

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. MATERIAL

#### 2.1.1. Eukaryotische Zellen und Lösungen für die Zellkultur

##### Capan-1

Die Zelllinie Capan-1 ist eine adhären wachsende Pankreaskarzinom-Zelllinie, die aus der Lebermetastase eines humanen duktales Adenokarzinoms von einem 40 Jahre alten Kaukasier stammt. Sie zeigt epitheliale Morphologie und wirkt tumorigen im Tiermodell. Hier wurde die Zelllinie vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg bezogen.

##### DanG

Die Zelllinie DanG ist eine adhären wachsende Pankreaskarzinom-Zelllinie, die aus einem humanen duktales Adenokarzinom stammt. Sie wurde vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg bezogen.

##### SW480

Die Zelllinie SW480 ist eine adhären wachsende Kolonkarzinom-Zelllinie, die aus dem primären Adenokarzinom eines 50 Jahre alten Kaukasiers stammt. Sie zeigt epitheliale Morphologie und wirkt tumorigen im Tiermodell. Die Zelllinie wurde von der „American Type Culture Collection“ bezogen.

##### Lösungen für die Zellkultur

FBS und dialysiertes FBS (Biochrom KG)

FBS Defined 40nm filtered (HyClone Laboratories Inc.) für Koloniebildungstest

L-Glutamin 100 x, 200 mM (Gibco / Invitrogen)

PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  1 x (Gibco BRL, PAA Laboratories)

Penicillin/Streptomycin 10000 U bzw. 10 mg / ml (Biochrom)

Trypsin-EDTA in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  0,05% / 0,02% w/v (Biochrom KG)

Iscove's Modified Dulbecco's Medium mit Glutamin 1x, 2x (Gibco BRL)

D-MEM ("high glucose") ohne Methionin, Cystein, L-Glutamin, Natriumpyruvat für Pulse-Chase Experimente (Gibco / Invitrogen), versetzt mit 2 mM Glutamin

Nährmedium: RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco / Invitrogen)

D-MEM mit L-Glutamin und 4,5 g/l Glucose (Gibco / Invitrogen)

Vollmedium: Capan-1: RPMI / 15% FBS

DanG: RPMI / 10% FBS

SW480: D-MEM / 10% FBS

jeweils mit 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin

#### 2.1.2. Prokaryotische Zellen und ihr Nährmedium

##### Bakterienstamm

Chemisch kompetente E. coli TOP10 (Invitrogen):

$F^-$  mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 deoR araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

Dieser Stamm eignet sich für Klonierungen mit Farbselektion der Klone, die das gewünschte Insert enthalten.

Nährmedium für Bakterien

LB-(Luria-Bertani-)Medium: Ad 1 Liter:  
 Trypton-Wasser (Sigma) 15 g  
 Bacto-Hefeextrakt (Difco) 5 g  
 NaCl (Merck) 10 g  
 Der pH-Wert wird mit 5 N NaOH auf 7,0 eingestellt.

**2.1.3. Antibiotika**Antibiotikum

Ampicillin (Grünenthal)  
 Geneticin G418-Sulfat (GibcoBRL) 700UG/MG  
 Hygromycin B (Invitrogen)  
 Penicillin/Streptomycin (Biochrom KG)

Stammlösung

50 mg/ml in sterilem Wasser  
 (jeweils in Medium sterilfiltriert)  
 50 mg/ml in PBS  
 10000 U / 10000 µg/ml

**2.1.4. Antikörper**Primäre Antikörper mit Human-Reaktivität

Antigen	Spezies / Klon	Konzentration	Firma
Akt	Kaninchen polyklonal	k.A.	New England Biolabs
Phospho-Akt	Kaninchen polyklonal, (Ser473)	k.A.	New England Biolabs
Erk1/2	Kaninchen polyklonal	k.A.	Cell Signaling
Phospho-Erk1/2	Kanin. polykl., (Thr202/Tyr204)	k.A.	Cell Signaling
H-Ras	Maus monoklonal (F235)	200 µg/ml	Santa Cruz
ILK	Kaninchen polyklonal	1 mg/ml	UBI / Biomol
K-Ras	Maus monoklonal (F234)	200 µg/ml	Santa Cruz
N-Ras	Maus monoklonal (F155-227)	100 µg/ml	Oncogene
p16 INK4a	Maus monoklonal (DCS-50.1/A7)	200 µg/ml	NeoMarkers
Pan-Ras	Maus monoklonal (RAS 10)	100 µg/ml	Oncogene
Rb	Maus monoklonal (G3-245)	500 µg/ml	PharMingen

Sekundäre Antikörper

GAM-POD: Ziege Anti-Maus IgG, Peroxidase-konjugiert, 800 µg/ml, Dianova  
 GAR-POD: Ziege Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-konjugiert, 800 µg/ml, Dianova  
 Anti-Rabbit-HRP: Anti-Kaninchen IgG, Meerrettichperoxidase-konjugiert, Cell Signaling

**2.1.5. Enzyme und Enzypuffer**Enzyme

BamH I (Restriktionsenzym) 10 U/µl	GibcoBRL
DNase I (RNase-frei) 10 U/µl	Roche
EcoR I (Restriktionsenzym) 10 U/µl	GibcoBRL
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	GibcoBRL
Not I (Restriktionsenzym) 10 U/µl	GibcoBRL
Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	Stratagene
Proteinase K (19,6 mg/ml)	Roche
RNase A (100 mg/ml)	Qiagen

---

RNase-Inhibitor (40 U/μl)	Roche
Spe I (Restriktionsenzym) 10 U/μl	GibcoBRL
Taq-Polymerase (1 U/μl)	Roche
SuperScript II RNase H Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Gibco

Enzympuffer

5 x First-Strand Buffer für Reverse Transkriptase	GibcoBRL
5 x Ligasepuffer	GibcoBRL
10 x PCR-Puffer für Pfu-Polymerase	Stratagene
10 x PCR-Puffer mit MgCl <sub>2</sub> für Taq-Polymerase	Roche
Restriktionspuffer React 3	GibcoBRL
Restriktionspuffer React 4	GibcoBRL

**2.1.6. Rekombinante Proteine**

GST: Glutathion-S-Transferase 0,7 mg Protein / ml (Sigma)  
 GST-p16: humanes GST-p16<sup>INK4a</sup> 10 μg / 200 μl (PharMingen)

**2.1.7. Größenstandards**DNA-Marker

Ready-Load 100 bp DNA Ladder (GibcoBRL):

Neben einem Fragment von 2072 bp reichen die Fragmentgrößen von 1500 bp bis 100 bp in Vielfachen von 100 bp.

Proteinmarker

See Blue Pre-Stained Standard (Invitrogen):

Molekulargewichtsgrößen in kDa: 250, 98, 64, 50, 36, 30, 16, 6, 4

**2.1.8. Kits**

Effectene Transfection Kit	Qiagen
PCR Purification Kit	Qiagen
Plasmid MAXI Kit für Plasmidextraktion	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit für Plasmidextraktion	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Ras Activation Assay Kit	UBI
SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit	Invitrogen
TOPO TA Cloning Kit Version M	Invitrogen

**2.1.9. Mono- und Oligonukleotide**Mononukleotide

dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP; je 100 mM, Roche

Hefe-tRNA (25 mg/ml) (E. coli tRNA Carrier 10 mg/ml), Merck

K-ras Oligonukleotide (TIB Molbiol)

Sequenzen: Kita et al., 1999

<u>Name</u>	<u>Funktion</u>	<u>Sequenz des 17-mers</u>
AS-GTT	K-rasV12 Antisense	5'- CTA CGC CAA CAG CTC CA -3'
S-GTT	K-rasV12 Sense (Kontrolle)	5'- TGG AGC TGT TGG CGT AG -3'
RANDOM	Zufallssequenz (Kontrolle)	5'- GAT GCG GTT GTC CAC GA -3'

