

3. Material und Methoden

3.1. Puffer und Lösungen

LB-Medium: 10g NaCl
10g Bacto-Trypton
5g Hefeextrakt
ad 1000ml H₂O (pH 7,4)

LB-Agar: 10g NaCl
10g Bacto-Trypton
5g Hefeextrakt
15g Bacto-Agar
ad 1000ml H₂O (pH 7,4)

Sämtliche Medien wurden bei 121°C und 2 bar für 20 Minuten autoklaviert. Nach Bedarf wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 100µg/ml Ampicillin zugesetzt.

50x TAE-Puffer: 2M Tris
50mM EDTA
pH 8,0 (eingestellt mit Essigsäure)

Agarose-Lösung für DNA-Gele: 1-2% (w/v) Agarose in
1x TAE-Puffer

Ethidiumbromidlösung (EthBr): 0,001% (w/v) EthBr (Stammlsg. 10mg/ml) in
1x TAE-Puffer

6x Gelladepuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,25% (w/v) Xylencyanol
60mM EDTA
30% (v/v) Glycerol
in 1x TAE-Puffer

10x PBS-Puffer (pH 7,5):	160mM Na ₂ HPO ₄ 40mM NaH ₂ PO ₄ 1,5M NaCl
10x TBS-Puffer (pH 7,6):	500mM Tris/HCl 1,5M NaCl
1M Phosphat (pH7,2):	60,9g Na ₂ HPO ₄ 21,8g NaH ₂ PO ₄
PBS/Tween:	1000ml 1xPBS 0,1% Tween 20
20x SSC-Puffer:	87,7g NaCl 44,1g Natriumcitrat ad 500ml H ₂ O, pH 7,2
X-Gal:	40mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactosid in 1ml Dimethylformamid lösen
10x TE-Puffer:	100ml Tris [1M] pH 7,5 20ml EDTA [0,5M] pH 7,5 ad 1000ml H ₂ O
10x TBE-Puffer:	54,45g Tris-Base 27,5g Borsäure 20ml EDTA [0,5M] pH 8,0 ad 500ml H ₂ O
deion. Formamid:	10g Mixed Bed Resin 100ml Formamid 1 Stunde rühren, filtrieren (Lagerung bei -20°C)

2x Lämmli-Puffer	140mM Tris-HCl pH 6,8
	20% Glycerin
	4% SDS
	1M 2-Mercaptoethanol
	0,01% Bromphenolblau

Die an dieser Stelle nicht aufgeführten Puffer und Lösungen sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen aufgeführt.

3.2. Zelllinien

Folgende ATCC-Zelllinien (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, USA) wurden verwendet und entsprechend den Angaben des Herstellers kultiviert:

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.

Name	Herkunftsgewebe
SK-BR-3	Brust, Adenokarzinom, maligne pleurale Effusion
MCF-10A	Brust, benigne Veränderung
MCF-7	Brust, Adenokarzinom, pleurale Effusion
T47-D	Brust, duktales Karzinom, pleurale Effusion
ZR-75-1	Brust, duktales Karzinom, Aszites
MDA-MB-231	Brust, Adenokarzinom, pleurale Effusion
MDA-MB-453	Brust, Karzinom, Effusion
MDA-MB-468	Brust, Adenokarzinom, pleurale Effusion

3.3. Plasmid-Isolierung

cDNA-Klone wurden aus der von Research Genetics (Huntsville, USA) verwalteten „IMAGE Clone Library“ bestellt [Lennon *et al.*, 1996]. Die bakteriellen Kulturen wurden entsprechend ihrer Antibiotika-Resistenzen auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und einzelne Klone in 5ml LB-Medium angezogen. Die Plasmid-Isolierung erfolgte mit Hilfe des „GFX Micro Plasmid Prep“ Kits (Amersham Biosciences, Freiburg) und basierte auf der alkalischen Bakterienlyse und der selektiven Bindung der Plasmid-DNA an eine Silikamatrix [Birnboim und Doly, 1979]. Es wurden jeweils zweimal 2ml der Bakteriensuspension abzentrifugiert, dem Protokoll des Herstellers folgend, die Plasmid-DNA isoliert und im letzten Schritt in 50µl Wasser aufgenommen. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte durch photometrische Messung der Absorption der Ringsysteme aromatischer Nukleinsäuren bei 260nm.

3.4. Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten Dideoxynukleotiden [Sanger *et al.*, 1977]. Die PCR-Produkte wurden auf denaturierenden Polyacrylamid-Gelen auf ABI 377A DNA Sequenzier-Automaten (Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Für die PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

500ng	DNA
1µl	Sequenzierungs-Primer (5pmol/µl)
3µl	BigDye Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt)
ad 15µl	H ₂ O

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Sequenzierungs-Primer. Die Primer wurden bei MWG Biotech (Ebersberg) bestellt.

Primername	Primersequenz
M13 vorwärts	5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'
M13 rückwärts	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7 Terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
SP6	5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'

Der BigDye-Mix (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt) enthielt Puffer, AmpliTaq DNA Polymerase, dNTPs und Fluoreszenz-markierte ddNTPs. In Abhängigkeit von der zu sequenzierenden DNA wurden entsprechende Primer eingesetzt, die bei PCR-Produkten der Sequenz des Produktes entsprachen oder bei Plasmiden vektorspezifisch waren (siehe Tabelle 2). Für die Amplifikation und den Einbau der markierten ddNTPs wurde das folgende PCR-Programm verwendet:

	Temperatur	Dauer
Schritt 1	95°C	4 Minuten
Schritt 2	95°C	30 Sekunden
Schritt 3	50°C	10 Sekunden
Schritt 4	60°C	4 Minuten
Schritt 5	Wiederholung Schritt 2-4	29 Wiederholungen
Schritt 6	4°C	Bis zum Abbruch des Programms

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden die Produkte von überschüssigen nicht eingebauten Nukleotiden durch eine Sepharose-Reinigung getrennt. Das Sephadex G50 (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde hierfür zuvor für 4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in MultiScreen-PCR Platten (Millipore GmbH, Eschborn) mit 300µl Wasser aufgequollen und dann für 5 Minuten bei 910x g zentrifugiert. Auf die Sephadex-Säulen konnte dann die PCR-Reaktion aufgetragen werden und in 5 Minuten bei 910x g durchzentrifugiert werden. Das gereinigte PCR-Produkt wurde getrocknet und anschließend in 3µl Sequenzier-Auftragepuffer durch Schütteln resuspendiert. Die Proben wurden vor dem Auftragen für 10 Minuten bei 80°C denaturiert, auf Eis gestellt und je 1,5µl auf das Sequenziergel aufgetragen.

Als Sequenziergel wurde eine 5,25%ige Polyacrylamid-Gellösung (PAGE plus, Amresco, Solon, USA) mit 6M Harnstoff in TBE-Puffer verwendet, die zuvor über Nacht entgast wurde. Zur radikalischen Polymerisation wurden zu der Gellösung 0,5% Ammonium-Persulfat (APS) und 0,05% N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) gegeben. Nach elektronischer Auftrennung der PCR-Produkte auf einem ABI Prism 377 DNA-Sequenzier-Automaten wurden die vom Sequenzier-Automaten erzeugten Rohdaten mit den Programmen „Reap“ und „Scope“ (Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena) überarbeitet und in ein Format gebracht, das einen Transfer der Daten in bestehende Sequenz-Dateien des GAP4-Programmes [Bonfield *et al.*, 1995] ermöglichte. Ein Vergleich der sequenzierten Plasmide mit Datenbanksequenzen wurde zur Bestätigung der Identität der Plasmide durchgeführt. Nur bestätigte Plasmide wurden für weitere Experimente wie Northern Blot oder RNA in situ Hybridisierung verwendet.

3.5. LoH-Analyse

Zur Untersuchung der Patientenproben auf den Verlust eines Allels in der Tumorprobe wurden Mikrosatelliten (repetitive DNA-Sequenzen mit hoher Heterozygotität) amplifiziert. Die genomische Variation in der Tumorprobe kann auf verschiedene Weisen detektiert werden, wobei die Verwendung von Fluoreszenzmarkierten Produkten sensitiver ist als die Detektion durch Autoradiographie oder silbergefärbte Gele [Christensen *et al.*, 1999]. Für die LoH-PCR im Bereich 8p11 wurden Primerpaare bekannter Marker ausgewählt (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Primer für LoH-Analyse auf 8p11.

Marker	Primer-Sequenz (5'-Primer)	Primer-Sequenz (3'-Primer)
D8S268	5'-ACCTACAAGCAACAACACCA-3'	5'-GTTGACTTCCATGGCTCTTT-3'
D8S532	5'-GCTCAAAGCCTCCAATGAC-3'	5'-GACTTCGTGATCCACCTGC-3'

Die verwendeten Primer wurden mit Cy5 fluoreszenzmarkiert und die PCR-Produkte anschließend auf einem Sequenzierautomaten (*ALF*TM, Amersham Pharmacia) analysiert. Die Fragmentanalyse wurde mit der *Fragment Manager*TM Software (Amersham Pharmacia) durchgeführt [Niederacher *et al.*, 1997]. Als LoH wurde eine mehr als 40%ige Signalreduktion in einem der beiden Allele, verglichen zu den Signalintensitäten in der Normal-DNA, gewertet. Die LoH-Experimente wurden an der Universität Düsseldorf in Zusammenarbeit mit Dr. B. Betz und Dr. D. Niederacher durchgeführt.

3.6. Mutationsanalyse

Die „single strand conformation polymorphism“- (SSCP-) Analyse ist eine Methode zur Mutationsdetektion, die darauf beruht, dass Veränderungen in der Nukleotidsequenz (Polymorphismen oder Mutationen) bei einzelsträngigen DNA-Molekülen eine Änderung im Laufverhalten auf nicht-denaturierenden Gelen zur Folge haben. Der Unterschied im Laufverhalten zwischen Wildtyp und dem veränderten Strang ist stark temperaturabhängig und die optimale Detektion ist deshalb für jede neue Kombination unterschiedlich. Um dieser starken Spezifität gerecht zu werden, wurden für alle Proben drei Temperaturen getestet, und es wurde darauf geachtet, dass die Temperatur während des Laufes konstant blieb. Einzelsträngige DNA-Moleküle können bei gleichen äußeren Bedingungen mehrere stabile Konformationen einnehmen, deshalb sind auf dem SSCP-Gel pro Probe häufig mehrere Banden zu erkennen. Für die Analyse wurden jeweils beide Stränge der zu testenden PCR-Produkte markiert (siehe Post-PCR-Markierung, Kapitel 3.6.4); so bestand die Möglichkeit,

auch Mutationen zu identifizieren, die nur das Laufverhalten eines Stranges erkennbar verändern. Die durch SSCP-Analyse detektierten Veränderungen müssen durch Sequenzierung der Proben charakterisiert werden, da die SSCP keine Informationen über die genaue Lage oder Art der Veränderung liefert.

3.6.1. Primer-Design

Das Primer-Design für die SSCP-Analyse erfolgte mit Hilfe des Software-Programms „Primer3“ [Rozen und Skaletzky, 2000]. Das Programm wählt die Primer nach folgenden vom Anwender veränderbaren Kriterien aus: Schmelztemperatur, Größe, GC-Gehalt und Primer-Dimer Bildungsmöglichkeiten der Oligonukleotide. Beim Primer-Design für die SSCP-Analyse waren vor allem PCR-Produktgröße und somit die Position des Primer-Paares in der Zielsequenz wichtige Vorgaben. Die PCR-Produkte sollten den gesamten translatierten Bereich des Gens und die angrenzenden intronischen Sequenzen abdecken. Nur bei einer Größe bis 300 bp ist eine gute Detektionsrate in der Literatur beschrieben [Hayashi und Yandell, 1993], deshalb mussten größere Exons in mehreren PCR-Produkten amplifiziert werden, und diese Fragmente sollten sich für eine zuverlässige Analyse gegenseitig überlappen. Die Größe der Oligonukleotide wurde jeweils mit einem Optimum von 22 Nukleotiden angegeben. Nachträglich wurde der Primer-Sequenz am 5'-Ende noch der TT-„Spacer“ und ein A bzw. G für die spätere Post-PCR-Markierung angehängt. Die Primer-Sequenzen für die Mutationsanalyse des Tensin-Gens und die optimierten PCR-Bedingungen sind im Anhang angegeben (Tabelle 16).

3.6.2. Gradienten-PCR

Die Bedingungen für die PCR wurden für jedes Primerpaar und jede Primerkombination optimiert. Mit der Gradienten-PCR können unterschiedliche Temperaturen in einer PCR-Reaktion getestet werden. Außerdem wurden die $MgCl_2$ -Konzentrationen variiert, da die Mg^{2+} -Konzentration die Enzym-Aktivität der Polymerase und die Schmelztemperatur von doppelsträngiger DNA beeinflusst. In der Optimierung wurden ein Temperaturgradient zwischen 50° und 70°C sowie $MgCl_2$ -Konzentrationen von 1,5 mM und 2,5 mM getestet. Die Optimierungs-Reaktionen erfolgten mit Kontroll-DNA aus humaner Plazenta (Konzentration 30 ng/ μ l).

3.6.3. Amplifikation von Tumor-DNA und Post-PCR-Markierung

Für die Amplifikation wurden 100ng Tumor-DNA eingesetzt und die für das zu untersuchende Gen ausgewählten Primer mit den entsprechend optimierten PCR-Bedingungen verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde bei der Amplifikation genomische DNA aus humaner Plazenta (30 ng) mitgeführt.

