

## **2 Methoden und Materialien**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Anlage einer primären Schilddrüsenzellkultur**

Das benötigte Schilddrüsenewebe wurde uns von der Chirurgischen Klinik des St. Hedwig Krankenhauses Berlin zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um makroskopisch nicht malignitätsverdächtige, autonome Schilddrüsenadenome mit follikulären sowie parafollikulären Anteilen. Die Patienten hielten sich zur elektiven Thyreoidektomie stationär auf. Sie wurden präoperativ über die Studie informiert und gaben ihr Einverständnis zur Verwertung des Schilddrüsenewebes. Insgesamt wurden 41 Gewebe, davon 22 weiblicher und 19 männlicher Herkunft untersucht. Die Präparate wurden durch zufällige Initialien anonymisiert. Alter und Geschlecht des Patienten wurden dem jeweiligen Präparat zur späteren Auswertung zugeordnet.

Die Arbeitsschritte zur Präparation von nodulärem Schilddrüsenewebe bis zum Erhalt einer primären Schilddrüsenzellkultur wurden von Rapoport 1982 in einem Protokoll zusammengefaßt (133), und von uns in modifizierter Version angewendet (134).

Nach chirurgischer Gewebepreparation erfolgte die Aufbewahrung und der Transport in sterilen, mit 20 ml Transportmedium gefüllten Röhrchen, auf Eis. Das Transportmedium bestand aus HBSS, versetzt mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die nun folgende Gewebeaufarbeitung wurde unter sterilen Bedingungen in einer Zellkulturbank durchgeführt. Um eine möglichst homogene Zellpopulation zu erreichen, wurde sichtbares Bindegewebe, Gefäße und Nerven vom Schilddrüsenewebe mit Skalpell und Pinzette getrennt und der Gewebeverband mittels Skalpell zerkleinert. Die Reinigung des Gewebes von Erythrozyten erfolgte durch eine gewissenhafte Waschprozedur mit Transportmedium. Zur enzymatischen Aufspaltung in Schilddrüsenfollikel wurde das bearbeitete Gewebe mit 10 mg/ml Dispase II und 1,25 mg/ml Collagenase Typ A in 20 ml Transportmedium bei 38°C im Schüttelinkubator belassen. Nach einstündiger Inkubation wurde das Gewebe durch ein steriles Sieb filtriert. Es folgte die 5 minütige Zentrifugation des Filtrates bei 1000 Umdrehungen/ min (rpm). Dann wurde der Überstand abpipettiert und erneut zum Gewebe gegeben. Das im Röhrchen verbliebene Zellsediment wurde in 10 ml Kulturmedium gelöst und in Zellkulturschalen gegeben. Das Schilddrüsenewebe wurde anschließend erneut im Dispase-Kollagenase Gemisch für eine Stunde im Schüttelinkubator plaziert. Die beschriebene Prozedur wurde bis zur vollständigen Auflösung des Gewebeverbandes mehrfach wiederholt.

### 2.1.2 Kultivierung und Passagierung von Schilddrüsenprimärzellen

Die Primärzellkulturen wurden in Kulturschalen (Durchmesser: 150 oder 200 mm) in einem Zellkulturschrank bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre, die mit 5% CO<sub>2</sub> versetzt wurde, aufbewahrt.

Als Primärzellkulturmedium verwendeten wir Ham's F-12 Medium mit L-Glutamine, dem 10% fetales Kälberserum, 0,5% 5-Hormonlösung ( 10 ng/ml Glycyl-Histidyl-L-Acetat, 10 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Apo-Transferrin, 10 ng/ml Somatostatin und 3,2 ng/ml Hydrocortison ), 1% MEM nicht essentielle Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, sowie 5 mU/ml TSH steril filtriert hinzugefügt wurden. Außerdem wurde 2,5 µg/ml Amphotericin unfiltriert in das Fütterungsmedium gegeben.

Mehrere Tage nach Anlage einer Zellkultur waren die Primärzellen am Boden der Kulturschalen angewachsen. Nach Absaugen des alten Mediums spülte man mit dem ersten Mediumwechsel Erythrozyten und abgestorbene Zellen ab, sodaß das Wachstum der Thyreozyten verbessert wurde. Der Zellmediumwechsel mit 10 ml erfolgte alle 3 Tage.

Je nach Konfluenz der Zellen erfolgte die Zellpassagierung alle 7-10 Tage. Aus den Kulturschalen wurde das alte Medium abgesaugt, Rückstände wurden durch einen Spülvorgang mit 10 ml sterilem HBSS entfernt. Zur Auflösung der Zellhaftung vom Schalenboden wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin für 5 min im Zellkulturschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der nun mehrheitlich schwimmenden Zellen, wurde 5 ml Kulturmedium zur Inaktivierung des Trypsins hinzugegeben. Anschließend erfolgte die mehrfache Auf- und Abpipettierung, um noch restliche adhärente Zellen zu lösen. Das Medium-Trypsin-Zellgemisch wurde in 50 ml Röhrchen gesammelt. Durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min setzten sich die Zellen am Boden des Röhrchens ab. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes konnten die sedimentierten Zellen in 200 µl Zellkulturmedium gelöst werden und auf eine geeignete Anzahl an Kulturschalen verteilt werden. Jede Kulturschale enthielt außerdem 10ml erwärmtes Nährmedium. Nach dieser Prozedur erfolgte eine abschließende Beurteilung der Zellkultur unter dem Lichtmikroskop.

### 2.1.3 Kultivierung von Kontrollzelllinien

Die Archivierung verschiedener Schilddrüsenzelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196°C. Die entsprechenden Röhrchen wurden entnommen und in einem 37°C warmen Wasserbad für 5-8 min aufgetaut. Dann wurden sie mit einem geeigneten Nährmedium versetzt und auf Kulturschalen verteilt. Im Lichtmikroskop konnte die Zelldichte überprüft werden.

FRTL5 stellt eine Zelllinie differenzierter Thyreozyten der Ratte dar. Sie gilt als ein akzeptiertes Modell differenzierter Schilddrüsenzellen (135,136). Das verwendete Kulturmedium bestand aus

Ham's F-12 Medium, versetzt mit 5% Fötalem Kälberserum (FKS), 1% MEM nicht essentielle Aminosäuren, 100 U/l Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin. Zellkultivierung und Passagierung erfolgte nach denselben Richtlinien wie die primären Schilddrüsenzellen.

HTh74 ist die Zelllinie eines humanen anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms. Das Ham's F-12 Zellkulturmedium enthielt 10% FKS, 1% MEM, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin (137).

