

3 Material und Methoden

3.1 Material

| Lösungen und Puffer | Zusammensetzung/ Herstellung |
|---|---|
| GTC-Lysispuffer | 4M Guanodinium-Isothiocyanat-Lösung, 25 mM Natriumcitrat, pH 7,1; 2 % β -Mercaptoethanol |
| Verdünnungspuffer (Dilution-buffer) | 6x SSC, 10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, 0,25 % SDS |
| 5x RNA Fragmentierungspuffer | 200mM Tris-Acetat, 150mM MgOAc, 500mM KOAc, in DEPC-Wasser, die Lösung wurde durch einen 0,2 μ m Sterilfilter filtriert und bei -20 °C aufbewahrt. |
| 2x MES Hybridisierungspuffer | 200mM MES Lösung, 2M NaCl, 40mM EDTA, 0,02 % Tween 20 in DEPC-Wasser, die Lösung wurde durch einen 0,2 μ m Sterilfilter filtriert und bei -20 °C aufbewahrt. |
| MES Lösung | 0,33M MES Monohydrat, 0,89M MES Natriumsalz, in DEPC-Wasser, die Lösung wurde durch einen 0,2 μ m Sterilfilter filtriert und bei 2-8 °C gelagert. |
| Stringenter Waschpuffer (Wash B) | 100mM MES Lösung, 0,1 M NaCl, 0,01 % Tween 20, die Lösung wurde durch einen 0,2 μ m Sterilfilter filtriert und bei 2-8 °C gelagert. |
| Nicht-stringenter Waschpuffer (Wash A) | 6x SSPE, 0,01 % Tween 20, die Lösung wurde durch einen 0,2 μ m Sterilfilter filtriert und bei 2-8 °C gelagert. |
| TE-Puffer | 10mM Tris-HCL, 1mM EDTA (pH 7,5) |
| 2x Färbepuffer | 200mM MES Lösung, 2M NaCl, 0,1 % Tween 20, in DEPC-Wasser, die Lösung wurde durch einen 0,2 μ m Sterilfilter filtriert und bei -20 °C aufbewahrt. |
| SAPE Färbelösung (Streptavidin, R-Phycorythrin Konjugat) pro Chip | 800 μ l 2x Färbepuffer, 64 μ l BSA (50mg/ml), 16 μ l SAPE (1mg/ml), 720 μ l DEPC-Wasser |
| Antikörper Lösung pro Chip | 400 μ l 2x Färbepuffer, 32 μ l BSA (50mg/ml), 4,8 μ l biotinylierte Anti-Streptavidin Antikörper Lösung (0,5 mg/ml), 8 μ l IgG (aus Ziegenserum), 355,2 μ l DEPC-Wasser |

| Kits | Hersteller |
|---|-----------------------------------|
| PolyAtract [®] System 1000 Kit | Promega (Mannheim, D) |
| T7 Kit | Ambion (Huntingdon, GB) |
| RNeasy Mini Kit (250) | Quiagen (Hilden, D) |
| GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit | Amersham Bioscience (Freiburg, D) |

| Chemikalien | Hersteller |
|---|--|
| Ampli Taq DNA Polymerase with GeneAmp 10xReaction Buffer | Applied Biosystems (Foster City, USA) |
| Antikörper Lösung (IgG Reagenz aus Ziege) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) |
| Anti-RNase 28U/μl | Ambion (Huntingdon, GB) |
| B2 Kontroll-Oligonukleotid (5nM) | Metabion GmbH (Martinsried, D) |
| beta-Mercaptoethanol 48,7 % (PolyATtract 1000) | Promega (Mannheim, D) |
| biotinylated Oligo-dT (PolyATtract 1000) | Promega (Mannheim, D) |
| biotinylierte Anti-Streptavidin Antikörper Lösung (Ziege) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) |
| BSA (bovine serum albumin) 50mg/ml | Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) |
| DEPC-Wasser | Roth (Karlsruhe, D) |
| Dilution Buffer (PolyATtract 1000) | Promega (Mannheim, D) |
| DNA-Marker (pTRI-Xef 1) 0,5mg/ml | Ambion (Huntingdon, GB) |
| DNA-Marker (pTRI-Xef 1) 0,5mg/ml (T7 Kit) | Ambion (Huntingdon, GB) |
| dNTP`s 100mM | Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg, D) |
| DTT 0,1M | Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) |
| E. coli DNA Ligase 100 U/μl | Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) |
| E. coli DNA Polymerase I 10U/μl | Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) |
| EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 0,5M | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) |
| Eosin Y (0,1%iger Alkoholgehalt) | Sigma (Taufkirchen, D) |
| Ethanol (99,8 %) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Ethanol 99,7 % | Merck (Darmstadt, D) |
| GAPDH Primer Forward | Metabion GmbH (Martinsried, D) |
| GAPDH Primer Reverse | Metabion GmbH (Martinsried, D) |
| GAPDH Sonde | Metabion GmbH (Martinsried, D) |
| GTC-Extraction Buffer (PolyATtract 1000) | Promega (Mannheim, D) |
| Hämalaun | VWR International GmbH (Darmstadt, D) |
| Heringssperma DNA (10mg/ml) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) |
| Kaliumacetat (KOAc) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) |
| Magnesiumacetat (MgOAc) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) |
| MES Monohydrate (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) |
| MES-Natriumsalz | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) |
| NaCl 5M (Natriumchloridlösung) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) |
| Random Hexamer Primer 3μg/μl | Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) |
| Ribogreen TM bzw. Picogreen TM | Molecular Probes (Leiden, NL) |
| RNA-Marker | Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) |
| RNase H 2U/μl | Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) |
| rt4 cDNA (Prostatakarzinomzelllinie) | MetaGen Pharmaceuticals GmbH interne Herstellung |
| SAPE-Färbelösung (Streptavidin, R-phycoerythrin conjugate) | Molecular Probes (Leiden, NL) |
| SA-PMP (Streptavidin Magnetic Sphere Paramagnetic Particles) (PolyATtract 1000) | Promega (Mannheim, D) |
| SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) |

| Chemikalien | Hersteller |
|--|--|
| SSC 0,5xSolution (PolyATtract 1000) | Promega (Mannheim, D) |
| SSPE (Saline-sodium phosphate-EDTA Puffer) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) |
| SUC Primer Forward | Metabion GmbH (Martinsried, D) |
| SUC Primer Reverse | Metabion GmbH (Martinsried, D) |
| SUC Sonde | Metabion GmbH (Martinsried, D) |
| Superscript II RNase H- Reverse Transcriptase 200U/μl | Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) |
| T4-DNA Polymerase 5U/μl | Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) |
| T7-dT ₂₄ Primer | Metabion GmbH (Martinsried, D) |
| Tris-Acetat 1M, pH 8,1 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) |
| Tris-HCL 1M, pH 7,8 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) |
| Tween 20 | Roth (Karlsruhe, D) |
| U133A /B GeneChips | Affymetrix, Inc. (Santa Clara, USA) |
| Wasser, Dnase und Rnase frei | ICN Biomedicals Inc. (Aurora, USA) |
| 100x Kontroll cRNA-Cocktail | Affymetrix, Inc. (Santa Clara, USA) |
| 10mM Bio-11-CTP | Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA) |
| 10mM Bio-16-UTP | Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA) |
| 10x T7 ATP 75mM (T7 Kit) | Ambion (Huntingdon, GB) |
| 10x T7 CTP 75mM (T7 Kit) | Ambion (Huntingdon, GB) |
| 10x T7 Enzyme Mix (T7 Kit) | Ambion (Huntingdon, GB) |
| 10x T7 GTP 75mM (T7 Kit) | Ambion (Huntingdon, GB) |
| 10x T7 Reaktionspuffer (T7 Kit) | Ambion (Huntingdon, GB) |
| 10x T7 UTP 75mM (T7 Kit) | Ambion (Huntingdon, GB) |
| 28U/ml Anti-RNase | Ambion (Huntingdon, GB) |
| 2x Taqman Universal PCR-Mastermix | Applied Biosystems (Foster City, USA) |
| 5x Erststrang-Puffer | Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) |
| 5x Zweitstrang Puffer | Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) |

| Primer und Sonden | Sequenz |
|----------------------------|---|
| T7-dT ₂₄ Primer | 5'-GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG (T) ₂₄ -3' |
| B2 Kontroll-Oligonukleotid | 5'-Bio-GTC GTC AAG ATG CTA CCG TTC AGA-3' |
| GAPDH Primer Forward | 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3' |
| GAPDH Primer Reverse | 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3' |
| GAPDH Sonde | 5'-FAM-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC- Tamra-3' |
| SUC Primer Forward | 5'-TGT CAT CGC ACT GTC CAT AGA G-3' |
| SUC Primer Reverse | 5'-CCG TAG CCT CCT GTG GCA-3' |
| SUC Sonde | 5'-FAM-CCA TCC ATC GCA TAA gag CAA AGA ACA CTG-Tamra-3' |
| Random Hexamer Primer | Oligonukleotid-Hexamere zufälliger Sequenz |