Bei Post-PCR-Markierung werden PCR-Fragmente im Anschluss an die Amplifikation mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Die Markierung erfolgt durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität des Klenow-Fragmentes (3'-Austauschreaktion); hierbei wird das letzte Nukleotid am 5'-Ende des Gegenstranges des PCR-Fragmentes durch ein markiertes Nukleotid ersetzt. Um die Austauschreaktion zu erleichtern, wurden zwei Thymine (TT) als Abstandhalter („spacer“) in die Primersequenz eingebaut. Nach dem „Spacer“ tragen die Primer am 5'-Ende als „Template“ für die auszutauschenden Nukleotide entweder ein Adenin (A) oder Guanin (G). Die entsprechenden Nukleotide auf dem Gegenstrang (Thymin bzw. Cytosin) wurden gegen fluoreszenz-markiertes dUTP bzw. dCTP ausgetauscht. Bei der Markierungsreaktion wurden beide Stränge markiert.

Post-PCR-Markierungs-Ansatz:

1µl	50mM Tris-HCl (pH 8,7)
1µl	100mM MgCl ₂
0,04µl	100µM Fluoreszenzfarbstoff (R6G-dCTP oder R110-dUTP)
2,76µl	H ₂ O
0,2µl (5U)	Klenow-Fragment
5µl	PCR-Fragment

Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1µl EDTA (0,2M) und 30µl deionisiertem Formamid wurde die Markierungsreaktion gestoppt. Die Proben konnten an dieser Stelle bei -20°C eingefroren und gelagert werden. Bevor die Proben auf das SSCP-Gel aufgetragen werden konnten, wurden je 1µl Post-PCR-Markierungs-Ansatz mit 0,4µl GS500 (interner Standard) und 0,6µl Dextran-Blue Stammlösung gemischt. Die Proben wurden für 1 Minute bei 94°C denaturiert und anschließend bis zum Auftragen auf Eis gelagert.

3.6.4. SSCP-Gel

Zur Herstellung von 50ml einer 8%igen AccuGel™-Lösung mit 10% deionisiertem Formamid wurden folgende Komponenten gemischt:

10ml	40% AccuGel™-Stammlösung (29:1 Acrylamid:Bisacrylamid-Lösung)
5ml	10x TBE-Puffer
5ml	100% deionisiertes Formamid
30ml	Millipore-Wasser

Die Lösung wurde filtriert (Porengröße 0,45µm) und 30 Minuten entgast. Direkt vor dem Giessen des Gels wurden zu jeweils 15ml Gel-Lösung 150µl APS (10%) gegeben und die Lösung erneut 2-5 Minuten entgast. Nach dem Entgasen wurde die Lösung mit 6µl TEMED versetzt und vorsichtig gemischt, um erneute Blasenbildung zu vermeiden. Das Gel wurde mit einer Schichtdicke von 200µm gegossen. Es wurden 1µl Probe pro Spur auf ein 12cm langes Gel geladen. Die Einstellung der Geltemperatur erfolgte über ein externes Kühlgerät. Es wurden SSCP-Gelläufe bei drei Gel-Temperaturen (15°, 25°, 30°C) durchgeführt.

3.6.5. Datenanalyse mit GeneScan® Analysis Software

Die Software analysiert Rohdaten vom ABI PRISM 377 DNA Sequenzier-Gerät nach der Größe der DNA-Fragmente. Als interner Standard wurde GeneScan-500 (GS500) benutzt; dieser Standard erlaubt die Analyse von Fragmentlängen zwischen 35 und 500bp. Der Standard ist aus 16 Fragmenten unterschiedlicher Länge zusammengesetzt, die als Doppelstränge vorliegen, aber nur jeweils ein Strang ist fluoreszenzmarkiert. Der interne Standard wurde allen aufgetragenen Proben zugesetzt und unter den gleichen äußeren Bedingungen getrennt. Der interne Standard erlaubt in der Analyse ein Überlagern der Proben und den Vergleich der Fragmente. Die Verwendung eines internen Standards erhöht die Sensitivität der Mutationsdetektion erheblich, da kleinere Abweichungen im Migrationsverhalten der Probenfragmente besser erkannt werden können.

Die Ergebnisse der Analyse werden als Elektropherogramme und in Tabellenform ausgegeben. Die Elektropherogramme stellen die Fluoreszenzintensität als Funktion der Fragmentgröße oder der Laufzeit dar. Hierbei repräsentiert ein Elektropherogramm jeweils eine Spur des Gels. In der Tabelle werden die entsprechenden genauen Daten der Größenbestimmung angezeigt. Außerdem erlaubt die Software eine Rekonstruktion des Gelbildes als qualitative Darstellung des Laufes.

3.7. Northern Hybridisierung

Zur Untersuchung der RNA-Expression wurden Filter der Firma BD Bioscience Clontech (Heidelberg) verwendet. Die Hybridisierungen erfolgten nach modifizierten Protokollen des Herstellers.

3.7.1. Sondenherstellung

Nach Auswahl des zu untersuchenden Sequenzbereiches des betreffenden Gens wurde die Sequenz durch das Programm RepeatMasker auf Sequenzwiederholungen überprüft. Wurden keine repetitiven Sequenzbereiche identifiziert, wurden aus der „I.M.A.G.E. Clone Library“ von Research Genetics (Huntsville, USA) Klone bestellt, die den betreffenden Bereich enthielten. Die Plasmide wurden durch Sequenzierung verifiziert (vgl. Kapitel 3.4). Die in dieser Arbeit verwendeten Klone sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Verwendete Klone für die Sondenherstellung zur Northern Hybridisierung. Die Klone wurden bei Research Genetics (Huntsville, USA) bestellt.

Gen	GenBank-Nummer	Genlänge [bp]	Klon-Position	Klonlänge [bp]
<i>SFRP1</i>	W21306	4500	240-2720	2500
<i>Tensin</i>	R18014	10218	9094-10218	1200

Die cDNA Fragmente in den Plasmiden wurden durch Restriktionsverdau aus dem Vektor ausgeschnitten. Für den Restriktionsverdau wurden 1 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 25 µl mit jeweils 1 µl des entsprechenden Restriktionsenzym für 2h bei 37°C verdaut. Ausgewählt wurden Restriktionsenzyme deren Schnittstelle in der multiplen Klonierungsstelle lag und die keine weiteren Schnittsequenzen im cDNA Fragment enthielten. Die DNA-Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und die DNA-Konzentration bestimmt.

3.7.2. Kontroll-Dot-Blot

Zur Abschätzung der Effizienz der radioaktiven Markierung wurden unterschiedliche Konzentrationen der Sonden-DNA punktförmig auf Membranen aufgetragen. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe in 10x SSC mit Konzentrationen von 1 ng/µl bis 100 fg/µl hergestellt. Die verdünnten Sonden-Lösungen wurden für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Die unterschiedlichen Konzentrationen wurden auf eine Hybond-N+ Membran aufgetragen (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Membranen

wurden für fünf Minuten in Denaturierungslösung (0,5M NaOH, 1,5M NaCl), eine Minute in Neutralisierungslösung (1,5M NaCl, 0,5M Tris-HCl pH 7,2, 1mM EDTA) inkubiert und für weitere zwei Stunden bei 80°C gebacken.

3.7.3. Sondenmarkierung und Aufreinigung

Zur Hybridisierung wurden radioaktiv markierte Sonden verwendet, die mit dem „Megaprime™ DNA Labeling System“ von Amersham Biosciences (Freiburg) markiert wurden. 25ng der als Sonde zu verwendenden DNA wurden in 28µl Wasser aufgenommen, 5µl des Nonamer Primer-Mixes wurden zugegeben und für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden 10µl Markierungspuffer, 5µl α -P³²-dCTP (10mCi/ml, Amersham Biosciences, Freiburg) und 2µl Klenow-Enzym (1U/µl) zugegeben, leicht gemischt, abzentrifugiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die markierte Sonde wurde durch Reinigung über eine Gelfiltrationssäule (Sephadex G50, Amersham Biosciences, Freiburg) von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt. Die 50µl der Markierungsreaktion wurden auf die Säule aufgetragen und anschließend für zwei Minuten bei 3000rpm zentrifugiert, um die aufgereinigte Sonde zu erhalten. Die Bestimmung der ungefähren Einbaurate erfolgte über eine Szintillationsmessung durch Messung der Aktivität vor und nach der Säulenreinigung.

3.7.4. Hybridisierung der Membranen

Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit Lachs-Hoden-DNA prähybridisiert. 1,5mg der Lachs-Hoden-DNA (Sigma, München) wurden für fünf Minuten bei 95°C denaturiert, für eine Minute auf Eis gestellt und dann zu 15ml der auf 60°C vorgewärmten ExpressHyb Lösung (Ambion, Huntington, Großbritannien) gegeben. Die Membran und die selbst hergestellten Filter mit der Konzentrationsreihe der Sonde (Kontroll-Dot-Blots) wurden mit der DNA bzw. RNA Seite nach oben in die Hybridisierungsröhren gegeben und für etwa 1h bei 65°C in 10ml Lösung inkubiert. Die markierte Sonde wurde mit 50µl 20x SSC, 150µg Lachs-Hoden-DNA, 30µg Cot-I DNA und Wasser auf 200µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach einer fünfminütigen Denaturierung bei 95°C und 30 Minuten Inkubation bei 68°C wurde die Sonde zu den verbliebenen 5ml ExpressHyb gegeben. Nach Entfernen der Prähybridisierungslösung und Zugabe der Lösung mit der markierten Sonde wurde über Nacht bei 65°C hybridisiert.

Nach der Inkubation wurde die Hybridisierungslösung abgossen und für eine mögliche

weitere Hybridisierung bei -20°C verwahrt. Die Membran wurde zweimal mit $2\times$ SSC, 1% SDS für fünf Minuten und zweimal für 30 Minuten bei jeweils 65°C gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschweißt und eine Photoplatte in einer PhosphorImager Kassette exponiert. Die photostimulierbaren Oberflächen speichern die durch radioaktiven Zerfall emittierten Strahlungen und erlauben eine 15-250fach sensitivere Detektion von ^{32}P als übliche Röntgenfilme [Johnston *et al.*, 1990]. Die Photoplatte wurde dann in einem PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) gescannt und die beobachteten Signale mit der Software ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) ausgewertet. Zur mehrfachen Verwendung der Membranen wurde die Markierung durch fünf Minuten Inkubation in kochendem 0,5%igem SDS herunter gewaschen und der Filter zur Kontrolle der Effizienz der Dehybridisierung erneut über Nacht in der PhosphorImager Kassette exponiert.

3.8. RNA *in situ* Hybridisierung

Die RNA *in situ* Hybridisierung (ISH) wurde zur Expressionsanalyse an Paraffin-Material eingesetzt [Gall und Pardue, 1969; John *et al.*, 1969]. Bei dieser Methode wird mit Hilfe von genspezifischen Nukleinsäure-Sequenzen (Sonden) die Expression der Zielgene in ihrer zellulären Umgebung visualisiert. Sowohl DNA als auch RNA kann als Sonde genutzt werden. Die Sonden werden entweder radioaktiv oder nicht-radioaktiv (Digoxigenin, Biotin oder Fluorochrom) markiert. In dieser Arbeit wurden RNA-Sonden eingesetzt, die über *in vitro* Transkription von genspezifischer cDNA generiert und DIG-markiert wurden [Holtke und Kessler, 1990; Komminoth, 1992]. Bei der *in vitro* Transkription konnten die Promotorsequenzen (T3, T7, SP6) der Klonierungsvektoren genutzt werden [Kassavetis *et al.*, 1982; Dunn und Studier, 1983]. Im ersten Schritt wurde die Plasmid-DNA der cDNA-Klone linearisiert und durch die entsprechende RNA-Polymerase unter Einbau von Digoxigenin-markiertem dUTP transkribiert. Neben der spezifischen „antisense“-Sonde, die zur mRNA komplementär ist, wurde auch eine „sense“-Sonde für die Negativ-Kontrolle hergestellt. Die Hybridisierung erfolgte auf Paraffin-Gewebeschnitten, die zuvor durch Vorhybridisierung für die Sonde zugänglich gemacht worden waren. Zur Detektion wurde ein Phosphatasegekoppelter anti-DIG-Antikörper verwendet, der nach Zugabe von „BM Purple“, einem chromogenen alkalischen Phosphatase-Substrat, an der AP-Bindungsstelle ein permanentes, dunkelviolettes Präzipitat bildet.

3.8.1. Präparation der RNA-Sonden

Für die Linearisierung der Antisense- und Sensesonde wurden 20µg Plasmid-DNA mit den in Tabelle 5 angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten.

Tabelle 5: Restriktionsenzyme für die Linearisierung und RNA-Polymerasen für die *in vitro* Transkription für die jeweiligen Plasmid-Vektoren

Vektor	Linearisierung		RNA-Polymerase	
	Antisense	Sense	Antisense	Sense
pT7T3	EcoRI oder Aval	HindIII oder NotI	T3	T7
(p)Bluescript SK-	EcoRI oder XbaI	XhoI oder PstI	T7	T3

Die Aufreinigung des Linearisierungsansatzes erfolgte über eine Phenol-Chloroform-Reinigung und anschließende Ethanol-Acetat-Fällung. Zunächst wurde ein Volumen Phenol (Tris-gesättigt, pH 8,0) zugegeben. Nach Mischen und abzentrifugieren (12000g, 5min, RT) wurde der wässrige Überstand abgenommen, mit einem Volumen Chloroform vermischt und erneut wie oben angegeben zentrifugiert. Der wässrige Überstand mit der gereinigten DNA wurde in 2,5 Volumen 100% Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat (3M, pH 7,0) 10 Minuten bei -80°C gefällt und abzentrifugiert (12000g, 10 Minuten, 4°C). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 40µl H₂O_{DEPC} aufgenommen. Zur Konzentrationsabschätzung der linearisierten DNA wurden 1µl der Probe und 250ng DNA-Standard (MarkerIII, Roche Diagnostics, Mannheim) auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die Konzentration über den Vergleich mit dem Standard abgeschätzt.