HTC, die Zelllinie eines humanen follikulären Schilddrüsenkarzinoms, wuchs im gleichen Kulturmedium wie HTh74 (138).

### 2.1.4 Veränderung der Kulturbedingungen nach der SACK Methode

Angelehnt an das Protokoll von Lee et al (108) setzten wir dem Standardzellkulturmedium eine unterschiedliche Konzentration von fötalem Kälberserum zu. Außerdem wurde 1mM Xanthosin beigefügt oder verzichtet. Die Zellkulturen wurden mit hoher Zelldichte wöchentlich passagiert und gefüttert. Nach 6-8 Wochen Kultivierung erfolgte die immunzytochemische Anfärbung der Primärzellen nach Protokoll.

Kontrollgruppe	Gruppe1	Gruppe2	Gruppe3	Gruppe4
Kein Xanthosin 10%FKS normale Zelldichte Fütterung 2-3 Tage	1mM Xanthosin 1% FKS hohe Zelldichte Fütterung wöchentlich	Kein Xanthosin 1% FKS hohe Zelldichte Fütterung wöchentlich	Kein Xanthosin 10% FKS hohe Zelldichte Fütterung wöchentlich	1mM Xanthosin 1% FKS hohe Zelldichte Fütterung 2-3 Tage

**Tabelle 2.1:** Stimulationsprotokoll nach Lee et al (108), variable Faktoren waren Xanthosin, Konzentration des Fötalen Kälberserums (FKS), Zelldichte und Fütterungsintervall

### 2.15 Östrogenstimulation von Schilddrüsenprimärzellkulturen

48 Stunden vor der Hinzugabe von 17β-Östradiol wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Die Zellkulturen wurden nun mit einem Phenol Red freien Nährmedium und 0,5% Fötalem Kälberserum versetzt. Das Medium enthielt keine Wachstumsfaktoren und Hormone (111).

Nach 14 tägiger Inkubationszeit erfolgte die mRNA Gewinnung, die Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion. Außerdem wurden die Zellen in der Durchflußzytometrie analysiert.

	<b>Konzentration 17<math>\beta</math>-Östradiol</b>	<b>Inkubationszeit</b>	<b>Literatur</b>
<b>Gruppe 1</b>	10 nmol	14 Tage	111
<b>Gruppe 3</b>	10 $\mu$ mol	14 Tage	115

**Tabelle 4:** Östrogen Stimulationsprotokoll primärer Schilddrüsenkulturen (Gruppe 1 und 3),  
Gruppe 2 und 4: Kontrollgruppen ohne 17 $\beta$ -Östradiol Hinzugabe

### 2.1.6 Kultivierung von Zellen auf Objektträgern

Die Zellen wurden auf speziellen Objektträgern mit Zellkulturkammern (Lab-tek) kultiviert. Es erfolgte der regelmäßige Wechsel des zellspezifischen Kulturmediums (5 ml). Bei Konfluenz der Zellen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, mit HBSS gespült und anschließend die Zellkulturkammer vom Objektträger gelöst. Zur 5 minütigen Fixierung der Zellen diente ein 1:1 -20°C kaltes Ethanol-Methanol Gemisch. Danach erfolgte die immunzytochemische Anfärbung nach Protokoll.

## 2.2 mRNA Isolierung von Schilddrüsenprimärzellen und FACS Zellen

Für die mRNA Isolierung von kultivierten Zellen wurde das Protokoll des QIAGEN RNeasy Mini Kit verwendet. Vorbereitend wurde 1 ml RLT Puffer mit 10  $\mu$ l B-Mercaptoethanol gemischt. Das Kulturmedium wurde vorsichtig ohne Bodenkontakt der Pipette aspiriert und nach Zellwaschung mit HBSS jeweils 350  $\mu$ l RLT Puffergemisch hinzugegeben und in den Kulturschalen gleichmäßig verteilt. Die so vom Schalenboden gelösten Zellen wurden als Lysat in die vorbereiteten QIA shredder Säulen überführt und durch dreiminütige Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl homogenisiert. Die weiteren Arbeitsschritte umfaßten die durch Ethanol praktizierte Zellmembranzerstörung, sowie die selektive Bindung der nun freigesetzten intrazellulären RNA an eine Silika-Gel-Membran. Es folgten 3 Waschprozeduren mit RW1 Puffer und RPE Puffer und jeweils anschließender Zentrifugation. Im letzten Schritt der RNA Extraktion wurde 30  $\mu$ l RNase freies Wasser direkt auf die Silika-Gel-Membran pipettiert und für eine Minute zentrifugiert. Da mRNA temperatursensibel ist, wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung in einem Kühlschrank bei - 40°C aufbewahrt.

Die mRNA Gewinnung von FACS Zellen erfolgte nach dem Protokoll des QIAGEN RNeasy Micro Kit. Dieses Kit wurde speziell für kleinste Zellmengen entworfen. Die Zellen wurden während FACS in einem Falcon Röhrchen, gefüllt mit PBS Lösung, aufgefangen. Aufgrund der geringen Zellzahl ergab sich nach Zentrifugation kein sichtbares Zellsediment am Röhrchenboden. Deshalb war ein sehr vorsichtiges Abpipettieren der Flüssigkeit ohne Berührung des Bodens wichtig. Anschließend versetzte man die Zellen mit 75  $\mu$ l RLT Puffergemisch,

sowie bei geringer Zellzahl (unter 5000 Zellen) mit 5 µl carrier RNA. QIA shredder Säulen dienten der Homogenisierung des Zelllysates. Nach Zentrifugation und Hinzugabe von 70% Ethanol erfolgte die Zerstörung der Zellwände. Weitere Schritte beinhalteten die Inkubation mit einem DNase Mix für 15 min bei Raumtemperatur, sowie mehrere Waschprozeduren mit RPE und RW1 Puffer. Abschließend wurde direkt auf die Silica-Gel-Membran 14 µl RNase freies Wasser gegeben. Nach Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl löste sich die mRNA im RNase freien Wasser. Die Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank bei  $-40^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3 Konzentrationsbestimmung von mRNA

Zur Konzentrationsbestimmung der gewonnenen mRNA wurde die Methode der Spektralphotometrie angewendet. Erster Arbeitsschritt bestand in der Kalibrierung des Spektralphotometers (Pharmacia, Ultrospec II) auf 0,00 bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dazu verwendete man eine mit 1000 µl aqua bidest gefüllte Quarzküvette. 2µl mRNA wurden mit 998µl aqua bidest gut vermischt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht die optische Dichte von 1 einer RNA Konzentration von 40 mg/ml (139). Aus der gemessenen optischen Dichte konnte nun die RNA Konzentration der Probe in µg/ml berechnet werden. Jede mRNA Probe wurde doppelt bestimmt, um ein exaktes Ergebnis zu erhalten und Fehlbestimmungen zu minimieren.

