

3 Materialien und Methoden

3.1 Patienten

Es wurden insgesamt Kolongewebsproben von 67 Patienten (36 Männer, mittleres Alter $64,1 \pm 13,1$ Jahre, range 26 bis 90 Jahre und 31 Frauen, mittleres Alter $68,5 \pm 14,5$ Jahre, range 39 bis 91 Jahre) untersucht, wobei 64 dieser Patienten ein kolorektales Karzinom hatten. Bei drei Patienten zeigten sich tubulovillöse bzw. tubulöse Adenome. Aufgrund der Genese der Kolonkarzinome über die Adenom-Karzinom-Sequenz wurden auch diese Gewebeproben hinsichtlich ihrer ER β -Expression untersucht, jedoch wurden sie bei der Analyse der Expressionen in den Tumorgeweben nicht berücksichtigt. Nach präoperativer Einwilligung wurden während der Operation bei jedem Patienten sowohl Gewebeproben aus gesundem Kolongewebe, sowie Gewebeproben aus dem Tumorgewebe entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

3.2 Histologie

49 Adenokarzinome waren im Kolon lokalisiert, elf im Rektum und vier im kolorektalen Übergang. Die Tumorklassifikation der pathologischen Gewebeproben nach TNM erfolgte durch das „Institut für Pathologie“ des Campus Charité Mitte. Die TNM-Klassifikation dient der Bestimmung der Ausbreitung eines Tumors, wobei das T für die Tumorgöße und damit auch für die Invasivität des Primärtumors steht. Ein weiteres Kriterium für die Beschreibung der Ausbreitung eines Tumors ist die Beurteilung des Lymphknotenbefalls. Tumorzellen können aus dem Primärtumor lymphogen in regionäre Lymphknoten ausgeschwemmt werden und sich dort vermehren, so dass es zur Entstehung regionärer Lymphknotenmetastasen kommen kann (N-Stadien). Eine Aussage über die Malignität eines Tumors kann mit Hilfe des Grading, d. h der Einteilung in Differenzierungsgrade, getroffen werden. Dabei ist diese Einteilung eine wichtige therapeutische und prognostische Größe.

3.3 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Materialien und Geräte:

Ultraturrax T25	IKA, 2953000, Staufen, D
90 Well Mikrotiterplatte	
FLUOstar Galaxy V4.30-0	BMG Labtechnologies, Offenburg, D

Reagenzien:

PBS	Gipco, 14287-080, Karlsruhe, D
Igepal CA-630	Sigma, I-3021, Steinheim, D
Sodiumdeoxycholate	Sigma, D-6750, Steinheim, D
PMSF	Sigma, P-7626, Steinheim, D
Protease Cocktail Tabletten	Roche, 1 836 153, Mannheim, D
BCA- Protein Assay-Reagenz A	Uptima, UP9542A4
4% Kupfer-II-Sulfat-Pentahydrat	Merck, 1.02790, Darmstadt, D
Rinder-Serum-Albumin	Sigma, A6003, Deisenhofen, D

Zusammensetzungen Puffer:

<i>Ripa-Puffer</i>	100 ml 1xPBS
	1% Igepal CA-630
	0,5% Sodiumdeoxycholate
	0,1% SDS

Vor dem Benutzen 10 µl PMSF und Protease Cocktail Tabletten (1 auf 15-25 ml Puffer) dazugeben.

<i>Standard-Aliquot für BCA</i>	2000 µg Rinder-Serum-Albumin/1 ml Aqua dest.
---------------------------------	---

Aus diesem Standardaliquot wurde eine Verdünnungsreihe von 62,5 µg/ml-1000 µg/ml angesetzt.

<i>BCA-Mix</i>	BCA-Protein Assay-Reagenz: Kupfer-Sulfat mischen im Verhältnis 1:50
----------------	---

Durchführung:

Die Biochinonicsäuremethode (BCA) beruht prinzipiell auf der sogenannten Biuretreaktion, bei der Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung mit Proteinen einen blauvioletten Komplex bilden, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen werden kann.