Für die Markierung der Sonde wurden folgende Reagenzien (Roche Diagnostics, Mannheim) gemischt und 3 Stunden bei 37°C inkubiert:

- 1µg linearisierte DNA
- 2µl DIG RNA Labeling Mix (je 10mM ATP, CTP, GTP; 6,5mM UTP; 3,5mM DIG-UTP in Tris-HCl pH 7,5)
- 2µl 10x Transkriptions-Puffer (400mM Tris-HCl pH 8,0, 60mM MgCl₂, 100mM DTE, 20mM Spermidin, 100mM NaCl, 1 Unit/ml RNase Inhibitor)
- 16 U RNase Inhibitor
- 16 U RNA-Polymerase

Die RNA wurde anschließend durch die Zugabe von 2,5µl LiCl (4M) und 75µl Ethanol (100%) bei -80°C für 10 Minuten gefällt und abzentrifugiert (12000g, 30min, 4°C). Die gefällte RNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 50µl H₂O_{DEPC} aufgenommen. Die Kontrolle der gewonnenen Sonden-RNA erfolgte in einem 0,7% Agarose-RNA-Gel (1x MOPS-Puffer mit 1% Formaldehyd). Hierzu wurde die RNA (1µl) mit 40% Formamid und 6% Formaldehyd in 1x MOPS-Puffer vermischt, 10 Minuten bei 65°C inkubiert und auf Eis gestellt. Die Proben wurden zusammen mit einem RNA-Größenstandard mit RNA-Ladepuffer (50% Glycerin, 1mM EDTA, 0,4% Bromphenolblau, 0,4% Xylencyanol) versetzt und elektrophoretisch getrennt. Die gesamte RNA wurde in 1/20 Volumen Hybridisierungs-Lösung aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.8.2. Hybridisierung der Paraffinschnitte

Bei der Vorhybridisierung wurden die Paraffinschnitte in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zwei Inkubationsschritte mit Paraformaldehyd (PFA) dienten der Fixierung der Gewebestrukturen, während durch eine Proteinase-K-Behandlung das Gewebe angedaut und für die anschließende Hybridisierung mit der RNA-Sonde zugänglich gemacht wurde. Die Inkubationsschritte der Vorhybridisierung wurden in gebackenen Küvetten („backen“ = 4 Stunden, 200°C) durchgeführt. Alle Lösungen (mit Ausnahme von Tris-Puffern) wurden mit 0,1% DEPC versetzt und steril-filtriert.

Die Präparate wurden dreimal 10 Minuten in Xylol entparaffiniert, zweimal fünf Minuten in 100% Ethanol und anschließend in einminütigen Inkubationsschritten in absteigenden Ethanol-Konzentrationen (95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%) rehydriert. Die Präparate wurden zweimal fünf Minuten in 1x PBS gewaschen, 30 Minuten in 4% PFA fixiert und wiederum gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in Proteinase-K-Puffer (10µg/ml Proteinase K) 10 Minuten inkubiert und erneut zweimal in 1x PBS gewaschen. Es folgte ein weiterer Fixierungssschritt in 4% PFA (30 Minuten) mit anschließender Inkubation in 1x PBS (fünf Minuten) und zweimal in 2x SSC (je zwei Minuten). Bis zur Hybridisierung mit der RNA-Sonde inkubierten die Präparate mindestens 30 Minuten in Tris-Glycin-Puffer.

Zur Sonden-Hybridisierung wurde von dem Objektträger die überschüssige Flüssigkeit entfernt und auf den Schnitt je 100µl Hybridisierungslösung (0,5-2,5ng/µl RNA-Sonde) gegeben, wobei die Flüssigkeit durch einen Parafilm-Streifen auf dem Präparat verteilt und abgedeckt wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Präparate in Küvetten überführt und stringent gewaschen.

Nach dreimaligem Waschen mit 5x SSC (je 20 Minuten) wurden die Präparate 40 Minuten bei 60°C in Formamid-Waschlösung (20% Formamid in 0,5x SSC) inkubiert. Die Formamid-Waschlösung wurde einmal gewechselt und sehr langsam (über ca. 90 Minuten) auf 37°C abgekühlt. Es folgte ein Waschschrift für 15 Minuten bei 37°C mit NTE-Puffer. Die nicht-gebundene RNA wurde im nächsten Waschschrift (30 Minuten, 37°C) mit NTE-Puffer und RNaseA [10µg/ml] abgebaut. Es folgten weitere Waschschrift mit NTE-Puffer (15 Minuten, 37°C), Formamid-Waschlösung (40 Minuten, 60°C) und zweimalige Inkubation in 2x SSC für 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Zur Vorbereitung auf die Antikörper-Inkubation wurden die Schnitte eine Stunde in 1% Blockierungs-Lösung (1% Blocking Reagent, Roche Diagnostics, Mannheim) in 0,1M Maleinsäure-Puffer) inkubiert. Die Antikörper-Hybridisierung erfolgte mit dem anti-DIG-Antikörper (1:2000 in 1% Blocking-Reagent) über Nacht in einer feuchten Kammer. Die Präparate wurden anschließend dreimal 10 Minuten, zweimal eine Stunde in 1x TBST-Puffer (1x TBS mit 0,1% Tween-20), und dreimal 10 Minuten in NTMT-Puffer gewaschen. Für die Detektion des Hybridisierungssignals wurden die Schnitte in 1ml BM-Purple-AP Substrat (Roche Diagnostics, Mannheim) mit 2mM Levamisol und 0,1% Tween-20 bei RT (schnelle Reaktion) oder bei 4°C (langsame Reaktion) inkubiert und je nach Färbereaktion wurde die Färbelösung zweimal täglich gewechselt. Die Färbedauer betrug bis zu sieben Tagen, wobei die Reaktion regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Bei gut sichtbarem Signal wurden die Präparate dreimal 10 Minuten in NTMT-Puffer gewaschen und mit 0,1% Kernechtrot-Lösung für 10 Minuten gegengefärbt. Abschließend wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt und gemeinsam mit einem Pathologen ausgewertet.

Verwendete Lösungen:

10x MOPS-Puffer:	200mM	3-(N-Morpholino-)Propansulfonsäure
	50mM	Natriumacetat (pH 7,0)
	10mM	EDTA (pH 8,0)
		pH 7,0 mit NaOH einstellen
	autoklavieren und lichtgeschützt aufbewahren	
4% PFA in 1x PBS:	16g	Paraformaldehyd (PFA)
	360ml	DEPC-H ₂ O
	1,4ml	NaOH (2M)

	15-30 Minuten bei 60°C im Wasserbad lösen
	40ml 10x PBS zugeben
	pH 7,0 mit HCl (2M) einstellen
Tris-Glycin-Puffer:	24,2g Tris-Base
	15g Glycin
	ad 2l H ₂ O
	pH 7,0 mit HCl einstellen, filtrieren und autoklavieren
Hybridisierungspuffer (ISH):	25ml Formamid
	7,5ml NaCl (5M)
	5ml 10x PE
	0,5ml tRNA [10mg/ml] (Sigma)
	0,25ml Heparin (10%, Sigma)
	0,5ml BSA (10%, Sigma)
	2,5ml SDS (20%)
	ad 50ml DEPC-H ₂ O
NTE-Puffer:	0,5M NaCl
	10mM Tris-HCl pH 7,0-7,4
	0,5mM EDTA
Maleinsäure-Puffer:	0,1M Maleinsäure
	0,15M NaCl
	pH 7,5 mit NaOH einstellen, filtrieren und autoklavieren
NTMT-Puffer:	100mM NaCl
	100mM Tris-HCl pH 9,5
	50mM MgCl ₂
	0,1% Tween-20

3.9. Poly-A⁺-RNA Präparation

Die poly-A⁺-RNA Präparation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des poly-A-Tract 1000 Kits von Amersham Biosciences, Freiburg.

3.9.1. RNA-Präparation aus Gewebeproben

Das Patientengewebe wurde in 150µl GTC-Puffer + 2% β-Mercaptoethanol aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Zur RNA-Präparation wurde das Zell-Lysat durch 30 Sekunden vortexen homogenisiert. Zu dem Lysat wurden auf 70°C vorgewärmter Verdünnungspuffer (300µl) + 1% β-Mercaptoethanol und 10pmol biotinyliertes Oligo-dT zugegeben. Die Proben wurden für fünf Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurden die Lysate für 10 Minuten bei 14000rpm zentrifugiert. 120µl der an Streptavidin gekoppelten paramagnetischen Partikel (SA-PMP) wurden dreimal mit 500µl 0,5x SSC gewaschen. Der klare Überstand der Zentrifugation wurde zu den gewaschenen SA-PMPs gegeben und die Bindung an die biotinylierten Oligo-dT/RNA-Hybride durch Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur ermöglicht. Die gebundenen SA-PMPs wurden im magnetischen Ständer von dem genomische DNA enthaltenden Überstand abgetrennt. Der Überstand wurde zur späteren Isolierung der genomischen DNA aufgehoben und bei -20°C gelagert. Die gebundenen SA-PMPs wurden dreimal mit 0,5x SSC gewaschen. Nach sorgfältiger Abnahme der Waschlösung wurden zur Elution 80µl DEPC-Wasser zu den SA-PMPs gegeben, für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die poly-A⁺-RNA Lösung von den Partikeln getrennt. Anschließend wurde die RNA in der SpeedVac getrocknet, in 11µl DEPC-Wasser resuspendiert und von 1µl RNA-Lösung die Konzentration bestimmt.

Verdünnungspuffer:	6x	SSC
	10mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	1mM	EDTA
	0,25% (w/v)	SDS
GTC-Puffer:	4M	Guanidinthiocyanat (GTC)
	25mM	Natriumcitrat (pH 7,1)

3.9.2. RNA-Präparation aus Zellen

Die Vorgehensweise bei der Präparation von RNA aus Zellkultur-Zellen verlief analog zu der Präparation aus Geweben, jedoch mit anderen Volumina der verwendeten Lösungen. Von den Zellen einer Zellkulturflasche wurde die Nährlösung abgenommen und GTC-Puffer zugegeben. Zur Homogenisierung des Zell-Lysates wurde es mehrmals durch eine Kanüle aufgezogen. Für die Präparation von etwa 5ml GTC-Zellysat wurden 8ml des Verdünnungspuffers, 3ml SA-PMPs (gewaschen mit 3ml 0,5x SSC) und 500pmol biotinyliertes Oligo-dT zugegeben. Eluiert wurde die poly-A⁺-RNA mit 475µl DEPC-Wasser und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur gefällt (doppeltes Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3M NaAcetat). Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 14000rpm, waschen mit 100µl Ethanol (70%) und erneuter Zentrifugation für 20 Minuten bei 14000rpm wurde der Ethanol abgenommen, das Pellet getrocknet und in 20µl DEPC-Wasser resuspendiert.

3.10. cDNA-Synthese

3.10.1. Erststrangsynthese aus isolierter poly-A⁺-RNA

Die isolierte poly-A⁺-RNA wurde zur weiteren Untersuchung durch quantitative PCR in cDNA umgeschrieben. Für die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde eine MMLV Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA Polymerase, verwendet. Die benutzte Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) hat durch eine Punktmutation ihre RNaseH Aktivität verloren (RNaseH⁻) und besitzt eine besonders hohe Syntheseleistung. Die isolierte, quantifizierte poly-A⁺-RNA wurde in 10µl DEPC-Wasser aufgenommen und 1µl T7-(dT)₂₄-Primer (100pmol/µl) zugegeben. Nach 10 Minuten bei 70°C wurde die RNA auf Eis gestellt und der Erststrangansatz zugegeben, der sich folgendermaßen zusammensetzte:

4µl 5x Erststrang-Puffer (Gibco Life Technologies)

2µl 0,1M DTT

1µl 10mM dNTPs

1µl anti-RNase (28U/µl, Ambion)

Nach Zugabe des gesamten Ansatzes wurde 1µl Superscript II RNaseH⁻ Reverse Transkriptase (200U/µl, Gibco Life Technologies) zugegeben und anschließend für eine

Stunde bei 37°C inkubiert. Sequenz des T7-(dT)₂₄-Primers:

5'-GGCCAGTGAATTGTAATAGCACTCACTATAGGGAGGCGGT₂₄-3'

3.10.2. cDNA Synthese für quantitative PCR (Taqman™)

Aus der poly-A⁺-RNA von 23 verschiedenen Normalgeweben, sowie Brusttumor- und Brustnormalgewebe und 7 Brustzelllinien wurde eine einzelsträngige cDNA hergestellt, wie im Abschnitt zuvor beschrieben. Die gewonnene cDNA wurde auf eine Konzentration von 1ng/μl verdünnt. Von jeder cDNA wurden die C_T-Werte für das zu untersuchende Gen und für das Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gemessen. Von der RNA der Patientengewebe-Proben wurde nach der ersten Runde der Amplifikation, von der quantifizierten cRNA ausgehend eine Erststrangsynthese durchgeführt und die entstandene cDNA auf 1ng/μl verdünnt.

