zwei Stunden bei 80°C im Vakuum getrocknet.

Anschließend wurde das getrocknete Gel, über Nacht bei -80°C, auf einem Röntgenfilm gelegt, auf welchem die Signale als geschwärzte Banden detektiert werden können.

2.5. In situ Hybridisierung

(in Kooperation mit der wissenschaftlichen Arbeitsgruppe von Professor Ratcliffe in Oxford, England)

Anhand von zuvor durchgeführten RNase Protection Assays (RPA) wurden die Tumorgewebsproben für die In-situ-Hybridisierung entsprechend ausgewählt. Es kamen dabei Tumore zum Einsatz, die im RPA ein sehr deutliches, ein weniger deutliches oder ein schwaches EPO Signal aufwiesen.

Von den eingefrorenen Tumorgewebsproben wurden dann im Kryotom bei -20°C 2-5 µm dicke Schnitte angefertigt. Es erfolgte im weiteren eine Fixierung auf Silan-beschichteten Objektträgern, um anschließend in das Labor von Herrn Prof. Ratcliffe zur Weiterbearbeitung geschickt zu werden.

Da die genannte Methode nicht im eigenen Labor durchgeführt wurde, ist sie hier nur in den Grundzügen erläutert. Von dem kooperierenden Labor wurde die Technik unter anderem vorbeschrieben [44].

Zur Detektion der EPO-mRNA wurde ein mit ³⁵S-UTP (Amersham, Biosciences Freiburg) markierter RNA-Strang des gesamten kodierenden Bereiches des EPO-Gens generiert. Nach erfolgtem Andau der Gewebsschnitte mit Proteinase K und Hydrolyse des ³⁵S-UTP markierten RNA-Stranges wurde dieser mit den Gewebsschnitten inkubiert. Daraufhin waren in der Dunkelfeldmikroskopie die markierten Zellen erkennbar.

2.6. Lösungen und Antikörper

[A] Proteinextraktionspuffer (PE):

8M Harnstoff/Urea, 10% Glycerol, 10mM Tris-HCl ph 6,8, 1% Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) 5mM Dithiothreitol (DTT), 0,5mM Phenylmethyl Sulfonyl Fluorid (PMSF) mit je 1mg/l Aprotinin, Pepstatin und Leupeptin

[B] Ladepuffer

250µM Tris; 50% Glycerol; 10% SDS; 500µM DTT; 0,5% Bromophenol Blau

[C] Elektrophoresepuffer:

25mM Tris-Base; 200mM Glycin; 0,1% SDS

[D] Transferpuffer:

10mM Tris; 100mM Glycin; 10% Methanol; 0,05% SDS

[E] Blockingpuffer:

5%iges Milchpulver; PBS/0,1% Tween 20

[F] Antikörper gegen HIF-1 α :

Maus-anti-HIF-1 α monoklonaler Antikörper; Transduction Laboratories; Lexington, USA

[G] Antikörper gegen HIF-2 α :

Hase-anti-HIF-2 α polyklonaler Antikörper; NOVUS biologicals; Littelton, USA

[H] sekundärer Antikörper für HIF-1 α :

Goat-anti-Mouse, HRP-konjugiert; DAKO-UK

[I] sekundärer Antikörper für HIF-2 α :

Swine-anti-Rabbit, HRP-konjugiert; DAKO-UK

[J] Hybridisationspuffer:

80% Formamid; 40mM Pipes pH 6,4; 400mM Natriumchlorid (NaCl); 1,0mM EDTA

[K] „master mix“-Lösung:

1x Transkriptionspuffer; 10mM DTT ; je 0,5M CTP, ATP, UTP; 20 Einheiten Human Placenta RNase Inhibitor

[L] Säulenpuffer:

100 μ M Tris-HCl pH 7,5; 50nM EDTA; 0,0005% SDS

[M] RNase Puffer:

10mM Tris-Cl 7,5; 5mM EDTA; 300mM NaCl

[N] Ladepuffer:

80% Formamid; 1xTBE; <0,1% Bromophenol blue; <0,1% Xylene Cyanol

2.7. Chemikalien

Acrylamidlösung	Carl Roth GmbH	Karlsruhe-Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma	Steinheim-Deutschland
ATP	Rouche	Mannheim-Deutschland
Bisacrylamid	Carl Roth GmbH	Karlsruhe-Deutschland
Chemielumineszenz (ECL)	Pierce	Rockford-USA
Coomassie Blue	Sigma	Steinheim-Deutschland
CTP	Rouche	Mannheim-Deutschland
DEPC-H ₂ O	Sigma	Steinheim-Deutschland
DNase I	Rouche	Mannheim-Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma	Steinheim-Deutschland
EDTA	Sigma	Steinheim-Deutschland
Formamid	Sigma	Steinheim-Deutschland
G-50 Sephadex Säulen	Rouche	Mannheim-Deutschland
Glycin	Sigma	Steinheim-Deutschland
Glycerol	Sigma	Steinheim-Deutschland
Harnstoff/Urea	Sigma	Steinheim-Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt-Deutschland
Methanol	Baker	Deventer-Holland
Milchpulver	Frema Reform	Lüneburg-Deutschland
NaCl	Merck	Darmstadt-Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck	Darmstadt-Deutschland
NTP mix	GIBCO-BRL	Karlsruhe-Deutschland
pBR322 DNA-Mspl Digest	New England Biolabs	Frankfurt-Deutschland
Penicillin	Biochrom HG	Berlin-Deutschland
Pipes	Sigma	Steinheim-Deutschland
PMSF (Phenylmethyl Sulfonyl Fluorid)	Sigma	Steinheim-Deutschland

Proteinase K	Sigma	Steinheim-Deutschland
PVDF-Membran	Millipore	Bedford-USA
Rainbow-Marker	Amersham	England
	Pharmacia Biotech	
RNAasin	Roche	Mannheim-Deutschland
RNAzol B	Biogenesis	Poole-England
S6-Polymerase	Boehringer	
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	Sigma	Steinheim-Deutschland
Streptomycin	Biochrom KG	Berlin-Deutschland
T7-Polymerase	Boehringer	
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma	Steinheim-Deutschland
Transkriptionspuffer	Roche	Mannheim-Deutschland
Tris	Sigma	Steinheim-Deutschland
Tween 20	Sigma	Steinheim-Deutschland
(Polyoxyethylensorbitan Monolaurate)		
UTP	Rouche	Mannheim-Deutschland
Polyacrylamidgel	Kit der Firma Sequagel, National diagnostics Inc., Hesse Hull, England	
Whatman-Filterpapier		
Trockeneis		
Flüssiger Stickstoff		

Proteaseinhibitoren:

Aprotinin	Sigma	Steinheim-Deutschland
Leupeptin	Sigma	Steinheim-Deutschland
Pepstatin	Sigma	Steinheim-Deutschland

2.8. Geräte

CSA-Amplifikationssystem	DAKO	Hamburg-Deutschland
Homogenisator IKA Ultra-Turrax T8	Janke&Kunkel	Staufen-Deutschland
96 Wellplatte	Nuc	Wiesbaden-Deutschland
Gelkammern(Mini Protean 3)	BioRad	Hempstead-England

Material und Methoden

Reagiergefäße Microtube 1,5ml	Sarstedt	Nümbrecht-Deutschland
BioRad Power Pack 200	BioRad	Hemstead-England
BioRad Modell 200/2.0 Power Supley	BioRad	Hemstead-England
RNA-Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech	England
Röntgenfilm 35x43cm	Kodak X-OMT LS	USA
Biofuge fesco	Heraeus Instruments	Osterode-Deutschland
Biofuge 15	Heraeus Sepatech	Osterode-Deutschland
Waage Mettler AE 260	Delta Rampe	Deutschland
Falcon-Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	Becton Dickinson	USA
	Labware	
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortech.	Deutschland
Falcon-Röhrchen (10ml, 15ml)	Becton Dickinson	USA
	Labware	
Minishaker MS1		USA
Combitips plus 2,5ml	Eppendorf AG	Hamburg-Deutschland
Szintillationszähler	Wallac	Boston-USA
Phosphoimager	Fujix, BAS 2000	Fuji-Japan