Um die Proteinkonzentration im Kolongewebe messen zu können, musste zuerst ein verdünntes Homogenisat aus Gewebe und Puffer hergestellt werden. Dafür wurde jeweils 1 ml Ripa-Puffer in ein Falconröhrchen vorgelegt und anschließend wurden jeweils 150 µg der zu untersuchenden Gewebeprobe eingewogen. Mit dem Ultraturrax wurde das Gewebe homogenisiert und anschließend in Flüssigstickstoff tiefgefroren.

Mittels der BCA-Messung erfolgte nun die Einstellung aller Proben auf die gleiche Proteinkonzentration. Hierfür wurden die Proben nach dem Auftauen zunächst im Verhältnis 1:75 mit Aqua dest. verdünnt. Zusätzlich wurde der BCA-Standard in einer Verdünnungsreihe von 5 Proben mit den Konzentrationen 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml und 62,5 µg/ml angesetzt. 20 µl der verdünnten Proben, der Standardproben und eines Leermediums (Aqua dest.) wurden auf eine Microtiterplatte aufgetragen und mit jeweils 300 µl BCA-Mix bedeckt. Die Platte kam dann für etwa 30 Minuten bei 37°C in den Brutschrank. Danach konnte mit dem Fotometer die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bei 550 nm gemessen werden (Lowry et al. 1951). Durch gegebenenfalls weitere Verdünnung wurden anschließend alle Proben auf eine Proteinkonzentration von 125 µg/20 µl eingestellt .

3.4 Western Blot

Das Prinzip des Western Blots beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach der Molekülgröße. Hierbei werden die aufgetrennten Proteingemische aus einer Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel liegendes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Proteinnachweis mittels eines spezifischen Antikörpers, dem Primärantikörper. Dieser wird dann durch einen zweiten Antikörper, dem Sekundärantikörper, detektiert. Inkubiert man die Membran für etwa 1 Minute mit einer Entwicklersubstanz, so kann man anschließend in einer Dunkelkammer die Banden auf einem Röntgenfilm darstellen. Die Western Blot Analyse erfolgte nach einem standardisiertem Protokoll (Luss et al. 1996).

Materialien und Geräte:

Blockthermostat BT 200	Kleinfeld, Gerden, D
Mini Protean 3 Electrophoresis-Cell-Set	Bio-Rad, 165-3301, München, D
Mini Trans-Blot Cell-Set	Bio-Rad, 170-3930, München, D
Gelgießvorrichtung	Bio-Rad, 165-2943, München, D
Glasplatten innen	Bio-Rad, 165-2907, München, D
Glasplatten außen	Bio-Rad, 165-2908, München, D
Abstandshalter	Bio-Rad, 165-2933, München, D
10-Taschen-Gelkamm	Bio-Rad, 165-2922, München, D
Gelkammer	Bio-Rad, 165-2946, München, D
Puffertank für Mini Protean	Bio-Rad, 165-2975, München, D
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad, 162-0112, München, D
Gel-Blotting-Papier	Merck, GB002, Darmstadt, D
Kodak X-omat AR Film	Kodak, 636 03 5, Rochester, NY, USA

Reagenzien:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, 1.06345.1000, Darmstadt, D
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, 1.06580.1000, Darmstadt, D
NaCl	Merck, 1.06404.1000, Darmstadt, D
Glycin	Serva, 23390, Heidelberg, D
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Merck, 8.17034.1000, Hohenbrunn, D
Tris Base	Sigma, T-1503, Steinheim, D
HCl	Sigma H-7020, Steinheim, D
Ammonium Peroxidsulfat (APS)	Sigma, A-9164, Deisenhofen, D
Acrylamid 30%	Roth, 3029.1, Karlsruhe, D
Methanol	J.T.Baker, 8045, Deventer, NL
Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	Sigma, T-9281, Deisenhofen, D
Tween20	Aldrich, 27.434-8, Steinheim, D
β -Mercaptoethanol	Calbiochem, 444203, Darmstadt, D
Bromphenoblau	Sigma, B-6896, Deisenhofen, D
Glycerol	Sigma, G-7757, Steinheim, D
Ponceau S	Merck, 1.14275.0010, Darmstadt, D
Trichloressigsäure	Merck, 807.1000, Darmstadt, D