Die Erststrangsynthese erfolgte im Gegensatz zur Synthese bei poly-A⁺-RNA nicht mit der Sequenz des sense-Stranges (entspricht der mRNA), sondern der Sequenz des antisense-Stranges. Der cRNA-cDNA-Hybrid wurde mit 1μl RNaseH (2U/μl) für 20 Minuten bei 37°C verdaut und anschließend wurde die RNaseH-Aktivität durch Erhitzen auf 95°C (zwei Minuten) inaktiviert. Für die Synthese des Zweitstranges wurde zusätzlich 1μl T7-(dT)₂₄-Primer (100pmol/μl) zugegeben, zur Denaturierung von Sekundärstrukturen auf 70°C erwärmt und für 10 Minuten bei 42°C inkubiert. Die weitere Reaktion erfolgte analog dem Protokoll der Zweitstrangsynthese mit Verzicht auf eine nochmalige RNaseH-Behandlung.

3.10.3. Zweitstrangsynthese

Direkt zum Ansatz der Erststrangsynthese wurde folgender Ansatz gegeben:

- 91μl DEPC-Wasser
- 30μl 5x Zweitstrang-Puffer (Gibco Life Technologies)
- 3μl 10mM dNTPs
- 1μl *E.coli* DNA-Ligase (10U/μl, Gibco Life Technologies)
- 4μl *E.coli* DNA Polymerase I (10U/μl, Gibco Life Technologies)
- 1μl RNaseH (2U/μl, Gibco Life Technologies)

Die Zweitstrangsynthese wurde für zwei Stunden bei 16°C durchgeführt. Anschließend wurden noch 2μl T4 DNA Polymerase (5U/μl, Gibco Life Technologies) zugegeben und für

weitere fünf Minuten bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10µl EDTA (0,5M) abgestoppt. Für die Reinigung der cDNA wurde der gesamte Zweitstrangsynthese-Ansatz zu 500µl Aufnahme-Puffer gegeben, auf eine Säule überführt und für 30 Sekunden bei 14000rpm zentrifugiert. Die Säule wurde mit 500µl Waschpuffer durch Zentrifugation gespült (14000rpm, 30 Sekunden). Die an die Säulenmatrix gebundene DNA wurde durch erneute Zentrifugation (14000rpm, 30 Sekunden) mit zweimal 30µl DEPC-Wasser eluiert. Die cDNA wurde unter Vakuum einrotiert und das Pellet in 9µl DEPC-Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die Konzentration der cDNA photometrisch bestimmt.

3.11. Quantitative PCR (TaqMan™)

Die Taqman™-PCR ist ein automatisierter PCR-Assay, bei dem die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produktes simultan ermöglicht werden. Bei dieser so genannten „Real-Time“-PCR wird bei den zu quantifizierenden Proben das entstehende Amplifikat nach jedem Zyklus über ein Fluoreszenzsignal-übermittelndes System detektiert [Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993]. Zur Detektion durch eine fluoreszenzmarkierte, gen-spezifische Sonde wird die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq* DNA Polymerase genutzt [Holland *et al.*, 1991]. Im ersten Schritt der PCR hybridisieren die spezifischen Primer und die fluoreszenzmarkierte Sonde an den Matrizen-Strang. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert, dessen Fluoreszenz von einem „Quencher“-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) am 3'-Ende aufgrund der räumlichen Nähe durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt wird. Bei der Extension verdrängt die *Taq* Polymerase die Sonde, die durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität hydrolysiert wird. Dabei wird der Reporter-Farbstoff abgetrennt und kann ein Fluoreszenz-Signal erzeugen (Abb. 7). Das Signal wird während der PCR-Zyklen von einer CCD-Kamera empfangen und über ein entsprechendes Software-Programm (GeneAmp 5700 SDS Software, Perkin Elmer) prozessiert.

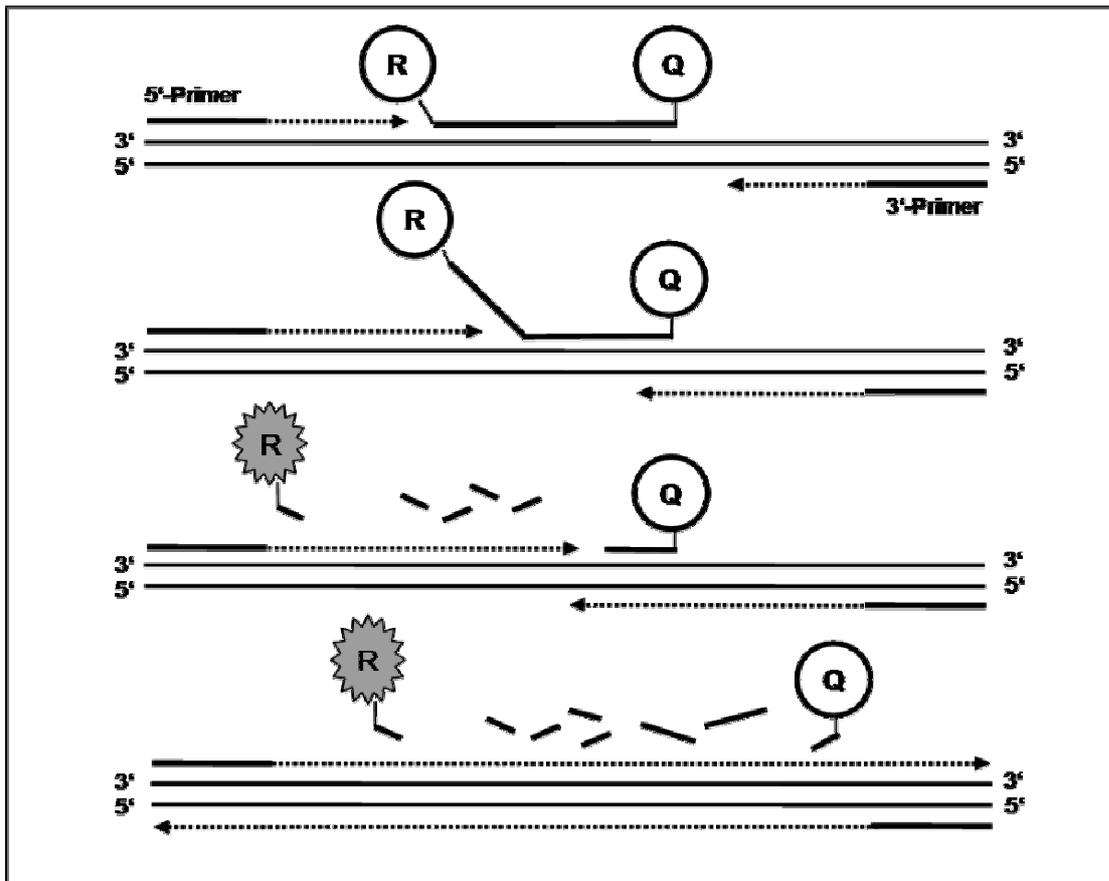


Abb. 7: Prinzip der quantitativen PCR. Bei der Extension wird der Reporter-Farbstoff (R) durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq Polymerase vom „Quencher“-Farbstoff (Q) abgespalten und erzeugt ein Fluoreszenzsignal.

Für den TaqMan-PCR-Ansatz wurde der „2x TaqMan Universal PCR Mastermix“ von Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet, zu dem noch die cDNA, Primer und Sonden hinzugegeben und mit DEPC-Wasser auf 25µl aufgefüllt wurde. Der Mastermix beinhaltete die AmpliTaq Gold DNA Polymerase, AmpErase UNG (Uracil N-Glykosylase), dNTPs mit dUTP, einen Reaktionspuffer mit MgCl₂ und eine passive Referenz zur Signal-Normalisierung. Die AmpliTaq Gold DNA Polymerase ist eine modifizierte Form der rekombinanten AmpliTaq DNA Polymerase, die bei Raumtemperatur keine Aktivität zeigt und zu ihrer Aktivierung zunächst für 10 Minuten auf 95°C erhitzt werden musste. Auf diese Weise wurde die Bildung von Primer-Dimeren verhindert. Zum Schutz vor „Carryover“-Kontamination ist dem Mastermix „AmpErase UNG“ hinzugefügt worden [Longo *et al.*, 1990]. Bei Verwendung von dUTPs in den PCR-Reaktionen wurde eingebautes UTP von „Carryover“-Kontaminationen vor dem Start der PCR durch die Glykosylase in einem 50°C Schritt gespalten. Die anschließenden 10 Minuten bei 95°C inaktivierten das Enzym, damit es zu keinen Störungen in der folgenden PCR-Amplifikation kam. Als passive Referenz wurde der Farbstoff Rox zugesetzt, der keinen Einfluss auf die PCR hat, sondern

Fluoreszenzfluktuationen in der Normalisierung der Fluoreszenzsignale ausgleicht.

Um eine möglichst hohe Effizienz der PCR-Reaktion zu ermöglichen, sollte das Amplikon eine Länge von ungefähr 100bp haben. Bei der Auswahl der Primer sind die üblichen Kriterien wie ein G/C-Gehalt von etwa 20-80% und eine T_m von 58-60°C zu beachten. Bei der Sonde ist vor allem zu berücksichtigen, dass sie eine um ungefähr 10°C höhere Schmelztemperatur als die Primer besitzt, da sie in der Hybridisierung an die „Template“-DNA nicht durch die DNA-Polymerase stabilisiert wird. Die Länge sollte etwa 24-30 Nukleotide betragen und der G/C-Gehalt sollte zwischen 40-60% liegen. Das 5'-Ende der Sonde darf kein G tragen, da es sonst zu einem „Quenchen“ (Unterdrücken) des gebundenen Reporterfarbstoffes kommt. Die Sonde sollte außerdem relativ nahe am 3'-Ende des Primers liegen. Die Kombinationen der Primer- und Sonden-Konzentrationen wurden zuvor in separaten Primer- und Sondenmatrices ausgetestet. Die Primer wurden in Konzentrationen von 50 bis 900nM und die Sonden von 50 bis 200nM getestet. Es wurde die Primer-/Sondenkonzentration gewählt, die einen möglichst frühen Fluoreszenzanstieg, ein hohes Endniveau und einen möglichst geringen Sondenverbrauch ermöglichte (siehe Tabelle 6). Die Lage der Taqman-Sonde für das SFRP1-Gen ist in der Abb. 9 (S.45) dargestellt.

Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden sowie ihre jeweiligen Endkonzentrationen und die resultierenden Produktgrößen. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) und die Sonden von der Firma metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

	SFRP1-3500 (121bp)	Tensin-5544 (130bp)
Konzentrationen	300/300/100nM	300/300/100nM
5'- Primer	AGGTCCTTGGCAGAACTCAGTT	GGCCTTCAATGACAGGGATCTA
3'- Primer	AGCCAAGTGTTACACAGGATATTTAAA	CCACCCGAGCATGGCTAA
Sonde	TAGAAGATATGCATGGGAGGTGAGGATTCCAAA	CTGCATCATCAGCCTTCCAATACCAGG

Die PCR-Reaktion und die parallel verlaufende Detektion wurden mit dem „GeneAmp 5700 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die speziellen „ABI PRISM Optical Caps and Tubes“ ermöglichten einer im Deckel des PCR-Blocks installierten Optik, während der PCR-Zyklen die Reporter-Farbstoffe anzuregen und die resultierende Fluoreszenz zu messen. Es wurde folgendes PCR-Programm benutzt:

2 Minuten	50°C	Glykosylase-Verdau
10 Minuten	95°C	Inaktivierung Glykosylase Aktivierung AmpliTaq Gold Polymerase
15 Sekunden	95°C	Denaturierung
1 Minute	60°C	Primer Annealing und Extension

3.11.1. Vergleichende C_t -Methode

Gemessen wurde der Zyklus der Reaktion, in dem die Amplifikation des PCR-Produktes zuerst detektiert wurde. Der Parameter C_t (Threshold Cycle) ist definiert als die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert oberhalb der Basislinie überschreitet. Wird ein Gen in einem Gewebe stark exprimiert, liegen zu Beginn der PCR-Reaktion schon eine große Anzahl von cDNA-Kopien vor und der festgelegte Schwellenwert wird nach weniger Zyklen erreicht als in einem Gewebe mit niedrigerer Expression. Nach der vergleichenden C_t -Methode wurden die C_t -Werte für das Haushaltsgen GAPDH und das zu untersuchende Gen bestimmt [Fink *et al.*, 1998]. Zur Normalisierung wurde der C_t -Wert von GAPDH vom C_t -Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert. Dieser ΔC_t -Wert bildete den normalisierten Expressionswert des Gens in dem untersuchten Gewebe. Durch Vergleich dieser normalisierten Expressionswerte ist eine relative Quantifizierung zwischen verschiedenen Geweben oder zwischen Tumor- und Normalgewebe möglich. Zum Vergleich der Expressionshöhen eines Gens in verschiedenen Geweben wurde die Expression des Gens in einem Gewebe X, z.B. Brustnormalgewebe, als 1 definiert. Die relative Expression des Gens in anderen Geweben in Bezug auf das Gewebe X wurde durch Subtraktion des ΔC_t -Wertes des Gewebes vom ΔC_t -Expressionswert des Gewebes X bestimmt.