Primer für reverse TranskriptionOligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer 0,5 µg/µl (GibcoBRL)Primer für GAPDH

<u>Name</u>		<u>Sequenz des 20-mers</u>
gapdh forw	(Clontech)	5'- ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC -3'
gapdh rev	(Clontech)	5'- TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA -3'

Primer für K-ras (TIB Molbiol)

<u>Name</u>	<u>Annealing-Temperatur</u> (Vorschlag von TIB Molbiol)	<u>Sequenz des 17-mers</u>
krasleft	59,7°C	5'- GAG AGA GGC CTG CTG AA -3'
krasright	58,3°C	5'- TAC TGG CAC TTC GAG GA -3'

Primer mit Schnittstellen für K-ras (TIB Molbiol)

<u>Name</u>	<u>Annealing-Temperatur</u> (Vorschlag von TIB Molbiol)	<u>Sequenz</u>
bamleft	72,1°C	5'- CGG GAT CCG AGA GAG GCC TGC TGA A -3' (25-mer)
noright	72,1°C	5'- AAG CGG CCG CTA CTG GCA CTT CGA GGA -3' (27-mer)

**2.1.10. Vektoren und Plasmide**

pIRESHyg	(5,7 kb)	Clontech
pRC <sub>CMV</sub>	(5,5 kb)	Invitrogen
pRC <sub>CMV</sub> /p16	(6,03 kb)	mit humaner p16 <sup>INK4a</sup> cDNA, kloniert von T. Plath, Arbeitsgruppe Rosewicz

**2.1.11. Chemikalien und Radiochemikalien**

Acryl-/Bisacrylamid 30%/0,8% (37,5:1)	Roth
Agarose	GibcoBRL
Ammoniumpersulfat	Merck
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Hefeextrakt	Difco
Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bradford)	Bio-Rad
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
Butanol	Merck
Chloroform	Merck

Dimethylsulfoxid	Merck
Dithiothreitol	GibcoBRL, Sigma
ECL-Reagenzien für Western Blot	Renaissance NEN
EDTA (Titriplex)	Merck, Sigma
Essigsäure 100%	Merck
Ethanol absolut	Merck
FTS	Calbiochem
Gel Drying Solution	Bio-Rad
Glutathion-Agarose	ICN
Glycerin 87%	Merck, Sigma
Glycin	Serva
Harnstoff	Merck
Isopropanol	Merck
L-Cystein	ICN
L-Methionin	ICN
LY294002	Calbiochem
Magermilchpulver	Bio-Rad
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Merck, Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Natriumhydroxid 5 M	Merck
Nonidet P-40 10%	Boehringer, Sigma
PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	GibcoBRL, PAA Laboratories
PD98059	Calbiochem
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
RNazol B	WAK-Chemie Medical GmbH
Salzsäure 2 M	Merck
Sucrose	Merck
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan	Merck
Tween 20	Merck
Wasser steril, doppelt destilliert	Braun
Z-IETD-FMK	Calbiochem
$\alpha$ -P32 UTP	Amersham Biosciences
EasyTag EXPRE <sup>35</sup> S <sup>35</sup> S Protein Labeling Mix	NEN

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von der Firma Sigma bezogen.

### 2.1.12. Sonstige Materialien

Deckgläser 20 x 26 mm <sup>2</sup>	Superior
Combitips plus 5 ml	Eppendorf
Einmalküvetten	Sarstedt
Einmalskalpelle	Feather
Einmalspritze 20 ml	Braun
Farbnegativfilm Optima II Prestige, 100 ASA, 36 Exp.	AGFA
Filmkassette	Kodak
Filter 0,22 $\mu$ m	Millipore
Filtertips 10, 100 und 1000 $\mu$ l	Greiner
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell

Gewebekulturflaschen 50, 250 und 750 ml	Falcon
Gewebekulturplatten 6 wells, 24 wells	Falcon
Gewebekulturschalen (10 cm Durchmesser)	Falcon
Gewebekulturschalen mit Raster (3,5 cm Durchmesser)	Nunc
Gewebekulturschalen mit Raster (13,5 cm Durchmesser)	Falcon
Hämazytometer	Neubauer
Insulinspritze mit 0,45x12 mm Kanüle	Terumo
Kryoröhrchen (2 ml)	Nalgene
Microcons YM-10	Millipore
Mikroliter-Spritze (50 µl)	Hamilton
Nitrozellulosemembran Hybond ECL	Amersham Pharmacia biotech
Nylonmembran Nytran	Schleicher & Schuell
Parafilm	Menasha
PCR-Softtubes 0,2 ml	Biozym
Petrischalen (10 cm Durchmesser)	Greiner
Polystyrol-Röhrchen für FACS	Falcon
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Röhrchen 12 ml	Greiner
Röhrchen 15 ml	Falcon
Röhrchen 50 ml	Falcon
Röntgenfilme Biomax ML und MR	Kodak
Transparentfolie	Saran, Tartan
Zahnstocher	Fackelmann
Zellschaber	Costar

### 2.1.13. Geräte

Autoklav Jumo Comp LS	Webeco
Brutschrank für Bakterienplatten	Heraeus
Brutschrank für Gewebezellen	Forma Scientific, Heraeus
Brutschrank mit Schüttler SM-30	Edmund Bühler
Elektrophorese- und Blotapparaturen für Minigele	Bio-Rad
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Bio-Rad
FACSCalibur + Computer mit Cell Quest Software	Becton Dickinson + Macintosh
Feinwaage max. 150 g	Sartorius
Filmentwicklungsgerät 45compact	Protec
Geltrockner	Bio-Rad
Grobwaage max. 1200 g	Kern
Heizblock	Eppendorf
Heizofen	Heraeus
Hybridisierungssofen	Biometra
Kamerasystem und UV-/Weißlichtkasten	Biometra
Lichtkasten mit UV (312 nm)	Bachofer
Magnetrührer	Variomag
Mikroskop Wilovert	Hund, Wetzlar
Mikroskop mit Kameraaufsatz	Zeiss, Nikon
Mikrowelle	Siemens
Multipette	Eppendorf

---

Photometer DU 640	Beckman
Pipettierhilfen	Brand, Hirschmann, Integra Biosciences
Schüttler	Heidolph, Junke & Kunkel
Slot-Blot Apparatur	Schleicher & Schuell
Spannungsgeräte	Bio-Rad, Consort
Sterile Werkbank	Heraeus
Thermocycler RoboCycler Gradient 96	Stratagene
Thermomixer compact	Eppendorf
Thermostat Dri-Block	Techne
Tischzentrifugen	Beckman, Eppendorf
Trockenschrank	Memmert
UV-Crosslinker	Stratagene
Vortex Reax Control	Heidolph
Wasserbäder	Julabo
Zentrifuge Allegra 64R	Beckman

---

## 2.2. METHODEN

### 2.2.1. Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Durchlicht-Fotografie

Eukaryotische Zellen werden im Durchlichtmikroskop (Zeiss) mit einer aufgesetzten automatischen Kamera mit Drahtauslöser (Nikon) bei maximaler Lichtstärke fotografiert.

#### 2.2.1.2. Anoikis-Test

Im Versuch wird der Zustand der von ihrer Matrix abgelösten eukaryotischen Zellen dadurch erhalten, dass die Kulturplatten mit einem unpolaren Agens, PolyHEMA, beschichtet werden, an dem die Zellen nicht adhären können. Adhärenz Zellen werden normalerweise auf aufgerauter, negativ geladener Plastikware kultiviert.

##### Beschichtung der Platten:

10 g Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) (PolyHEMA) werden in 1 l absolutem Ethanol bei 37°C gelöst und bei 37°C im Dunkeln gelagert. Die Zellkulturplatten werden wie folgt beschichtet:

6-well-Platte: 2 ml pro well

24-well-Platte: 400 µl pro well

Die Lösung dampft bei 37°C über mindestens drei Tage bis zur Trockne ab.