Sulfosalicylsäure	Sigma, S-2130, Steinheim, D
Coomassie-brilliant-blue	Fluka 27816, Steinheim, D
Essigsäure	Merck, 1.00063.2500, Darmstadt, D
Blot-Quick-Blocker (Milchpulver)	Roth, T145.2, Karlsruhe, D
Natriumazid	Merck, 1.06688.0100, Darmstadt, D
Reblot plus kit	Chemicon, 2500, Temecula, USA
ECL Western blotting detection reagents	Amersham, RPN2106, Freiburg, D
Rainbow protein molecular weight marker	Fermentas, SM0671, St. Leon-Rot, D
Beta-actin mouse anti human(Prim. AK)	Sigma, A-5441, , Taufkirchen, D
ER beta mouse anti human (Prim. AK)	Abcam, AB 288, Cambridge, UK
POD labelled anti mouse (Sek.AK)	Amersham, NA931, Freiburg, D

Zusammensetzungen Puffer:

5xLadepuffer für SDS-Gel (Lämmli-Puffer):

für 100 ml:

0,4 M Tris base (4,84 g)

10% SDS (10 g)

50% Glycerol (50 ml)

25% β -Mercaptoethanol (25 ml)

1 Spatelspitze Bromphenolblau

auf pH 7,5-8,0 titrieren

Trispuffer pH 8,8:

1,5 M Tris base (18,15 g)

100 ml Aqua dest.

mit konzent. HCl auf pH 8,8 titrieren

Trispuffer pH 6,8:

1 M Tris base (12 g)

100 ml Aqua dest.

mit konzent. HCl auf pH 8,8 titrieren

Laufpuffer

3,02 g Tris base

18,8 g Glycin

in 900 ml Aqua dest. lösen

10 ml SDS dazugeben

und auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

Blot buffer

1 M Tris base-Lsg. (6,055 g/mol)
 1,9 M Glycinlsg. (28,538 g/mol)
 10 ml 10% SDS-Lsg.
 200 ml Methanol
 und auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

*Waschpuffer PBS mit Tween20:
 (10fach Stock)*

0,5 M Na₂HPO₄·2H₂O (82,3 g)
 0,17 M NaH₂PO₄·2H₂O (26,5 g)
 0,68 M NaCl (39,7g)
 in 800 ml Aqua dest. auflösen
 und auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

Die Stocklösung wird vor dem Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und mit 1 ml Tween20 versetzt.

Reblot Reagenz:

15 ml Waschpuffer
 1,5 ml Reblot (mild)

Gelzusammensetzung:*Runninggel (12,5%, für ein Gel):*

Aqua dest.	3,4 ml
Acrylamid	4,0 ml
Trispuffer pH 8,8	2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml
APS 10%	50 µl
TEMED	5 µl

Die Zusammensetzung des Runninggels richtete sich hierbei nach der Größe des zu untersuchenden Proteins. So würde man zum Beispiel bei einer Proteingröße von 70-200 kDa ein 5%iges Gel verwenden und ein 15%iges bei einer Größe von 8-50 kDa.

Da das zu untersuchende Protein ERβ eine Größe von 53 und 59 kDa besitzt, wurde hier ein 12,5% Runninggel gewählt, das einen Bereich von 10-70 kDa abdeckt.

<i>Loadinggel:</i>	Aqua dest.	3,2 ml
	Acrylamid	0,5 ml
	Trispuffer pH 6,8	1,25 ml
	SDS 10%	50 µl
	APS 10%	100 µl
	TEMED	10 µl

Zusammensetzung Färbelösungen:

<i>Poinceau S Solution:</i>	2 g Ponceau S
	30 g Trichloressigsäure
	30 g Sulfosalicylsäure
	in 80 ml Aqua dest. lösen und dann mit
	Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

<i>Coomassie blue</i>	0,3 g Coomassie-brilliant-blue
	180 ml Methanol
	40 ml Essigsäure

Verdünnung der Antikörper:

Primärantikörper (PAK):

Sowohl der Antikörper ER β Maus-Anti-Human, als auch der Antikörper β -actin Maus-Anti-Human sollen, laut Angaben des Herstellers, in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet werden. Die folgenden Mengenangaben gelten für die Inkubation zweier Membranen.