3.12. DNA-Präparation aus Gewebeproben

Für die Isolierung der genomischen DNA wurden die Überstände aus der poly-A⁺-RNA Präparation verwendet (siehe Kapitel 3.9.). Um eventuell noch enthaltene Streptavidin-Magnet-Partikel abzutrennen, wurden die Überstände zunächst eine Minute bei 14000rpm zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurden 525 μ l abgenommen und mit 30x SSC-Puffer (385 μ l), 6M GTC (115,5 μ l) und H₂O (24,5 μ l) gemischt. Die DNA-Präparation erfolgte mit den Säulen aus dem SV Total RNA Isolation System (Promega, Mannheim). Der gesamte Ansatz wurde mit 400 μ l 95%igem Ethanol versetzt, in zwei Schritten auf die SV40 Säule überführt und die Säulen jeweils eine Minute bei 14000rpm zentrifugiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit je 600 μ l SV RNA Wasch-Lösung (Zentrifugation für eine Minute, 14000rpm) und ein dritter Waschschrte mit 250 μ l SV RNA Wasch-Lösung und zwei Minuten Zentrifugation. Zur Elution der DNA wurden zunächst 30 μ l H₂O auf die Säule gegeben und nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur zentrifugiert (eine Minute, 14000rpm). Um die DNA vollständig von der Säule zu entfernen, erfolgte eine Wiederholung des Elutionsschrittes mit 20 μ l H₂O. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

3.13. Proteinchemische Methoden

3.13.1. Protein-Überexpression in *E.coli*

Für die Überexpression wurde das Zielgen in den Expressionsvektor pET-30a(+) (Novagen, Madison; USA) kloniert (Vektorkarte Abb. 8A). Das Zielgen steht unter der Kontrolle eines T7-lac-Promotors, dieser besteht aus dem Transkriptions- und Translationssignal des Bakteriophagen T7-Promotors und der lac Operator-Sequenz [Studier *et al.*, 1990; Dubendorff und Studier, 1991]. Der pET-30a-Vektor trägt außerdem den Promotor und die kodierende Sequenz für den lac Repressor (*lacI*), so dass eine unerwünschte Aktivierung des T7-lac-Promotors und somit des Zielgens blockiert wird (s. Abb. 8B). Um Plasmid-Instabilität aufgrund von potentiell toxischer Wirkung der Protein-Überexpression auf die Wirtszelle zu vermeiden, wurde das Expressionskonstrukt zunächst in einen *E.coli* Stamm kloniert, der kein T7-RNA-Polymerase-Gen enthält (Top10). Nach Etablierung des Expressionsplasmids in dem nicht-exprimierenden Wirt, kann es nach Transfer in einen Wirt (z.B. BL21(DE3)), der das T7-RNA-Polymerase-Gen unter lacUV5-Kontrolle besitzt, durch Zugabe von IPTG induziert werden. Dadurch wird eine genaue Regulation der Zielgen-Expression möglich.

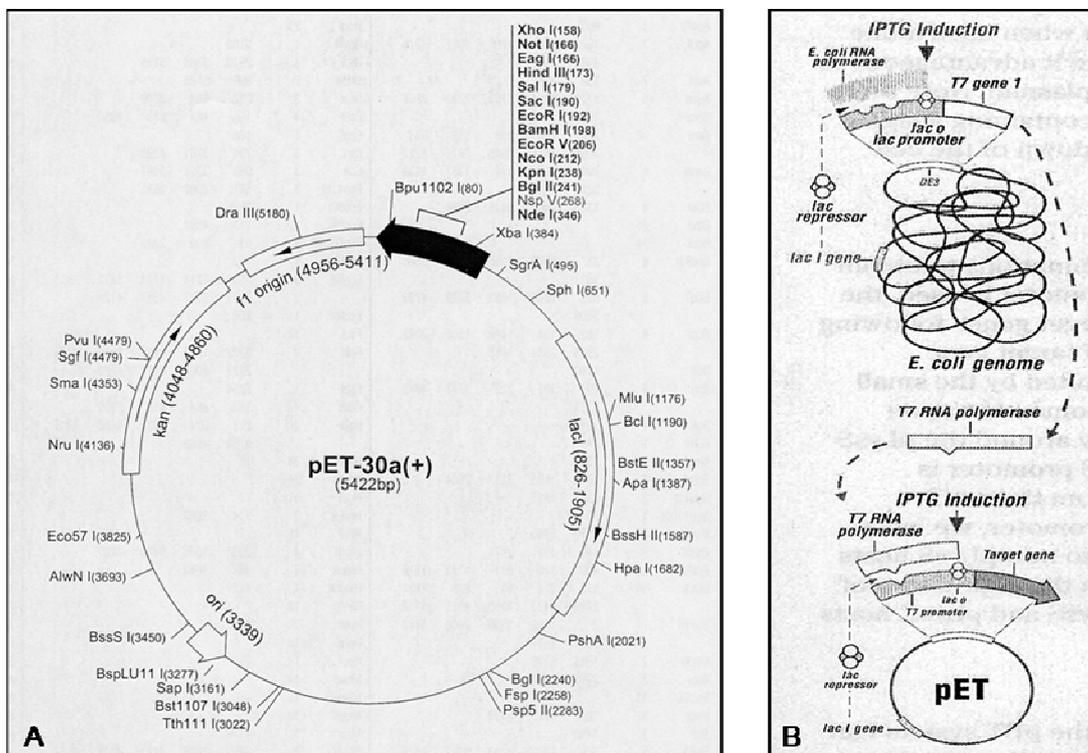


Abb. 8: pET-30a(+) Vektor. A. Vektorkarte. B. Schematische Darstellung der Kontrolle des T7lac Promotors und der Induktion durch IPTG (nach pET System Manual, Novagen).

Zunächst wurde das Zielgen von einer cDNA-Matrize („template“) amplifiziert und durch Einsatz von Mutagenese-Oligos (Primer für SFRP1-Expression in Bakterien: oBN42-2 (NcoI-Schnittstelle): 5'-TTGGCCATGGGGGACGTCTGCATCGCCA-3'; oBN42-rev1 (XhoI-Schnittstelle): 5'-TGAGCTCGAGGCACTCATGGTTTTTCA-3'; Insertgröße: 432bp) wurden die benötigten Restriktions-Schnittstellen für die spätere Klonierung eingeführt.

Der PCR-Ansatz für die Amplifikation war wie folgt:

cDNA-Template	1-10ng
dNTPs [je 2,5mM]	2,5µl
MgCl ₂ [25mM]	2µl
Primer vorwärts [100pmol/µl]	0,5µl
Primer rückwärts [100pmol/µl]	0,5µl
10x PCR-Puffer	2,5µl
<i>Taq</i> -Polymerase [5U/µl]	0,25µl
H ₂ O	ad 25µl

Die Amplifikation erfolgte mit einer Gradienten-PCR, d.h. es wurden 11 Ansätze bei aufsteigenden Anlagerungstemperaturen (45°-65°C) für die Primer parallel getestet. Das PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

	Temperatur	Dauer
Schritt 1	95°C	10 Minuten
Schritt 2	95°C	30 Sekunden
Schritt 3	45-65°C	30 Sekunden
Schritt 4	72°C	1 Minute
Schritt 5	Wiederholung Schritt 2-4	34 Wiederholungen
Schritt 6	72°C	10 Minuten

Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel überprüft und wenn das erwartete Fragment detektiert wurde, erfolgte die Aufreinigung des PCR-Ansatzes über Amicon-Säulen (Millipore, Elutionsvolumen 20µl) oder mit dem „Qiaquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Elutionsvolumen 30µl). Im Anschluss an die Aufreinigung wurde die Konzentration der PCR-Fragmente bestimmt. Vor der Klonierung wurden die aufgereinigten PCR-Fragmente und der Klonierungsvektor pET-30a(+) mit den zuvor ausgewählten Restriktionsenzymen geschnitten (in der Regel NcoI und XhoI, New England Biolabs, falls keine Schnittstellen in der

Gensequenz lagen). Der folgende Restriktionsansatz wurde für zwei bis vier Stunden bei 37°C inkubiert und der gesamte Ansatz nach dem Verdau auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Restriktionsansatz:

	Vektor	cDNA-Fragment
DNA	5µg	25µl
Restriktionsenzym I	2,5µl	1µl
Restriktionsenzym II	2,5µl	1µl
10x Puffer	10µl	10µl
100x BSA	1µl	1µl
H ₂ O	ad 100µl	ad 100µl

Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kits“ (Amersham Pharmacia, Freiburg). Für die Ligation wurden 2,5µl geschnittenes, gereinigtes PCR-Fragment („insert“) und 0,5µg geschnittene Vektor-DNA mit Ligase-Puffer und T4-DNA-Ligase gemischt. Als Negativ-Kontrolle sollte ein Ansatz mit H₂O statt PCR-Fragment mitgeführt werden. Der Ligationsansatz wurde bis zu drei Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend in chemisch-kompetente Zellen („One Shot® Top10 competent cells“, Invitrogen) transformiert. Ein Teil des Transformationsansatzes wurde auf LB-Platten mit Kanamycin [50µg/ml] ausgestrichen und nach über Nacht Kultivierung wurden einzelne Klone in 4ml LB-Medium mit Kanamycin überimpft. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht wurde die Plasmid-DNA mit dem „GFX™ Micro Plasmid Prep Kit“ (Amersham Pharmacia, 50µl Elutionsvolumen) isoliert. Zur Kontrolle der Transformation wurde die Plasmid-DNA mit den zur Klonierung benutzten Restriktionsenzymen geschnitten und der Restriktionsansatz auf einem Agarose-Gel analysiert. Das Insert sollte als deutliche Bande auf der erwarteten Höhe erkennbar sein. Als weitere Kontrolle erfolgte eine Sequenzierung des Inserts. Als Sequenzierungs-Primer können sowohl die Mutagenese-Primer als auch T7 und T7-Terminator verwendet werden. Das Protokoll zur Sequenzierung wurde unter Kapitel 3.4 beschrieben.

Das Expressionskonstrukt (pET-30a mit Insert) wurde für die Protein-Überexpression in einen anderen *E.coli* Stamm (One shot® BL21 Star™ (DE3), Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transformiert. Zunächst wurde eine Vorkultur (5ml 2x YT-Medium + Kanamycin) mit einer Einzelkolonie angeimpft und 1ml Vorkultur nach dreistündiger Inkubation bei 37°C in die Hauptkultur (50ml 2x YT-Medium + Kanamycin) überführt. Bei einer OD₆₀₀ von ~0,8 (gemessen gegen Wasser) wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 500µl IPTG [0,1M] induziert. Vom Zeitpunkt der Induktion (= Zeitpunkt 0) an wurde stündlich ein 250µl Aliquot

entnommen, abzentrifugiert (15 Minuten, 5000rpm) und das Zell-Pellet bei -20°C eingefroren. Die Inkubation wurde nach drei bis vier Stunden abgebrochen und die gesamte Kultur ebenfalls abzentrifugiert und das Pellet bei -20°C eingefroren. Als erste Kontrolle der Proteinexpression wurden die Proben-Pellets in $50\mu\text{l}$ Lämmli-Puffer aufgenommen, gemischt, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, abzentrifugiert und $15\mu\text{l}$ der Proben auf ein 10-15%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Als Vergleich wurden 6-10 μl 10kDa Protein-Marker parallel aufgetragen. Das Gel wurde zur Detektion der Proteinbanden mit Coomassie-Blue-Lösung gefärbt.

2x YT-Medium:

16g	Trypton
10g	Hefe-Extrakt
5g	NaCl
ad 1000ml H_2O	

3.13.2. Reinigung von rekombinanten Proteinen aus *E.coli* BL21(DE3)

Die Aufreinigung des Protein-Pellets der Gesamtkultur erfolgte über eine denaturierende Metallchelate-Chromatographie (IMAC) [Porath, 1992]. Diese Methode beruht auf der Komplexbildung eines His-tag-Proteins mit einem Übergangsmetallion, das sehr fest an ein „Harz“ gebunden ist. Durch diese sehr stabile Bindung können die Übergangsmetallionen auch unter extremen Chromatographiebedingungen nicht ausgewaschen werden. Durch die ebenfalls sehr starke Bindung des His-tags an die Metallionen können unspezifisch gebundene Proteine leicht unter relativ stringenten Bedingungen ausgewaschen werden. Die Elution des His-tag-Proteins erfolgt durch einen Imidazol-Gradienten. Bei der Elution mit Imidazol findet eine Verdrängung der His-tag-Proteine durch Imidazol statt, das aufgrund seiner Ähnlichkeit mit den Histidinresten um die Koordinationsstellen konkurriert. Es wurde Talon™ „Metal Affinity Resin“ (Clontech) für die Reinigung verwendet. Das Talon-IMAC-Harz ist ein sehr beständiges und nicht-Nickel-haltiges IMAC-Harz. Talon enthält einen speziellen Polydentat-Metall-Chelator. Dieser Chelator bindet das elektropositive Metallion über vier Koordinationsstellen in einer elektronegativen Tasche. Dadurch wird ein Auswaschen der Metallionen verhindert. Zwei weitere Koordinationsstellen sind frei zugänglich, so dass sie His-tag-Proteine binden können.

Das bei der Expression erhaltene Zell-Pellet wurde für die Lyse mit 10ml Ni-A-Puffer versetzt, 10-15 Minuten resuspendiert und anschließend zur Entfernung der unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (5-10 Minuten, 6000rpm). Bevor mit der Reinigung begonnen

werden konnte, wurden zur Herstellung der Talon-Matrix 1ml Talon™ „Metal Affinity Resin“ (Clontech) abzentrifugiert (zwei Minuten, 3000rpm), der Überstand entfernt und die Talon-Matrix mit 5ml Ni-A-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernen des Überstandes konnte der klare Zellysat-Überstand auf die Talon-Matrix gegeben werden. Um die Bindung der His-tag-Proteine an die Talon-Matrix zu ermöglichen, wurde die Säule zunächst 15-20 Minuten bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert und anschließend abzentrifugiert (zwei Minuten, 3000rpm). Es folgten drei Waschschrte, einmal mit 10ml Ni-A-Puffer und zweimal mit Ni-B-Puffer (10 Minuten, RT; zwei Minuten, 3000rpm). Die Proteine wurden mit einem linearen Imidazol-Gradienten von 2mM-100mM eluiert und das Eluat fraktioniert gesammelt. Abschließend wurde die Talon-Matrix mit 10mM EDTA gespült, um alle restlichen Proteine von der Säule zu waschen. Von jeder Fraktion wurden 15µl mit 3µl Lämmli-Puffer versetzt, auf ein Polyacrylamid-Gel (15%) aufgetragen und durch Coomassie-Färbung detektiert.