Zur Bestimmung der Ras-Aktivität werden  $7 \times 10^6$  Zellen gleichmäßig auf zwei Zellkultur-schalen (10 cm Durchmesser) und zwei PolyHEMA-beschichtete 6-wells verteilt, für die FACS-Analyse werden je  $2 \times 10^5$  Zellen in einem 6-well bzw. einem PolyHEMA-beschichteten 24-well ausgesät und 20-24 h kultiviert.

#### 2.2.1.3. FACS-Analyse

Das Prinzip der Durchflusszytometrie wurde erstmals 1953 von Crosland-Taylor beschrieben; eine Beschreibung des FACS (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung) veröffentlichte Shapiro 1988. Zellen mit fluoreszenzmarkierten Molekülen werden als feine Tröpfchen in einer Fließkammer an einem Laserstrahl vorbeigeleitet, durch den die Größe, Granularität und Fluoreszenzart jeder einzelnen Zelle registriert werden kann. Durch Aufladung der Tröpfchen werden die Zellen nach ihren Parametern sortiert (Roitt et al., Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 1995). Die Messung wird in Zytogrammen, z.B. als Dot Plot mit den Parametern der Zellgröße und –granularität oder als Histogramm mit der Zellzahl, bezogen auf die Fluoreszenzdichte, angegeben. Verschiedene Fluoreszenzdichten werden in unterschiedlichen Kanälen des FACS registriert. Hier wird die DNA eukaryotischer Zellen durch Einlagerung von Propidiumiodid markiert, um Zellzyklusanalysen erstellen und die Apoptoserate einer Zellpopulation bestimmen zu können. Der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen liegt noch unter dem ruhender Zellen (G0-Phase) bzw. von Zellen in der G1-Phase.

##### FACS-Färbung

##### Färbelösung:

50 µl Propidiumiodidlösung (1mg/ml)



3 µl RNase A (100mg/ml)  
pro 1 ml PBS

Ca.  $2 \times 10^5$  Zellen werden trypsiniert und / (oder schon in Suspension) in ein 15ml-Röhrchen überführt und 5 min bei 350 g (1300 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen, das Pellet in 900 µl PBS resuspendiert und zur Vereinzelung der Zellen zehnmal durch eine Multipette mit 10µl-Spitze gezogen. Beim Vortexen der Zellen werden tropfenweise dreimal 700 µl absolutes Ethanol zugegeben, bevor die Proben mindestens über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden. Die Zellen werden zentrifugiert (wie oben), mit 1 ml PBS gewaschen und in 500 µl Färbelösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur werden je 10000 Zellen mit Hilfe der CellQuest Software im FACSCalibur-Gerät (Becton Dickinson) analysiert. Zur Auswertung werden Histogramme und ihre statistischen Daten verwendet. Die Anoikisrate wird aus der Differenz der apoptotischen Fraktionen suspendierter zu den korrelierenden adhärennten Kulturen errechnet.

#### 2.2.1.4. Transfektion von Oligonukleotiden

Um Oligodesoxynukleotide (Oligos) schnell und in großer Zahl in eukaryotische Zellen zu transferieren, empfiehlt sich die Transfektion. Hier wird die DNA mittels eines Enhancers (Qiagen) kondensiert und in Micellen eines nicht-liposomalen Lipids (Effectene, Qiagen) in die Zellen transferiert. So soll eine hohe Transfektionseffizienz erreicht werden bei gleichzeitig geringer Toxizität, da die Transfektion im normalen, serumhaltigen Medium durchgeführt werden kann.

##### Effectene Transfection Kit (Qiagen):

Effectene Transfection Reagent (1mg/ml)  
Enhancer (1mg/ml)  
Buffer EC

##### Oligodesoxynukleotide (TIBMolbiol):

AS-GTT (K-rasV12 Antisense)  
S-GTT (K-rasV12 Sense)  
RANDOM

##### Sequenz der 17mere:

5'- CTA CGC CAA CAG CTC CA -3'  
5'- TGG AGC TGT TGG CGT AG -3'  
5'- GAT GCG GTT GTC CAC GA -3'

Die Oligos sind spezifisch für die Punktmutation in K-ras von GGT (Glycin) zu GTT (Valin) in Kodon 12, die auch in Capan-1 Zellen auf beiden Allelen zu finden ist, und wurden bereits erfolgreich in anderen Pankreaskarzinom-Zelllinien getestet (Kita et al., 1999). Sie werden als Stammlösungen von 200 µM in sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Capan-1 Zellen werden in drei wells zu je  $2 \times 10^5$  Zellen (für K-rasV12 Antisense-Oligos) oder in je einem well mit  $(1-2) \times 10^5$  Zellen (für Random- und Sense-Oligos) in 6-well-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Vor der Transfektion wird das alte Medium vollständig abgesaugt und pro well durch 700 µl Capan-1 Medium (RPMI / 15% FBS / Penicillin, Streptomycin) ersetzt. Für eine Endkonzentration von 5 µM (in 1 ml) werden 25 µl Oligo-Stammlösung mit 75 µl Buffer EC auf 100 µl aufgefüllt, mit 9,6 µl Enhancer versetzt und eine Sekunde gevortext. Nach 2-5 min Inkubation bei Raumtemperatur werden 12 µl Effectene zugegeben und 10 Sekunden gevortext. Die Mischung inkubiert 10 min bei Raumtemperatur, bevor 200 µl Medium (wie oben) zugegeben werden. Nach zweimaligem Durchziehen durch die Pipette wird der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gebracht. Die Zellen werden für 4 h kultiviert, danach wird das Medium gegen 1 ml neuen

---

Capan-1 Mediums / 5  $\mu$ M Oligo ausgetauscht, die Zellen werden weiterhin in einer feuchten Kammer im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Fünf Tage nach der Transfektion werden die Zellen einem Anoikis-Test für die FACS-Analyse unterzogen (siehe Anoikis-Test).

### 2.2.1.5. Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird Plasmid-DNA dauerhaft in eukaryotische Zellen eingebracht. Nach der Transfektion, hier mit dem Enhancer-Effectene-System von Qiagen (siehe oben, „Transfektion von Oligonukleotiden“), werden die Zellen mit einem Antibiotikum unter Selektionsdruck gesetzt, so dass nur Zellen, die Teile des Plasmids mit seinem Resistenzgen in ihr Genom integriert haben, überleben können. Diese werden vereinzelt, um Klone mit nur einer Population heranzuzüchten. Die Methode der stabilen Transfektion ist ein langwieriges Verfahren, bietet jedoch hier den Vorteil, neue Zelllinien hervorzubringen, die von verfahrensbedingten Apoptosevorgängen nicht mehr beeinflusst werden. Für den Transfer des gewünschten Konstrukts in Capan-1 oder Capan-1/p16 Zellen wird in diesem Experiment ein bicistronischer Vektor verwendet, in den das Genfragment zwischen Promoter und Resistenzgen eingebaut wird. So ist die Wahrscheinlichkeit, das gewünschte Protein zu exprimieren, bei allen selektierten Zellen sehr hoch.