ER β Maus-Anti-Human (1:2000)	15 ml Waschpuffer
β -actin Maus-Anti-Human (1:2000)	7,5 µl PAK
	150 µg Milchpulver

Die Primärantikörper können mehrmals verwendet werden. Dafür müssen sie nach jedem Gebrauch mit 0,01% Natriumazid (15 µl auf 15 ml verdünnten Antikörper) versetzt werden und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Sekundärantikörper (SAK):

Sowohl für den ER β - als auch für den β -actin-Nachweis wurden verschiedene Sekundärantikörperverdünnungen ausgetestet. Die optimalsten Ergebnisse wurden für den Östrogenrezeptor mit einer Verdünnung des Sekundärantikörpers von 1:1000 erzielt. Für den β -actin-Nachweis genügte eine Verdünnung von 1:2000. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich wiederum auf die Inkubation zweier Membranen.

POD markiert Anti-Maus 1:1000	15 ml Waschpuffer 15 μ l SAK 150 μ g Milchpulver
POD markiert Anti-Maus 1:2000	15 ml Waschpuffer 7,5 μ l SAK 150 μ g Milchpulver

Durchführung:

Die zu untersuchenden Proben wurden wie unter 3.3 beschrieben auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt. Sodann wurden die Proben 1:4 mit Lämmli-puffer gemischt (20 μ l Probe:5 μ l Lämmli-puffer) und für 5 min bei 95°C im Heizblock inkubiert, um eine Denaturierung der Proteine zu bewirken. Nach kurzem Anzentrifugieren bei 4°C wurden die Probengemische in die Geltaschen gefüllt. Zusätzlich wurden noch ein Marker (Rainbowmarker) zur Identifizierung der Banden, und eine Negativkontrolle (Aqua dest.) auf das Gel aufgetragen. Anschließend kamen die Gele in den Puffertank, der mit dem Laufpuffer aufgefüllt wurde. Die elektrophoretische Auftrennung wurde zunächst bei 80 V gestartet, bis die Proben in das Runninggel eingetreten waren. Dann wurde die Spannung auf 110 V erhöht. Die Gesamtlaufzeit betrug etwa 210 min.

Mit dem Prinzip des Semi-Dry-Transfer wurde das Gel auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Für den Transfer wurde das Gel der Nitrocellulose-Membran angelegt und zwischen Filterpapieren, die zuvor in Blot buffer getränkt wurden, in einer Kassette eingespannt. Die Kassetten kamen zusammen mit einem Eisakku in die Blottingkammer, die dann mit Blot buffer aufgefüllt wurde. Die Transferzeit betrug eine Stunde bei einer Spannung von 340 mA. Nach einer einstündigen Blockung der unspezifischen Bindungsstellen der Proteine mit verdünntem Milchpulver (20%) folgte über Nacht die Inkubation der Membranen mit einem spezifischen verdünntem Primärantikörper bei 4°C im Kühlraum. Dieser Primärantikörper ist gegen das zu

untersuchende Protein gerichtet und reagiert mit der Proteinoberfläche der Nitrocellulose-Membran. Danach erfolgte eine weitere gründliche Waschung mit dem Waschpuffer für 3x20 min. Anschließend wurden die Membranen für 90 Minuten in dem verdünnten Sekundärantikörper, der mit dem Fc-Fragment des primären Antikörpers reagiert, bei Raumtemperatur inkubiert. Die jeweiligen Verdünnungen der Antikörper richteten sich entweder nach den Empfehlungen des Herstellers oder wurden sekundär modifiziert (s.o.).

Im Anschluss an die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte erneut eine gründliche Waschung und die Detektion mittels ECL-Detection-Kitt durch Chemiluminescence, die auf dem Prinzip der Lichtemission beruht. Hierbei führt die Oxidation des Luminols zu einer Lichtemission mit einer maximalen Wellenlänge von 428 nm, welche in einer Dunkelkammer mit Hilfe von Entwicklergerät und Film die spezifischen Banden sichtbar werden lässt.

Nach der Entwicklung wurden die Membranen mittels eines Reblot-Reagenz gestrippt, um anschließend den β -actin-Nachweis vorzunehmen. Hierfür wurden die Membran zunächst eine Stunde in dem verdünnten Primärantikörper und nach einem kurzem Waschgang für 90 Minuten in dem verdünnten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur gewaschen. Abschließend erfolgte erneut die Detektion mit dem ECL-Detection-Kitt und die Entwicklung in der Dunkelkammer.

3.5 RNA-Isolierung

Materialien und Geräte:

Ultraturrax T25	IKA, 2953000, Staufen, D
FLUOstar Galaxy V4.30-0	BMG Labtechnologies, Offenburg, D

Reagenzien:

Guanidin-Thiocyanat	Sigma, G-7028, Deisenhofen, D
Natriumcitrat	USB, Cat. 13735, Cleveland, USA
N-Lauryl-Sarcosine	Sigma, L-9150, Deisenhofen, D
β -Mercaptoethanol	Calbiochem, 444203, Darmstadt, D
Natriumacetat	Sigma, S-2889, Deisenhofen, D
Phenol	Sigma, P-4682, Deisenhofen, D
Chloroform	Sigma, C-2432, Steinheim, D
Isoamylalkohol	Sigma, I-9392, Deisenhofen, D
Isopropanol	Sigma, I-9516, Deisenhofen, D

Ethanol	Merck, 1.00986.1000., Darmstadt, D
DEPC	Sigma, D-5758, Deisenhofen, D

Zusammensetzungen:

Solution D

4 M Guanidin-Thiocyanat
 25m M Na-Citrat, pH7
 0,5% N-Lauryl-Sacrosine
 0,1 M β -Mercaptoethanol

DEPC-Wasser

1 ml DEPC auf 11 steriles Aqua dest.

Durchführung:

Für die Isolierung der RNA wurden je 150 mg der kryokonservierten Gewebeproben in 1 ml Solution D gegeben und mit dem Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurden 0,1 ml Na-Acetat, 950 μ l Phenol und 0,2 ml Chloroform-Isoamylalkohol in einem Verhältnis von 49:1 hinzugefügt. Nach Fraktionierung der Proben in je 1 ml Homogenat wurden sie für 20 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand mit der darin enthaltenen RNA wurde weiterverwendet, die beiden unteren Phasen wurden verworfen. Zu den Proben wurde nun in gleichen Teilen Isopropanol dazugegeben und anschließend wurden sie für eine Stunde bei minus 20°C gelagert. Hierbei fällt die RNA in Form eines Präzipitats aus. Nach einer weiteren Zentrifugation für 20 Minuten bei 10000 g wurde das Pellet mit 0,3 ml Solution D und 0,3 ml Isopropanol versetzt und eine Stunde bei minus 20°C inkubiert. Das Pellet wurden dann erneut für 20 Minuten bei 10000 g zentrifugiert und anschließend in 75% Ethanol resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 10000 g. Danach wurde der Überstand bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend erfolgte die Lösung der RNA mit 250 μ l DEPC-Wasser.

Für die Bestimmung der Konzentration wurde die RNA mit sterilem Aqua dest. 1:50 verdünnt. Anschließend wurde mit dem Fotometer die Konzentration (Absorptionsmaximum bei 260 nm) gemessen. Alle Proben wurden auf eine Konzentration von 0,1 μ g/ μ l eingestellt und danach bei minus 20°C eingefroren. Zusätzlich wurde noch die Ratio, das heißt der Quotient der Messwerte von 260 nm und 280 nm, bestimmt, um die Qualität der extrahierten RNA beurteilen zu können. Ein Quotient von >1,7 zeigt einen reinen RNA-Gehalt an, während es bei einer Ratio von <1,7 zu Verunreinigungen mit Protein oder Phenolen gekommen ist. Alle Materialien und Geräte, die für die RNA- Extraktion genutzt worden sind, wurden autoklaviert bzw. mit DEPC-Wasser gespült.

3.6 Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Methode, mit der man auch aus winzigen Spuren eines Ausgangsmaterials RNA-Fragmente nachweisen kann. Hierfür wird zunächst aus dem zu untersuchenden Gewebe die Gesamt-RNA isoliert und mittels einer reversen Transkriptase zu cDNA umgewandelt.

Dann folgt die eigentliche Polymerase-Ketten-Reaktion, die sich in drei Schritte gliedert. Als erstes werden die Doppelstränge denaturiert. Im nächsten Schritt, dem Annealing, werden die beiden Einzelstränge mit einem künstlichen Ansatzstück (Primer) für die Taq-DNA-Polymerase versehen. Die so vorbereiteten Einzelstränge werden dann durch die Taq-DNA-Polymerase jeweils wieder zum Doppelstrang ergänzt. Diese Schritte werden in zahlreichen Zyklen durchlaufen, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung des Ausgangsmaterials kommt. Mittels Gelelektrophorese können nun die entsprechenden Gene analysiert werden.

Geräte:

Thermocycler PTC-100 und PTC-200	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, D
Power Pac 200	Biorad, 165-5053, München D
UV-Messgerät	Biometra TI3/Biodoc2, Göttingen, D

Reagenzien:

Oligo(dt) 12-18	Gibco, 18418-012, Karlsruhe, D
RNAse out	Promega N 2111, Mannheim, D
Tris HCl	Sigma, T-3253, Deisenhofen, D
KCl	Merck, 4936.1000., Darmstadt, D
MgCl ₂	Merck, 2478179, Darmstadt, D
Agarose	Roth, 2267.4, Karlsruhe, D
DTT	Sigma, D-0623, Deisenhofen, D
Superscript II RT	Gibco, 18064-14, Karlsruhe, D
Xylencyanol	Sigma, X-4126, Deisenhofen, D
Bromphenolblau	Sigma, B-6896, Deisenhofen, D
Glycerol	Sigma, G-7757, Deisenhofen, D
Tris Base	Sigma, T-1503, Steinheim, D
Borsäure	Sigma, B-6768, Steinheim, D

EDTA-Lösung	Sigma E-5134, Steinheim, D
NaOH-Plätzchen	Sigma, S-0899, Steinheim, D
50 Base pair ladder	Amersham Biosciences, 27-4005-01, Freiburg, D
Ethidiumbromid	Sigma, E-8751, Deisenhofen, D
dNTP	Gibco, Cat-No. 10297-018, Karlsruhe, D
Taq Polymerase	Gibco, Cat-No. 10342-020, Karlsruhe, D
Primer für human ER β	Thermo Electron, Ulm, D
Primer für β -actin	Interactiva, Ulm, D

Zusammensetzungen:

Ladepuffer

0,25 g Xylencyanol
0,25 g Bromphenolblau
40% Glycerol

5xTBE-Puffer

54 g Tris base
37,5 g Borsäure
20 ml 0,5 M EDTA-Lsg. (pH8)
auf 1 l Aqua dest.

Da der Puffer 0,5fach verwendet wird, muss er 1:10 mit Aqua dest. verdünnt werden. Danach wird der Puffer autoklaviert.

Basenpaarleiter

20 ml Base pair ladder
162 μ l 0,5xTBE-Puffer
18 μ l Ladepuffer

10xPCR-Puffer

200 mM Tris-Hcl
500 mM KCl

<i>Mix für Umschreibung(für 1 Probe)</i>	2 µl 10xPCR Puffer (ohne Mg)
	2 µl 25 mM MgCl ₂
	1 µl 10 mM dNTP
	2 µl 0,1 M DTT
<i>Mastermix(für 1 Probe)</i>	2 µl 10xPCR Puffer
	1 µl dNTP's
	1 µl Primer as
	1 µl Primer s
	0,3 µl Taq Polymerase
	1 µl MgCl ₂
	11,7 µl DEPC-Wasser

Primerkonzentrationen

ERbeta, Beta-actin :

Der Hersteller gibt das Lösungsvolumen für 100 pmol/µl (= 100 µM) an. Der Primer wurde mit dem doppelten Volumen DEPC-Wasser auf 50 µM verdünnt und in Aliquots a 10 µl abgefüllt. Vor dem Benutzen werden die Primer durch Zugabe von 90 µl DEPC-Wasser 1:10 verdünnt (5 µM) und so in die PCR eingesetzt.

Durchführung:

Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde 1 µg RNA der zu untersuchenden Probe mit 1 µl Oligo 12-18 und 1µl RNase out versetzt. Dieses Gemisch wurde im Thermocycler für 10 min auf 70°C erhitzt und danach auf Eis gestellt. Zu den Proben wurde nun jeweils 7 µl des Mixes für die Umschreibung dazugegeben. Die Proben kamen erneut für 5 min bei 42°C in den Thermocycler. Danach wurde in jedes Tube 1 µl Super Script II RT gegeben. Die Proben wurden nun für 50 min bei 42°C und anschließend für 15 min bei 70°C in den Thermocycler gegeben. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die fertigen cDNA-Proben bei minus 20°C gelagert.

Zur Amplifizierung der cDNA wurden spezifische Primer verwendet und unterschiedliche Versuchsabläufe durchgeführt. Alle Proben wurden steril behandelt und auf Eis gehalten. Für jede Probe wurden 18 µl des Mastermixes vorgelegt und jeweils 2 µl der entsprechenden cDNA dazugegeben. Die Proben wurden gemischt, zentrifugiert und anschließend in das PCR-Gerät zum Nachweis der gesuchten Gene eingesetzt. Durch gleichzeitige Analyse eines sogenannten

„house-keeping gene“, wie beta-actin, kann der Einsatz gleichmäßiger DNA Mengen in den untersuchten Proben kontrolliert werden.

Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte. Hierfür wurde ein 1%es Agarosegel angefertigt. Durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes (Ethidiumbromid) können die Banden nach Beendigung des Laufvorganges sichtbar gemacht und fotografiert werden. Das Gel wurde in eine Kammer eingesetzt und diese mit 0,5xTBE-Puffer aufgefüllt. Vor dem Einfüllen der Proben in die Geltaschen wurden diese mit Ladepuffer gemischt (10 ml Probe+2 µl Ladepuffer). Zusätzlich wurde in je eine Geltasche der Basenpaarleiter und eine Negativkontrolle (Aqua dest.) pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V. Die Laufzeit betrug insgesamt 90 min.

Nach Beendigung des Laufvorganges wurde das Gel in einer Dunkelkammer auf eine UV-Platte gelegt und fotografiert.

Folgende Primer wurden zur Analyse genutzt.

<u>ER beta</u>	297bp (Mosselman et al. 1996)
Sense	5` ATA GCC CTG CTG TGA TGA A `3
Antisense	5` AGT GAG CAT CCC TCT TTG AA `3

<u>beta-actin</u>	289bp (Du Breuil et al. 1993)
Sense	5` ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA `3
Antisense	5` CGG AAC CGC TCA TTG CC `3

PCR-Schritte:

	ER beta		beta-actin	
1	96°C	3min	94°C	3min
2	96°C	30sek	94°C	1min
3	58°C	30sek	58°C	1min
4	72°C	90sek	72°C	2min
5	38 Zyklen	Schritte 2-4	29 Zyklen	Schritte 2-4
6	72°C	10min	72°C	10 min.
7	4°C	∞	4°C	∞

3.7 Statistik

Nach dem Einscannen der Fotos wurde die Intensität der einzelnen Banden mittels der Computersoftware „Un-scan-it gel version 5.1“ densitometrisch eingelesen. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde aus allen Datensätzen der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) berechnet. Der statistische Unterschied zwischen den nicht verbundenen Datensätzen wurde mit Hilfe des student'schen T-Test ermittelt. Alle Berechnungen erfolgten mittels Microsoft Excel 2002. Innerhalb der Abbildungen wurden nicht signifikante Ergebnisse als „n.s.“ gekennzeichnet. Signifikante Veränderungen wurden wie folgt dargestellt:

* p<0,05

** p<0,01

*** p<0,001