### 2.4 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription dient der Synthetisierung komplementärer DNA Stränge (cDNA) aus mRNA. Dies ist notwendig, um im nächsten Schritt mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), selektive DNA Sequenzen zu vervielfältigen und nachzuweisen.

Ein definiertes Volumen der mRNA Lösung, das 1µg mRNA enthält, wurde mit 2µl Oligo-dt (30 pmol) und RNase freiem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 16,75 µl gemischt. Es erfolgte die 5 minütige Inkubation bei  $70^{\circ}\text{C}$  auf dem Thermoblock, sowie anschließend die Aufbewahrung auf Eis. Folgende Reagentien wurden bis zu einem Volumen von 25 µl hinzugefügt: 5µl M.MLV 5x RT Puffer, 1,25 µl 10 mmol/l dNTP, 1 µl Ribonuklease Inhibitor und 1 µl M-MLL-Reverse Transkriptase. Im Thermoblock begann die Reverse Transkription mit einer Inkubationsphase von  $70^{\circ}\text{C}$  über 5 min. Bei  $42^{\circ}\text{C}$  erfolgte dann über 60 min die cDNA Synthese. Während der anschließenden 5 minütigen Phase wurde die Reverse Transkriptase bei  $95^{\circ}\text{C}$  denaturiert und dann auf  $4^{\circ}\text{C}$  abgekühlt (140).

Da cDNA temperaturstabil ist, erfolgte die Aufbewahrung der Proben im  $+4^{\circ}\text{C}$  Kühlschrank.

### 2.5 Polymerase- Kettenreaktion

Die Methode zur Vervielfältigung selektiver DNA Sequenzen wurde von Kary Mullis 1984 entwickelt und 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie prämiert (141). Es handelt sich dabei um eine thermozyklische Reaktion, wobei jeder Zyklus 3 verschiedene Phasen beinhaltet. Als erster Schritt erfolgt die Denaturierung der cDNA in Einzelstrang DNA. Es schließt sich die Annealing Phase an, wobei die Anlagerung spezifischer Oligonucleotide (Primer) an komplementäre Sequenzabschnitte im 5' Bereich der DNA erfolgt. Die Annealing Temperatur ist abhängig von Sequenz und Länge des Primers. Zum Schluß folgt die Extensionsphase, in der es mit Hilfe der Polymerase und zugegebenen Nukleotiden zur Ergänzung der einzelsträngigen DNA zur Doppelstrang DNA kommt. In jedem sich wiederholenden Zyklus kommt es so zur Verdopplung des Reaktionsproduktes und damit exponentiellen Anstiegs der DNA Menge (142).

#### 2.5.1 Amplifikation von cDNA durch die Polymerase- Kettenreaktion

Das verwendete Protokoll zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) entnahmen wir Manole et al (111). Es wurden 4 µl der cDNA nach der Reversen Transkription in ein 50 µl Reaktionsgemisch gegeben, was neben aqua bidest folgende andere Reagentien beinhaltet: 5 µl 10x Reaktionspuffer, 5 mmol/ l MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTPs, je 50 pmol des Primerpaares und 2,5 U (0,5 µl) Taq DNA Polymerase. Durch Zugabe von 3 Tropfen Mineralöl in jede Probe wurde die wäßrige Phase vor Reagentienverlust durch Verdampfen geschützt. Eine Negativprobe (ohne cDNA) ist wichtig, um die Qualität der PCR zu beurteilen und eventuelle Verunreinigungen und unspezifische Reaktionen zu erkennen. Nach einer Erwärmungsphase des PCR Ansatzes über 10 min bei 95°C wurde 0,5 µl Taq Polymerase in jede Probe dazugegeben. Die anschließende Denaturierung der cDNA erfolgte über 10 min bei 94°C. Im allgemeinen verlief die Annealing Phase über 35 Zyklen mit 95°C für 30 sec, anschließend Primer spezifisch 55- 61°C für 30 sec und 72°C für 60 sec. Nach Beendigung der Zyklen schloß sich die Extensionsphase bei 72°C für 10 Minuten an. Im letzten Schritt der PCR erfolgte die Abkühlung der Proben auf 4 °C zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen von Primern, Nukleotiden und Polymerasen. Bis zur Durchführung einer Agarosegelelektrophorese verblieben die Proben im +4°C Kühlschrank.

Tabelle 2.2 zeigt eine Übersicht der verwendeten Primersequenzen, Basenpaare, spezifische Bedingungen der Annealing Phase und Literaturquellen.

Name und Sequenz der Oligonukleotid-Primer Sense und Antisense	Basenpaare	Bedingungen der Annealing Phase	Lit.
<b>B- actin</b> 5` - CCC AGG CAC CAG GGC GTG AT-3` 5` - TCA AAC ATG ATC TGG GTC AT-3`	250 bp	25 Zyklen 1` 95°C 45`` 59°C 1` 72°C	111
<b>Gata-4</b> 5` - CTC CTT CAG GCA GTG AGA GC-3` 5` - GAG ATG CAG TGT GCT CGT GC-3`	575 bp	35 Zyklen 30`` 95 °C 30`` 58 °C 60`` 72 °C	74
<b>HNF4α</b> 5` - TCT CAT GTT GAA GCC ACT GC-3` 5` - GGT TTG TTT TCT CGG GTT GA-3`	501 bp	30`` 95 °C 30`` 57 °C 60`` 72 °C	143
<b>p 63</b> 5` - CCT GGA ACG TAT TCC ACT GAA CT-3` 5` - CGC TTC GTA CCA TCA CCG TTC T-3`	550 bp	30`` 95 °C 30`` 55 °C 60`` 72 °C	144
<b>Oct4</b> 5` - GAC AAC AAT GAG AAC CTT CAG GAG A- 3` 5` - CTG GCG CCG GTT ACA GAA CCA-3`	235bp	30`` 95 °C 30`` 55 °C 60`` 72 °C	50
<b>Connexin 43, Ratte</b> 5` - GCG TGA GGA AAG TAC CAA AC-3` 5` - GTG AAG CCG CCG CCA AAG TTG-3`	527bp	30`` 95 °C 30`` 58 °C 60`` 72 °C	145
<b>Thyreoglobulin</b> 5` - AGT CCT AAG TCC CCT GAT GC-3` 5` - CAA AGG GAG ACG TCG AGT GT-3`	280 bp	30`` 95 °C 30`` 55 °C 60`` 72 °C	134