Capan-1 oder Capan-1/p16 Zellen werden auf Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser) ausgesät und über Nacht kultiviert. Bei einer Konfluenz von 40-80% werden sie transfiziert: 5  $\mu$ l einer 1 $\mu$ g/ $\mu$ l Plasmid- oder Vektor-DNA-Lösung werden mit 295  $\mu$ l Buffer EC versetzt und mit 40  $\mu$ l Enhancer 1 s gevortext. Nach 2-5 min Inkubation bei Raumtemperatur werden 50  $\mu$ l Effectene zugegeben, 10 s gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen werden die Zellen mit PBS gewaschen und pro Schale 7 ml frisches Medium 0 (RPMI/15%FBS/Antibiotika ohne das Selektionsantibiotikum) zupipettiert. Zum Transfektionsansatz werden 3 ml Medium 0 gegeben, und nach zweimaligem Durchziehen durch die Pipette wird der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gebracht. Die Zellen werden für 24 h kultiviert, mit PBS gewaschen und weitere 24 h mit neuem Medium 0 kultiviert, bevor sie mit Medium + Selektionsantibiotikum in einer Verdünnung von 1:5 und 1:10 auf mehrere große Zellkulturschalen mit Raster (13,5 cm Durchmesser) bzw. zur Anzucht von Mischpopulationen auf Zellkulturflaschen passagiert werden. Capan-1 Zellklone werden mit 250  $\mu$ g/ml, doppelt transfizierte Capan-1/p16 mit 100  $\mu$ g/ml Hygromycin selektiert. Die Selektion mit Hygromycin ist nach ca. zwei Wochen beendet, wobei das Medium ein- bis zweimal pro Woche gewechselt wird. Die Mischpopulationen werden, wenn nötig, passagiert, während von den Schalen bei genügender Größe einzelne Klone mit einer 100  $\mu$ l Pipette vorsichtig abgeschabt, in wenig Medium aufgesaugt und in 24well-Platten überführt werden. Dazu werden die Klon-Schalen vorher mit PBS gewaschen, das abgesaugt wird. So sind die Klone gut sichtbar und vermischen sich nicht, dürfen aber dabei nicht trocknen. Die Zellhaufen werden viermal vorsichtig durch eine 1000  $\mu$ l Pipette gezogen und die 24well-Platten 5 min bei 350 g (1300 rpm) zentrifugiert, damit sich die Zellen leichter am Boden absetzen können. Nach der Aufzucht in 24well-Platten werden die Klone in Kulturflaschen steigender Größen kultiviert.

Die semi-stabile Transfektion des pRC<sub>CMV</sub>/p16-Plasmides in SW480 Zellen erfolgt analog in D-MEM / 10% FBS. Statt der Hygromycin-Selektion und der Anzucht einzelner Klone werden jedoch Mischpopulationen mit 1,4 mg/ml G418 (70% Aktivität) selektiert (Dauer der Selektion mit G418: ca. eine Woche) und nach 10 Tagen aufgearbeitet.

### 2.2.1.6. Koloniebildungstest

Adhärent wachsende eukaryotische Zellen haben in transformiertem Zustand zumeist die Fähigkeit, Kolonien in halbfestem Agar zu bilden. Da Transformation auch ein Charakteristikum von Tumorzellen ist, erlaubt der Koloniebildungstest eine Aussage über den Grad der Transformation von Tumorzelllinien.

#### Methylcellulose-Mix

In 500 ml kochendes, steriles destilliertes Wasser werden langsam 21g Methylcellulose eingerührt. Nach dem Abkühlen auf 37°C werden 500 ml eiskaltes Iscove's Medium (2x) eingerührt, die Lösung wird in 100 ml portioniert bei -20°C über Nacht eingefroren. Ein Aliquot wird bei 37°C aufgetaut und in 12 ml Röhren zu je 3,6 ml portioniert, die bei -20°C gelagert werden.

#### 3%iger Agar

3g Agar werden in 100 ml sterilem destilliertem Wasser aufgeköcht, in 12 ml Röhren zu je 3 ml portioniert und bei 4°C aufbewahrt.

#### 0,06%ige $\beta$ -Mercaptoethanol-Lösung

8,45 ml PBS werden mit 5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und sterilfiltriert. Die Lösung wird frisch angesetzt.

Für den Koloniebildungstest werden Methylcellulose-Aliquots und FBS (HyClone) bei 37°C warmgestellt. Die Zellen werden auf  $3 \times 10^4$  Zellen in 1 ml RPMI (ohne Zusätze) eingestellt. Folgender Ansatz wird unter sterilen Bedingungen schnell pipettiert:

3,6 ml	Methylcellulose-Mix
2,7 ml	FBS (HyClone)
60 $\mu$ l	$\beta$ -Mercaptoethanol-Lösung
770 $\mu$ l	Iscove's Medium (1x)
300 $\mu$ l	Zellsuspension

Die Röhren werden kräftig geschüttelt und umgeschwenkt. Die Agar-Aliquots (zwei für sieben Zelllinien) werden in der Mikrowelle kurz aufgeköcht und mit je 6 ml RPMI (ohne Zusätze) vermischt. Es werden 1,63 ml der Agarlösung pro Ansatz zugegeben und wieder kräftig geschüttelt. Die Röhren werden 20 min bei 37°C inkubiert. Währenddessen werden große Gewebekulturschalen mit je 7 kleinen Gewebekulturschalen (3,5 cm Durchmesser, davon 6 mit Raster) bestückt. Nach der Inkubation werden mit einer Insulinspritze je 3 Schalen mit jeweils 1 ml Zellsuspension befüllt; in die offene Schale ohne Raster werden 2 ml PBS gegeben, um Austrocknung zu verhindern. Die Ansätze werden 10-13 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bei ausreichender Größe werden die Kolonien in den Schalen bei 40facher Vergrößerung unter dem Mikroskop gezählt.

### 2.2.1.7. Tumorbildung in der Nacktmaus

Je  $5 \times 10^5$  eukaryotische Zellen werden in 30  $\mu$ l / Tier subkutan in die rechte hintere Flankenregion einer NMRI-nu/nu Maus inokuliert (Fa. Schering). Ab dem 7. Tag nach Inokulation werden gebildete Tumore ein- bis zweimal wöchentlich mit einer digitalen Messlehre vermessen. Bei ersten Anzeichen ulzerativer Prozesse am Tumor wird das entsprechende Tier schmerzfrei getötet, der Tumor wird konserviert.

### 2.2.1.8. Allgemeine Methoden der Zellkultur

#### Kultivierung

Eukaryotische Zellen werden bei 37°C in einem Brutschrank mit gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die verwendeten Zelllinien wachsen adhärent. Sie werden auf Platten oder Flaschen kultiviert, deren Boden durch eine physikalische Behandlung aufgeraut und negativ geladen wurde und so eine Anhaftung der Zellen möglich macht. Die Versorgung mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren wird durch das Vollmedium gegeben.

#### Passagieren

Um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten, werden konfluente Zellen mit PBS gewaschen und bei 37°C mit Trypsin-EDTA behandelt. Die Kulturgefäße werden geklopft, so dass sich alle Zellen ablösen können. Die Zellen werden in Medium aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Nach der Zentrifugation 5 min bei 350 g (1300 rpm) bei Raumtemperatur wird das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in Verdünnung wieder ausgesät.

#### Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Gesamt-Zellzahl wird ein 20x26 mm<sup>2</sup> Deckglas angehaucht und auf eine Neubauer-Zählkammer geschoben. 10-15 µl Zellsuspension werden in die Kammer pipettiert, wo sich die Zellen in Zählquadraten verteilen und unter dem Mikroskop gezählt werden. Die Zellzahl von 4x16 Quadraten multipliziert mit 2500 und der Verdünnung ergibt die Zellzahl/ml.

### 2.2.2. Nukleinsäuretechniken

#### 2.2.2.1. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Nukleinsäurelösungen haben ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm und können dadurch UV-spektrometrisch vermessen werden. Ihre Reinheit wird über den Quotienten aus den optischen Dichten bei 260 und 280 nm bestimmt, da störende Proteine bei beiden Wellenlängen, Nukleinsäuren jedoch nur bei 260 nm absorbieren. Für DNA sollte die Reinheit zwischen 1,6 und 1,8 liegen, für RNA zwischen 1,8 und 2,0. Eine optische Dichte von 1,0 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml Doppelstrang-DNA oder 40 µg/ml RNA. Hier werden die Konzentrationsbestimmungen mit einer 100 µl Quarzküvette in einem Beckman-Spektrophotometer durchgeführt. Nach dem Abgleich mit Millipore-Wasser werden 1:20 (für Plasmid-Mini-Präparationen), 1:100 oder 1:500 Verdünnungen der Nukleinsäurelösungen vermessen.