Verwendete Lösungen:

Ni-A-Puffer	6M	Guanidiniumchlorid
	0,1M	Na-Phosphat
	10mM	Tris-HCl
	pH 8,0 einstellen, Lösung filtrieren	
Ni-B-Puffer	8M	Harnstoff
	0,1M	Na-Phosphat
	10mM	Tris-HCl
	pH 8,0 einstellen, Lösung filtrieren	

3.13.3. *In vitro* Translation (IVT)

Für die *in vitro* Translation wurde die kodierende Sequenz des SFRP1 cDNA-Klons W21306 amplifiziert und in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His (Invitrogen) kloniert (Klonierungsprimer: SFRP1_protein.forward1: 5'-ggagaacagggcgcagag-3'; SFRP1_protein.reverse1: 5'-cttaaacacggactgaaaggtg-3'; Insertgröße: 965bp). Das Insert wurde ohne das Stopcodon und im gleichen Leserahmen wie das V5-Epitop und der Poly-Histidin-Tag kloniert, um eine spätere Detektion und Reinigung des Proteins zu erleichtern. Da für die Klonierung der pcDNA3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit (Invitrogen) benutzt

wurde, war eine Behandlung mit Restriktionsenzymen oder eine Ligation nicht notwendig. Beim „TA Cloning“ liegt der Vektor als so genannter „aktivierter“ Vektor vor, d.h. in linearisierter Form mit einem 3'-Thymidin (T)-Überhang und kovalent gebundener Topoisomerase. Durch die nicht-Matrizen-abhängige terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase werden an die 3'-Enden der PCR-Produkte (Insert) einzelne deoxy-Adenosine (A) angehängt. Dieses deoxy-Adenosin des Inserts bindet sehr effektiv an den 3'-Thymidin-Überhang des Vektors. Die an den Vektor gebundene Topoisomerase vermittelt die endgültige Ligation zwischen Insert und Vektor und wird gleichzeitig vom Vektor freigesetzt [Shuman, 1994].

Für die IVT wurde das „TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System“ (Promega, Madison, USA) verwendet. Das Prinzip basiert auf dem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat-System [Pelham und Jackson, 1976]. Für die Reaktion wurden 1µg Plasmid-DNA (Expressions-Konstrukt) mit 40µl TNT® Quick Mastermix und 1mM Methionin gemischt; für eine radioaktive Markierung wurde ³⁵S-Methionin [1000Ci/mmol] verwendet. Die RNA-Synthese wird gesteuert von einem Bakteriophagen-Promotor (T7 oder SP6). Die Translation ist hingegen unter eukaryotischer Kontrolle. Für eine optimale Translation wurde das Start-Codon in eine „Kozak-Konsensus-Sequenz“ (A/GCCAUGG) eingebettet, hierdurch wurden störende Sekundärstrukturen verhindert [Kozak, 1986]. Der im Kit von Promega enthaltene Mastermix beinhaltet bereits die RNA Polymerase, Nukleotide, Salze und RNase Inhibitor. Die IVT-Produkte wurden mit PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend fixiert und getrocknet. Durch Belichtung eines Röntgenfilms (Kodak MR, mind. zwei Stunden bei -80°C) konnten die entstandenen Proteine detektiert werden.

3.13.4. Herstellung von polyklonalen Peptidantikörpern

Für die Auswahl geeigneter Proteinbereiche zur Herstellung von synthetischen Peptiden zur Immunisierung von Kaninchen wurden in der Proteinsequenz des Antigens Bereiche ausgewählt, die keine homologen Domänenmotive enthielten und aufgrund ihrer Hydrophobizität vermutlich exponiert vorlagen. Die Peptidsynthese und Kaninchen-Immunisierung wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt. Die verwendeten Antigen-Sequenzen sind in Tabelle 7 gezeigt. In Abb. 9 sind die Positionen der Antigen-Sequenzen im SFRP1-Protein schematisch dargestellt. Außerdem wurde die Lokalisation der Taqman-Sonden eingezeichnet.

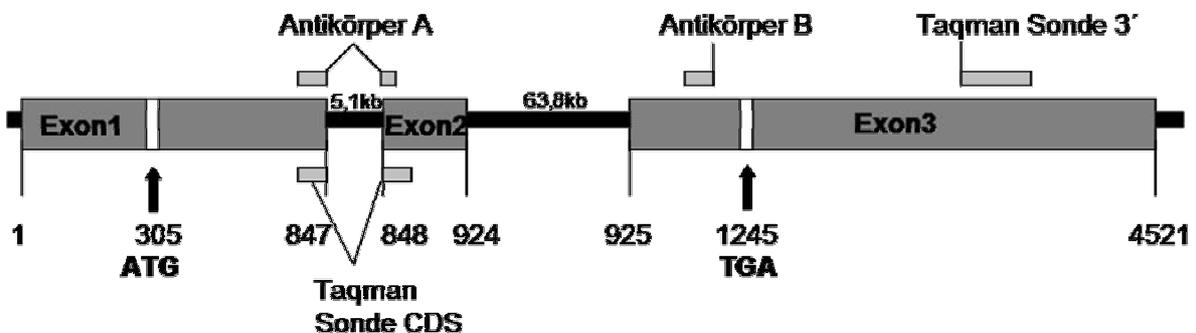


Abb. 9: Genstruktur von SFRP1 und Position der Antigensequenzen und der Taqman-Sonden. Exons 1-3 sind in dunkelgrau dargestellt, die Introns in schwarz. ATG = Startcodon, TGA = Stopcodon.

Tabelle 7: Peptide für die Kaninchen-Immunisierung

Peptidantikörper	Position	Sequenz (NH ₂ – COOH)	Genname	Exon
SFRP1 AKa	171-186	PPNATEASKPQGTTVC	<i>SFRP1</i>	1
SFRP1 AKb	285-299	HKWDKKNKEFKNFM	<i>SFRP1</i>	3

3.13.5. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid durch den Radikalbildner Ammonium-Persulfat (APS) und den Radikalstabilisator N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) entsteht in Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten Acrylamids ein Gel mit unterschiedlichen Porengrößen. Auf das eigentliche Trenngel wird ein schmales Sammelgel gegossen, das die Taschen für den Probenauftrag beinhaltet. Der in diesem Gel verwendete Puffer ist leicht sauer (pH 6,8), während der pH-Wert des Trenngels und Laufpuffers leicht basisch ist (pH 8,8). Bei Anlegen eines Stroms an das Gelsystem laufen die Pufferionen des Sammelgels in Richtung Anode. Bei Eintritt des im

Laufpuffer enthaltenen Glycins in das Sammelgel wird die Aminogruppe zur Ammoniumgruppe protoniert, während die Carboxylgruppe deprotoniert bleibt. Die ausgeglichene Ladung des Glycins bewirkt einen elektrophoretischen Stillstand im Sammelgel. Die vorauslaufenden Ionen des Sammelgels bewirken so einen lokalen Ladungsträgermangel und dadurch einen hohen Widerstand. Bei konstantem Strom führt die erhöhte Feldstärke zu einem schnelleren Lauf der anionischen Proteine, bis diese die vorauslaufende Ionenfront erreichen. Durch diese Aufkonzentration der Proteine im Sammelgel ergeben sie bei ihrer Auftrennung im daran anschließenden Trenngel diskrete scharfe Banden. Durch Zugabe des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und bekommen durch Anlagerung von SDS-Ionen ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis, so dass sie in dem Gel entsprechend ihrer Größe getrennt werden können. Neben selbstgegossenen Gelen wurden Gradientengele der Firma BioRad verwendet (4-15% SDS-Polyacrylamidgel).

Verwendete Lösungen:

4x Sammelgelpuffer: 0,4% SDS; 0,5 M Tris/HCL pH 6,8

4x Trenngelpuffer: 0,4% SDS; 1,5 M Tris/HCl pH 8,8

Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung: 30%/0,8%

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 3,5 mM SDS

	Trenngel 8% (8ml)	Sammelgel 4,5% (3,5ml)
4x Trenngelpuffer	2ml	-
4x Sammelgelpuffer	-	0,83ml
H ₂ O	3,84ml	2,07ml
Acrylamid/Bisacrylamidstammlösung	2,13ml	0,43ml
APS	54µl	40µl
TEMED	2,7µl	3µl

3.13.6. Western-Hybridisierung

Zum Transfer von Proteinen aus dem Gel auf eine PVDF-Membran wurde die Nassblot-Methode verwendet. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol aktiviert, in Wasser gespült und für fünf Minuten mit dem Protein-Gel in Nassblot-Puffer äquilibriert. Die Membran wurde blasenfrei auf das Gel aufgelegt und zwischen zwei getränkten Filterpapieren

zur Kathodenseite in die Transferkammer eingespannt. In die Pufferkammer wurde ein Kühlakku eingehängt und bei 4°C und 100V wurden die Proteine in 90 Minuten vom Gel auf dem Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran in 20ml 5% Trockenmilch/PBST für 60 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde der Primär-Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in 10ml PBST für 90 Minuten zugegeben. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal mit PBST für jeweils 10 Minuten gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit dem Sekundär-Antikörper (anti-Kaninchen IgG; 1:100000 in PBST) für weitere 90 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Waschschrift (3x 10 Minuten, PBST). Während der Inkubations- und Waschschrift wurde die Membran geschwenkt. Für die Signal-Detektion wurde das ECL⁺ System von Amersham Biosciences (Freiburg) oder SuperSignal® von Pierce (Perbio Science, Bonn) nach Angaben der Hersteller benutzt.

3.13.7. Immunzytochemie

Für die Immunzytochemie wurden Zellen in speziellen „Lab-Tek Chamber Slides“ (Nunc GmbH, Wiesbaden) ausgesät und bis zu einer mittleren Dichte (subkonfluent) angezogen. Nach dreimaligem Waschen mit 10mM Tris-HCl + 0,05% Tween 20 (pH 7-8) wurden die Zellen mit 4% PFA für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach Entfernung des Fixierungsmittels wurden die Zellen für 20 Minuten mit 10mM Tris-HCl + 0,05% Tween 20 (pH 7-8) inkubiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase-Aktivität der Zellen durch Behandlung mit 3% H₂O₂ in Isopropanol (maximal 10 Minuten) gehemmt. Nach Rehydrierung der Zellen in einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Objektträger in PBS überführt. Zur Blockierung unspezifischer Wechselwirkungen wurden die Objektträger für fünf Minuten mit einer Protein-Blockierungslösung behandelt (DAKO Diagnostics GmbH, Hamburg). Nach Entfernen der Blockierungslösung wurden die Zellen mit 100µl Primär-Antikörper-Verdünnung für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einem Tropfen des sekundären Antikörpers aus dem „4plus™ Universal Immunoperoxidase Detection System“ (Biocarta, Hamburg) für 10 Minuten inkubiert und danach mit PBS gewaschen. Auf die Zellen wurde ein Tropfen des Tertiärreagenz (Streptavidin-HRP) gegeben, für weitere 10 Minuten inkubiert und nach der Inkubation wie zuvor gewaschen. In jede Kammer des Objektträgers wurde ein Tropfen Färbereagenz gegeben (Romulin AEC Chromogen, Biocarta, Hamburg), die Färbung unter dem Mikroskop verfolgt und mit H₂O abgestoppt. Als Gegenfärbung wurde Hämalaun nach Mayer benutzt. Die Färbung mit 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC) Chromogen ergab ein

orangerotes Färbeprodukt, die Zellkerne erschienen durch die Gegenfärbung blauviolett. Die Objektträger wurden vor dem Eindecken mit Pertex (medite, Burgdorf) in einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt und in Xylol überführt. Als Negativkontrolle wurde jeweils eine Kammer parallel zu den übrigen behandelt, jedoch ohne Zugabe von Primärantikörper. Als Positivkontrolle diente ein Primärantikörper mit bekanntem Färbeargebnis, z.B. Multi-Cytokeratin-Antikörper (polyklonaler Kaninchen-Antikörper, Novocastra, Newcastle, UK).

3.13.8. Immunhistochemie an Paraffin-Schnitten

Die Lokalisation der Proteinexpression im Gewebe wurde durch immunhistologische Färbungen an Paraffinschnitten von Patientengewebe vorgenommen. Dazu wurden spezifische Antikörper auf die Schnitte hybridisiert und durch einen sekundären Antikörper mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion sichtbar gemacht.

Die Paraffinschnitte wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Zusätzlich wurde die endogene Peroxidase-Aktivität durch Behandlung mit 3% H₂O₂ blockiert. Die Antigendemaskierung erfolgte durch Hitze, d.h. die Schnitte wurden 10 Minuten in 10mM Citrat-Puffer (pH 6) in der Mikrowelle gekocht. Die Schnitte wurden nach dem Abkühlen in PBS-Puffer überführt. Als Blockierungslösung wurde Protein-Block von DAKO Diagnostics GmbH (Hamburg) verwendet. Die Schnitte wurden für 60 Minuten mit verdünntem Primär-Antikörper bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach wiederholtem Spülen mit PBS-Puffer wurde der Sekundär-Antikörper („4plus™ Universal Immunoperoxidase Detection System“, Biocarta, Hamburg) zugegeben und 10 Minuten inkubiert. Anschließend folgten ein weiterer Waschschrift mit PBS und die Inkubation mit Streptavidin-Enzym-Komplex. Nicht gebundene Komplexmoleküle wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Die Detektion erfolgte mit AEC Chromogen-Lösung, wie im Kapitel Immunzytochemie beschrieben. Die Färbereaktion wurde mikroskopisch kontrolliert und mit H₂O abgestoppt. Als Negativkontrolle wurde ein Schnitt ohne Primärantikörper bei ansonsten gleicher Behandlung verwendet.