<b>Connexin 43, human</b>	506 bp	30``	95 °C	145
5` - GCG TGA GGA AAG TAC CAA C-3`		30``	55 °C	
5` - GGG CAA CCT TGA GTT CTT CC-3`		60``	72 °C	
<b>ABCG2</b>	379 bp	25 Zyklen		146
5` - AGT TCC ATG GCA CTG GCC ATA-3`		30``	94 °C	
5` - TCA GGT AGG CAA TTG TGA GG-3`		30``	58 °C	
		60``	72 °C	

**Tabelle 2.2:** verwendete Primersequenzen mit jeweiliger Anzahl der Basenpaare, spezifischer Annealing Temperatur und Literaturangabe

### 2.5.2 Kombinierte Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion der mRNA von FACS Zellen

Zur Anwendung kam das Protokoll des QIAGEN One step RT-PCR Kits. Im hergestellten Master Mix waren 10µl 5x QIAGEN One step RT-PCR Puffer, 2 µl dNTP, 2 µl QIAGEN One step Enzym Mix, 5-10 Einheiten RNase Inhibitor, sowie das Primerpaar. Das allgemeine Volumen wurde durch steriles RNase freies Wasser bis zu einem Volumen von 50 µl aufgefüllt. Zum Master Mix wurde anschließend jeweils 10 µl RNA hinzugegeben. Aufgrund der geringen Zellzahl nach FACS ist eine spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung nicht möglich und nach diesem Protokoll auch nicht erforderlich. Eine Negativprobe, die der Qualitätskontrolle der Polymerase-Kettenreaktion diene, enthielt keine RNA. Abschließend wurde die wäßrige Phase durch 50 µl Mineralöl vor Verdunstung im Thermoblock geschützt. Der vorgeschlagene Programmzyklus beinhaltete die 30 minütige Reverse Transkription bei 50°C. Anschließend erfolgte die Aktivierung der Polymerase-Kettenreaktion über 15 min bei 95°C. Die weiteren Schritte umfassten Denaturierung der DNA, Primer spezifische Annealing Phase, sowie die Extensionsphase, angelehnt an das in 2.5.1 beschriebene Protokoll.

### 2.6 Agarosegel Elektrophorese

Die Agarosegel Elektrophorese stellt ein Trennverfahren dar, das die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit verschieden großer, geladener Moleküle im elektrischen Feld ausnutzt. Nukleinsäuren wandern aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode. Die optimale Dichte des Agarosegels richtet sich nach der erwarteten DNA Fragmentlänge. Bei 1000 Basenpaaren wird ein 1% iges Agarosegel empfohlen,



bei 200 Basenpaaren sollte die bevorzugte Dichte des Gels 2% betragen.

Für ein 1% iges Agarosegel wurde 1g Agarosepulver abgewogen und mit 100 ml 1x TBE Lösung gemischt. Nach 3 minütigem Aufkochen in der Mikrowelle wurde das Gemisch mit 5 µl Ethidiumbromide, einem Fluoreszenzfarbstoff, versetzt und nochmals zum Kochen gebracht. Die horizontalen Gelkammern wurden sorgfältig mit dem Gel aufgefüllt, und ein Kamm eingefügt. Nach Erkalten des Gels wurde dieser ebenso wie die Seitenwände der Kammer entfernt und das Gel mit 1x TBE als Laufpuffer bedeckt. Es erfolgte nun die Mischung von 5 µl DNA aus dem PCR Ansatz mit 1 µl Orange G zur Erhöhung des spezifischen Gewichtes. Dann wurden die Proben in die einzelnen Lochkammern pipettiert. Nach Anlegen der Spannung von 90 V an die Gelkammern liefen die Proben Richtung Katode. Nach etwa 45-60 Minuten wurde ein spezifisches Bandensignal, abhängig von der Basenzahl des verwendeten Primers, sichtbar. Eine Test DNA (Ladder DNA) zeigte Kontrollbanden bei 800 und 350 Basenpaaren. Die Dokumentation fand durch Ansicht unter einem UV Lichtgerät statt. Fotoaufnahmen erfolgten mit einem p53 Polaroid Film und Kamera und mit einer Sony DSC-W7 Digitalkamera.

### **2.7 Extraktion von DNA aus Agarosegel**

Unter UV Licht wurde das DNA Fragment einer bestimmten Größe mit einem scharfen Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Extraktion und Reinigung der DNA erfolgte nach dem Protokoll des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma QIAGEN.

### **2.8 Restriktion von DNA**

16 µl extrahierte und gereinigte DNA wurde mit 2 µl Restriktionsenzym, sowie 2 µl Reaktionspuffer versetzt und für mindestens 2 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Restriktionsenzyme sind für den jeweils zu untersuchenden Marker ausgesuchte Endonucleasen, die spezifische Basensequenzen (meist 4-8 Nukleotide) in einer DNA Doppelhelix erkennen und an spezifischen Stellen hydrolysieren und damit schneiden. Um geeignete Restriktionsenzyme zu finden, wurde mit dem Programm Biology Workbench 3.2 gearbeitet. Die Kontrolle der Restriktion erfolgte durch Elektrophorese in einem Agarosegel (147).

### **2.9 Immunzytochemie**

Zum immunzytochemischen Nachweis der Transkriptionsfaktoren wurden primäre Schilddrüsenzellen, sowie Kontrollzelllinien (HeLa, FRTL5, HTh74, HTC) auf Objektträger kultiviert. Die Fixierung erfolgte mit einem 1:1 Methanol Ethanol Gemisch bei -20°C für 5-7

Minuten. Anschließend wurden die Präparate mit 15% iger Essigsäure für 8 Minuten inkubiert, sowie 30 Minuten mit fließendem Leitungswasser gespült. Die anschließende 30 minütige Prozedur mit in TBS 1:10 verdünntem Schweineserum diente der Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbung durch Anlagerung der Antikörper an Bindegewebe oder Kollagen (148). Nach dem sorgfältigen Abtropfen der Lösung vom Objektträger wurde der Primärantikörper in adäquater Verdünnung mit TBS und 0,5% igem Rinderserumalbumin hinzugegeben. Es erfolgte die Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Der 2. Tag des immunzytochemischen Protokolls begann mit einer mehrmaligen Waschprozedur in TBS. Die nun folgende 2 stündige Inkubation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer erfolgte mit einem in TBS verdünnten Zweitantikörper (1:500), einem biotinkonjugierten Antikörper gegen Ratten- oder Mausimmunglobulin. Es folgte eine erneute Waschprozedur mit TBS, sowie eine 90 minütige Inkubation der Präparate mit in TBS 1:500 verdünnter Alkalischer Phosphatase, einem konjugierten Extravidin- Biotin- Komplex, und 0,5% BSA. Nach einem Spülvorgang mit TBS wurde die 10 minütige Anfärbung mit Fast Red und nach erneutem gründlichen Spülen die Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun Lösung durchgeführt. Abschließend wurden die Präparate mit Kaisers Glycerin Gelatine beschichtet (149).

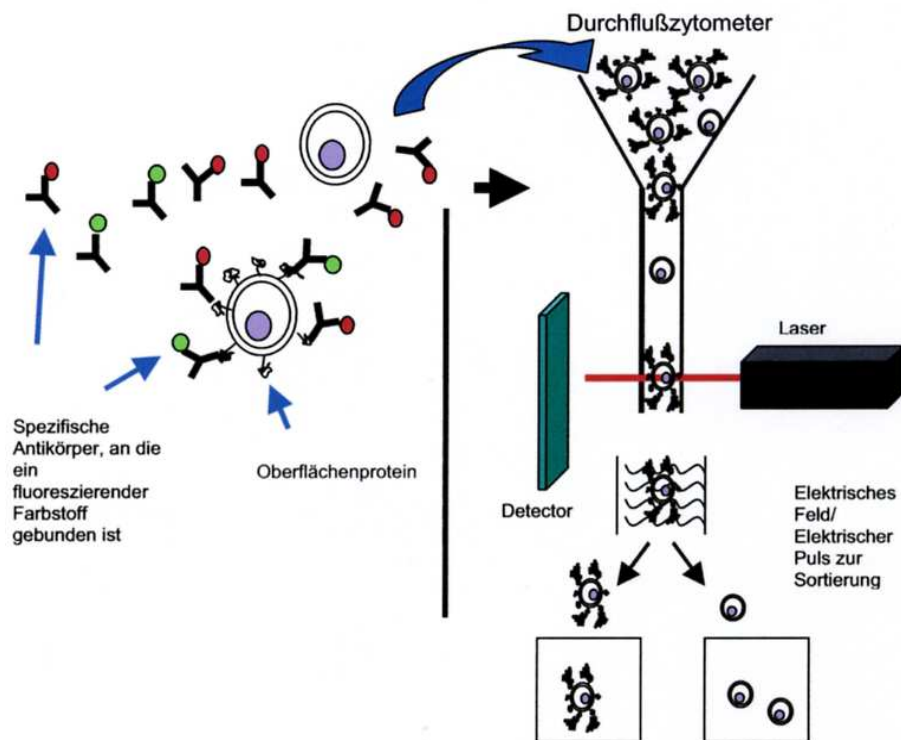
### **2.10 Durchflußzytometrie und Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS)**

Die Durchflußzytometrie stellt eine Methode zur Charakterisierung und gleichzeitig möglichen Isolierung von Zellpopulationen dar. Sie erfüllt den Anspruch einer hohen Sensitivität von 0,01-0,05% und Spezifität, die erforderlich sind, um sehr kleine Zellzahlen zu detektieren (150). Daher eignet sich die Methode zur Untersuchung adulter Stammzellen - sehr seltenen Zellen im differenzierten Zellverband.

In einer Reihe von Publikationen wurde das Verfahren der Durchflußzytometrie und FACS zur Isolierung adulter Stammzellen beschrieben (151,152,153). Zellen lassen sich durch Oberflächenproteine und Transkriptionsfaktoren charakterisieren. Prinzip der Durchflußzytometrie ist die spezifische Antigen- Antikörperbindung von Fluorochromen an ausgesuchte Proteine. Die Emissionseigenschaften der Fluorochrome dienen der Darstellung der Zellen im Diagramm.

Die in dieser Arbeit verwendeten Marker (Primärantikörper) und Fluorochrome (Sekundärantikörper) wurden über Santa Cruz Biotechnology bezogen. Die Durchflußzytometrie fand am FACS Calibur Durchflußzytometer (Becton-Dickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland) im Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin statt. Die präparierten Zellen flossen in einer PBS Lösung durch eine dünne Meßkammer (Flußzelle) und wurden dort von einem Laserlicht angestrahlt. Je nach physikalischen Eigenschaften der Zelle

(Größe, Granularität) und unterschiedlichen Emissionsmaxima der Fluorochrome entstand ein spezifisches Streulicht. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Cellquest Software (Becton-Dickinson Biosciences).



**Abbildung 2.1:** Prinzip der Durchflußzytometrie und FACS (National Institut of Health, 2001)

### 2.10.1 Methoden zur Erhöhung der Zellmembranpermeabilität

Bei den zu untersuchenden Markern handelte es sich ausschließlich um Transkriptionsfaktoren, die in der Zelle lokalisiert waren. Um eine spezifische Bindung der Marker an die Antikörper und Fluorochrome zu erreichen, war ein intrazelluläres Eindringen der Antikörper erforderlich. Wir verglichen unterschiedliche Methoden zur Erhöhung der Zellmembranpermeabilität. Ziel war es, hoch spezifische Ergebnisse zu erhalten und dabei die Zellmorphologie der sortierten Zellen weitestgehend zu schonen.

Als kommerzielle Methode verwendeten wir einen Methanol enthaltenen Permeabilitätspuffer der Firma Santa Cruz Biotechnology, der speziell für die intrazelluläre Proteindetektion entwickelt wurde. Die Aufbewahrung des Permeabilitätspuffer erfolgte im

Kühlschrank bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . In einem ersten Arbeitsschritt wurden die Zellen durch Trypsinbehandlung vom Kulturschalenboden gelöst, zentrifugiert und 2 mal in einem 50ml Röhrchen mit  $4^{\circ}\text{C}$  kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde 1ml eines  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten Permeabilitätspuffers in die Zellsuspension mit empfohlener Zelldichte von  $1 \times 10^6 / \text{ml}$  gegeben und über 15min auf Eis inkubiert. Es erfolgte die mehrfache Zentrifugation und Waschprozedur mit einem speziellen  $4^{\circ}\text{C}$  kalten Waschpuffer. Anschließend wurde nach dem Protokoll der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung verfahren.

Beim Mikrowellenerhitzen (Microwave Heating) erfolgte als erster Schritt die Eichung der Mikrowelle, um die in der Literatur empfohlenen Zeit- und Temperaturangaben anwenden zu können (155). Die nach Trypsinierung gewonnene Zellsuspension wurde in einer vorbereiteten Lösung aus Natriumcitratpuffer (pH: 6,0) und Schweineserumalbumin resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung in 10 ml Röhrchen für 30-60 Sekunden auf  $90-100^{\circ}\text{C}$  erhitzt und dann für 10 Minuten auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation, Abpipettierung des Mediums und Lösung des Zellsedimentes in PBS wurde weiter nach dem Protokoll der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung verfahren (154, 155). Nach Verwendung eines Permeabilitätspuffers und der Methode des Mikrowellenerhitzens wurde die Zellsuspension nicht mit Propidium Jodid versetzt.

Zur Lösung der Zellen von der Kulturschale und Aufhebung der Zelladhärens wurden die Zellkulturen mit Trypsin behandelt. Die 3. Methode fand unter der Annahme statt, daß Trypsin sekundär eine Veränderung der Zellmembran bewirkt. So erfolgte die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung ohne weitere chemische oder physikalische Permeabilisierungsprozeduren. Abschließend wurde mit Propidium Jodid DNA Fragmente und Zellschrott angefärbt.

In der Analyse der Durchflußzytometrie boten die 3 Methoden jeweils ein hohes Maß an Spezifität der Antigen-Antikörperbindungen und wiesen vergleichbare Ergebnisse auf. Somit wurde im Verlauf neben der Trypsinierung der Zellkultur auf zusätzliche Methoden der Zellmembranpermeabilisierung verzichtet. Die Zellmorphologie und Integrität konnte so größtmöglich geschützt werden.

### **2.10.2 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung**

Zugrunde lag das von Santa Cruz Biotechnology erstellte Protokoll zur indirekten Immunfluoreszenzmarkierung. Erster Schritt bestand im Lösen der Zelladhärens in den Zellkulturschalen mit je 5 ml Trypsin. Die gewonnene Zellsuspension wurde durch Zentrifugation in Flüssigkeitsüberstand und Zellsediment getrennt. Es folgte die Lösung der Zellen in  $100 \mu\text{l}$  PBS. Die empfohlene Zellkonzentration lag bei  $1 \times 10^6 / \text{ml}$ .

Die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung bestand in zwei nacheinander

durchzuführenden spezifischen Antigen-Antikörper Reaktionen. Die Antikörper der zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren (Primärantikörper), sowie die passenden an Antikörper gekoppelten Fluorochrome (Sekundärantikörper) wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology bezogen.

Die Inkubation mit 10-30 µl Primärantikörper erfolgte über 30 Minuten auf Eis. Es schloß sich ein 2 maliger Waschvorgang mit PBS Lösung und jeweiliger Zentifugation und Abpipettierung des Flüssigkeitsüberstandes an. Nun folgte die 30 minütige Inkubation mit einem Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörper, wiederum auf Eis und in einem dunklen Behälter. Durch die anschließende Waschprozedur wurden die Zellen von überschüssigen Reagenzien gereinigt. Die Durchflußzytometrie und FACS sollte möglichst zügig nach Präparation der Zellen durchgeführt werden. Bis dahin verblieben die Zellsuspensionen im dunklen Behälter auf Eis.

Um eine größtmögliche Spezifität und notwendige Sensitivität der Antikörperbindung zu erreichen, wurden Titrierungsprotokolle der Primär- und Sekundärantikörper durchgeführt und die optimalen Konzentrationen bestimmt. Bei zu hoher Konzentration eines Antikörpers stellte sich ein hoher Grad an unspezifischen Bindungen dar. Bei zu niedriger Konzentration war die Anzahl der positiven Zellen sehr gering und nicht aussagekräftig.

	V o l u m e n ( µ l )				
<b>Primärantikörper</b>	Oct4	GATA-4	p63	HNF4α	Tg
	20	20	10	15	40
<b>Sekundärantikörper</b>	Fitc	PE	APC		
	20	20	30		

**Tabelle 2.3:** durch Titration ermitteltes Optimalvolumen der Primärantikörper und Fluorochrome bei einer Zellzahlkonzentration von  $1 \times 10^6$ / ml.

### 2.10.3 Präparierung der Zellen vor FACS

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte nach dem Protokoll der Durchflußzytometrie. Zur Vorbereitung der FACS Methode wurden die Proben abschließend in speziellen Filtern (Pre- Separation Filter, Miltenyi Biotec) mit einer Porengröße von 30 µm von großen Partikeln und Unreinheiten gereinigt.

### 2.10.4 Methoden zur Qualitätskontrolle der Durchflußzytometrie und FACS

Zur Detektion von DNA Fragmenten und Zelltrümmern wurden die Proben mit 2 µl Propidium Jodid (0,1 µg/ml) versetzt. Außerdem wurde eine Nativprobe (ohne Primär- und Sekundärantikörper) mit 2 µl PI vorbereitet. Dies ermöglichte im ersten Schritt der Durchflußzytometrie avitale Zellfragmente, die einen hohen Grad unspezifischer Bindung aufweisen, aus der weiteren Analyse auszuschließen und die Spezifität des Ergebnisses zu erhöhen. Bei der Verwendung eines Permeabilitätspuffers wurde auf den Einsatz von Propidium Jodid verzichtet.

Zellen besitzen unselektive Oberflächenrezeptoren (Fc Rezeptoren), die die verwendeten Antikörper binden können und damit die Spezifität der Bindung verringern. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Primärantikörpern (zum Beispiel normal goat IgG) inkubiert. Im zweiten Schritt folgte die Bindung des Fluorochroms. Am Durchflußzytometer wurde nun die Zahl der positiven Zellen detektiert. Viele positive Zellen sprachen für ein unspezifisches Bindungsverhalten. Vor der Durchführung dieses Protokolls wurden 2 Gruppen gebildet. Einer Zellgruppe wurde Beriglobin zur Blockierung unspezifischer Rezeptoren zugesetzt. Mit und ohne Beriglobinzugabe zeigten die primären Schilddrüsenzellen kaum unspezifisches Bindungsverhalten. In der Grafik stellten sich nur wenige positive Zellen dar. Somit konnte auf die Inkubation der Zellen mit Beriglobin zur Blockierung der Fc Rezeptoren verzichtet werden.

Gewebezellen weisen ein hohen Grad an Autofluoreszenz auf, der durch die Trypsinierung zusätzlich verstärkt wird. Zur Reduktion der Autofluoreszenz wurden die Zellen nach Trypsinierung für 30 min mit fötalem Kälberserum inkubiert. Außerdem wurde die Trypsinkonzentration und Inkubationszeit verringert, um die Zellmembran zu stabilisieren. Ein anderer Versuch bestand in der Verwendung von 5ml EDTA (0,2 g/dl) zur Zelllösung, anstatt Trypsin.

### 2.10.5 Auswertung und Interpretation der Durchflußzytometrie und FACS

Zur Auswertung wurde das Cellquest Programm von Becton-Dickinson Biosciences verwendet. Nachdem für die jeweiligen Fluorochrome die optimalen Einstellungen (Kompensation, Verstärkung) analysiert wurden, erfolgte bei jedem weiteren Experiment die gleiche Einstellung, um vergleichbare Daten zu erheben.

Eine Eigenschaft der Zelle, die in der Durchflußzytometrie gemessen wurde, ist das Streulicht, das durch das Auftreffen der Zelle auf einen UV Laserstrahl (488 Laser) erzeugt wird. Das Vorwärtstreulicht hing vor allem von der Größe der Zelle ab, das Seitwärtstreulicht ergab sich durch die Zellgranularität. Zur Anschaulichkeit der Meßergebnisse dienten Diagramme (dot plots). Dabei wurde auf der x- Achse das Vorwärtstreulicht und auf der y-Achse das Seitwärtstreulicht abgebildet, jeder dargestellte Punkt im Diagramm entsprach einer gemessenen

Zelle. Dadurch war eine erste Aussage über die physikalische Heterogenität oder Homogenität der untersuchten Zellpopulation möglich.

Im zweiten Diagramm wurden die vitalen Zellen von DNA Fragmenten durch Färbung mit Propidium Jodid grafisch getrennt und von der weiteren Analyse durch das sogenannte Gaten ausgeschlossen. Dabei definierte man eine bestimmte Gruppe von Zellen (durch Umkreisen), und nutzte nur diese in einem nächsten Diagramm zur weiteren Analyse.

Im dritten Diagramm konnten Zellen aufgrund des unterschiedlichen Emissionsmaximums und Streuverhaltens der gekoppelten Fluorochrome unterschieden werden. Einfach- und Mehrfachfärbungen waren möglich. Dabei war wichtig, Fluorochrome mit möglichst unterschiedlichen Emissionsmaxima zu kombinieren.

Um die analysierten Zellen zu sortieren und in Falcon Röhrchen aufzufangen, wurden entsprechende Gates gelegt. Jede so definierte Zellpopulation konnte auf diese Weise physisch getrennt werden.

<b>Fluorochrom</b>	<b>Emissionsmaximum</b>
PE	580 nm
Fitc	520 nm
APC	660 nm
PI	350 nm

**Tabelle 2.4 :** Fluorochrome und ihre Emissionsmaxima

### 2.11 Isolation der Side Population

Eine alternative Methode zur Isolation adulter Stammzellen wurde von Goodell et al 1996 publiziert (117). Das Protokoll für den Vitalfarbstoff Hoechst 33342 wurde zur Isolierung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark der Maus entworfen.

Konfluente Primärzellkulturen wurden mit Trypsin in Suspension genommen, zentrifugiert (1200 rpm, 5 min) und in 37°C warmer DMEM Lösung in einem Falcon Röhrchen resuspendiert. Die optimale Zelldichte lag bei  $1 \times 10^6$ /ml. Hoechst 33342 Farbstoff wurde in einer Konzentration von 5 µg/ml hinzugegeben und gut mit der Zellsuspension vermischt. Höher titrierte Konzentrationen des Hoechst Farbstoffs (6,7,8 µg/ml) führten zu einem Verlust an lebensfähigen Zellen und Veränderung der Side Population (127). Es folgte anschließend die 120 minütige Inkubation in einem 37°C warmen Wasserbad. Die Qualität des Färbeverhalten der Zellen hing in hohem Maß von einer gleichbleibenden Temperatur im Wasserbad ab. Während der Inkubationszeit sollten die Röhrchen häufiger gut geschüttelt werden. Nach 120 min wurde

die Lösung zentrifugiert (1200 rpm, 5 min) und die Zellen in 4°C kalter HBSS Lösung resuspendiert. Die dauerhafte Abkühlung der gefärbten Zellen auf 4°C war wichtig, um weitere Farbeffekte zu verhindern. Zur Spezifizierung der Eigenschaften der Side Population konnte eine Zweitfärbung mit spezifischen Antikörpern (Oct4, ABCG2) erfolgen. Eine Färbung der Zellen mit Propidium Jodid (2 µg/ml) war zur Diskriminierung toter Zellfragmente notwendig.

Anschließend wurden die gefärbten und ungefärbten Zellen in der Durchflußzytometrie identifiziert. Die Durchflußzytometrie fand an einem FACS Calibur Durchflußzytometer im Deutschen Rheumaforschungszentrum statt. Mit einem 350 nm Argonlaser wurden die Zellen durchleuchtet. Es existierten 2 unterschiedliche Emmissionsmaxima: Hoechst blue bei 450 nm (Standard) und Hoechst red bei 670 nm. Das Fluoreszenzverhalten wurde mit einem 450/ 20 BP Filter (Hoechst Blue) und einem 675 EFLP optischen Filter (Hoechst Red) gemessen. Ein zweiter Argonlaser mit 488 nm regte die Fluorochrom gekoppelten Antikörper (zum Beispiel Oct4-Fitc) an.

Zur Datenanalyse wurde das Cellquest Software Programm (Becton-Dickinson) verwendet. Hoechst Blue wurde auf der vertikalen Achse, Hoechst Red wurde auf der horizontalen Achse dargestellt. Die Mehrzahl der Zellen war für beide Emissionsmaxima positiv. Eine kleine Subpopulation, die Side Population, zeigte kein Färbeverhalten. Mittels FACS konnten diese Zellen isoliert und in sterilen Falcon Röhrchen, gefüllt mit HBSS und 10% FKS, aufgefangen werden (129).



### 2.12 Materialien

Die Mehrzahl der aufgeführten Methoden wurden mit sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt. Plastikmaterialien (zum Beispiel Pipetten) wurden in einem Autoklaven mit gesättigtem und gespanntem Wasserdampf bei einer Temperatur von 121°C über 2 Stunden sterilisiert. Wiederverwendbare Metallinstrumente, wie Pinzetten und Siebe wurden bis 200°C in einem speziellen Backofen erhitzt und anschließend unter sterilen Bedingungen aufbewahrt.

#### 2.12.1 Allgemeine Lösungen

PBS: 120 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$

TBE: 10 mM Tris, pH:7,6  
150 mM NaCl

TBS: 109 g/l Tris  
55,6 g/l Borsäure  
9,3 g/l EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

#### 2.12.2 Zellkulturbedarf

Coon`s modified Ham F12	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
DMEM	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
RPMI 1640 Medium	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Hank`s balanced salt solution (HbSS)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

Alle Zellkulturmedien wurden unter der Sterilbank vorbereitet. Zur Vermeidung einer Kontamination mit Mikroorganismen, wurden sämtliche Lösungen durch einen keimdichten Filter (Porengröße 0,2 µm) gegossen.

MEM nicht essentielle Aminosäuren (100x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Apo- Transferrin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glycyl-Histidyl-Lysin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Hydrocortison	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Somatostatin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
TSH	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Insulin (Insuman rapid)	Aventis Pharma (Frankfurt, Deutschland)

Penicillin/ Streptomycin	Roche (Mannheim, Deutschland)
Amphotericin B	Bristol-Meyers Squibb (Deutschland)
Dispase II	Roche (Mannheim, Deutschland)
Kollagenase A	Roche (Mannheim, Deutschland)
Trypsin	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Xanthosine (x-0750)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

### **2.12.3 Enzyme und Chemikalien zur mRNA Gewinnung, Reversen Transkription und Polymerase- Kettenreaktion**

Reverse Transkriptase, 10X Reaction Buffer	PromegaCorp (Mannheim, Deutschland)
RNA Guard RNase Inhibitor	Amersham Biosciences (Aylesbury, GB)
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen Inc (Karlsruhe, Deutschland)
5X PCR Buffer	Invitrogen Inc (Karlsruhe, Deutschland)
MgSO <sub>4</sub>	Invitrogen Inc (Karlsruhe, Deutschland)
Oligo dT Primer	Roche (Mannheim, Deutschland)
Primer	Invitrogen Inc (Karlsruhe, Deutschland)
dNTP Mononukleotide	Roche (Mannheim, Deutschland)
Restriktionsendonukleasen	Roche (Mannheim, Deutschland)
50 bp DNA ladder	Invitrogen Inc (Karlsruhe, Deutschland)
TrackIt Cyan/ Orange gel loading buffer	Invitrogen Inc (Karlsruhe, Deutschland)
Agarosepulver	Gibco BRL
B Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidium bromid 10mg/ ml	Merck (Darmstadt)
RNeasy Mini-Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNeasy Micro-Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
One Step RT PCR-Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qia Shredder	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

### **2.12.4 Materialien für die Immunzytochemie**

Fast Red Naphthol Tabletten	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Extravidin-Biotin Komplex	Sigma Chemicals (St. Luis, MO)
Primärantikörper (s. 2.12.5)	Santa Cruz Biotechnology

### Sekundärantikörper (s.2.12.5)

Donkey anti-mouse	DAKO A/S Dänemark (E0433)
Donkey anti-rabbit	DAKO A/S Dänemark (E353)
Fluorochrome	Santa Cruz Biotechnology
Kaisers Gelatine	Merck (Darmstadt)

### 2.12.5 Materialien für die Durchflußzytometrie und FACS

Sämtliche Primärantikörper und Fluorochrome wurden von Santa Cruz Biotechnology bezogen.

Primärantikörper: Oct- 4 rabbit polyclonal IgG (sc-9081); Oct- 4 mouse monoclonal IgG (sc-5279); HNF- 4 rabbit polyclonal IgG (sc-8987); HNF-4 goat polyclonal IgG (sc-6556); Gata- 4 rabbit polyclonal IgG (sc-9053); p63 rabbit polyclonal IgG (sc-8343); Tg goat polyclonal IgG (sc-7835); ABCG2 IgG (sc-18841); p-erk mouse monoclonal IgG (sc-7383); normal goat IgG (sc-3887); normal rabbit IgG (sc-3888)

Sekundärantikörper, Fluorochrom gekoppelt: donkey anti rabbit- FITC (sc-2090); goat anti mouse IgG- FITC (sc-2010); donkey anti goat IgG- FITC (sc-2024); donkey anti rabbit IgG- PE (sc- 3745); donkey anti goat IgG- FITC (sc-2024)

Hoechst 33342	Sigma Chemicals (St. Luis, MO)
Propidium Jodid (0,1 mg/ ml)	Santa Cruz Biotechnology
FCM Wash buffer	Santa Cruz Biotechnology
FCM Permeabilization buffer	Santa Cruz Biotechnology

### 2.12.6 Plastikmaterialien

100x20 mm Kulturschalen	Sarstedt
150x20 mm Kulturschalen	Sarstedt
Zentrifugationsröhrchen (1,5; 15 und 50ml)	Sarstedt
Tips (1; 10; 100µl)	Sarstedt
Pipetten (5; 100, 1000µl)	Sarstedt
Polystyren Zellkulturkammern	Nunc (Wiesbaden, Deutschland)
Filtersystem, 500 ml/ 22 µm	Sigma Aldrich (Steinheim,Dtl)
Filtersystem 30/ 0,8 µm	Schleicher & Schuell
Falcon Tubes (5ml)	Becton Dickinson Biosciences, USA
Miltenyi FACS Pre- Separation Filter	Miltenyi Biotech

### 2.12.7 Geräte

Zellkulturschrank	Heraeus Instruments
Sterilbank	Heraeus,LaminairHB2448
Dampfsterilisator Autoclav	H&P varioclav
Backofen	Memmert
Wasserbad	Kötermann Labortechnik
Schüttelinkubator	Infors HT
Homogenisator	EppendorfThermomixer5436
Zentrifugen	Hettich Mikro 200R
	Hettich Rotina 46 R
	BeckmannMicrofugeE
Spectralphotometer	Pharmacia, Ultrospec II
Spannungsgeräte	GibcoBRL,EPS-ST606
	Pharmacia,ECPS3000/150
	Consort, Microcomputer
	electrophoresis power supply
Thermoblock	Biometra, Trio-Thermoblock
UV Illuminator	Bachofer Laboratoriumsgerät
UV Kamera	Polaroid MP4 Kamera
	Polaroid 545 4x5 Film
Phasenkontrastmikroskop	Nikon, TMS
Halogen Mikroskop	Opton Standard 16
Halogen Mikroskop Kamera	OptonMC6, Karl Zeiss Linse
Digitalkamera	Sony DSC-W7; Cyper Shot
Scanner	Canon Scan 5000
FACS Calibur Durchflußzytometer	Becton-Dickinson

### 2.12.8 Software

Image J	Densitometrie
SPSS Vers. 11.5	Statistik
Adope Photoshop Vers. 6.0	Photo-und Grafikbearbeitung
Biology Workbench Vers. 3.2	Analyse der DNA Sequenz
	Kalkulation der Restriktion
Cellquest	Analyse der Durchflußzytometrie