#### 2.2.2.2. Agarosegelelektrophorese

In Agarosegelen können lineare DNA-Moleküle zwischen 0,1 und 60 kb aufgetrennt und ihre Molekulargewichte durch Eichfragmente bestimmt werden (Maniatis et al., 1989). Probenpuffer dient dazu, die DNA in den Geltaschen zu beschweren und den Lauf durch Farbfronten zu markieren. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zum Pluspol, wobei ihre Position im Gel durch Interkalierung von Ethidiumbromid, das unter UV-Licht fluoresziert, sichtbar gemacht werden kann.

<u>6 x Probenpuffer:</u>	<u>10 x TBE:</u>	<u>50 x TAE für 1 Liter:</u>
30% Sucrose	900 mM Tris-Base	242 g Tris-Base
30% Glycerin	900 mM Borsäure	57,1 ml Eisessig
1 Spatelspitze Orange G pro 15 ml	20 mM EDTA	100 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0)

1%ige Agarosegele werden durch Aufkochen der Agarose in 1 x TBE oder 1 x TAE hergestellt. Nach dem Abkühlen auf ca. 40°C werden die Lösungen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in Gelträger der Elektrophoresekammern gegossen. Käbme werden zum Aussparen von Taschen verwendet. Nach dem Gelieren werden die Gele mit 1 x TBE oder 1 x TAE bedeckt und die DNA mit 1/6 Volumen Probenpuffer in die Taschen gefüllt. Als Längenstandards wird eine 100bp-Leiter eingesetzt. Die Elektrophorese wird anfangs bei 50 V, später bei 80-100 V durchgeführt. Die Gele werden unter UV-Licht betrachtet und mit einer Geldokumentationsanlage aufgenommen. Die Bilder werden auf Disketten gespeichert und ausgedruckt.

### 2.2.2.3. Klonierungstechniken

Die Klonierungstechniken werden auf der Grundlage von Maniatis et al., 1989, durchgeführt.

#### Restriktion

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsendonukleasen, die spezifische Erkennungssequenzen von mindestens sechs Basenpaaren benötigen, in Fragmente zerlegt werden. Eine Einheit Enzym wird dabei als die Menge definiert, die in einer Stunde 1 µg DNA schneiden kann. Hier werden Enzyme und passende Puffer der Firma Gibco verwendet.

Puffer (Gibco)	Tris-HCl (mM)	pH	MgCl <sub>2</sub> (mM)	NaCl (mM)
React 3	50	8,0	10	100
React 4	20	7,4	5	-

Zur Restriktion werden im Überschuss ca. 10 Einheiten (U) Enzym pro µg DNA eingesetzt. Die DNA wird bei 37°C in einem Puffer geschnitten, der eine möglichst hohe, jedoch keine Überaktivität der Enzyme gewährleistet. Bei präparativen Ansätzen wird 3-4 Stunden, bei Testrestriktionen 1-1,5 Stunden inkubiert, danach die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt.

#### Ligation

Mit Hilfe des Enzyms Ligase können überhängende komplementäre oder glatte Enden doppelsträngiger DNA miteinander verbunden werden. Hier wird Insert zu Vektor in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt

		<u>5 x Ligasepuffer:</u>
Vektor	ca. 100 ng	250 mM Tris-HCl pH 7,6
Insert	3:1 zum Vektor	50 mM MgCl <sub>2</sub>
5 x Ligasepuffer (Gibco)	2 µl	5 mM ATP
T4 DNA Ligase (1U/µl, Gibco)	1 µl	5 mM DTT
Bidest. Wasser	ad 10 µl	25% Polyethylenglykol-8000

Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 4°C inkubiert und ein Teil zur Transformation von E. coli Zellen verwendet.

### Transformation

Bei einer Transformation werden Plasmide in Bakterienzellen geschleust, deren Membran dafür durchlässig gemacht wurde, sogenannte „kompetente“ Zellen. Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten chemisch kompetenten E. coli Zellen TOP10 (Invitrogen) werden langsam auf Eis aufgetaut und vorsichtig gemischt. Pro Ansatz werden 50  $\mu\text{l}$  kompetente Zellen im Originalgefäß vorsichtig mit 2  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz vermischt und 20-30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wird für 30 s einem Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt, sofort auf Eis heruntergekühlt und mit 250  $\mu\text{l}$  LB-Medium (ohne Antibiotikum) versetzt. Die Zellen werden 1 h bei 300 rpm unter gelegentlichem Invertieren geschüttelt. Je 25  $\mu\text{l}$  und 50  $\mu\text{l}$  der Suspension werden auf LB-Agarplatten (100 mg/ml Ampicillin) ausgestrichen und nach dem Einziehen auf dem Deckel über Nacht im  $37^{\circ}\text{C}$ -Brutschrank inkubiert. Die Platten können mit Parafilm verschlossen ein paar Wochen bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

#### **2.2.2.4. Gelextraktion von DNA-Fragmenten**

Einzelne DNA-Fragmente können nach Auftrennung in einer präparativen Agarosegel-Elektrophorese aus dem Gel eluiert und an Trägermaterial gebunden gereinigt werden. Hier wird mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach dem Firmenprotokoll von Qiagen gearbeitet.

Elutionslösung: je 30  $\mu\text{l}$

1/10 Volumen Puffer EB (Elutionspuffer, 10 mM Tris-Cl pH 8,5; Qiagen)

9/10 Volumen bidest. Wasser

#### **2.2.2.5. Isolierung von Plasmid-DNA**

##### Plasmid-Mini-Präparation

Zur Analyse rekombinanter DNA werden Plasmide mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen aus E. coli Zellen isoliert. Nach der Transformation werden Klone von den Agarplatten mit autoklavierten Zahnstochern gepickt, auf einer „Masterplatte“ abgestrichen und in 12 ml Röhrchen mit je 2 ml LB-Medium (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin) überführt. Die Röhrchen werden mit lockeren Deckeln über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 225 rpm geschüttelt, die Masterplatte bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Je 1-1,5 ml Kultur werden zur Plasmidisolierung nach dem Protokoll der Firma Qiagen eingesetzt, die DNA wird am Ende mit 50  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer EB (10 mM Tris-Cl pH 8,5) eluiert.

##### Plasmid-Maxi-Präparation

Zur Gewinnung ausreichender Mengen Plasmid-DNA aus E. coli Zellen für Transfektionen wird der Plasmid MAXI Kit der Firma Qiagen verwendet. Über Nacht werden in 150 ml LB-Medium mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin E. coli Kulturen herangezogen, die aus Klonen oder Glycerinkulturen hochgezüchtet wurden. Die Bakteriensuspension wird in drei 50 ml Falcon-Röhrchen 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 6000 g zentrifugiert, die Überstände werden abgegossen. Die Pellets werden in 10 ml Puffer P1 vereinigt und zur Plasmidisolierung nach dem Protokoll der Firma Qiagen weiter behandelt, die DNA wird am Ende in 300-500  $\mu\text{l}$  sterilem bidest. Wasser gelöst.

### 2.2.2.6. RNA-Isolierung

Aus eukaryotischen Zellen (je eine Kulturschale mit 10 cm Durchmesser) wird die Gesamt-RNA mit RNazol B nach dem Protokoll der Firma Cinna/Biotech Laboratories isoliert, in 50 µl RNase-freiem Braun-Wasser gelöst und die Konzentration im Photometer bestimmt.

### 2.2.2.7. Nuclear Run-Off

Im Nuclear Run-Off wird die mRNA-Synthese eines Gens überprüft, indem dessen cDNA im molaren Überschuss in einem Slot Blot mit P32-dUTP radioaktiv markierter RNA aus Zellkernen hybridisiert wird. Durch Vergleich mit Haushaltsgenen sind die autoradiografischen Signale quantifizierbar. Die Methode wird nach der Kernpräparation (Rosewicz et al., 1994) nach Darling und Brickell, Nucleinsäure-Blotting, 1996, durchgeführt. Abweichend davon wird die synthetisierte RNA über Microcons gereinigt.

### 2.2.2.8. RT-PCR

Bei der RT-PCR wird die Gesamt-RNA aus Zellen durch das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben, von der mittels Polymerase-Kettenreaktion einzelne Sequenzen amplifiziert und dadurch erst detektiert werden können.

#### Reverse Transkription

Entdeckt wurde die Reverse Transkriptase (RT) in RNA-Tumroviren, die ihre RNA-Genome zur Replikation in der Wirtszelle in komplementäre DNA (cDNA) umschreiben müssen (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970). Hier wird SuperScript II RNase H Reverse Transkriptase aus dem Moloney Leukämievirus der Maus (Firma Gibco) eingesetzt, die „First-Strand“-cDNA mit hoher Ausbeute und einem großen Anteil vollständiger Produkte herstellt. Für die Duplex-PCR wird ein Invitrogen-Kit verwendet.

#### RT-Mix:

Oligo dT Primer 0,5 µg/µl	2 µl
5 x First-Strand Buffer	6 µl
DTT 0,1 M	3 µl
dNTPs jedes 1,25 mM	8 µl
RNasin 40 U/µl	1,5 µl
RT 200 U/µl	2 µl

Die RNA wird in RNase-freiem bidest. Wasser auf 1 µg / 7,5 µl verdünnt, 10 min bei 70°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt, bevor der RT-Mix zugegeben wird. Der Ansatz wird mindestens 1 h bei 37°C inkubiert, die Reaktion wird durch 10 min Erhitzen bei 95°C gestoppt und die cDNA bei -20°C gelagert.

#### PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987) werden ausgewählte DNA-Abschnitte eines Nucleinsäuregemisches mit Hilfe von Primern (Oligonukleotiden) und einer Polymerase stark vervielfältigt. In einer Duplex-PCR werden zwei verschiedenen Primerpaare gleichzeitig eingesetzt, um gewünschte Fragmente in einem Ansatz mit einem Haushaltsgen amplifizieren zu können. Zur Amplifikation des K-ras Gens wird hier Taq-Polymerase (Roche) aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* bzw. Pfu-Polymerase (Stratagene) aus dem

Bakterium *Pyrococcus furiosus* speziell für die PCR mit Primern, die mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme synthetisiert wurden, verwendet. Pfu-Polymerase ist etwa achtmal genauer beim Synthetisieren der Gegenstränge als Taq-Polymerase. Die Reaktionen werden in dünnwandigen 0,2ml-Reaktionsgefäßen in einem Gradienten-Thermocycler mit Heizdeckel (Stratagene) durchgeführt. Die Primer werden mit einem Primer Design-Programm ausgewählt und nach der Synthese (TIB Molbiol) getestet. Nach Optimierung der Annealing-Temperatur durch Gradientenprogramme werden die PCR-Reaktionen folgendermaßen durchgeführt:

<u>K-ras PCR:</u>	<u>1 x 50 µl Ansatz:</u>
cDNA	1 µl
10 x PCR-Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (Roche)	5 µl
dNTP-Mix (je 1,25 mM)	8 µl
Primer krasleft (100 µM)	0,5 µl
Primer krasright (100 µM)	0,5 µl
Taq-Polymerase (1 U/µl, Roche)	0,2 µl
Bidest. Wasser	34,8 µl

<u>K-ras PCR mit Schnittstellen-Primern:</u>	<u>„Präparativer“ 4 x Ansatz zu je 50 µl:</u>
cDNA	4 µl
10 x PCR-Puffer (Stratagene)	20 µl
dNTP-Mix (je 1,25 mM)	16 µl
Primer bamleft (10 µM)	10 µl
Primer noright (10 µM)	10 µl
Pfu-Polymerase (2,5 U/µl, Stratagene)	4 µl
Bidest. Wasser	136 µl

<u>K-ras Duplex-PCR:</u>	<u>1 x 25 µl Ansatz:</u>
cDNA (aus Invitrogen-Transkription)	3 µl
10 x PCR-Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (Roche)	2,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM, Invitrogen)	0,5 µl
Primer krasleft (10 µM)	1 µl
Primer krasright (10 µM)	1 µl
Primer GAPDH links (1 µM)	0,75 µl
Primer GAPDH rechts (1 µM)	0,75 µl
Taq-Polymerase (1 U/µl, Roche)	0,6 µl
Bidest. Wasser	14,9 µl

#### PCR-Programme:

##### K-ras PCR:

Fenster	1	2	3	Zyklen
WIN 1	95°C, 1 min	-	-	1
WIN 2	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 3 min	30
WIN 3	-	-	72°C, 7 min	1
WIN 4	-	-	-	-



K-ras PCR mit Schnittstellen:

Fenster	1	2	3	Zyklen
WIN 1	95°C, 45 s	-	-	1
WIN 2	95°C, 45 s	60°C, 45 s	72°C, 2 min	10
WIN 3	95°C, 45 s	68°C, 45 s	72°C, 2 min	25
WIN 4	72°C, 10 min	-	-	1

Die Primer bamleft und noright sind durch das Anfügen der Schnittstellen für BamH I und Not I nicht mehr ganz optimal gewählt, so dass nach den ersten 10 Zyklen eine höhere Annealing-Temperatur eingestellt wird, um Verunreinigungen mit unerwünschten PCR-Produkten zu vermeiden.

K-ras Duplex-PCR:

Fenster	1	2	3	Zyklen
WIN 1	95°C, 4 min	-	-	1
WIN 2	95°C, 1 min	58°C, 1 min	72°C, 3 min	33
WIN 3	-	58°C, 2 min	72°C, 7 min	1
WIN 4	-	-	-	-

**2.2.3. Proteintechniken****2.2.3.1. Herstellung von Zelllysaten**

Tween-Lysepuffer:  
 50 mM HEPES pH 7,5  
 150 mM NaCl  
 0,5 M EDTA  
 0,2 M EGTA  
 10% Glycerin  
 (Matsushime et al., 1994)

Frisch dazu:  
 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
 1 mM DTT  
 2 µg/ml Aprotinin  
 1 mM NaF  
 5 µg/ml Leupeptin  
 0,1 mM PMSF  
 10 mM β-Glycerophosphat  
 0,1% Tween-20

NP-40-Lysepuffer:  
 20 mM Tris-Base pH 7,8  
 150 mM NaCl  
 2 mM EDTA  
 50 mM β-Glycerolphosphat  
 0,5% NP-40  
 1% Glycerin

Frisch dazu:  
 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
 1 mM DTT  
 10 KIU/ml Aprotinin  
 10 mM NaF  
 2 µM Leupeptin  
 2 mM PMSF

SDS-Lysepuffer:  
 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8  
 6 M Harnstoff  
 10% Glycerin  
 2% SDS  
 0,00125% Bromphenolblau  
 5% β-Mercaptoethanol

Ca.  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen werden in 20-500 µl Lysepuffer auf Eis lysiert. In NP-40-Puffer bzw. Tween-Puffer werden die Zellen nach zweimaliger PBS-Wäsche mit einem Zellschaber abgeschabt, 10 x bei 30% Power (5 Zyklen) sonifiziert (oder 8 x in einer Insulinspritze geschert für IP und Pulse-Chase) und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 4°C und maximaler Umdrehung pro min wird das Lysat abgenommen (und in N<sub>2</sub> schockgefroren für IP) und bei -80°C gelagert. Für die SDS-Lyse werden die Zellen trypsiniert, 1/10 wird separat pelletiert und in 10-100 µl 0,1 N NaOH für die Proteinbestimmung lysiert, der Rest wird in SDS-Puffer gevortext, 15 x bei 58% Power (5 Zyklen) sonifiziert und 15 min bei 65°C inkubiert. Die Proben werden bei -80°C gelagert.

### 2.2.3.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen kann durch eine Farbreaktion in Lösung photometrisch bestimmt werden. Hier wird ein Bradford-Reagenz der Firma BioRad in 1:5 Verdünnung verwendet. Je 5 µl oder 10 µl Probe (eventuell verdünnt) werden mit 500 µl oder 1 ml verdünntem Bradford-Reagenz in einer Plastik-Küvette gemischt und 10 min inkubiert. Proben und BSA-Standard werden in Doppelbestimmung gegen einen Leerwert des gleichen Puffers bei 595 nm im Photometer (Beckman) vermessen. Mit Hilfe der BSA-Eichlösung werden die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet.

### 2.2.3.3. Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese können denaturierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Lämmli, 1970). Dabei wandern die denaturierten, durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zum Pluspol, anfangs in einem Sammelgel zur Fokussierung der Banden und anschließend in einem Trenngel. Durch Molekulargewichtsstandards kann die Größe der Proteine bestimmt werden.

#### Laufpuffer nach Lämmli:

192 mM Glycin  
25 mM Tris  
0,1% SDS

#### 5 x Probenpuffer:

250 mM Tris-HCl  
10% SDS  
50% Glycerin  
500 mM DTT  
0,5% Bromphenolblau

	<u>10% Trenngel (10 ml):</u>	<u>13,5% Trenngel (10 ml):</u>
30% Acryl-/Bisacrylamid 37,5:1	3,3 ml	4,5 ml
2 M Tris-Base pH 8,8	1,875 ml	1,875 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
Millipore-Wasser	4,62 ml	3,42 ml
10% Ammoniumpersulfat	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	5 µl

#### 5,6% Sammelgel:

Stammlösung 5 ml  
10% SDS 50 µl  
10% Ammoniumpersulfat 50 µl  
TEMED 5 µl

#### Stammlösung:

200 ml  
30% Acryl-/Bisacrylamid 37,3 ml  
37,5:1  
2 M Tris-Base pH 8,8 12,6 ml  
Millipore-Wasser 150,1 ml

Die SDS-Gele werden mit Elektrophoresesystemen für Minigele der Firma BioRad hergestellt. TEMED und 10% Ammoniumpersulfat werden erst kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben. Zuerst wird das Trenngel bis ca. 1 cm unterhalb des später eingesetzten Kamms gegossen und mit Butanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren wird das Butanol abgegossen, mit Filterpapier nachgetrocknet und das Sammelgel darüber gegossen. Ein Kamm mit 10 Taschen wird sofort in das Sammelgel gesteckt.

#### Molekulargewichtsstandard:

20 µl See Blue Pre-Stained Standard (Invitrogen)

Gleiche Proteinmengen der Lysate werden mit dem entsprechenden Puffer auf gleiches Volumen gebracht. Die NP-40- oder Tween-Zellysate werden mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und wie die Lysate in SDS-Puffer 5 min bei 95°C denaturiert. Währenddessen werden die Gele luftblasenfrei in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, mit Lämmli-Puffer bedeckt und die Kämme gezogen. Die Taschen werden gespült, bevor Proben und Standard mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen gefüllt werden. Die Elektrophorese wird bei 60-180 V durchgeführt, bis die blaue Front gerade aus den Gelen herausgelaufen oder die unterste benötigte Markerbande am Gelende zu sehen ist.

#### 2.2.3.4. Western Blot

Beim Western Blot werden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Membran transferiert, auf der sie indirekt detektiert werden können. Hier werden über die Bindung spezifischer primärer Antikörper Meerrettich-Peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper gebunden. Durch die Meerrettich-Peroxidase wird ein Chemilumineszenz-Reagenz umgesetzt, so dass die Proteinbanden schwarz auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden können.

##### Blotting

10 x Blotpuffer:  
250 mM Tris-Base  
1,92 M Glycin

Transferpuffer:  
1 x Blotpuffer  
10% Methanol

Der Blot wird luftblasenfrei in Transferpuffer für eine Nass-Blot-Kammer für Minigele (BioRad) wie folgt aufgebaut:

Minuspol (schwarz)  
1 x Schwamm  
1 x Gel-Blotting-Papier  
Gel  
Nitrozellulose-Membran  
1 x Gel-Blotting-Papier  
2 x Schwamm  
Pluspol (rot)

Um Verunreinigungen zu vermeiden wird stets mit sauberen Handschuhen gearbeitet. Membran und Filterpapiere werden vorher auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Membran wird kurz in Millipore-Wasser und mindestens 10 min in Transferpuffer eingeweicht, bevor der Blot zusammengebaut wird. Geblottet wird mit Eiskühlung bei 100 V für 35-60 min. Der vorgefärbte Marker dient zum Nachweis des Transfers. Die Membran trocknet zum Fixieren der Proteine an der Luft, bevor die Banden mit Ponceau S angefärbt werden. Ein grober Mengenvergleich bzw. Scannen im Weißlicht ist dadurch möglich. Nach dem Waschen mit Millipore-Wasser werden die Proteine mit TBS-Tween (siehe unten) wieder entfärbt.

##### Immunodetektion

TBS-Tween:  
1/10 10 x TBS  
0,05% Tween-20

10 x TBS:  
200 mM Tris-Base  
1,36 M NaCl  
einstellen auf pH 7,4 mit 2 M HCl

Die folgenden Schritte werden in Plastik-Kästchen unter Schütteln auf einem Taumeler oder in 50ml-Röhrchen auf einem rotierenden Drehrad ausgeführt. Die Nitrozellulose-Membran wird bei Raumtemperatur 30 min bis 2 h mit 5% Trockenmilch in TBS-Tween inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Über Nacht wird die Membran bei 4°C mit einer 1:100 (H-, N- und K-Ras), 1:400 (Pan-Ras) oder 1:1000 Verdünnung des ersten Antikörpers (alle übrigen verwendeten Primärantikörper) in 5% Trockenmilch / TBS-Tween inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran dreimal 5-10 min mit TBS-Tween oder zweimal kurz mit Millipore-Wasser (stringentere Wäsche durch Wasser, Protokoll der Firma UBI) gewaschen. Zum Blot wird eine 1:20000 Verdünnung (GAM-POD, GAR-POD) bzw. 1:5000 Verdünnung (Anti-Rabbit-HRP von NEB, Cell Signaling) des zweiten Antikörpers in 5% Trockenmilch / TBS-Tween gegeben und 60-90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird dreimal 5-10 min mit TBS-Tween oder zweimal kurz mit Millipore-Wasser, einmal 5 min mit TBS-Tween und noch viermal kurz mit Millipore-Wasser gewaschen. Die ECL-Reagenzien Oxidizing und Enhanced Luminol Reagent der Firma NEN werden zu gleichen Teilen gemischt und die Membran sofort 1 min darin inkubiert. Nach kurzem Abtropfen wird sie zwischen zwei sauberen Folien luftblasenfrei in eine Filmkassette gelegt. Röntgenfilme werden von wenigen Sekunden bis zu mehreren Stunden auf der Membran exponiert.

#### Stripping der Membran

Um Antikörper von Blotmembranen zu entfernen, können die Membranen in hoch-reduzierendem Puffer gewaschen werden.

#### Strip-Puffer:

2% SDS

62 mM Tris-Base pH 8,8

#### Frisch ansetzen:

20 ml Strip-Puffer

174,5 µl β-Mercaptoethanol

Bis zu vier Membranen werden mit 20 ml Strip-Puffer/β-Mercaptoethanol in einem mit Parafilm verschlossenen Glaskästchen für 30 min bei 57°C im Wasserbad geschüttelt, mehrmals mit TBS-Tween oder PBS-Tween gewaschen und sind dann wieder für eine weitere Antikörper-Detektion bereit.

### **2.2.3.5. Kopräzipitation von Proteinen**

Durch die Präzipitation von Proteinen aus Zelllysaten über Sepharose- oder Agarose-Beads können kopräzipitierte Proteine im anschließenden Western Blot immunodetektiert werden. Eine mögliche Assoziation von K-Ras mit p16 ist unter Einsatz von rekombinantem GST-p16 gut zu überprüfen, da hierbei keine störenden Antikörperbanden einer Immunpräzipitation im Western Blot auftreten. Je 1 mg Protein aus Tween-Zelllysaten werden mit je 20 µl Glutathion-Agarose bei 4°C vorgereinigt (langsame Rotation), zentrifugiert (siehe 2.2.3.6.) und mit einer Insulinspritze auf 20 µl GST-p16 Agarose-Beads (1 µg) bzw. zur Kontrolle auf 20 µl Glutathion-Agarose / 1 µg rekombinantes GST (eine Stunde vorgekoppelt) überführt. Nach der langsamen Rotation bei 4°C über Nacht werden die Beads dreimal in Tween-Puffer gewaschen (wie 2.2.3.6.) und mit 15 µl 5 x Probenpuffer (siehe 2.2.3.3.) 5 min bei 95°C gekocht. Die Proteine im Überstand werden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot immunspezifisch nachgewiesen.

### 2.2.3.6. Ras-Aktivitätsassay

Aktives Ras kann an die Ras-Bindungsdomäne (RBD) des Raf-1 Proteins binden. Daher werden im Ras-Aktivitätsassay der Firma UBI RBD-gekoppelte Agarose-Beads eingesetzt, um aktives Ras zu präzipitieren, das im anschließenden Western Blot mittels Ras-Antikörpern detektiert werden kann. Im Kit ist ein GST-Fusionsprotein enthalten, das der humanen RBD (Aminosäuren 1-149) des Raf-1 Proteins entspricht und an Glutathion-Agarose gebunden ist. Auch der 5 x Lyse-/Waschpuffer MLB wird mitgeliefert.

<u>5 x Mg<sup>2+</sup>-Lyse-/Waschpuffer (5 x MLB):</u>	<u>1 x MLB:</u>
125 mM HEPES pH 7,5	1/5 5 x MLB
750 mM NaCl	10% Glycerin
5% Igepal CA-630 (=NP-40)	10 µg/ml Aprotinin
50 mM MgCl <sub>2</sub>	10 µg/ml Leupeptin
5 mM EDTA	25 mM NaF
10% Glycerin	1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>

#### Raf-1 RBD Agarose:

600 µg Raf-1 RBD Agarose  
1,2 ml 50% Agarose in PBS, 50% Glycerin

Ca. 80-90% konfluente Zellen einer Kulturschale (10 cm Durchmesser) werden zweimal mit PBS gewaschen und in 250-500 µl 1 x MLB nach 5 min Inkubation auf Eis mit einem Zellschaber abgeschabt. Suspendierte Zellen eines PolyHEMA-beschichteten 6-wells werden einmal mit PBS gewaschen und in 250 µl 1 x MLB lysiert. In einem 1,5ml-Reaktionsgefäß werden die Zellen 8 x geschert (durch eine Insulinspritze gezogen) und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 4°C und maximaler Umdrehung pro min wird der Überstand in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Proben werden auf Eis aufgetaut, einer Proteinbestimmung unterzogen (auch vor dem Schockfrieren möglich) und, nur wenn nötig, über Nacht in Eis im Kühlraum aufgehoben. Von den Lysaten werden gleiche Proteinmengen, 800-1000 µg, eingesetzt, die mit 1 x MLB auf etwa 1 mg/ml in gleichen Volumina verdünnt werden. Die Lysate rotieren langsam mit je 20 µl Glutathion-Agarose 30 min bei 4°C, um unspezifisch bindende Proteine aus den Lysaten zu entfernen. Währenddessen werden 1,5ml-Reaktionsgefäße mit je 20 µl (10 µg) RBD-Agarose vorbereitet, die auf dem Vortex zur besseren Mengenverteilung in PBS / 50% Glycerin mit einer Multipette mit abgeschnittenem 5ml-Tip pipettiert werden. Die Lysate werden 30 s bei 4°C und maximaler Umdrehung pro min zentrifugiert und mit einer Insulinspritze auf die RBD-Beads gegeben. Die Suspension rotiert langsam 30 min bei 4°C und wird dann dreimal mit je 300 µl 1 x MLB gewaschen (Zentrifugation wie oben). Nach dem letzten Trockensaugen mit der Insulinspritze werden die Beads mit je 20 µl 2,5 x Probenpuffer (siehe 2.2.3.3.) für 5 min auf 95°C erhitzt und die Überstände in einem 13,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion im Western Blot erfolgt mit Ras-Antikörpern.

### 2.2.3.7. Pulse-Chase Experiment

Die Stabilität eines Proteins in der Zelle kann durch radioaktive Markierung während der Translation (Pulse) und die Verfolgung der Abbaukinetik über mehrere Zeitpunkte (Chase) ermittelt werden. Hier werden pro Zeitpunkt je eine (Capan-1) bzw. zwei bis fünf 10cm-

---

Schalen (Capan-1/p16) mit je  $3 \times 10^6$  Zellen angesetzt. Nach ca. 7 Stunden werden die Zellen zweimal mit je 4 ml PBS gewaschen und 30 min mit 3 ml D-MEM ohne Methionin/Cystein mit 5% dialysiertem FBS gehungert. Jede Schale wird in eine große Rasterschale gesetzt. Zum Medium werden 300  $\mu\text{Ci}$  EXPRE<sup>35</sup>S<sup>35</sup>S Easy Tag, NEN, pro Schale gegeben, die Zellen werden 14 Stunden im Brutschrank inkubiert. Alle Schalen (außer Zeitpunkt 0) werden 2 x mit 5-10 ml warmem PBS gewaschen, mit 7-8 ml Normalmedium mit je 2mM Cystein/Methionin versetzt und weiter inkubiert. Die Nullwerte werden 2 x mit kaltem PBS gewaschen, mit 500  $\mu\text{l}$  MLB / Schale bzw. maximal 1 ml MLB /Zeitpunkt einer Zellsorte 5 min auf Eis inkubiert, abgeschabt, 8 x in einer Insulinspritze geschert und zentrifugiert (wie 2.2.3.6.). Die Überstände werden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Nach weiteren 6, 12, bzw. 24 Stunden werden die anderen Schalen gleichermaßen aufgearbeitet. Aus der maximal möglichen Proteinmenge bei gleichen Mengen aller Proben (500-600  $\mu\text{g}$ ) wird K-Ras mit einem K-Ras spezifischen Antikörper immunpräzipitiert wie in 2.2.3.5., jedoch mit 15  $\mu\text{l}$  Protein G Sepharose-Beads und 7  $\mu\text{l}$  (1,4  $\mu\text{g}$ ) K-Ras Antikörper (mindestens 2  $\mu\text{g}$  K-Ras Antikörper / mg Protein). Die Proteine werden in der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wird 30 min in Gel Drying Solution inkubiert und zwischen Filterpapier / Saranfolie 2 Stunden bei  $80^\circ\text{C}$  im Gelrockner getrocknet. Die Folie wird abgezogen und das Gel auf dem Filterpapier in Haushaltsfolie gelegt (hinten zukleben). Die Banden werden autoradiografisch nachgewiesen.

#### **2.2.4. Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Bei der statistischen Auswertung der Daten werden Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die zugehörigen Standardabweichungen und die Signifikanz angegeben. Deren Berechnung erfolgt mit den Programmen Microsoft Excel bzw. ANOVA, Graph Pad Prism.