3.13.9. Immunfluoreszenz-Färbung

Eine weitere Methode zur Lokalisation von Proteinen im Gewebe oder in Zellen ist die Immunfluoreszenz. Durch Parallel-Färbungen mit zwei oder mehr Antikörpern kann mit dieser Methode die Lokalisation von verschiedenen Proteinen an der gleichen Probe verglichen werden. Im Gegensatz zur Immunhistochemie sind Sekundär-Antikörper bei dieser

Methode mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, die in unterschiedlichen Frequenzbereichen angeregt werden.

Für die Färbungen von Paraffinschnitten wurden diese, wie im Kapitel Immunhistochemie beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Die Behandlung mit Peroxidase war nicht notwendig, da keine Detektion über Enzymaktivität erfolgte. Die Antigen-Demaskierung erfolgte wie oben beschrieben durch Kochen in Citrat-Puffer. Nach dem Abkühlen der Schnitte und einem Waschschrift in PBS wurden die Schnitte mit normalem Esel-Serum inkubiert (15 Minuten, RT), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Das Serum für die Blockierung sollte von der Spezies stammen aus der die Sekundär-Antikörper gewonnen wurden. Anschließend erfolgte die Hybridisierung, je nachdem ob eine Einzel- oder Doppelfärbung erwünscht war, mit dem Primär-Antikörper oder mit einem Antikörper-Cocktail für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschriften mit PBS wurden der Sekundär-Antikörper oder ein Antikörper-Cocktail zugegeben und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden nach erneutem Waschen mit PBS mit DAPI enthaltendem „Vectashield®“ (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckt. DAPI ist eine Gegenfärbung für die Zellkerne und erleichtert die spätere Auswertung der Fluoreszenz-Färbungen. Für die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die in der folgenden Tabelle genannten Antikörper verwendet.

Tabelle 8: Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbung.

Antikörper	Organismus	Verwendete Konzentration	Hersteller	Färbung
bn42 AkB	Kaninchen	1:50	Eurogentec	Epithel
CD34	Maus	1:50	DAKO	Endothel
CD68	Maus	1:100	DAKO	Makrophagen
Vimentin	Maus	1:100	Santa Cruz	Fibroblasten
Cytokeratin	Maus	1:50	Novocastra	Cytokeratin
E-Cadherin	Maus	1:100	Transduction Lab.	Epithel-Membran
Anti-Kaninchen Alexa-594	Esel	1:200	Molecular Probes	Sekundärer Antikörper
Anti-Maus Alexa-488	Esel	1:200	Molecular Probes	Sekundärer Antikörper

3.13.10. „Tissue Microarrays“ (TMAs)

Der Einsatz von TMAs erlaubt die Hochdurchsatz-Analyse eines Gens oder Proteins an einer großen Anzahl Gewebeproben. Bei der Herstellung eines TMAs werden Gewebestanzungen aus Paraffin-Material im Array-Format in einen Empfänger-Block gebracht. Dieser Block wird anschließend Mikrometer-dünn geschnitten und die Schnitte auf Objektträger gebracht. TMA-Schnitte können sowohl für RNA *in situ* Hybridisierung als auch für immunhistochemische Färbungen verwendet werden, um RNA- oder Protein-Expression zu analysieren. Das Prinzip der TMA-Herstellung ist in Abb. 10 gezeigt. Die in dieser Arbeit verwendeten TMAs wurden in Basel und Regensburg hergestellt und in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. G. Sauter (Universität Basel) und PD Dr. A. Hartmann (Institut für Pathologie, Universität Regensburg) gefärbt und analysiert.

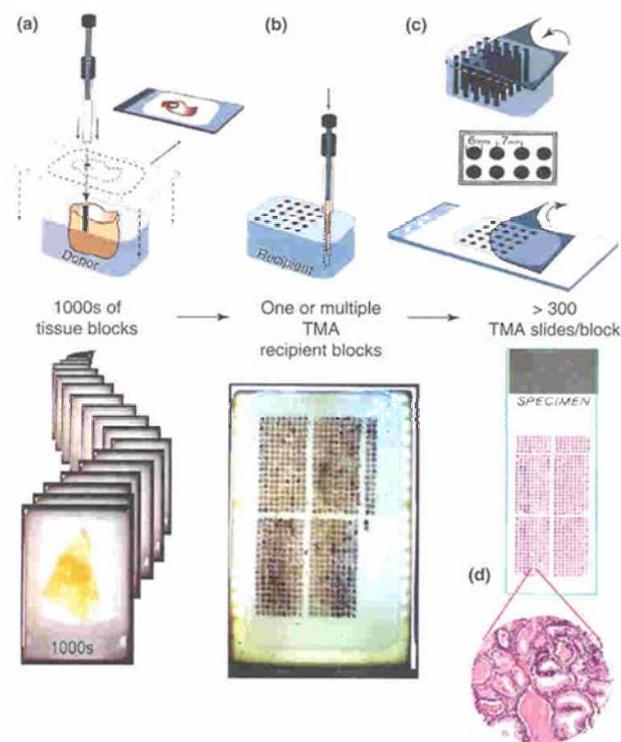


Abb. 10: Prinzip des TMAs. Gewebestanzungen aus in Paraffin eingebetteten Gewebe-Blöcken (a) werden in einen Empfänger-Block transferiert (b). Schnitte vom TMA-Block werden auf Objektträger gebracht (c) und ein Schnitt mit Hämatoxylin/Eosin-gefärbt (d). Dieser Schnitt dient später als Referenz und ermöglicht die bessere Diagnose der Morphologie. Die übrigen TMA-Schnitte stehen für weitere Analysen wie ISH und IHC zur Verfügung (verändert nach [Basik *et al.*, 2003]).

3.14. Zellbiologische Methoden

3.14.1. Zellzahl-Bestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde zunächst das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen durch Zugabe von Trypsin von der Flasche abgelöst und mit Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 700-800rpm für fünf Minuten abzentrifugiert und je nach Pellet-Größe in 5-8ml Medium resuspendiert. Ein Tropfen Zellsuspension wurde in die vorbereitete Neubauer-Zählkammer („Neubauer improved“) gegeben und zwei bis vier Quadrate ausgezählt. Die Summe der Zellen geteilt durch die Anzahl der ausgezählten Quadrate entspricht der Anzahl Zellen $\cdot 10^4$ pro ml Medium.

3.14.2. Mycoplasmen-Test

Mit diesem Test wurden Zellkulturen auf Kontamination mit Mycoplasmen getestet [Chen, 1977]. Die zu testenden Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen in 2-3ml Medium kultiviert (mind. 24h) und durch die Zugabe von ca. 20 Tropfen Fixierlösung (1 Teil Essigsäure + 3 Teile Methanol) für zwei Minuten fixiert. Die Fixierlösung wurde entfernt und die Zellen nach erneuter Zugabe von 3ml Fixierlösung 5-10 Minuten bei Raumtemperatur weiter fixiert. Nach Entfernen der Lösung wurden die Deckgläschen getrocknet und konnten bei Raumtemperatur gelagert oder direkt gefärbt werden. Für die Färbung wurden drei bis vier Tropfen Färbelösung (33258 Hoechst) auf einen sauberen Objektträger gegeben und die Deckgläschen mit den Zellen in die Lösung gelegt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde dreimal mit destilliertem Wasser gespült. Zum Eindecken der Zellen wurde Zitronensäure-haltige Eindecklösung auf einen Objektträger getropft und die Deckgläschen mit den gefärbten Zellen nach unten auf den Objektträger gelegt. Der Fluoreszenzfarbstoff färbt DNA spezifisch an. Bei einer Kontamination mit Mycoplasmen erscheinen diese als fluoreszierende Punkte im Zytoplasma und an den Zellmembranen. Die Auswertung der Färbung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

3.14.3. Proteinüberexpression in humanen Zelllinien

Für die Expression von SFRP1 in humanen Zelllinien wurde der kodierende Sequenzbereich (CDS) des *SFRP1* Gens in einen Expressionsvektor kloniert (Insertgröße: 998bp). Der pEF6/V5-His Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) trägt einen SV40 Replikationsursprung, die Promotor-Region des humanen *EF-1 α* Gens (1,2kb), ein Füllfragment sowie ein Poly-

Adenylierungssignal der humanen G-CSF cDNA [Mizushima und Nagata, 1990]. Für die Selektion der transfizierten Zellen enthält der Vektor das Gen für Blasticidin-Resistenz. Die Struktur des Vektors ist in Abb. 11 dargestellt.

Der Polypeptidketten Elongationsfaktor 1 α (*EF-1 α*) ist das eukaryotische Gegenstück zum *E.coli* EF-Tu welcher die GTP-abhängige Bindung der aminoacyl-tRNA an die Ribosomen unterstützt. EF-1 α ist ein in eukaryotischen Zellen und in fast allen Säugerzellen stark exprimiertes Protein. Die EF-1 α gesteuerte Expression eignet sich besonders für die konstitutive Expression von Proteinen in Epithelzellen wie beispielsweise die in späteren Experimenten verwendeten Brusttumor-Zelllinien.

Klonierungsprimer:

SFRP1_BamHI.s1: 5'-ATGGAAGGATCCGACGTCGCGGAGAACAGGG-3',

SFRP1_EcoRI.r1: 5'-GGGCGCGAATTCGGAGAATCACTTAAACACGGACTG-3'

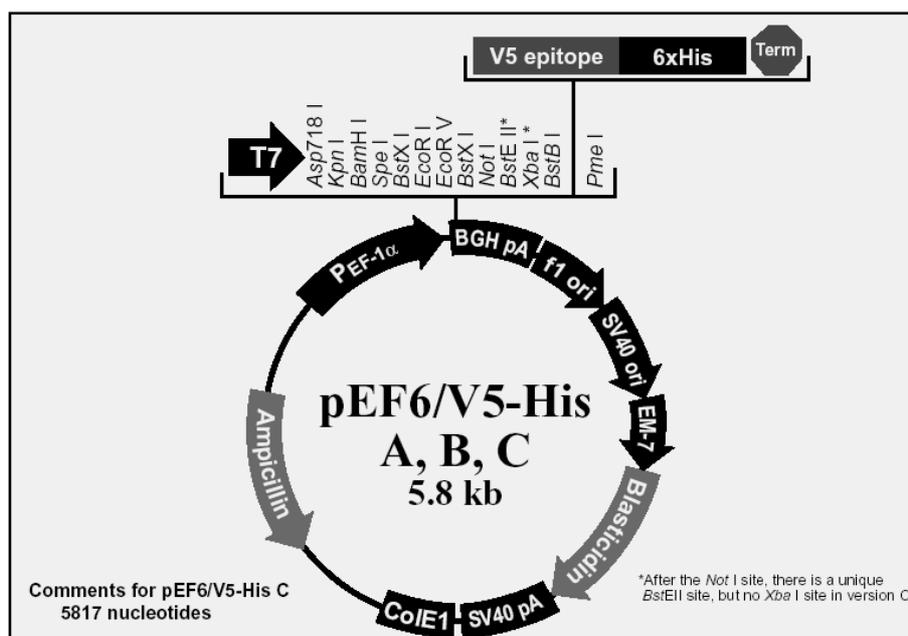


Abb. 11: Vektorkarte von pEF6/V5-His der Firma Invitrogen. Sequenzdaten dieses Vektors sind verfügbar unter der Internet-Adresse <http://www.invitrogen.com>.

3.14.4. Transfektion

Die Transfektion wurde mit FuGENE6 Transfektionsreagenz (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, USA) durchgeführt. Die Reaktion basiert auf dem Prinzip der Lipid-basierten Transfektion, bei der DNA von Lipid-Partikeln umschlossen und so in die Zelle transportiert wird. Bei der Durchführung der Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 50-80% aufweisen. Das Transfektionsreagenz wurde zunächst mit serumfreiem Medium gemischt, hierfür wurden 6µl FuGENE-Reagenz direkt in das Medium pipettiert. Die Plasmid-DNA (1-2µg), die das zu exprimierende Gen trägt, wurde mit dem verdünnten FuGENE-Reagenz vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur für mindestens 15 Minuten inkubiert. Während dieser Inkubationszeit bilden sich die DNA-Lipid-Komplexe aus. Die Lösung wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und die Zellen für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt. Die Zellen wurden nach der Transfektion entweder direkt für Assays oder Lysat-Herstellung benutzt oder durch Zugabe von Antibiotikum entsprechend der auf dem Expressionsvektor liegenden Resistenz selektioniert, z.B. Blastocidin bei pEF6-Vektor. Die Transfektionseffizienz konnte durch parallele Transfektion mit einem EGFP-Konstrukt kontrolliert werden. Die erfolgreich transfizierten Zellen fluoreszieren nach 24-48 Stunden grün, wenn sie bei 489nm angeregt werden.