| Geräte und Materialien | Hersteller |
|---|---|
| Color Videokamera (ex wave HAD) | Sony Deutschland GmbH (Köln, D) |
| Combitips plus Pipettenspitzen Taqman | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| Eismaschine | Scotsman Ice Systems (Bettolino di Pogliano, I) |
| Fluidics-Waschstation | Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA) |
| Folien | SL Microtest (MMI) (Jena, D) |
| Fuoreszenzscanner (FluorImager595) | Molecular Dynamics (Sunnyvale, USA) |
| Gefriertruhe -20 °C | Liebherr Hausgeräte GmbH (Ochsenhausen, D) |
| Gefriertruhe -80 °C | Heraeus Holding GmbH (Hanau, D) |
| GeneAmp 5700 Sequence Detection System | Applied Biosystems (Weiterstadt, D) |
| GeneArray Scanner | Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA) |
| GeneMaths-Software | Applied Maths (Sint-Martens-Latem, B) |
| Hybridisierungsöfen (Hybridization Oven 640) | Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA) |
| Kleber (Fixogum) | Marabu Werke GmbH & Co. KG (Tamm, D) |
| Kryotom (Microm HM560) | Microm Laborgeräte (Walldorf, D) |
| Kühlschank | Liebherr Hausgeräte GmbH (Ochsenhausen, D) |
| Kunststoff-Cap (CapSure™ LCM Caps) | Arcturus Engineering (CA, USA) |
| Küvette (Uvette 220-1600nm) | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| Magnetständer | Promega (Mannheim, D) |
| Mikroskop (Axiovert S100) | Carl Zeiss AG (Göttingen, D) |
| Minizentrifuge | National Labnet Co. (Woodbridge, USA) |
| Multipette® Plus Pipette Taqman | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| Objektträger | medite GmbH (Burgdorf, D) |
| Palm Mikrodissektions-System | P.A.L.M. Mikrolaser Technologies AG (Bernried, D) |
| PCR Cycler (Mastercycler gradient) | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| Photometer (Ultrospec2000) | Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg, D) |
| Pipetten | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| Pipettenspitzen | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| Safe-Lock Tube (Eppis) | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| SL Mikrodissektions-System | SL Microtest (MMI) (Jena, D) |
| Thermomixer 5436 (Inkubation Puffer IVT) | Grant Instruments Ltd (Cambridge, GB) |
| U133A /B GeneChips | Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA) |
| Vakuumpumpsystem | Vakuubrand GmbH (Wertheim, D) |
| Vakuumentrifuge (Vakuumkonzentrator speed-Vac Plus) | Thermolife Science (Egelsbach, D) |
| Vakuumentrifuge (Vakuumkonzentrator speed-Vac SVC100) | Savant Instruments (Farmingdale, USA) |
| Vortex | NeoLab (Heidelberg, D) |
| Zentrifuge 5417R | Eppendorf AG (Hamburg, D) |
| 96-Loch Platte (96-well optical reaction plate) | Applied Biosystems (Weiterstadt, D) |

3.2 Arbeitsübersicht

Aus inhomogenen kryokonservierten kolorektalen Tumor- und Normalgeweben wurden mit Hilfe der Laser gestützten Mikrodissektion weitgehend reine Ansätze von Tumor- und Normalepithelzellen erzeugt. Unter Verwendung von biotinylierten Oligo(dT)-Primern und Streptavidin-gekoppelten paramagnetischen Partikeln (SA-PMP) wurde die mRNA aus den Proben isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben und durch eine in vitro Transkription (IVT) linear amplifiziert. Für die Hybridisierung der gewonnenen cRNA auf Affymetrix Oligonukleotid-Chips war eine Menge von 15 µg Biotin-markierter cRNA erforderlich. Die durch Mikrodissektion und anschließende RNA Extraktion gewonnene mRNA Menge lag zum Teil bei unter 1ng, so dass die einmalige Amplifikation (Amplifikationsfaktor pro IVT ca. 10^2 - 10^3) für die Chiphybridisierung nicht ausreichte. Es wurden folglich alle untersuchten kolorektalen Proben aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit in drei aufeinander folgenden Runden linear amplifiziert, wobei in der letzten in vitro Transkription durch den Einbau biotinylierter Nukleotide die Markierung erfolgte. Mit der Biotin markierten cRNA aus der dritten IVT konnte nach Fragmentierung die Chiphybridisierung erfolgen. Die aus den Chipexperimenten generierten Daten wurden unter Berücksichtigung definierter Chip- und Fluoreszenzparameter korrigiert und normalisiert. Eine Kontrolle der Hybridisierungsspezifität erfolgte ebenfalls. Basierend auf statistischen und anderen mathematischen Testergebnissen (Wilcoxon test, Diskriminanzscore nach Golub (82) (modifizierte *t*-Teststatistik), Tumor-Normalgewebe-Quotient) wurde anschließend eine Rangfolge für sämtliche Gene und expressed sequence tags (ESTs) berechnet anhand derer die differenziell exprimierten Gene und ESTs ausgewählt wurden. Eine Arbeitsübersicht ist Abbildung 5 zu entnehmen.

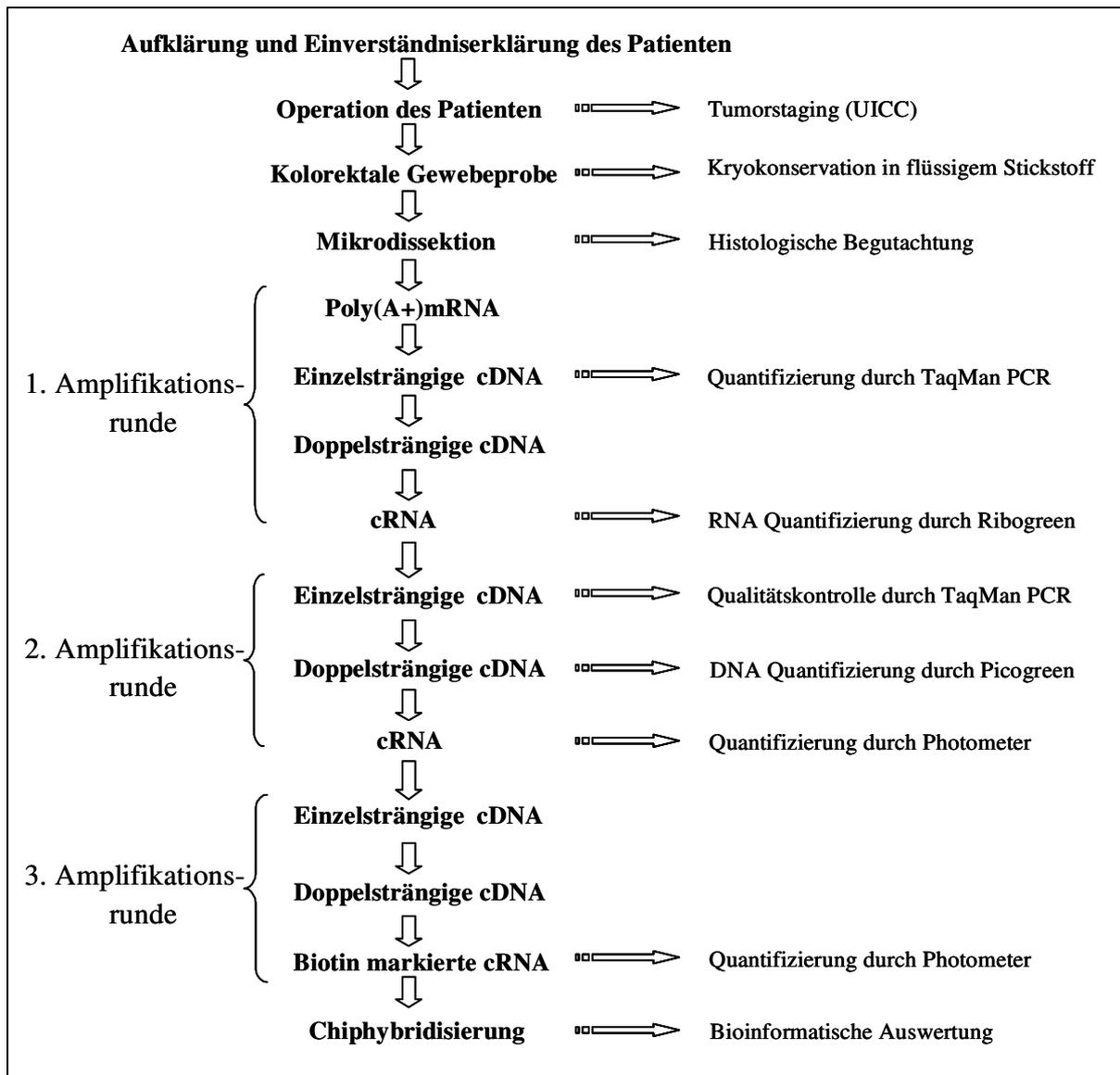


Abbildung 5 Übersicht über das methodische Vorgehen in dieser Arbeit

3.3 Patientenkollektiv

3.3.1 Aufklärung und Datenerhebung

Die 45 an der Studie teilnehmenden Patienten erklärten nach ausführlicher Aufklärung schriftlich ihr Einverständnis. Die zur Aufklärung verwendeten Informations- und Fragebögen sowie die Vorlagen zur Einwilligungserklärung sind im Anhang (Seiten 99-103) zu finden. Aus Gründen des Datenschutzes wurden die Gewebeproben der Patienten durch

Zahlenkodierung anonymisiert. Die klinischen Daten wurden über die Recherche der Operationsberichte, Histologiebefunde und Entlassungsbriefe erhoben und in einer Excel-Datenbank archiviert. Die Entnahme der Gewebe sowie die damit durchgeführten Untersuchungen sind von der Ethikkommission, Campus Benjamin Franklin, Charité, Universitätsmedizin Berlin am 08.01.2001 genehmigt worden.

3.3.2 Asservierung der kolorektalen Gewebe

Das in der Studie verwendete kolorektale Tumor- und Normalgewebe stammte von 45 Patienten mit kolorektalem Karzinom, die im Zeitraum von 2001 bis 2002 im Universitätsklinikum Benjamin Franklin (UKBF), jetzt Campus Benjamin Franklin, Charité, Universitätsmedizin Berlin, in kurativer oder palliativer Absicht operiert wurden. Direkt im Anschluss an die chirurgische Entfernung wurde das kolorektale Gewebe längs der taenia libera eröffnet und die lumenale Seite des Darmrohres kurz zwecks Reinigung mit Wasser gespült. Gemeinsam mit einem Pathologen wurde das Präparat nun makroskopisch begutachtet und derart sektioniert, dass von jedem Patienten ein Stück Tumorgewebe und korrespondierendes Normalgewebe vom oral gelegenen Anteil des Resektats in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden konnte. Die Zeitspanne zwischen der chirurgischen Resektion und der Lagerung in flüssigem Stickstoff betrug max. 30 min., um die Ischämie bedingte mRNA-Degeneration, wie es in einer Studie von Huang et al. gezeigt wurde (110), zu minimieren. Anschließend wurde das Gewebe bei -80 °C bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

3.3.3 Histologische Begutachtung der kolorektalen Gewebe

Das kolorektale Normal- und Tumorgewebe wurde durch die Pathologen des UKBF anhand von in Paraffin eingebetteten Schnitten hinsichtlich des Differenzierungsgrades und des Tumorstadiums beurteilt. Die histologische Beurteilung der kryoasservierten kolorektalen Gewebe in Bezug auf ihre Eignung für die Mikrodissektion erfolgte gemeinsam mit der in der MetaGen beschäftigten Pathologin, Dr. Irina Klamann. Die Tabellen 5 und 6 dienen der Übersicht über jene Patienten, deren Gewebe für die Chiphybridisierung verwendet wurde.

| Probenlabel | T | N | M | UICC | G | Histo | Lokalisation | Alter | Sex |
|-------------|---|---|---|------|---|-------|--------------|-------|--------|
| Co1 | 3 | 0 | 0 | 2 | 3 | Ad Ca | Kolon | 73 | weibl. |
| Co5 | 3 | 1 | 0 | 3 | 3 | Ad Ca | Kolon | 86 | weibl. |
| Co6 | 2 | 0 | 0 | 1 | 2 | Ad Ca | Rektum | 59 | männl. |
| Co8 | 4 | 1 | 0 | 3 | 3 | Ad Ca | Kolon | 47 | weibl. |
| Co10 | 3 | 1 | 0 | 3 | 2 | Ad Ca | Rektum | 71 | weibl. |
| Co11 | 3 | 2 | 0 | 3 | 2 | Ad Ca | Kolon | 59 | männl. |
| Co14 | 3 | 0 | 0 | 2 | 2 | Ad Ca | Rektum | 76 | weibl. |
| Co17 | 3 | 2 | 0 | 3 | 3 | Ad Ca | Rektum | 63 | männl. |
| Co21 | 3 | 0 | 1 | 4 | 2 | Ad Ca | Rektum | 61 | männl. |
| Co23 | 4 | 2 | 0 | 3 | 2 | Ad Ca | Kolon | 58 | weibl. |
| Co24 | 4 | 2 | 1 | 4 | 3 | Ad Ca | Kolon | 59 | weibl. |
| Co26 | 3 | 2 | 0 | 3 | 3 | Ad Ca | Rektum | 22 | männl. |
| Co29 | 3 | 1 | 0 | 3 | 2 | Ad Ca | Rektum | 49 | männl. |
| Co32 | 3 | 2 | 1 | 4 | 3 | Ad Ca | Rektum | 61 | männl. |
| Co33 | 3 | 2 | 1 | 4 | 3 | Ad Ca | Rektum | 72 | weibl. |
| Co36 | 3 | 2 | 1 | 4 | 2 | Ad Ca | Rektum | 60 | männl. |
| Co37 | 3 | 0 | 0 | 2 | 3 | Ad Ca | Rektum | 66 | männl. |
| Co39 | 3 | 0 | 0 | 2 | 2 | Ad Ca | Rektum | 60 | weibl. |
| Co40 | 3 | 0 | 0 | 2 | 3 | Ad Ca | Rektum | 66 | weibl. |
| Co47 | 3 | 1 | 0 | 3 | 2 | Ad Ca | Kolon | 44 | männl. |
| Co48 | 3 | 2 | 1 | 4 | 3 | Ad Ca | Rektum | 76 | weibl. |
| Co56 | 3 | 0 | 0 | 2 | 2 | Ad Ca | Kolon | 59 | weibl. |
| Co535 | 3 | 2 | 1 | 4 | 3 | Ad Ca | Kolon | 70 | weibl. |
| Co612 | 3 | 0 | 0 | 2 | 3 | Ad Ca | Kolon | 76 | männl. |
| Co618 | 3 | 0 | 0 | 2 | 3 | Ad Ca | Kolon | 79 | männl. |

Tabelle 5 Tabellarische Gesamtübersicht über die 25 Patienten, deren kolorektale Proben auf den Oligonukleotidarray hybridisiert wurden.

| Anzahl der Patienten | Geschlecht | | Alter | | | Grading | | | UICC-Stadium | | | |
|----------------------|------------|--------|-------|------|--------|---------|----|----|--------------|----|-----|----|
| | männl. | weibl. | Min. | Max. | Median | 1 | 2 | 3 | I | II | III | IV |
| 25 | 12 | 13 | 22 | 86 | 61 | 0 | 11 | 14 | 1 | 8 | 9 | 7 |

Tabelle 6 Tabellarische Einzelübersicht über die 25 Patienten, deren kolorektale Proben auf den Oligonukleotidarray hybridisiert wurde.

3.4 Mikrodissektion und mRNA Isolierung

In dieser Arbeit wurde das UV-Laser Mikrodisektions-System SL Mikrotest verwendet, um kolorektale Tumor- und Normalgewebeeepithelien aus entsprechenden kryokonservierten Gewebeblöcken zu gewinnen. Zudem ermöglichte die Laser gestützte Mikrodissektion innerhalb des Tumors Epithelzellverbände aus der Tumorinvasionsfront, die an das gesunde Gewebe angrenzt, und aus zentralen Tumoranteilen getrennt voneinander zu isolieren, wodurch die von Baisse et al. beschriebenen intratumorösen Genexpressionsunterschiede untersucht werden konnten (62). Um eine gute Ausgangsqualität der mRNA zu

gewährleisten, wurde während der Mikrodissektion nach Empfehlung von Schutze et al. semi-steril gearbeitet (75) und nach Empfehlung von Goldworthy et al. kryokonserviertes Gewebe eingesetzt (111).

3.4.1 Vorbereitung der Kryoschnitte

Auf gebackenen Objektträgern wurden ca. 3-4 cm² große Folienabschnitte (Foliendicke: 2 µm) aufgezogen und an beiden Seitenlängen mit Fixogum befestigt. Da die Folien nicht autoklavierbar sind, wurden die mit Folie bezogenen Objektträger zur Sterilisation eine Stunde UV-Licht exponiert.

Die bei -80 °C gelagerten kolorektalen Gewebelöcke wurden im Kryotom (Microm HM560) weiterbehandelt. Von jedem Präparat wurden, je nach Größe der Schnittfläche, zwischen 25 und 40 je 8 µm dicke Schnitte angefertigt und auf die folienbezogene Seite der vorbereiteten Objektträger aufgezogen. Nach kurzer Lufttrocknung wurden die Schnitte 30 sec in 70%igem Ethanol fixiert. Daraufhin wurden die Schnitte in Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser (DEPC-Wasser) kurz gespült, 1 min 30 sec in Hämalaun nach Mayer gefärbt, kurz in DEPC-Wasser gespült, jeweils für 1 min in 70%igem und 95%igem Ethanol entwässert, 30 sec in Eosin Y (0,1%iger Alkoholgehalt) gefärbt und abschließend 2x 2 min in 95 %, sowie 2x 1 min in absolutem Ethanol entwässert. Dabei wurden alle für die Fixierung und Färbung verwendeten Lösungen mit DEPC-Wasser angesetzt, sowie unter einem RNasen freiem Abzug gearbeitet. Die mit gefärbten und entwässerten Schnitten beschichteten Folien wurden vorsichtig vom Objektträger gelöst und so gewendet, dass sie mit der Schnittseite nach unten auf einen frisch gebackenen Objektträger überführt werden konnten. Die Folie wurde glatt gestrichen und mit Klebestreifen auf dem Objektträger fixiert. Nach 20 minütiger Vakuumexsikkation waren die Schnitte für die Laser gestützte Mikrodissektion vorbereitet. Zur histologischen Begutachtung der Gewebe wurden vor jeder Mikrodissektion fixierte Kryoschnitte mit Hämalaun-Eosin gefärbt und eingedeckt.

3.4.2 Durchführung der Mikrodissektion

Die Laser gestützte Mikrodissektion erfolgte mit dem UV-Laser Mikrodissektions-System SL Mikrotest. Der Objektträger mit dem Kryoschnitt wurde auf dem Objektisch des Mikroskops fixiert und das Gewebe histologisch in Anwesenheit eines Pathologen begutachtet. Durch Hitze oder andere Einflüsse beschädigtes Material wurde verworfen. Anschließend wurde auf die ausgewählten Gewebeareale ein steriles Kunststoff-Trägermedium (Cap) aufgesetzt und leicht angedrückt. Das beschichtete Cap diente der Ablösung und Überführung der mikrodissezierten Zellverbände in ein Eppendorfgefäß (siehe Abbildung 3). Die zu mikrodissezierenden Gewebeareale, die durch das CAD visualisiert wurden, konnten am Bildschirm vorgezeichnet werden. Der computergesteuerte, motorisierte Mikroskoptisch ermöglichte das Abfahren der eingezeichneten Spur mit dem UV-Laser (siehe Abbildung 6). Die Einstellungen von Geschwindigkeit, Energie und Fokus des Laser erfolgten manuell und richteten sich nach dem Schneideerfolg, die Spurbreite ließ sich dabei zwischen 7,5 und 30 μm einstellen. Fuhr der UV-Laser die vorgezeichnete Spur ab, verschmolz sogleich die Membran des Caps interkalierend mit der Folie, auf die der gefärbte Schnitt aufgezogen war, so dass das mikrodissezierte Zielgewebe mit Hilfe des Caps abgehoben (siehe Abbildung 3 und 6) und in ein 0,5ml Eppendorfgefäß überführt werden konnte.

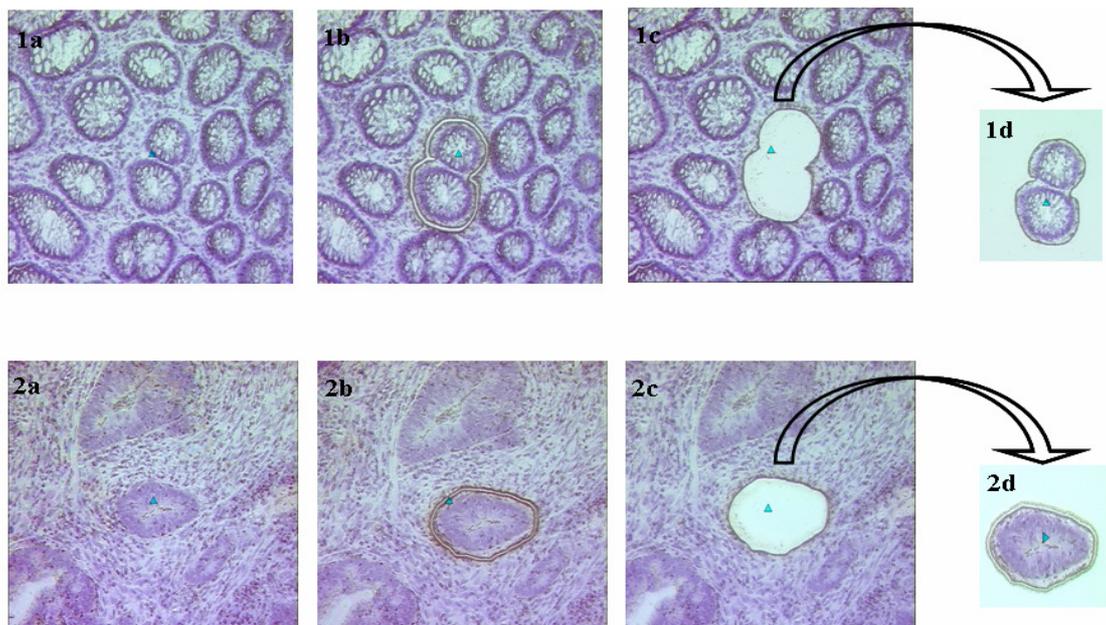


Abbildung 6 Arbeitsschritte bei der Laser gestützten Mikrodissektion von kolorektalem Normalgewebe (1a-d) und Tumorgewebe (2a-d) bei 20facher Vergrößerung.

Zur Homogenisierung der ausgeschnittenen Gewebeareale, sowie zum Schutz der RNA befand sich im Eppendorfgefäß 144 µl GTC- Lysispuffer, der lysierende sowie Ribonuklease-inhibitierenden Eigenschaften besitzt. Auf diese Weise wurden von jedem Patient mikrodissizierte Gewebeareale eines Gewebetyps in einem Eppendorfgefäß vereinigt, bis eine Flächensumme von ca. 80 mm² für das Normalgewebe bzw. je ca. 60 mm² für die beiden verschiedenen Tumorepithelgebiete (Invasionsfront und Zentraltumor) erreicht war und währenddessen auf Eis gelagert. Vom Normalepithel wurde unter Berücksichtigung der vergleichsweise zum Tumor geringeren Genexpression die entsprechend größere Flächensumme (80 mm²) erarbeitet. Die ausgeschnittene Tumordinvasionsfront war ca. 500 µm breit und umfasste die an das Normalgewebe angrenzenden Tumorzellverbände, zusätzlich wurden Tumorepithelzellverbände aus den zentralen Regionen der kolorektalen Karzinome mikrodissiziert (siehe Abbildung 7). Pro Patient wurden demnach drei Proben hergestellt: 1.) homogenisiertes kolorektales Normalepithel, 2.) Tumorepithelzellen aus der Invasionsfront und 3.) Tumorepithelzellen aus zentralen Tumoranteilen. Das gewonnene Material wurde bis zur weiteren Aufarbeitung im GTC- Lysispuffer bei -80 °C gelagert.

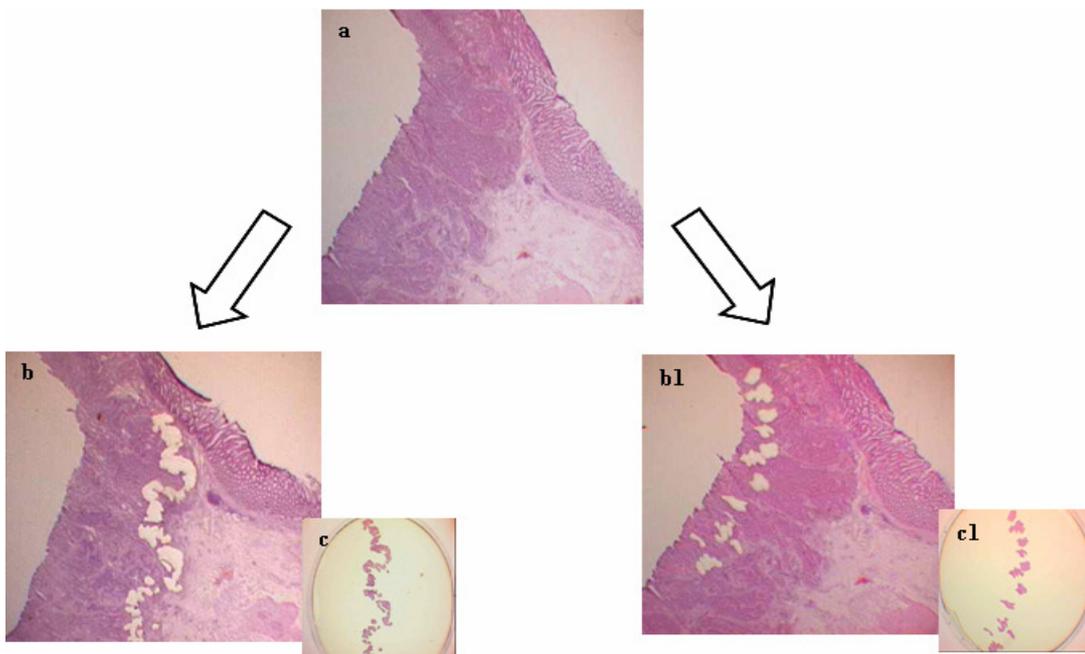


Abbildung 7 Laser gestützte Mikrodissektion von Tumorepithelien aus der Tumordinvasionsfront (b) und der zentralen Tumorregion (b1) und den an der Capmembran haftenden ausgeschnittenen Tumorepithelien (c und c1), bei 4facher Vergrößerung.

3.4.3 Isolierung der mRNA aus den mikrodisezierten Geweben

Die mRNA aus den mikrodisezierten Zellen wurde mit Hilfe des PolyAtract System 1000 Kits isoliert. Bei dieser Methode ist es möglich, mit biotinylierter Oligo(dT)-Primer und Straptavidin-gekoppelter paramagnetischer Partikel (SA-PMP) die mRNA relativ schnell aus dem Lysat am Magnetständer zu isolieren.

Bei der mRNA-Präparation wurde das mikrodisezierte und lysierte Gewebe, welches bei -80 °C gelagert wurde, auf Eis aufgetaut und durch etwa 30s vortexen homogenisiert. Zu dem Lysat wurden gegeben:

- 300 µl Verdünnungspuffer (auf 70 °C vorgewärmt)
- 6,15 µl β-Mercaptoethanol (48,7 %)
- 1,2 µl biotinylierte Oligo-dT (10 pmol)

Die Proben wurden für 5 min auf 70 °C erhitzt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert zwecks Anlagerung der biotinylierten Oligo-dT Primer an die poly-A Enden der mRNA. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurden die Lysate für 10 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Währenddessen wurden 120 µl der an Streptavidin gekoppelten paramagnetischen Partikel (SA-PMP) dreimal mit 500 µl 0,5x SSC gewaschen und in 120 µl 0,5x SSC aufgenommen. Der Überstand der zentrifugierten Proben wurde nun zu den gewaschenen SA-PMP's gegeben. Während der Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur lagerten sich die biotinylierten Oligo-dT-mRNA-Hybride an die SA-PMP's ermöglicht. Nach Abtrennung der gebundenen SA-PMP's im magnetischen Ständer von dem flüssigen Überstand, der die genomische DNA sowie restliche Ribonukleinsäuren enthält, wurden die Partikel dreimal mit je 500 µl 0,5x SSC im Magnetständer gewaschen. Zur Elution der mRNA wurden nach der letzten Abnahme der Waschlösung 80 µl DEPC-Wasser hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die mRNA enthaltende Elutionslösung wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, während die SA-PMP Partikel durch das magnetische Feld des Magnetständers an der Gefäßwand haften blieben. Anschließend wurde die RNA in der Vakuumzentrifuge einrotiert und anschließend in 10 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

3.5 cDNA Synthese

Die isolierte mRNA wurde zu weiteren Untersuchungen für die Affymetrix Chipexperimente in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte in zwei aufeinander folgenden Schritten. In der Erststrangsynthese wurde durch die reverse Transkriptase ein zur mRNA komplementärer DNA Einzelstrang synthetisiert. In der Zweitstrangsynthese wurde durch die DNA Polymerase der zur neu synthetisierten einzelsträngigen DNA komplementäre Zweitstrang erzeugt.

3.5.1 Erststrangsynthese

Für die reverse Transkription von RNA in einsträngige cDNA wurde eine reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA Polymerase, verwendet. Die benutzte Superscript II Reverse Transcriptase hat durch eine Punktmutation ihre RNase H Aktivität verloren und besitzt eine besonders hohe Syntheseleistung.

Für die Erststrangsynthese wurde die isolierte mRNA in 10 μ l DEPC-Wasser aufgenommen und anschließend 1 μ l T7-dT₂₄-Primer (100 pmol/ μ l) hinzugegeben. Nach 10 min Erhitzen bei 70 °C wurde die Probe auf Eis gestellt, wodurch es zur Anlagerung der T7-dT₂₄-Primer an die mRNA kam. Anschließend wurden folgende Komponenten für die Erststrangsynthese hinzugefügt:

| | |
|-----------|----------------------------|
| 4 μ l | 5x Erststrang-Puffer |
| 2 μ l | DTT (0,1 M) |
| 1 μ l | dNTP`s (10 mM) |
| 1 μ l | Anti-RNase (28 U/ μ l) |

Nach Zugabe des Ansatzes und 2 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde 1 μ l Superscript II Reverse Transcriptase (200 U/ μ l, RNase negativ) hinzugegeben, kurz gevortext, herunterzentrifugiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der abgeschlossenen Erststrangsynthese wurde als indirekte Qualitätskontrolle eine quantitative TaqMan PCR durchgeführt mit Succinyl-Aldehyd-Dehydrogenase-Primer und -Sonden (siehe Abschnitt 3.8.3).

3.5.2 Zweitstrangsynthese

Direkt zum Ansatz der Erststrangsynthese wurde folgender Zweitstrangsynthesenansatz gegeben:

| | |
|------------|--|
| 91 μ l | DEPC-Wasser |
| 30 μ l | 5x Zweitstrang Puffer |
| 3 μ l | dNTP's 10 mM |
| 1 μ l | E. coli DNA Ligase (10 U/ μ l) |
| 4 μ l | E. coli DNA Polymerase I (10 U/ μ l) |
| 1 μ l | RNase H (2 U/ μ l) |

Die Zweitstrangsynthese wurde für 2 Stunden bei 16 °C durchgeführt. Anschließend wurden 2 μ l T4-DNA Polymerase (5 U/ μ l) zugegeben und für weitere 5 min bei 16 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 10 μ l 0,5 mM EDTA abgestoppt.

3.5.3 Aufreinigung der cDNA

Die doppelsträngige DNA wurde mit dem „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ aufgereinigt. Zu 500 μ l des Aufnahme-Puffers wurde der gesamte Zweitstrangsynthese-Ansatz gegeben, auf eine Säule überführt und bei Raumtemperatur für 30 sec bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 500 μ l Waschpuffer durch Zentrifugation für 30 sec bei 14.000 rpm gespült. Die an die Säulenmatrix gebundene doppelsträngige cDNA wurde durch erneute Zentrifugation für je 1 min bei 14.000 rpm 2x mit 30 μ l DEPC-Wasser eluiert. Nach der Einrotation der aufgereinigten cDNA in der Vakuumzentrifuge, wurde das Pellet in 8 μ l DEPC-Wasser aufgenommen.

3.6 In vitro Transkription (IVT)

Die doppelsträngige cDNA wurde nun durch eine in vitro Transkription linear amplifiziert. Dies erfolgte über die, in der Erststrangsynthese eingeführte T7-RNA-Polymerase Transkriptionsstartstelle. Die T7-RNA-Polymerase ist in der Lage, von doppelsträngiger cDNA, bei Zugabe von Ribonukleotiden, die komplementäre RNA (cRNA) zu synthetisieren. Nach Bindung der RNA-Polymerase an die doppelsträngige Promotorsequenz wurden die

beiden cDNA-Stränge getrennt, der 3`-5`-Strang dient als Matrize zur Erzeugung eines komplementären 5`-3`-Stranges.

Die IVT wurde nach modifiziertem Protokoll der Firma Ambion durchgeführt. Der IVT Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

| | |
|--------|----------------------|
| 7,5 µl | NTP`s (75 mM) |
| 8 µl | cDNA |
| 2 µl | 10x Reaktionspuffer |
| 2 µl | 10x T7 Enzyme Mix |
| 0,5 µl | Anti-RNase (28 U/ml) |

Nach der Zugabe dieses IVT Ansatzes auf die aufgereinigte doppelsträngige cDNA lief die Reaktion für 6 Stunden bei 37 °C.

3.6.1 Aufreinigung der cRNA

Die Aufreinigung der cRNA nach der IVT erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“. Der IVT Ansatz wurde mit DEPC-Wasser auf 100 µl aufgefüllt, zu 350 µl RLT Puffer hinzugegeben, mit 250 µl Ethanol (99,7 %) gemischt und auf die Säule überführt. Nach einminütiger Inkubation wurde für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert, anschließend der Durchfluss erneut auf die Säule gegeben und erneut gleichartig inkubiert und zentrifugiert. Die gebundene cRNA wurde 2x mit 500 µl RPE Waschpuffer zuerst 15 sec bei 10.000 rpm, bei der zweiten Zugabe 2 min bei 14.000 rpm gewaschen. Zur Elution der cRNA wurde nun auf die Säule 2x 25 µl DEPC-Wasser gegeben, je 1 min inkubiert und bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die eluierte cRNA wurde in der Vakuumzentrifuge einrotiert und in 11 µl DEPC-Wasser resuspendiert, wovon anschließend 1 µl für die Quantifizierung in der Ribogreen Messung im Fluorimager eingesetzt wurde.

3.7 Zweite und dritte Amplifikationsrunde

Die durch Mikrodissektion und anschließende RNA-Extraktion isolierte mRNA Menge lag zum Teil bei unter 1 ng, so dass die einmalige Amplifikation (Amplifikationsfaktor ca. 10^2 - 10^3) für die Hybridisierung auf Affymetrix Chips, für die etwa 15 µg erforderlich sind, nicht ausreichte. Studien von Luzzi et al., Wang et al., Van Gelder et al., Aoyagi et al., Phillips et

al. sowie Luo et al. zeigten, dass die zwei- bis dreimalige T7 basierte RNA Amplifikation reproduzierbar ist und sich das amplifizierte Material gut für Chiparray basierte Expressionsanalysen eignet (112-116). Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit wurden daher alle Proben vor der Chiphybridisierung in drei aufeinanderfolgenden Runden amplifiziert.

In der zweiten und dritten Amplifikationsrunde verliefen die Erststrang-, die Zweitstrangsynthese und die IVT sowie die erforderlichen Aufreinigungen im Wesentlichen analog zu den entsprechenden Versuchen der ersten Amplifikationsrunde. Lediglich die Abweichungen werden im Folgenden aufgeführt.

3.7.1 cDNA Synthese in der zweiten und dritten Amplifikationsrunde

Für die Erststrangsynthese der zweiten und dritten Amplifikationsrunde wurden idealerweise 500ng cRNA eingesetzt. Lag die cRNA Menge nach der ersten IVT unter 500ng, wurde für die zweite Erststrangsynthese die gesamte vorhandene cRNA Menge eingesetzt, vorausgesetzt die Taqman PCR nach der ersten Erststrangsynthese lieferte C_t -Werte kleiner gleich 30. Die Erststrangsynthese von cDNA aus cRNA erfolgte nicht mit einem Oligo-dT-Primer wie die Synthese von cDNA aus mRNA, sondern mit 1 μ l Random Hexamer Primer (250 ng/ μ l). Random Hexamer Primer sind Oligonukleotid-Hexamere zufälliger Sequenz, die sich den cRNA-Strängen komplementär anlagern und somit die Startpunkte für die Reverse Transkriptase bilden. Nach der einstündigen Erststrangsynthese in der zweiten und dritten Runde wurde die cRNA durch Zugabe von 1 μ l RNase H (2 U/ μ l) in einer 20 minütigen Inkubation bei 37 °C abgebaut. Durch weitere 2 minütige Inkubation bei 95 °C erfolgte die Inaktivierung der Enzyme. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert. Für die zweite indirekte Qualitätskontrolle, der quantitativen Taqman PCR mit Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Primern und -Sonden, wurden 4 μ l des fertigen Erststrangsynthesenansatzes auf 1 ng/ μ l verdünnt (Ansatz zur Taqman PCR siehe Abschnitt 3.8.3.2).

Für die Zweitstrangsynthese wurden in der zweiten und dritten Amplifikationsrunde zusätzlich 1 μ l T7-dT₂₄-Primer (100 pmol/ μ l) zugegeben, zur Denaturierung von Sekundärstrukturen auf 70 °C erwärmt, anschließend für 10 min bei 42 °C inkubiert und danach auf Eis gelagert. Die weitere Reaktion der Zweitstrangsynthese erfolgte analog dem Protokoll der Zweitstrangsynthese der ersten Amplifikationsrunde unter Auslassung der

bereits erfolgten RNase H Zugabe. Das cDNA Pellet, das aus der Aufreinigung des Zweitstrangsyntheseansatzes hervorging, wurde in der zweiten Amplifikationsrunde in 9 μl DEPC-Wasser aufgenommen, wovon 1 μl für die Konzentrationsbestimmung durch eine Picogreen Messung verwandt wurde. In der dritten Amplifikationsrunde wurde das aus der Aufreinigung des Zweitstrangsyntheseansatzes hervorgehende Pellet direkt durch den Ansatz für die dritte biotinmarkierte IVT aufgenommen.

3.7.2 IVT in der zweiten Amplifikationsrunde

Die zweite unmarkierte IVT lief analog zur ersten IVT ab. Im Anschluss an die Aufreinigung der cRNA aus der zweiten IVT wurden die 50 μl eluierte cRNA nicht wie in der ersten Amplifikationsrunde in der Vakuumzentrifuge einrotiert, sondern nach Abnahme von 1 μl für die photometrische Konzentrationsbestimmung, wurde das entsprechende Volumen von 500ng cRNA für die dritte Erststrangsynthese eingesetzt und der verbleibende Rest bei -80°C gelagert. Nach der zweiten IVT erfolgte also die cRNA Quantifizierung nicht durch die sensitivere Ribogreen Messung wie nach der ersten IVT, sondern mittels photometrischer Verfahren. Nur, wenn nach der ersten IVT weniger als 500ng cRNA vorlagen und für die zweite Erststrangsynthese eingesetzt werden konnten, wurde die erwartungsgemäß niedrigere cRNA Menge nach der zweiten IVT durch die sensitivere Ribogreen Messung bestimmt.

3.7.3 Biotinmarkierte dritte IVT

In der dritten Amplifikationsrunde wurde das Pellet, das aus der Aufreinigung des Zweitstrangsyntheseansatzes hervorging, direkt durch den biotinmarkierten Ansatz der dritten IVT aufgenommen, der sich wie folgt zusammensetzte:

| | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| 2 μl | 10x T7 ATP (75 mM) | 2 μl | 10x T7 GTP (75 mM) |
| 1,5 μl | 10x T7 CTP (75 mM) | 1,5 μl | 10x T7 UTP (75 mM) |
| 3,75 μl | Bio-11-CTP (10 mM) | 3,75 μl | Bio-16-UTP (10 mM) |
| 1 μl | DEPC-Wasser | 2 μl | 10x Reaktionspuffer |
| 2 μl | 10x T7 Enzyme Mix | 0,5 μl | Anti-RNase (28 U/ml) |

Das erhöhte Volumen der Nukleotide wurde durch eine Reduktion des Volumens der cDNA ausgeglichen. Auch in der dritten Amplifikationsrunde lief die Reaktion für 6 Stunden bei 37°C.

Nach der Aufreinigung der cRNA wurde analog zur zweiten Amplifikationsrunde eine photometrische Messung zur Bestimmung der Konzentration durchgeführt.

3.8 Quantitätsbestimmungen und Qualitätskontrollen des genetischen Materials

Das Probenmaterial wurde nach verschiedenen Versuchsschritten, wie es dem Flussdiagramm in Abbildung 5 zu entnehmen ist, quantifiziert. So wurde die cRNA Konzentration aus der ersten IVT über eine Ribogreen-Messung und nach der zweiten und dritten IVT mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Nur, wenn nach der ersten IVT weniger als 500ng cRNA vorlagen und für die zweite Erststrangsynthese eingesetzt werden konnten, wurde die erwartungsgemäß niedrigere cRNA Menge nach der zweiten IVT durch die sensitivere Ribogreen Messung bestimmt. Die Konzentrationsmessung der doppelsträngigen cDNA in der zweiten Amplifikationsrunde erfolgte durch eine Picogreen-Messung. Nach der ersten und zweiten Erststrangsynthese wurde darüber hinaus eine quantitative Taqman PCR durchgeführt.

3.8.1 Ribogreen- und Picogreen-Messung

Die Konzentrationsbestimmung der cRNA und der doppelsträngigen cDNA erfolgte mit RibogreenTM bzw. PicogreenTM. Gegenüber der photometrischen Messung von RNA können bei dieser sensitiven Methode durch die spezifische Bindung der fluoreszierenden Ribogreen- bzw. Picogreen-Partikel sehr geringe cRNA- bzw. cDNA-Konzentrationen bis zu 1 ng/µl gemessen werden. Die Konzentrationsbestimmung beruht dabei auf einer relativen Quantifizierung im Vergleich zu einer ebenfalls zu messenden Standardreihe mit bekannten Konzentrationen (117). Die RibogreenTM bzw. PicogreenTM wurden im Verhältnis 1:200 mit TE-Puffer verdünnt. Von den Standard-Nukleinsäure-Lösungen (RNA- und DNA-Marker) bekannter Konzentration wurde mit TE als Verdünnungsmedium eine Eichreihe mit den Konzentrationen 0 ng/µl, 0,04 ng/µl, 0,4 ng/µl, 1 ng/µl und 2 ng/µl erstellt. Je 1 µl der zu messenden Proben wurde in 49 µl TE-Puffer aufgenommen und zusammen mit der Eichreihe

in eine 96-Loch Platte pipettiert. Im Anschluss wurde 50 µl des ebenfalls in TE-Puffer gelösten Quantifizierungsreagenz (RibogreenTM bzw. PicogreenTM Reagenz) zu allen Ansätzen gegeben, so dass sich die Konzentrationen der Eichreihe halbierten. Nun wurde die Fluoreszenz nach Laseranregung im Fluoreszenzscanner gemessen. Nach linearer Regressionsanalyse der Eichgeraden konnten die Konzentrationen der Versuchsproben ermittelt werden.

3.8.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Nach der zweiten und dritten IVT wurde die Konzentration der cRNA photometrisch bestimmt. Dazu wurden zu 1 µl Probe aus der Aufreinigung des IVT-Ansatzes 99 µl TE-Puffer gegeben. Anschließend wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm die Extinktion gemessen und die Konzentration der cRNA nach dem Lambert-Beer-Gesetz vom Photometer errechnet und im Display angezeigt.

3.8.3 Taqman Untersuchungen einsträngiger cDNA

Die Taqman PCR ist eine automatisierte PCR-Reaktion, bei der die Amplifikation und der Nachweis des spezifischen PCR-Produktes simultan möglich ist. Das entstehende Amplifikat wird bei dieser sogenannten „*Real-Time*“-PCR nach jedem Zyklus quantifiziert, indem die aus der PCR resultierende Fluoreszenz der Sonden über ein Fluoreszenzmesgerät (GeneAmp 5700 Sequence Detection System) detektiert wird (118). Die Ausgangsproben können anschließend über den logarithmisch dargestellten Verlauf der PCR innerhalb der exponentiellen Phase miteinander verglichen und das Expressionslevel des untersuchten Gens bestimmt werden. Die Taqman PCR ermöglicht somit die Quantifizierung eines definierten Amplifikats in einer Probe.

Das Prinzip der Quantifizierung besteht in der Messung eines Fluoreszenzsignals, welches während der PCR folgendermaßen entsteht: Die für die „*Real-Time*“-PCR verwendete genspezifische Sonde ist fluoreszenzmarkiert. Am 5'-Ende sitzt ein Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat), am 3'-Ende ein Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat). Aufgrund der räumlichen Nähe dieser beiden Farbstoffe wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes unterdrückt. Zunächst hybridisieren die sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte

Sonde und die spezifischen Primer an den Matrizen-Strang. Bei der Amplifikation verdrängt die Taq Polymerase, die den Matrizen-Strang vom 3`-Ende zum 5`-Ende abliest, die Sonde und hydrolysiert diese durch ihre 5`-3`-Exonuklease-Aktivität (119). Dabei wird der Reporter-Farbstoff vom Quencher-Farbstoff räumlich getrennt, so dass Ersterer ein Fluoreszenzsignal erzeugen kann. Dieses Fluoreszenzsignal wird im Anschluss an jeden PCR Zyklus gemessen. Die eigentliche Quantifizierung der zu untersuchenden Probe erfolgte nun durch die Analyse des Fluoreszenzsignalanstieges: Im Falle einer 100%igen Effizienz der PCR müsste sich mit jedem Zyklus die Menge des Amplifikats und dementsprechend das Fluoreszenzsignal einer Probe verdoppeln. Dieses Phänomen lässt sich in einer logarithmischen Funktion, in der das Fluoreszenzniveau bzw. die Menge des entstehenden Amplifikats gegen die Zyklenzahl aufgetragen wird, darstellen. Der C_t -Wert (Threshold Cycle) ist die Zyklenzahl, ab der die Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert überschreitet, der gegenüber dem Ausgangswert signifikant erhöht ist (siehe Abbildung 11). Wird ein Gen in einem Gewebe stark exprimiert, so liegen zu Beginn der PCR-Reaktion entsprechend viele cDNA-Kopien vor und der festgelegte Schwellenwert wird nach weniger Zyklen überschritten als in einem Gewebe mit niedriger Expression, d. h. der C_t -Wert ist entsprechend niedriger. Demnach kann der C_t -Wert als Maß zur Quantifizierung der Ausgangsmenge verwendet werden.

3.8.3.1 Quantifizierung und Qualitätserfassung mittels Taqman PCR

Um beurteilen zu können, ob das mikrodissizierte Probenmaterial für die beabsichtigten Expressionsanalysen eine ausreichende Menge an bereits in einsträngige cDNA umgeschriebene mRNA enthielt, wurde die Expression eines ubiquitär homogen exprimierten Gens, eines sogenannten „*Housekeeping*“-Gens mittels Taqman PCR bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass, wenn die Expression dieses „*Housekeeping*“-Gens im Probenmaterial erwartungsgemäß hoch ist, auch die Menge der restlichen mRNA in der Probe adäquat sei. Daher wurde dieser Versuch als Quantitätskontrolle angesehen.

Als „*Housekeeping*“-Gene wurden Succinyl-Aldehyd-Dehydrogenase (SUC) und Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) benutzt. Unter Verwendung der Primer und Sonden für GAPDH konnte man nach der Erststrangsynthese der zweiten Amplifikationsrunde zusätzlich die Qualität des genetischen Materials beurteilen, da die

GAPDH-Primer und -Sonden näher als die SUC-Primer und -Sonden am 5`Ende der cDNA banden und somit die Amplifikatlänge miterfasst wurde.

3.8.3.2 Durchführung der Taqman PCR

Für den Taqman PCR Ansatz wurden in eine 96-Loch Platte pipettiert:

| | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| 1 µl | cDNA Probe | | |
| 12,5 µl | 2x Taqman Universal PCR-Mastermix | | |
| nach der ersten Erststrangsynthese: | | nach der zweiten Erststrangsynthese: | |
| 300 nM | SUC Primer forward | 300 nM | GAPDH Primer forward |
| 900 nM | SUC Primer reverse | 300 nM | GAPDH Primer reverse |
| 100 nM | SUC Sonde | 100 nM | GAPDH Sonde |

Der Ansatz wurde mit DEPC-Wasser auf 24 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle mit rt4 (RNA aus Blasenkarzinomzelllinie) sowie eine Negativkontrolle mit DEPC-Wasser angesetzt.

Der Mastermix enthielt die AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTP`s mit dUTP, MgCl₂ und eine passive Referenz (Farbstoff ROX), die Fluktuationen der Fluoreszenzsignale ausglich, nicht aber die PCR beeinflusste. Die AmpliTaq Gold DNA Polymerase entsprach einer modifizierten Form der AmpliTaq DNA Polymerase, die bei Raumtemperatur keine Aktivität zeigte und zu ihrer Aktivierung initial für 10 min auf 95 °C erhitzt werden musste, wodurch die Bildung von Primer-Dimeren verhindert wurde. Die Amplifikation erfolgte durch eine PCR mit 40 Zyklen (15 sec 95 °C, 1 min 60 °C), wobei zwei initiale Temperaturschritte (2 min 50 °C, 10 min 95 °C) vorausgingen. Aufgrund der Sensitivität dieser quantitativen PCR wurden von jeder cDNA-Probe drei identische PCR-Ansätze (Dreifachbestimmung) durchgeführt und als Ergebnis der Mittelwert und die entsprechenden Standardabweichungen berechnet. Proben, deren C_t-Wert 30 überschritt, wurden verworfen.

3.9 Affymetrix Chipexperimente

In dieser Arbeit wurde das Human Genome U133 (HG-U133) Set von Affymetrix Inc. verwendet, welches sich aus den GeneChips[®] U133A und U133B zusammensetzt. Dieses Set

ermöglicht die simultane Expressionsanalyse von ca. 45.000 Probensätzen, welche 39.000 Transkripte von ca. 33.000 bekannten menschlichen Genen repräsentieren.

Der GeneChip® HG-U133A enthält vornehmlich Sequenzen bekannter Gene der RefSeq Datenbank (www.nlm.nih.gov/RefSeq), wohingegen der GeneChip® HG-U133B primär Probensätze beinhaltet, die „*expressed sequence tags*“ (ESTs) repräsentieren. ESTs sind RNA Moleküle bekannter Sequenz, die sich aus Geweben bereits isolieren ließen denen bisher jedoch weder ein Gen noch ein Genprodukt zugeschrieben werden konnte.

Jeder Probensatz des Chips ist für ein Gen oder EST spezifisch und enthält für dieses Gen bzw. EST 11 verschiedene „*perfect match*“ Oligonukleotidfelder, die jeweils Replikate eines Oligonukleotids (25 Basen) enthalten (siehe Abschnitt 1.9, Abbildung 4). Zusätzlich liegt in einem Probensatz für jedes „*perfect match*“ Oligonukleotidfeld ein zugehöriges „*miss match*“ Oligonukleotidfeld vor. Die Oligonukleotide der „*miss match*“ Oligonukleotidfelder unterschieden sich von denen der „*perfect match*“ Oligonukleotidfelder durch eine in der Mitte (Position 13) gelegene Fehlpaarung, die der komplementären Base zur perfekten Sequenz entspricht. Einander zugehörige „*perfect match*“ und „*miss match*“ Oligonukleotidfelder bilden ein Probenpaar, das mit zehn anderen Probenpaaren, die für das gleiche Gen bzw. EST spezifisch sind als Probensatz bezeichnet werden.

3.9.1 Chiphybridisierung

Die Biotin-markierte cRNA musste vor der Hybridisierung auf den von Affymetrix Inc. einsatzbereit hergestellten Chip fragmentiert werden. Durch die Fragmentierung sollten die Voraussetzungen für die Hybridisierung optimiert werden, indem die Länge der Biotin-markierten cRNA an die Länge, der auf die Chipoberfläche fixierten Oligonukleotide (25 Basen) weitestgehend angeglichen wurde. Zu 15 µg cRNA mit einer Konzentration >0,6 µg/µl wurden 6 µl 5x RNA Fragmentierungspuffer gegeben, gegebenenfalls mit DEPC-Wasser auf 30 µl aufgefüllt, bei 95 °C für 35 min inkubiert und danach auf Eis gelagert. Aus der fragmentierten biotinylierten cRNA wurde folgender Hybridisierungs-Cocktail hergestellt:

| | | | |
|-------|-----------------------------------|--------|------------------------------|
| 30 µl | fragmentierte cRNA | 3 µl | 100x Kontroll cRNA-Cocktail |
| 3 µl | B2 Kontroll-Oligonukleotid (5 nM) | 3 µl | BSA 50 mg/ml |
| 3 µl | Heringsperma DNA (10 mg/ml) | 150 µl | 2x MES Hybridisierungspuffer |

Der Chip wurde vor der Hybridisierung mit 250 µl 1x MES Hybridisierungspuffer für 10 min bei 45 °C inkubiert. Der Hybridisierungs-Cocktail wurde für 5 min auf 99 °C erhitzt und anschließend für 5 min bei 45 °C inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 40 °C und 14.000 rpm abgetrennt. Von dem Überstand wurden 250 µl in den Chip pipettiert und über Nacht bei 45 °C im Hybridisierungsofen unter Rotation bei 45 rpm hybridisiert. Nach Hybridisierung wurde der Hybridisierungs-Cocktail abgenommen und konnte bei -20 °C eingefroren werden. Der Chip wurde daraufhin in die Fluidic-Waschstation gegeben und gewaschen. Nach zehn Waschschritten bei 25 °C mit Puffer A und vier Waschschritten mit Puffer B bei 50 °C wurde die SAPE-Färbelösung für 10 min bei 25 °C auf den Chip gegeben. Im Anschluss wurde mit 10 Waschschritten mit Puffer A bei 25 °C gewaschen, sowie für 10 min mit der Anti-Streptavidin Antikörper (biotinyliert) Lösung bei 25 °C und dann noch einmal, um die Fluoreszenzsignal zu verstärken, mit der SAPE-Färbelösung inkubiert, so dass der Hybridisierungskomplex vervollständigt wurde. Zum Abschluss wurde in 15 Waschschritten bei 30 °C mit Puffer A gewaschen und der Chip eingescannt. Bei einer Anregungswellenlänge von 570 nm wurde die Fluoreszenz des gebundenen Phycoerythin mit einer Pixelgröße von 3 µm gemessen. Aus drei aufeinander folgenden Scanvorgängen wurde ein Mittelwert der Pixelintensitäten ermittelt, der für die folgenden Auswertungen verwendet wurde.

3.10 Datenverarbeitung und Datennormalisierung

Die Datenanalyse wurde in der Abteilung für Bioinformatik in der MetaGen durchgeführt. Aus dem gescannten Chipbild wurde mit Hilfe der MAS 4.0 Software von Affymetrix eine Oligonukleotidfeld-Matrix berechnet, in der jedes Oligonukleotidfeld (24 µm x 24 µm) durch ein 18 µm x 18 µm großes Quadrat (6 x 6 Pixel, 3 µm Pixelgröße) wiedergegeben war. Aus drei aufeinander folgenden Scanvorgängen wurde der arithmetische Mittelwert der Pixelintensitäten ermittelt. Da nicht-biologische Faktoren die Genexpressionsdaten beeinflussen können, müssen für den Vergleich der Expressionsdaten verschiedener Chipexperimente und für die Identifikation differenziell exprimierter Gene die Rohdaten zunächst normalisiert werden.

3.10.1 Korrektur der Hintergrundhelligkeit

Die Korrektur der Hintergrundhelligkeit der Chips erfolgte, indem für jeden Chip der additive Hintergrund als Mittelwert der 2 % dunkelsten Oligonukleotidfeldintensitäten berechnet wurde. Zur Normierung wurde dieser additive Hintergrund von jeder gemessenen Oligonukleotidfeldintensität subtrahiert und der daraus resultierende Wert durch den Median aller Oligonukleotidfeldintensitäten dividiert.

3.10.2 Generierung eines repräsentativen Probensatzwertes

Für die weitere Datenauswertung war von entscheidender Bedeutung, dass pro Chipexperiment für jedes Gen bzw. EST 11 verschiedene Messungen erfolgten, da auf dem Chip jeder Transkript spezifische Probensatz 11 Oligonukleotidfelder enthielt (siehe Abbildung 4). Als repräsentativer Expressionswert für einen genspezifischen Probensatz wurde das 75 %-Quantil der 11 „*perfect match*“ Oligonukleotidfelder definiert.

3.10.3 Beurteilung der Hybridisierungsspezifität

Um trotz der fehlenden Wiederholungsmessungen die Spezifität der Hybridisierung zu erfassen und eine Signal-Rausch-Trennung zu erreichen, wurden die Intensitäten der 11 zueinandergehörigen „*perfect match*“ und „*miss match*“ Oligonukleotidfelder eines Probensatzes miteinander verglichen (siehe Abschnitt 1.9). Dazu wurde auf jeden Probensatz der Wilcoxon-Test angewendet, indem die 11 Intensitätsdifferenzen der korrespondierenden „*perfect match*“ und „*miss match*“ Oligonukleotidfelder berechnet wurden und bezüglich ihres Absolutbetrages derart in eine Rangordnung gebracht wurden, dass die Differenz mit dem kleinsten Absolutbetrag die Rangzahl eins bekam und die mit dem größten Betrag die Rangzahl 11 erhielt. Als Testgröße galt nun die Summe der Ränge derjenigen Differenzen, die ein negatives Vorzeichen aufwiesen. Im Idealfall, das heißt bei hoher Hybridisierungsspezifität, liefert jedes „*perfect match*“ Oligonukleotidfeld ein höheres Intensitätssignal als das zugehörige „*miss match*“ Oligonukleotidfeld, so dass die Differenzen („*perfect match*“ – „*miss match*“) ein positives Vorzeichen aufweisen und folglich die Testgröße null ist. Wenn die Testgröße unter den kritischen Wert der 5 % Grenze des Wilcoxon-Tests fällt, gilt der Probensatz als present bzw. detektiert.

3.10.4 Lineare Regression der Expressionsdaten

Durch technische und andere nicht-biologische Gegebenheiten verursachte Expressionsunterschiede, sollten durch den Intensitätsabgleich zwischen den Chipexperimenten (chipexperimentübergreifend) verrechnet werden. Hierzu wurde ein theoretischer Referenzchip generiert, dessen Probensatzintensitätswerte sich aus dem Median der entsprechenden Probensätze auf sämtlichen gescannten Chips berechneten. Der Vergleich der Expressionsdaten eines jeden Chip mit dem theoretischen Referenzchip erfolgte durch die graphische Darstellung der Wertepaare (x/y) in einem Koordinatensystem, wobei die x-Werte die Probensatzintensitätswerte des theoretischen Referenzchips und die y-Werte die des zu normalisierenden Chips darstellten. Es resultierte eine Punktwolke, wie sie in Abbildung 8a dargestellt ist.

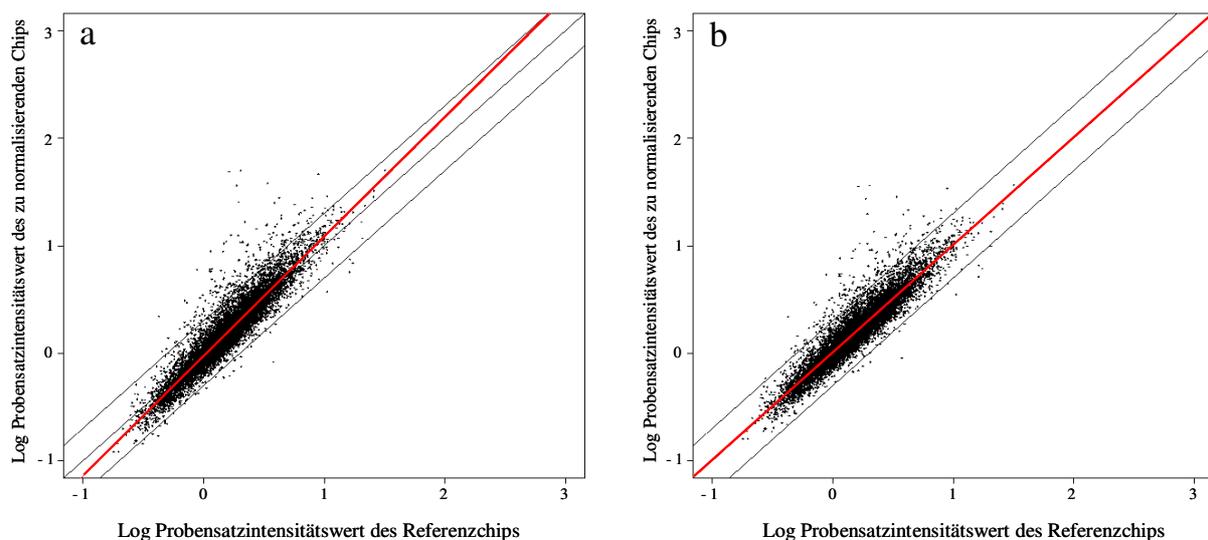


Abbildung 8 Lineare Regression: Trägt man die dimensionslosen Signalwerte des theoretischen Referenzchips (y-Werte) und des zu normalisierenden Chips (x-Werte) paarweise für jeden Probensatz gegeneinander auf, erhält man die graphische Darstellung einer Punktwolke sämtlicher Messwerte. Abbildung (a) zeigt die Punktwolke vor und Abbildung (b) nach linearer Regression. Durch die lineare Regression verläuft die Schwerpunktgerade (rot) der Punktwolke auf der Ursprungsgeraden, die Form der Punktwolke verändert sich jedoch nicht.

Nach den Regeln der linearen Regression wurde die Punktwolke derart transformiert, dass die Steigung der Schwerpunktgeraden gleich eins ($m=1$) und der Achsenabschnitt gleich null ($n=0$) wurde (siehe Abbildung 8b). Für den Fall, dass sich im Anschluss an die lineare Transformation nicht lineare Effekte zeigten, wurde folgendermaßen vorgegangen: Die

Probensätze des zu normalisierenden Chips wurden in zwei Gruppen eingeteilt, eine umfasste sämtliche Probensätze, die nach den oben aufgeführten Kriterien als detektiert galten, die andere alle nicht detektierten. Beide Gruppen wurden separat wie oben beschrieben normalisiert. Abschließend wurden die normalisierten Intensitätswerte durch den medianen Intensitätswert des Chips dividiert.

3.11 Definition und Identifikation differenziell exprimierter Sequenzen (DES)

Zur Identifikation differenziell exprimierter Sequenzen (DES) aus den 44.928 Probensätzen der GeneChips[®] U133A und U133B wurde zum einen das Ausmaß des Expressionsunterschiedes zwischen dem Normal- und Tumorgewebe berücksichtigt und zum anderen die Hybridisierungsspezifität als Qualitätsindikator für die Messung.

Hinsichtlich der Hybridisierungsspezifität wurden Gen- bzw. Transkript spezifische Probensätze zur Identifikation von DES verwendet, die in mindestens 80 % der untersuchten Proben, detektiert waren, das heißt, deren Hybridisierung, welche mittels des Wilcoxontests beurteilt wurde (siehe Abschnitt 3.10.3), sich als spezifisch erwies.

Für die Berechnung des Ausmaßes der Genexpressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Gewebetypen wurde folgendes heuristisches Verfahren angewandt (siehe Abbildung 9): Zunächst wurde für jedes Gen und EST anhand des Wilcoxontests die Signifikanz des Expressionsunterschiedes in den korrespondierenden Normal- und Tumorgewebe der 25 Patienten berechnet. Anschließend wurde anhand der statistischen Testergebnisse eine Rangfolge der Gene generiert, in der das Gen, welches die höchste Signifikanz aufwies, den ersten Rang der Rangfolge einnahm. Zudem wurde für jedes Gen und EST der Tumor-Normalgewebe-Quotient sowie der Diskriminanzscore nach Golub (82) (modifizierte *t*-Teststatistik) berechnet und auf analoge Weise eine Rangfolge erstellt. Abschließend wurde eine übergreifende Gesamtrangfolge berechnet, in der sich der Rang für ein Gen bzw. EST aus der Summe der Einzelränge ergab (siehe Abbildung 9). Arbiträr wurden die 100 Gene und ESTs, die sich als am deutlichsten über- und unterexprimiert erwiesen, als differenziell exprimiert angesehen.

| Gen/EST | Patient 1 | | Patient 2-25 | | statistische/ mathematische Tests | | | | | Gesamtrang | |
|---------|-----------|-------|--------------|-------|-----------------------------------|------|-------|------|--------------|------------|------|
| | Normal | Tumor | Normal | Tumor | Wilcoxon | Rang | Golub | Rang | T/E-Quotient | | Rang |
| 1 | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | |
| “ | | | | | | | | | | | |
| 45.000 | | | | | | | | | | | |

Abbildung 9 Schematische Übersicht über das heuristische Verfahren zur Berechnung der Gesamtrangfolge der Probensätze, gewichtet nach den Ergebnissen des Wilcoxontests, des Diskriminanzscores nach Golub (82) (modifizierte *t*-Teststatistik) und des Tumor-Normalgewebe-Quotienten zur Erfassung der Genexpressionsunterschiede im kolorektalen Tumor- und Normalgewebe.

3.12 Identifikation und Beurteilung Gewebe diskriminierender Signaturen

Mit Hilfe der Clusteranalyse wurden zunächst sämtliche detektierten Sequenzen hinsichtlich ihres Vermögens, das kolorektale Normal- und Tumorgewebe zu unterscheiden, beurteilt. Anschließend wurde das gleiche Verfahren mit den identifizierten DES, die sich im kolorektalen Tumorgewebe als signifikant über- und unterexprimiert erwiesen, durchgeführt. Zudem wurde untersucht, ob sich ein charakteristisches Expressionsprofil (Signatur) innerhalb der Tumor- und Normalgewebecluster findet, das die kolorektalen Gewebe nach weiteren histopathologischen Merkmalen bzw. nach Tumorstadien einteilt. Um von den generierten molekularbiologischen Signaturen die Trennschärfe bzw. deren Eignung als Klassifikator zu evaluieren, wurden die Testgütekriterien (Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert) berechnet.

3.12.1 Clusteranalyse

Clusteranalysen teilen ausgehend von einer Distanzmatrix der zu klassifizierenden Objekte diese in Gruppen oder Klassen (Cluster) ein. Ziel ist es dabei, einander ähnliche Objekte in Klassen zusammenzufassen bzw. sich stark unterscheidende Objekte in verschiedene Klassen einzugruppieren. Clusteranalysen können in nicht-hierarchische und die in dieser Arbeit eingesetzten hierarchischen Verfahren unterteilt werden. Der Algorithmus zur Klassifizierung kann durch folgendes Schema beschrieben werden:

1. Aus einer Zahl von *n* Objekten werden anhand eines Ähnlichkeitsmaßes die beiden einander am ähnlichsten Objekte ermittelt und zu einem Cluster fusioniert.

2. Die Abstände zwischen dem neuen Cluster und den restlichen $n-2$ Objekten werden berechnet.
3. Nun werden (wie in Punkt 1) erneut die Objekte oder Cluster mit den geringsten Abständen aufgesucht und fusioniert.
4. Es erfolgt eine erneute Abstandsberechnung für die verbleibenden $n-3$ Objekte. Dieses Verfahren wird so oft wiederholt, bis alle Objekte in einem Cluster vereinigt sind.

Die verschiedenen Methoden oder Algorithmen der Clusteranalyse unterscheiden sich voneinander durch die Art und Weise der Neuberechnung der Distanzen. Zur Visualisierung werden die numerischen Expressionswerte in eine Farbskala übersetzt, die eine optische Mustererkennung erleichtert. Zudem lässt sich die hierarchische Clusterstruktur der Daten in Form eines Dendrogramms (siehe Abbildung 10) veranschaulichen. Dabei handelt es sich um einen Baum, der die hierarchische Zerlegung einer Datenmenge, wie z.B. der Patienten oder Probensätze, in immer kleinere Teilmengen darstellt. Die Astlängen des Dendrogramms dienen als Maß für die Ähnlichkeit der Expressionsprofile der Patienten oder Probensätze. Je kürzer die Strecke der verbindenden Astlängen zweier Patienten oder Probensätze, desto ähnlicher sind sich letztere. Für die Berechnung der Clusteranalysen und Dendrogramme sowie für die Visualisierung der Daten über Farbcodierung wurde die Software GeneMath 1.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) angewandt.

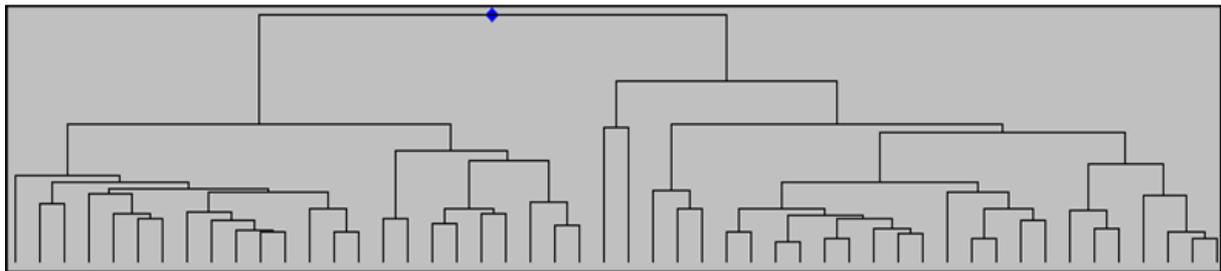


Abbildung 10 Dendrogramm zur Darstellung der Ergebnisse einer Clusteranalyse. Das Dendrogramm stellt die Zerlegung einer Datenmenge in immer kleinere Teilmengen (Cluster) dar, deren Objekte einander ähnlich sind. Die Wurzel des Dendrogramms repräsentiert einen einzigen Cluster, der die gesamte Datenmenge enthält. Ein innerer Knoten vereint ähnliche Objekte zu einem Cluster, die Blätter des Dendrogramms stehen für die einzelnen Objekte der Gesamtmenge.