3.14.5. Stabile Transfektion

Zur Etablierung stabil transfizierter Klone wurden die Zellen nach der Transfektion zunächst in Selektionsmedium kultiviert bis sich Kolonien gebildet hatten (12-13 Tage). Einzelne Kolonien, die genügend Zellen enthielten und genügend Abstand zu den Nachbar-Kolonien hatten, wurden für die Isolierung ausgewählt und markiert. nach dem Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS wird ein am unteren Ende mit Paraffin beschichteter Metall-Hohlzylinder über eine ausgewählte Kolonie gesetzt. Anschließend wurden 5-10 Tropfen Trypsin in den Zylinder gegeben und sobald die Zellen sich abgerundet haben, wurden sie mit etwas Medium in eine kleine Kulturflasche (T12,5 mit 2ml Selektionsmedium) überführt. Die Zellen sollten nach 24h unter dem Mikroskop kontrolliert werden, je nach Proliferationsrate wurden die Kulturen nach 48-72h in größere Kulturflaschen (T25 mit 5 ml Selektionsmedium) umgesetzt. Wenn die Zellen konfluent waren, wurden sie in T75-Kulturflaschen mit 10ml Selektionsmedium überführt und konnten anschließend für funktionelle Assays oder zur Herstellung von Zell-Lysaten verwendet werden.

3.14.6. Herstellung von Zell-Lysaten

Zur Herstellung von Zell-Lysaten wurde ein NP40-haltiger Lysis-Puffer verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mehrfach mit kaltem PBS-Puffer gespült. Nach der Zugabe des Lysis-Puffers konnten die Zellen mit einem Schaber abgekratzt werden. Pro Kulturschale (\varnothing 10cm) wurden bei konfluenten Zellen 500 μ l Lysis-Puffer zugegeben. Das Lysat wurde mehrmals auf- und abpipettiert und anschließend in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Nach zwei Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugieren entfernt und die Lysate konnten bis zur Benutzung bei -20°C gelagert werden. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Kit von Pierce (Perbio Science, Bonn) bestimmt.

NP40-Lysis-Puffer:	25mM	Tris-HCl (pH7,6)
	1%	NP-40 (IPEGAL, Sigma)
	150mM	NaCl
	1mM	EDTA
	1mM	DTT
	1mM	Na ₃ VO ₄
	1mM	Proteinaseinhibitor (Complete, Roche)

Proteinaseinhibitor und Na₃VO₄ wurden jeweils vor Gebrauch frisch zugesetzt.

3.14.7. Proliferations-Assay

Für die Bestimmung der Proliferation von Zellen wurde der „Cell Proliferation Kit II“ der Firma Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, USA) verwendet. Die Reaktion beruht auf der metabolischen Umwandlung des Tetrazoliumsalzes XTT (Natrium-3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxy-6-nitro)-benzen-Schwefelsäurehydrat) in Formazan (s. Abb. 12). Lebende, stoffwechselaktive Zellen spalten durch mitochondriale Dehydrogenasen das gelbe Tetrazoliumsalz XTT und es entsteht der orange-farbige Farbstoff Formazan. Formazan ist wasserlöslich und kann im ELISA-Gerät bei einer Wellenlänge von 450-500nm direkt spektrophotometrisch quantifiziert werden.

Das XTT-Färbereagenz (5ml) wurde mit 100 μ l Elektronen-Kopplungsreagenz (1,25mM N-methyl-dibenzopyrazinmethylsulfat, PMS) gemischt. Die Zellen waren für den Assay in einer 96-well Platte ausgesät worden, jeweils 500 Zellen in 150 μ l Medium pro Well. Zu den Zellen wurden je 75 μ l XTT gegeben und für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte

die Messung im ELISA Reader bei 450-550nm und einer Referenzwellenlänge >650nm.

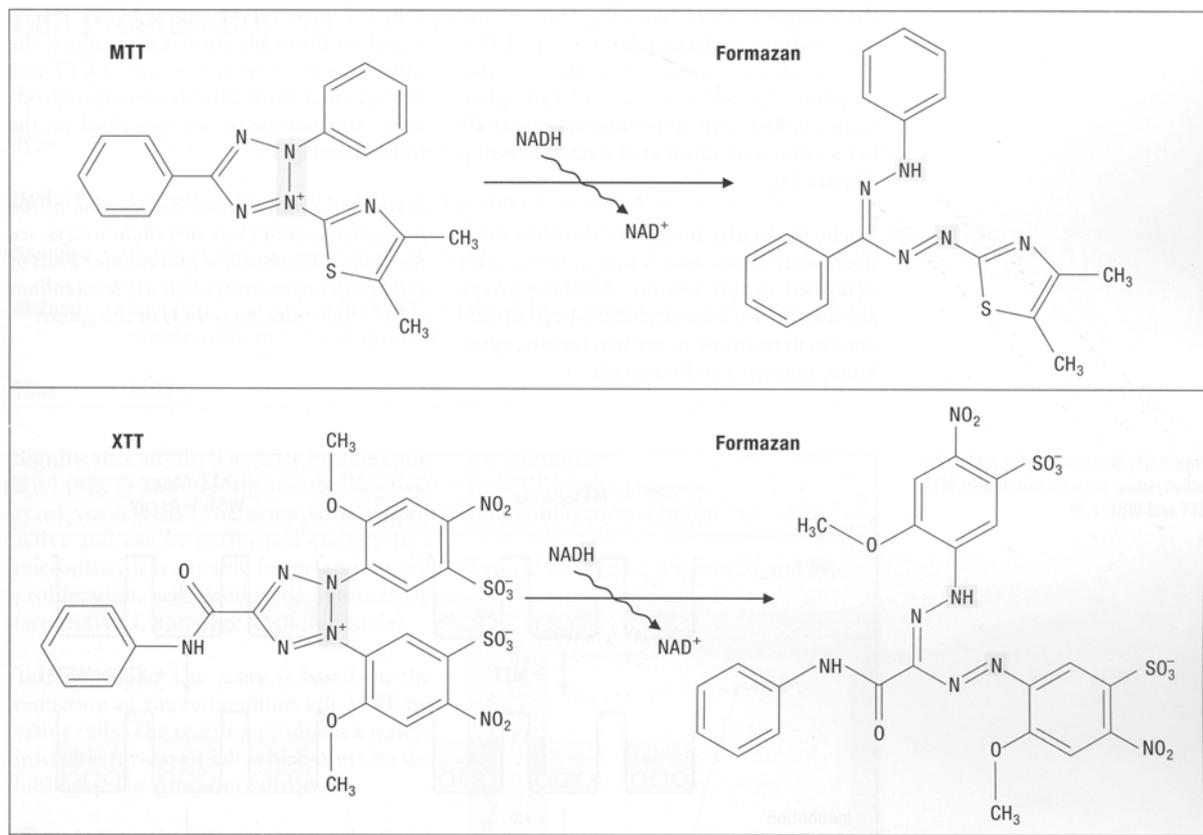


Abb. 12: Molekulare Struktur von MTT und XTT und ihre entsprechenden Reaktionsprodukte (Formazane).

3.14.8. Poly-HEMA-Assay

Mit Hilfe des polyHEMA-Assays kann das Verankerungs-unabhängige Wachstum von transformierten Zellen gemessen werden [Fukazawa *et al.*, 1995]. Adhärent wachsende Zellen sind auf die Verankerung an eine ECM angewiesen, um zu überleben. Neoplastische Zellen verlieren die Abhängigkeit von der Matrix-Verankerung. Für den Assay wurden 96-well Platten mit poly-2-Hydroxyethyl-methylacrylat (polyHEMA; 5mg/ml in 95% Ethanol) beschichtet. In jedes Well wurden 75µl polyHEMA-Lösung pipettiert. Die äußeren Wells wurden hierbei nicht beschichtet, da dort im späteren Experiment die Gefahr des Austrocknens besteht. Die beschichteten Platten wurden für mindestens drei Tage bei 37°C getrocknet und konnten anschließend bei Raumtemperatur für mehrere Wochen gelagert werden.

Für den Assay mussten die Zellen auf eine Konzentration von 1000-3000 Zellen/150µl Medium verdünnt werden. Die Zellen sollten in der Suspension als Einzelzellen vorliegen. Die Suspension wurde in die beschichteten Wells gegeben und vorsichtig über die Oberfläche verteilt. Wells, die nur Medium enthielten, dienten als Kontrolle. Transformierte Zellen

wachsen auf polyHEMA als dreidimensionale Konglomerate. Die Proliferation der Zellen wurde mit XTT gemessen, wie im Kapitel Proliferations-Assay (3.14.7) beschrieben.

3.14.9. Adhäsions-Assay

Epithelzellen sind über Adhäsionsmoleküle mit Nachbarzellen und der extrazellulären Matrix verbunden. Um die Adhäsionsfähigkeit von Zellen zu bestimmen, wurde ein Adhäsions-Assay durchgeführt. Hierzu erfolgte eine Beschichtung von 6-well Platten mit Matrigel [10µg/ml] (Becton Dickinson, Bedford, USA) eine Substanz, die aus EHS Maus-Tumoren gewonnen wird und eine extrazelluläre Matrix simuliert. Auf diese Matrix wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Das Medium mit den nicht-adhären Zellen wurde anschließend entfernt und die Wells mit PBS gespült. Nach Fixierung der adhären Zellen mit 2% Essigsäure (in Ethanol) für 10 Minuten bei Raumtemperatur, wurden die Zellen mit 0,1% Kristallviolett 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit H₂O bidest. gewaschen und getrocknet. Der Farbstoff wurde mit 10% Essigsäure aus den Zellen gelöst (fünf Minuten, Raumtemperatur) und je 200µl wurden in ein Well einer 96-well Platte überführt. Die Extinktion wurde bei 562nm im ELISA-Gerät gemessen (Referenzwellenlänge 690nm).

3.14.10. Invasions-Assay

Damit ein Tumor Metastasen bilden kann, müssen die Tumorzellen in der Lage sein die Basalmembran zu infiltrieren und zu durchwachsen. Diesen Prozess bezeichnet man als Invasion. Mit Hilfe des Matrigel-Invasions-Assays können Mechanismen, die an der Tumor- und Endothelzell-Invasion beteiligt sind, untersucht werden [Albini *et al.*, 1987]. Die Invasivität wurde im Zwei-Kompartiment „Boyden chamber“ (8µm Poren; Transwell, Corning, USA) gemessen [Reפש, 1989]. Der Aufbau dieses „Boyden chambers“ ist in Abb. 13 schematisch dargestellt.

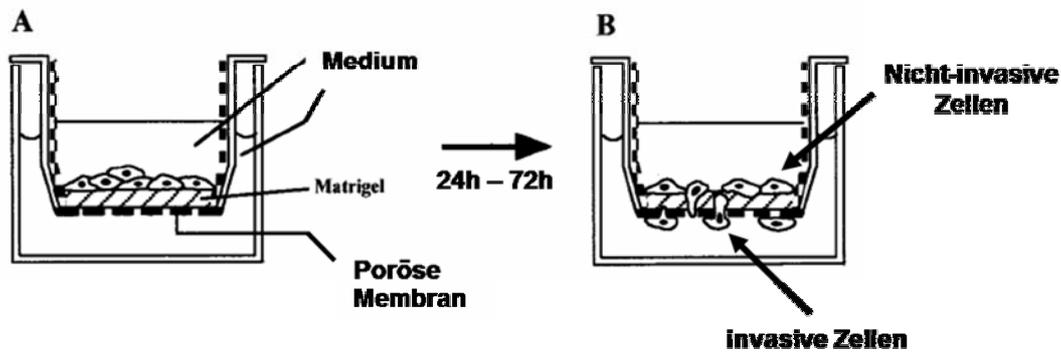


Abb. 13: Schematische Darstellung eines „Boyden Chambers“ zur Bestimmung des Migrations- bzw. Invasionsverhaltens von Zellen. A: Die Zellen wurden zu Beginn des Experiments in die obere Kammer des „Boyden-Chambers“ auf die mit Matrigel beschichtete poröse Membran gegeben. B: Nach einer Inkubation von 24h – 72h wanderten die invasiven Zellen durch die Matrigel-Schicht auf die Unterseite der Membran.

Die poröse Membran wurde mit 675µl Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, USA) beschichtet. Die Beschichtung simulierte die Basalmembran. In beide Kompartimente wurde Medium gegeben (1,5ml bzw. 2,5ml) und $1 \cdot 10^5$ Zellen in das obere Kompartiment ausgesät. Die Anzahl der nicht-invasiven Zellen auf der Oberseite der Membran und der invasiven Zellen auf der Unterseite wurde mit Hilfe eines kolorimetrischen Tests mit MTT-Tetrazoliumsals gemessen [Imamura *et al.*, 1994]. Die Struktur von MTT und dem aus der Umwandlung resultierenden Formazan ist in Abb. 12 dargestellt. In beiden Kompartimenten wurde MTT zugegeben (1mg/ml oberes Kompartiment; 0,5mg/ml unteres Kompartiment) und der Ansatz für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen aus dem oberen und unteren Kompartiment getrennt isoliert und das Formazan-Präzipitat mit jeweils 150µl DMSO aus den Zellen gelöst. Die Absorption wurde bei 562nm (Referenzwellenlänge 690nm) gemessen. Der Anteil invasiver Zellen berechnete sich aus dem Quotienten von invasiven Zellen und der Gesamtzellzahl (invasive + nicht-invasive Zellen).

3.15. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der TMA-Färbung erfolgte mit der Software SPSS Version 10.0 (SPSS Software GmbH, München). Um die Korrelation zwischen der Expression des Kandidatengens und anderen prognostischen Faktoren bzw. klinischen Parametern zu bewerten, wurden der Fisher Exakt-Test und der Chi-Quadrat-Test benutzt. Für die Überlebensanalyse wurden die Daten mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode ausgewertet. Mit Hilfe des Log-Rang-Tests konnten die errechneten Kaplan-Meier-Überlebenskurven miteinander verglichen werden. Zur Identifizierung von unabhängigen Prognose-Parametern wurde eine multivariate Überlebensanalyse anhand von Cox-Regressions-Modellen durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet.