

C Material und Methoden

C.1 <i>IN VITRO</i>	23	C.2.4 <i>in vivo</i> -Statistik	C.4.3 molekularbiol. Statistik
C.1.1 Material und Geräte		C.3 Proteinbiochemie	33
C.1.2 Zelllinien und allgemeine Kulturbedingungen		C.3.1 Material und Geräte	C.5 Pathohistologie
C.1.3 Proliferationstest		C.3.2 Proteinbestimmung	44
C.1.4 <i>in vitro</i> -Statistik		C.3.3 ER und PgR	C.5.1 Material und Geräte
C.2 <i>IN VIVO</i>	30	C.3.4 EGFR	C.5.2 Probengewinnung
C.2.1 Material und Geräte		C.3.5 Cyclin D1 und p21	C.5.3 HE-Färbung
C.2.2 Tiere, Haltung und Fütterung		C.3.6 proteinbiochem. Statistik	C.5.4 Immunhistochemische Färbungen (ER α /Ki-67)
C.2.3 Tumormodelle		C.4 Molekularbiologie	42
		C.4.1 Material und Geräte	C.5.5 Apoptose-Färbung
		C.4.2 Zellzyklusanalyse	C.5.6 pathohistolog. Statistik

C.1 *IN VITRO*-Tumorzellwachstum

C.1.1 Material und Geräte

Verbindungen:

Ethanol absolut, (#1.00983, Fa. Merck, Darmstadt)

ZK 156901 entspricht ICI 182,780, (Hersteller: Fa. Schering AG, Berlin)

ZK 183823 entspricht 4-Hydroxy-Tamoxifen, (Hersteller: Fa. Schering AG, Berlin)

ZK 191703, (Hersteller: Fa. Schering AG, Berlin)

ZK 5018 entspricht 17 β -Estradiol, (Hersteller: Fa. Schering AG, Berlin)

Zellkulturmedien und -zusätze:

Aktivkohle pro analysi, (#102186, Fa. Merck, Darmstadt)

DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*), (# F0415, Fa. Biochrom, Berlin)

DMEM / Ham's F12 (1:1), (#F4815, Fa. Biochrom, Berlin)

DMSO Dimethylsulfoxid, (#D-2650, Fa. Sigma, München)

FCS (*fetal calf serum*), (#10099-158, Fa. Gibco BRL, Paisley- Schottland)

Insulin, (#I-6634, Fa. Sigma, München)

ITS (Insulin-Transferrin-Sodium-Selenit), (#I-1884, Fa. Sigma, München)

L-Glutamin, (#25030-024, Fa. Gibco BRL, Paisley- Schottland)

MEM (Modified Eagle Medium) EARLE, (#FG0325, Fa. Biochrom, Berlin)

PBS (*Phosphate buffered Saline*) w/o Ca²⁺, Mg²⁺, (#L1825, Fa. Biochrom, Berlin)

RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) -1640 w/o Phenolrot, (#F1275, Fa. Biochrom, Berlin)

Trypsin/EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) 0,05%/0,02%, (#L2143, Fa. Biochrom, Berlin)

Zellkulturgefäße:

96-well Platten Costar® (#3595, Fa. Corning, New York, USA)

Filtrationsgerät Nalgene® (1000ml), (#167-0020, Fa. Nunc, Wiesbaden)

Kryoröhrchen 1,2 ml, (#E308.1, Fa. Carl Roth, Karlsruhe)
Zellkulturflaschen (25, 75, 162, 225 cm²), (Fa. Costar, New York, USA)
Zentrifugenröhrchen (50 ml), (#38008, Fa. Renner, Dannstadt)

Pipettenspitzen:

Eurotips (10-1000 µl), (Fa. Eppendorf, Hamburg)
Stripetten (5-100 ml), (Fa. Costar, New York, USA)

Substanzen zur Zellzählung:

AlamarBlue, (#DAL1100, Fa. Biosource Int., QCR, Keystone)
Crystal violet 96%, (#86,099-9, Fa. Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA)
Essigsäure 100%, (#100063, Fa. Merck, Darmstadt)
Glutardialdehydlösung 25%, (#104239, Fa. Merck, Darmstadt)
Trypanblau 0,5%, (#L6323, Fa. Biochrom, Berlin)

Geräte:

Brutschrank HERAcell®, (Fa. Heraeus, Hanau)
Einfrierautomat Kryo 10 series®, (Fa. Planer Biomed)
Fluoreszenzphotometer CytoFluor™2350 (Fa. Millipore, Bedford, MA)
Laminar Flow Box HERAsafe®, (Fa. Heraeus, Hanau)
Magnetrührer Combimag RCT®, (Fa. IKA-Werke, Staufen)
Mehrkanalpipette Micronic® (25-200µl), (Fa. Eppendorf, Hamburg)
Neubauer Zählkammer, (Fa. Brand)
Schüttler TITRAMAX 1000, (Fa. Heidolph, Schwabach)
Spektralphotometer Rainbow®, (Fa. TECAN, Crailsheim) + SoftwareTECAN easyBASE
Ultrazentrifuge L-60, (Fa. Beckman, München) + TI 50- Rotor
Umkehrmikroskop Axiovert 25, (Fa. Zeiss, Göttingen)
Wasserbad Julabo 20B®, (Fa. Julabo)
Zentrifuge Megafuge 1,0R (Fa. Heraeus, Hanau) + Rotor Sepatech® #2705

C.1.2 Zelllinien und allgemeine *in vitro*-Kulturbedingungen*Herkunft und Kulturbedingungen der humanen, endometrialen Adenokarzinomzelllinien*

Alle in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien stammen aus humanen, endometrialen Adenokarzinomen und wachsen adhärent als Monolayerschicht in den Kulturgefäßen (Tab.2).

Tab.2 Humane Endometrium-Adenokarzinomzelllinien, ihre Herkunft und *in vitro*-Kulturbedingungen

Zelllinien	ECC-1	Ishikawa	MFE-296	MFE-280	MFE-319	KLE
Herkunft	Prof. W. A. Toscano Jr, Minneapolis	Schering AG, Berlin	DSMZ*	DSMZ*	DSMZ*	ATCC**
Generationszeit [h]	43 h	27 h	27 h	80 h	54 h	54 h
Aussaat in T75cm² [Zellen]	2 x 10 ⁶	0,8 x 10 ⁶	0,6 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶
Medium	DMEM, 5% FCS, 1% L-Glutamin, 170mU/ml Insulin (modifiziert nach Ricci et al. 1999)	DMEM, 10% FCS, 1% L-Glutamin (modifiziert nach Lessey et al. 1996)	RPMI-1640 / MEM EARLE (1:1), 10% FCS, 0,5% L- Glutamin, 1% ITS (gemäß DSMZ*)			DMEM/Ham's F12 (1:1), 10% FCS, 1% L-Glutamin (gemäß ATCC**)

*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig)

** *American Type Culture Collection* (Rockville, MA)

Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde zur Etablierung des *in vitro*-Proliferationstests als Modellzelllinie verwendet. MCF-7 wurde aus dem Pleuraexsudat einer 69-jährigen Patientin mit disseminiertem Mammakarzinom etabliert (Soule et al. 1973). Das Wachstum dieser ER-positiven Zellen (Brooks et al. 1973) wird durch Estrogene stimuliert und ist mit partial-agonistischen und reinen AE inhibierbar (Lippman et al. 1976, Wakeling et al. 1991). Die Zellen, von denen 1×10^6 Zellen in einer 75 cm²-Kulturflasche (T75) ausgesät werden, benötigen zur Kultivierung Medium, bestehend aus RPMI 1640 w/o Phenolrot, 1% L-Glutamin, 200mMol Insulin/ml und 10% fetalem Kälberserum.

Allgemeine in vitro-Kulturbedingungen

Die Zellen werden im Brutschrank unter sterilen Bedingungen bei 37°C, wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5% CO₂ kultiviert. Alle drei bis vier Tage findet ein Mediumwechsel statt. Zellen, die in der Zellkulturflasche zu 80-90% konfluent gewachsen sind, werden passagiert. Zur Passage werden die Zellen nach Entfernung des Mediums und kurzem Waschen mit PBS in einer zweiminütigen Inkubation mit 2-4 ml Trypsin/EDTA von den Zellkulturflaschen abgelöst. Die Zugabe von 2 ml fetalem Kälberserum (FCS) stoppt diesen Prozeß. Das nach Zentrifugation (5 min. bei 800 UpM, RT) gewonnene Zellpellet wird in frischem Medium resuspendiert. 20 µl der Zellsuspension werden mit Trypanblau zur Vitalfärbung in einem Verhältnis von 1:5 gemischt. Die Zahl lebender Zellen wird unter dem Mikroskop in einer Zählkammer ermittelt. Neue 75 cm²-Kulturflaschen werden mit 10 ml Medium vorgelegt und 0,6-2,0 x 10⁶ Zellen pro Flasche ausgesät. Bei Verwendung von größeren Kulturflaschen werden entsprechend mehr Zellen ausgesät. Das Einfrieren von Zellen erfolgt nach Resuspension des Zellpellets in 4°C kaltem Einfriermedium (80% RPMI-1640, 10% DMSO, 10% FCS). Die Zellsuspension wird in 1 ml-Kryoröhrchen zu 2,3-2,8 x 10⁶ Zellen/ml aliquotiert und in dem Einfrierautomaten tiefgefroren. Hierzu werden die Zellen bei einer Abkühlungsrate von 5°C pro Minute auf 4°C runtergekühlt. Diese Temperatur bleibt für zehn Minuten konstant. Bei einer Abkühlungsrate von 2°C pro Minute werden die Zellen auf -8°C abgekühlt und für fünf Minuten bei dieser Temperatur belassen. Bei einer Abkühlungsrate von 1°C pro Minute werden die Zellen anschließend auf -120°C gekühlt. Nach weiteren zwei Stunden bei -120°C werden die Zellen in -180°C kaltem, flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Zur Rekultivierung werden die Zellen in den Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und die Suspension in eine mit 10 ml Medium vorgelegte 75 cm²-Kulturflasche gegeben. Der erste Mediumwechsel erfolgt nach 24 Stunden. Zur Herstellung von estrogenfreiem Serum, auch *Charcoal stripped* FCS (=CCS) genannt, werden 500 ml FCS mit 5 g Aktivkohle für

eine Stunde auf dem Magnetrührer vermennt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Zentrifugation (30 min. bei 40.000 UpM, 4°C) wird das Serum steril filtriert und als Aliquots bei -20°C gelagert.

C.1.3 In vitro-Proliferationstest für endometriale Adenokarzinomzellen

Die Bestimmung der *in vitro* Tumorzellproliferation in 96-Lochplatten wird nach einer modifizierten Methode von Kueng et al. 1989 durchgeführt.

Bestimmung der Zellzahl für den in vitro-Proliferationstest

Für jede Zelllinie muß separat eine Wachstumskurve erstellt werden. An dieser Wachstumskurve wird die optimale Zellzahl pro Loch einer 96-Lochplatte für den Beginn eines Wachstumsversuches bestimmt. In die Löcher einer 96-Lochplatte werden Zellen unterschiedlicher Zellzahl 8-fach in jeweils 200 µl Medium ausplatiert. Zur Leerwertmessung wird 200 µl Medium in die Löcher pipettiert. Nach 24 Stunden, in denen die Zellen adhäreren, wird das Medium gewechselt und die erste Platte gemessen. An darauffolgenden Tagen wird je eine weitere Platte gemessen. Ein Mediumwechsel erfolgt am dritten Tag. Für jede Startzellzahl wird eine Kurve, bestehend aus den pro Tag ermittelten Medianwerten der Leerwert-korrigierten Extinktionsmeßwerten, in einer Grafik dargestellt.

Stimulierung und Inhibition der Proliferation von endometrialen Adenokarzinomzellen in vitro

Durch Zugabe von E₂ in verschiedenen Konzentrationen wird ein eventuell estrogenabhängiges Zellwachstum untersucht. In weiteren Versuchen wird die Eigenschaft von AE untersucht, das estrogenstimulierte Zellwachstum zu inhibieren. Dazu werden die Zellen drei Tage vor Versuchsbeginn in phenolrotfreiem RPMI-1640 Medium mit CCS und den für die einzelne Zelllinie beschriebenen Zusätzen (C.1.2) kultiviert. Am Versuchstag erfolgt in einer 96-Lochplatte die Aussaat der Zellen in der jeweils optimalen Zellzahl in 200 µl Medium pro Loch. In die Löcher zur Leerwertmessung wird Medium pipettiert. 24 Stunden später— nach erfolgter Adhäsion der Zellen— wird das Medium unter Beifügung der zu testenden Substanzen gewechselt. Die Testsubstanzen sind als Stammlösung in Ethanol (ETOH) gelöst. Sie werden in einer solchen Konzentration zugegeben, dass eine Ethanolendkonzentration von 0,1% bei Versuchen zur Wachstumsstimulierung und von 0,2% bei Wachstumshemmung nicht überschritten wird. Eine weitere mit Zellen ausgesäte 96-Lochplatte wird zu diesem Zeitpunkt für

die Startzellzahl (Nullplatte) gemessen. Die Versuchsdauer beträgt 5-7 Tage mit einem Mediumwechsel nach drei Tagen. Der Versuch wird beendet, wenn Zellen, die mit 10^{-10} M E_2 inkubiert wurden, zu 80-90% konfluent gewachsen sind.

Messung mit AlamarBlue

Diese indirekte Methode der Zellzahlbestimmung beruht auf dem Reduktionspotential stoffwechselaktiver Zellen. Wachsende Zellen sind metabolisch aktiv und reduzieren oxidierte Stoffe in ihrer Umgebung. AlamarBlue enthält den REDOX-Indikator Resazurin, der in oxidiert Form blau ist und sich in reduzierter Form (Resorufin) rot färbt. Dem Medium zugesetzt wird Resazurin je nach Stoffwechselaktivität und damit Wachstumsaktivität der Zellen reduziert. Dieser Farbumschlag läßt sich am Fluoreszenzmeßgerät messen (Lancaster and Fields 1996). Bei Versuchsende werden 25 µl AlamarBlue pro Loch hinzugegeben und die Zellen für weitere vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Bei einer Wellenlänge von 530/590 nm wird die Fluoreszenz in den einzelnen Löchern gemessen.

Messung mit Kristallviolett

Bei dieser Methode wird die DNA im Zellkern durch Kristallviolett (N-hexamethylpararosanilin) angefärbt (Wakelin et al. 1981). Die Intensität der Blaufärbung, abhängig von der Menge an DNA gebundenen Kristallvioletts, wird am Spektralphotometer quantifiziert. Die Extinktionswerte entsprechen also der DNA-Menge und somit der Zellkernmenge und werden als indirekter Parameter der Zellzahl gleichgesetzt (Gillies et al. 1986). Bei dieser Messmethode werden die Zellen am Versuchsende mit 25 µl Glutardialdehydlösung (11%) pro Loch für 20 Minuten bei RT bei leichtem Schütteln fixiert. Die Platte wird ausgeschlagen, dreimal unter fließendem, entsalzten Wasser (VE-Wasser) gewaschen und luftgetrocknet. 100 µl Kristallviolett (0,1% in VE-Wasser, pH 4,5) werden pro Loch auf die fixierten Zellen pipettiert und 20 Minuten bei RT geschüttelt. Nach erneutem Waschen und Lufttrocknen werden je Loch 100 µl Essigsäure (10%) hinzugegeben, kurz geschüttelt und die Extinktion bei 595 nm am Spektralphotometer gemessen (Kueng et al. 1989).

C.1.4 Auswertung und Statistik des *in vitro*-Proliferationstests für endometriale Adenokarzinomzellen

Die Versuche werden mindestens dreimal durchgeführt, ausgewertet und in Grafiken dokumentiert. Die Kurvenpunkte in der Grafik geben die Medianwerte der Leerwert-korrigierten Messwerte jeder Gruppe an. Von jedem Median wird das 25%- und 75%-Quantil berechnet

und eingezeichnet. Zusammenfassend werden die prozentualen Wachstumsraten der Versuchsgruppen eines repräsentativen Beispiels in einer grafischen Darstellung gezeigt. Das prozentuale Wachstum wird nach der Formel des *National Cancer Institute* (Frederick, MD-USA) berechnet (Boyd and Paull 1995).

$$[(X-X_0)/(X_K-X_0)]*100$$

mit X = Extinktion der Testsubstanz
 X₀ = Extinktion der Nullplatte
 X_K = Extinktion des Kontrollwachstums

Alle Berechnungen werden mit Microsoft Excel© Version '98 durchgeführt. Es wird definiert, dass eine Stimulation des Zellwachstums durch E₂ dann vorhanden ist, wenn erstens keine Überlappung der Medianwerte der Behandlungsgruppen bei 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁹ M und 10⁻⁸ M mit dem Medianwert der ETOH-Kontrolle auftritt. Die 25%- und 75%-Quantile der Medianwerte der Behandlungsgruppen dürfen sich ebenfalls nicht mit denen der ETOH-Kontrolle überlappen. Zweitens müssen diese E₂-Medianwerte mit steigender Konzentration einen linear ansteigenden, linear abfallenden oder waagerechten Verlauf zueinander haben. Der Medianwert bei 10⁻⁹ M E₂ darf nicht unterhalb der Werte von 10⁻¹⁰ M und 10⁻⁸ M liegen. Das Wachstum muß drittens bezogen auf das unstimulierte Wachstum bei mindestens einem dieser Meßpunkte größer als 20% sein. Bei geringem Zellwachstum im Versuchsverlauf — die Medianwerte liegen unterhalb einer optischen Dichte (OD) von 1,2 — müssen alle drei Kriterien erfüllt sein, damit das Zellwachstum als estrogenstimuliert definiert wird. Bei starkem Zellwachstum — die Mediane liegen oberhalb 1,2 OD — reicht die Erfüllung zweier Kriterien aus. Eine Hemmung des estrogenstimulierten Zellwachstum durch AE ist dann vorhanden, wenn ETOH- und E₂-Kontrolle einen Mindestabstand von 0,1 OD haben. Zweitens muß der Verlauf der Kurve aus den Medianwerten ab Wachstumshemmung tendenziell absteigend sein. Wenn die Medianwerte von ETOH- und E₂-Kontrolle einen größeren Abstand als 0,2 OD zueinander haben, dann dürfen sich drittens 25%-Quantil des E₂-Medianwertes und 75%-Quantil desjenigen Behandlungsmedianwertes nicht überlappen, bei dem das Zellwachstum gehemmt wird. Es handelt sich um eine deutliche Wachstumsinhibition, wenn bei einer AE-Konzentration von 10⁻⁸ M der Medianwert der ETOH-Kontrolle unterschritten wird.

C.2 *IN VIVO*-Tumorwachstumsmodelle

C.2.1 Material und Geräte

Verbindungen/ Lösungsmittel:

Erdnußöl Arachidis Oleum®, (#400362, Fa. BUFA, Uitgeest-Holland)

Ethanol absolut, (#1.00983, Fa. Merck, Darmstadt)

Raloxifen, (Hersteller: Fa. Schering AG, Berlin)

Tamoxifen, (#T-5648, Fa. Sigma, München)

ZK 156901 entspricht ICI 182,780, (Hersteller: Fa. Schering AG, Berlin)

ZK 191703, (Hersteller: Fa. Schering AG, Berlin)

60 Tage-Pellets der Fa. Innovative Research of America, Sarasota- Florida:

17 β -estradiol (0,36 mg/pellet), (#SE-121)

17 β -estradiol (1,7 mg/pellet), (#SE-121)

Progesteron (10,0 mg/pellet) + 17 β -estradiol (0,5 mg/pellet), (#SHH-112)

Tamoxifen(*free base*) (5,0 mg/pellet), (#SE-361)

Zellkulturmedien und –zusätze:

Matrigel, (#354234, Fa. Collaborative Biomedical Products, Bedford- MA)

RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) -1640 w/o Phenolrot, (# F1275, Fa. Biochrom, Berlin)

Narkosemittel:

Ketavet®100mg/ml, (Fa. Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen)

Rompun®2%, (#PZN 13220422, Fa. BayerVital, Leverkusen)

Spritzen, Kanülen, OP-Besteck:

Anatomische Pinzette

Chirurgische Pinzette

Feine Schere, spitz/spitz

Einmal Kanülen 100 Sterican® (Gr.1, Gr.12), (Fa. Braun, Melsungen)

Klammeranlegepinzette mit Wundklammern nach Michel

Knopfkanülen

Skalpellsgriff mit sterilen Skalpellklingen

Trokar

Tuberkulinspritzen, (#621657, Codan Medical ApS, Rødby)

Geräte:

Laminar Flow Box HERAsafe®, (Fa. Heraeus, Hanau)

Meßschieber Absolute Digimatic Caliper® No. 500,(Fa. Mitutoyo, Andover-UK)

Scantainer, (Scanbar Ltd., Dänemark)

Software Interface IF-KB2, (Fa. Lothar Wehrle, Berlin)

Tierwaage PM 4800 Delta Range®, (Fa. Mettler, Gießen)

C.2.2 Tiere, Haltung und Fütterung

Tiere

Weibliche Fox Chase SCID Mäuse, 5-6 Wochen alt und ca. 20 g schwer, aus der spezifisch pathogenfreien (SPF) Zucht von M&B (Möllegard & Bomholdtgard, Ry-Dänemark) werden verwendet. Diese Tiere sind immundefizient hinsichtlich T- und B- Lymphozyten. Eine beim Züchter durchgeführte Untersuchung sichert den Status 'proven non-leaky' mit weit unter 100 ng Immunglobulinen/ml Blut.

Haltung und Fütterung der Tiere

Maximal sieben Mäuse werden im SPF-Bereich gruppenweise in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Makrolon Typ III mit 810 cm², Fa. Becker, Castrop-Rauxel) mit Filterdeckeln auf staubfreiem Weichholzgranulat (Fa. Rettenmeier&Söhne, Rosenberg) gehalten. Diese Käfige befinden sich in Laminar-flow Schränken, bei einer Temperatur von 22°C, einer Luftfeuchte von 50-60% und einer 14-stündigen Lichtperiode. Die Tiere erhalten eine ad libitum-Fütterung mit autoklavierten Pellets für Nacktmaushaltung fortifid® (Fa. Sniff, Soest) sowie autoklaviertes, angesäuertes Wasser (pH 2-3) zur freien Verfügung. Zweimal pro Woche werden die Käfige gewechselt. Sämtliche Manipulationen an den Tieren werden innerhalb einer Sterilwerkbank vorgenommen.

C.2.3 Tumormodelle zur Untersuchung der Proliferation von endometrialen Adenokarzinomzellen *in vivo*

Die *in vivo* Proliferationsversuche werden nach dem Tiermodell von Clarke 1996 modifiziert in SCID Mäusen durchgeführt.

*Versuch zur Stimulierung des Wachstums von endometrialen Adenokarzinomzelltumoren durch Estrogene *in vivo**

Das estrogenabhängige Wachstum der aus Zellen entstandenen Tumore wird in SCID Mäusen untersucht, die mit E₂ in verschiedenen Konzentrationen supplementiert werden. Die E₂-Pellets werden nach einer eintägigen Transport-Erholungsphase für die Tiere mittels Trokar sub-

kutan zwischen die Schulterblätter der Mäuse transplantiert. Jeweils fünf Tiere erhalten 0,36 mg E₂-, 1,7 mg E₂-, 0,5 mg E₂+Progesteron- bzw. Tamoxifen-Pellets. Fünf Kontrolltiere bleiben unbehandelt. Zwei Tage später werden pro Maus 1,5 x10⁶ endometriale Adenokarzinomzellen in 0,1 ml RPMI-1640 Medium (1:1 in Matrigel) als subkutanes Transplantat in die linke Flanke injiziert. Im Falle einer Tierpassage wird der subkutan gelegene Tumor der Maus unter sterilen Bedingungen mit dem Skalpell entnommen. Makroskopisch nekrotisches Material wird vom Tumor entfernt und mit dem Trokar werden ca. 2mm² große Stücke in andere Mäuse weitertransplantiert. Einmal wöchentlich werden die Tiere gewogen und die Tumorflächen mit dem Meßschieber gemessen. Nach 4-5 Wochen wird der Versuch beendet. Die Tiere werden mit 100% CO₂-Begasung getötet. Die Tumore werden entnommen, gewogen und für weitere Untersuchungen eingefroren oder fixiert.

Versuch zur Hemmung des Wachstums von endometrialen Adenokarzinomzelltumoren durch Antiestrogene in vivo

Die Hemmung des estrogenstimulierten Tumorwachstums von endometrialen Adenokarzinomzellen durch Behandlung mit AE wird *in vivo* untersucht. Jeder Maus wird nach eintägiger Transport-Erholungsphase ein 0,36 mg E₂-Pellet subkutan zwischen die Schulterblätter implantiert. Zwei Tage später erhalten die Tiere in die linke Flanke ein subkutanes Transplantat mit 1,5 x10⁶ endometrialen Adenokarzinomzellen, die in 0,1 ml RPMI-1640 Medium (1:1 in Matrigel) suspendiert worden sind. Hat der Tumor eine Größe von durchschnittlich 25 mm² erreicht, werden die Tiere randomisiert und in Gruppen à 7-10 Tiere verteilt. Die Negativkontrollgruppe wird unter intraperitonealer Narkose mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht=KG) und Xylazin (3 mg/kg KG) ovariectomiert. Das E₂-Pellet wird ebenfalls entfernt. Die in ETOH gelösten AE werden 1:10 mit Erdnußöl vermischt und 0,1 ml der Lösung täglich oral bzw. subkutan verabreicht. ICI 182,780 wird als 4-Wochen-Depot subkutan am ersten Behandlungstag injiziert. Die Negativkontrolltiere ohne Estrogenstimulierung und die Positivkontrolltiere mit E₂-Pellets erhalten täglich 0,1 ml ETOH in Erdnußöl (1:10). Einmal wöchentlich werden die Mäuse gewogen und die Tumorflächen mit dem Meßschieber ermittelt. Nach 4–5 Wochen endet der Versuch mit einer 100% CO₂-Begasung der Mäuse. Die Tumore werden entnommen, gewogen und für weitere Untersuchungen eingefroren oder fixiert.

C.2.4 Auswertung und Statistik der Tumormodelle für endometriale Adenokarzinomzellen *in vivo*

In einer grafischen Darstellung werden die Medianwerte der Tumorflächen je Gruppe mit 25%- und 75%-Quantilen in Abhängigkeit von der Zeit veranschaulicht. Die Medianwerte und 25%- und 75%-Quantile werden mit Microsoft Excel© Version '98 berechnet. Mit Hilfe der Software SigmaStat© werden die Tierversuche statistisch ausgewertet. Zur Anwendung kommt der Dunn's Test, dem das nicht parametrische Verfahren von Kruskal-Wallis zugrunde liegt (Dunn 1964).

C.3 Proteinbiochemische Methoden

C.3.1 Material und Geräte

Antikörper:

Actin-Sekundärantikörper:PODconjugated Goat/anti-rabbit IgG+IgM (H+L), (#111-035-045, Fa. Dianova, Hamburg)

anti human Cyclin D1, (#14561A, Fa. PharMingen International, Hamburg)

anti human p21, (#15431, Fa. PharMingen International, Hamburg)

anti-Actin, (#A-2066, Fa. Sigma-Aldrich,Steinheim)

Cyclin D1-Sekundärantikörper PODconjugated Goat/anti-rabbit IgG+IgM (H+L), (#115-035-068, Fa. Dianova, Hamburg)

EGFR-ELISA, (#QIA35, Fa. Qiagen, Hilden)

ER-EIA Monoclonal System, (#9842, Fa. Abbott, Wiesbaden)

p21-Sekundärantikörper PODconjugated Goat/anti-rabbit IgG+IgM(H+L), (#111-035-045, Fa. Dianova, Hamburg)

PgR-EIA Monoclonal System, (#4012, Fa. Abbott, Wiesbaden)

Verbindungen, Lösungen und Gele:

Albumin Standard, (#23209, Fa. Pierce, Rockford-USA)

BCA Bichinolinsäure Protein AssayA+B, (#23224+5, Fa. Pierce, Rockford-USA)

Complete® Proteaseblock, (#1697498, Fa. Boehringer, Mannheim)

DTT Dithiothreitol, (#D-9779, Fa. Sigma-Aldrich,Steinheim)

ECL(enhanced chemiluminescent) Plus®, (#RPN-2132, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire-UK)

EDTA Titriplex III, (#1.08418, Fa. Merck, Darmstadt)

EGTA Glycoetherdiamintetraessigsäure, (#E-4378, Fa. Sigma, München)

Endonuklease I, (#E-8263, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

Glycerin 87%, (#1.040094.0500, Fa. Merck, Darmstadt)

Igepal (Octylphenoxy)polyethoxyethanol CA-630, (#I-3021, Fa. Sigma, München)

KCl Kaliumchlorid, (#1.04936.0500, Fa. Merck, Darmstadt)
Magermilchpulver Sucofin®, (Fa. TSI Trade Service Int., Zeven)
Markerlösung RPN 800, (#RPN 800, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire-UK)
Mercaptoethanol, (#M-7522, Fa. Merck, Darmstadt)
Methanol, (#1.06009.2500, Fa. Merck, Darmstadt)
MgCl₂ Magnesiumchlorid, (#5833.1000, Fa. Merck, Darmstadt)
Na₂MoO₄, (#M-1651, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
NaCl Natriumchlorid, (#1.06404.1000, Fa. Merck, Darmstadt)
NaF, (#S-1504, Fa. Sigma, München)
Natrium-o-vanadat, (#S-6508, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
NuPage® Bis-Tris Gel, (#0110601-094, Fa. invitrogen, Groningen-Niederlande)
PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺, (#L1825, Fa. Biochrom, Berlin)
PMSF Phenylmethylsulfonylfluoride, (#P7626, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
Polyvinyl-Difluoridmembran HybondTM-P, (#RPN 303F, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire-UK)
Rotiload®, (#K929.1, Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) -1640 w/o Phenolrot, (# F1275, Fa. Biochrom, Berlin)
Running Puffer, (#SP-NP 0001, Fa. invitrogen, Groningen-Niederlande)
Salzsäure, rauchend, (#1.00317, Fa. Merck, Darmstadt)
Schwefelsäure 1N, (#109981, Fa. Merck, Darmstadt)
SDS Sodiumdodecylsulfat, (#L3771, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
Transfer Puffer, (#NP-0006, Fa. invitrogen, Groningen-Niederlande)
TrisHCl, (#1.08382, Fa. Merck, Darmstadt)
Tween 20, (#,P-7949Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

Zentrifugen:

Ultrazentrifuge L-60, (Fa. Beckman, München) + TI 50- Rotor
Zentrifuge 5417 R, (Fa. Eppendorf, Hamburg) + Rotor F45-30-11
Zentrifuge Megafuge 1,0R (Fa. Hereaus, Hanau) + Rotor Sepatech® #2705

Gefäße und Pipettenspitzen:

Combitips (0,5-50 ml), (Fa. Eppendorf, Hamburg)
Eurotips (10-1000 µl), (Fa. Eppendorf, Hamburg)
Kryoröhrchen 1,2 ml, (#E308.1, Fa. Roth, Karlsruhe)
Pipettenspitzen Multiflex Round Tips (0,5-200 µl), (#6144, Fa. Roth, Karlsruhe)
Reaktionsgefäße Safe-Lock (1-2 ml), (Fa. Eppendorf, Hamburg)
Stripetten (5-100 ml), (Fa. Costar, Cambridge- Großbritannien)
Zentrifugenröhrchen (50 ml), (#38008, Fa. Renner, Dannstadt)

Geräte:

Bio-PulverizerTM, (#59014H+59013, Fa. Biospec Products, Bartlesville, OK)

Blotmaschine TE 22, (Fa. Hoefer, San Francisco CA-USA) + Transferklammern
Filmkassette Hypercassette™, (#RPN13642, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire-UK)
Hyperfilm™ ECL™, (#RPN2103K, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire-UK)
Laufkammer SE260, (Fa. Hoefer, San Francisco CA-USA)
Milli Q^{UF}PLUS Water System, (Fa. Millipore, Molsheim-France)
Pentawash DOA-V161-BN, (Fa. MFG-Corp., USA)
Polytron PT 1200, (Fa. Kinematica AG, Schweiz)
Schüttel-Wasserbad Typ 3047, (Fa. Köttermann, Uetze-Hänigsen)
Schüttler TITRAMAX 1000, (Fa. Heidolph, Schwabach)
Spektralphotometer Rainbow®, (Fa. TECAN, Crailsheim) + SoftwareTECAN easyCurveFitting
Tauler Polymax 2040, (Fa. Heidolph)
Thermomixer 5436, (Fa. Eppendorf, Hamburg)
Vortex REAC 1R, (Fa. Heidolph)

C.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes von Zellen oder Tumorgewebsstücken

Die Proteinbestimmung mit Bichinolinsäure (BCA) wird mit dem BCA-Protein-Assay gemäß der Herstelleranweisung der Firma Pierce durchgeführt. Das Prinzip dieses Assays basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^+ -Ionen durch Proteine im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion). Das einwertige Kupferion bildet mit BCA einen wasserlöslichen Chelatkomplex, der als purpurner Komplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm photometrisch quantifiziert werden kann (Smith et al. 1985). Die Bestimmung des Proteingehaltes von endometrialen Tumorzellen oder Tumorgewebsstücken wird in den Versuchen zur Rezeptorexpression und in den Westernblotanalysen benötigt. Die Zellen werden in den für die jeweiligen Versuche benötigten Extraktionspuffer verdünnt. Die verdünnten Proben werden als Dreifachwerte zu je 50 μl in die Löcher einer 96-Lochplatte pipettiert. Für die Eichgerade wird eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin im Bereich von 2,5–20 μg Protein/50 μl Serum hergestellt. Ebenfalls in Dreifachwerten werden 50 μl von jeder Verdünnung pro Loch in die Löcher der Lochplatte pipettiert. Zu diesen 50 μl und zu denen der Proben werden 250 μl der Reagenzien A und B in einem Verhältnis von 50:1 hinzupipettiert. Die Lochplatte wird anschließend für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei 562 nm werden die Extinktionen der Proben am Spektralphotometer gemessen. Anhand der Eichgeraden werden die Proteinmengen der Proben durch die SoftwareTECAN easyCurveFitting® (Fa. Rainbow) berechnet.

C.3.3 Bestimmung des Estrogen- und Progesteronrezeptorgehaltes in Tumorzellen oder -geweben

Die Detektion der ER und PgR erfolgt gemäß der Herstelleranweisung der ER/PgR-EIA-Kits der Firma Abbott.

Herstellung des Extraktionspuffer zur Bestimmung der Rezeptoren

Der Extraktionspuffer (*high-salt*) wird bei 4°C aufbewahrt und alle vier Wochen aus den entsprechenden, mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) hergestellten Stammlösungen (SL) neu angesetzt. 1 ml Tris-HCl (1 M SL), 500 µl Na₂MoO₄ (1 M SL), 7,15 ml Glycerin (10%), 150 µl EDTA (500 mM SL) und 15 ml KCl (2 M SL) werden vermischt und mit Aqua dest. auf 50 ml Endvolumen verdünnt. Der pH-Wert wird auf pH 7,4 eingestellt. Kurz vor Gebrauch werden zu dem Puffer die Proteaseinhibitoren DTT und PMSF zu je 500 µl (100mM SL) gegeben. Der Puffer wird erneut auf pH 7,4 eingestellt.

Gewinnung der Proben zur Bestimmung des ER- und PgR-Gehaltes

Nach einer dreitägigen Estrogenablation werden die Zellen in 75cm²-Kulturflaschen mit den Testsubstanzen in phenolrotfreiem RPMI-1640 Medium mit CCS inkubiert. Zum Versuchsende wird das Medium entfernt, die Kulturflaschen mit PBS gespült und die Zellen mit 2-5 ml EDTA (20 mM)/PBS bei 37°C abgelöst. Die Suspension wird abzentrifugiert (5 min. bei 1000 UpM, 4°C), das Pellet in *high-salt*-Puffer aufgenommen, in Eppendorfgefäße pipettiert und dann bei -80°C maximal für ca. 4-6 Wochen gelagert. 200-300 mg des Tumorgewebes aus den *in vivo*-Experimenten (C.2.3, S.31) werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Aufarbeitung in Kryoröhrchen gelagert.

Aufarbeitung der Proben zur Bestimmung des ER- und PgR-Gehaltes

Zur Bestimmung der cytosolischen Rezeptoren müssen die Zellmembranen zerstört werden, wobei die Proben wegen möglicher Rezeptordestabilisierung nie über 4°C erwärmt werden dürfen. Die gefrorenen Zellen in den Eppendorfgefäßen werden abwechselnd viermal in ein 37°C-Wasserbad getaucht und wieder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das gefrorene Tumorgewebe wird mit einem Pulverisator zerkleinert. Maximal 24 Stunden kann das Pulver in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Nach einer Inkubation des Pul-

vers mit 500 µl *high-salt* Puffer für 30 Minuten wird es mit dem Polytronstab PT 1200 homogenisiert. Zell- oder Gewebshomogenate werden anschließend in der Ultrazentrifuge 60 Minuten bei 100.000 g und 4°C zentrifugiert und die Überstände quantitativ abgenommen. Von diesen Überständen wird eine Proteinbestimmung durchgeführt (C.3.2, S.35) und der Proteingehalt für die ER-Messung auf 2 mg Protein/ml mit *high-salt*-Puffer, für die PgR-Messung auf 1 mg Protein/ml eingestellt.

Bestimmung der ER- und PgR-Gehalte in den Proben von Zellen oder Tumorgewebsstücken

Das ER/PgR-EIA-Monoklonal-System ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, das auf dem „Sandwich“-Prinzip beruht. Mit ER/PgR-Antikörpern (Ratte, monoklonal) beschichtete Kugeln werden mit 100 µl Probenflüssigkeit und 100 µl Probenverdünnungsflüssigkeit für 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Für eine Eichgerade wird aus einer im Test-Kit mitgelieferten Standardprobe mit definiertem Rezeptorgehalt eine Verdünnungsreihe in einem Bereich von 0-250 fmol ER/PgR/mg Protein hergestellt. Je 200 µl dieser Verdünnungen und 200 µl einer ebenfalls mitgelieferten Kontrollprobe mit bekanntem Rezeptorgehalt werden auch mit den beschichteten Kugeln für 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Vorhandene humane ER/PgR werden in dieser Zeit an die Festphase gebunden. Alle anderen Zellbestandteile werden durch Absaugen der Flüssigkeit und Waschen der Kugeln entfernt. Anschließend werden die Kugeln mit 200 µl ER/PgR-Antikörpern (Ratte, monoklonal), die mit Meerrettich-Peroxidase (POD) konjugiert sind, 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Dieses Konjugat wird von den ER/PgR der Proben gebunden, die wiederum selbst an die Festphase der Kugeln gebunden sind („Sandwich“-Prinzip). Nicht gebundene POD-konjugierte ER/PgR-Antikörper werden durch Absaugen und Waschen der Kugeln entfernt. 300 µl zugegebene OPD-Lösung (Wasserstoffperoxid-haltiges o-Phenylendiamin•2HCl) reagieren mit der Peroxidase. Die Intensität der in der Enzymreaktion entstandenen Farbentwicklung korreliert mit der Menge Konjugat, das an Proben-ER/PgR gebunden ist. Innerhalb des Bereiches 0-250 fmol ER/PgR/mg Protein ist diese Färbung proportional zur ER/PgR-Konzentration. Durch Zugabe von 1 ml Schwefelsäure (1N) wird die Reaktion nach 30 Minuten gestoppt. Am Spektralphotometer wird die Farbinintensität von 250 µl OPD-Schwefelsäuregemisch bei 492 nm gemessen. Mit der Eichgeraden können die ER/PgR-Konzentrationen der Proben durch die SoftwareTECAN easyCurveFitting® (Fa. Rainbow) berechnet werden. Die Sensitivität der Tests liegt bei 1,5 fmol ER/mg Protein und 1,7 fmol PgR/mg Protein.

C.3.4 Bestimmung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor-Gehaltes in Tumorzellen

Die Detektion der EGFR in den Tumorzellen erfolgt gemäß der Herstelleranweisung des EGFR-Kits der Firma Qiagen.

Aufarbeitung der Proben zur Bestimmung des EGFR-Gehaltes

Das nach Ultrazentrifugation aus den Zell- oder Gewebshomogenaten gewonnene Pellet (C.3.3 *Probenaufarbeitung*, S. 36) wird in 500 µl *high-salt*-Puffer mit dem Polystyronstab PT 1200 resuspendiert. Es ist bei -180°C (flüssiger Stickstoff) monatelang lagerbar. 300 µl der Proben werden mit 60 µl *AEA*® (Antigen Extraktionsvermittler) fünf Minuten bei RT in Eppendorfgläsern inkubiert und dann 25 Minuten bei 14.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird quantitativ abgenommen. Es wird eine Proteinbestimmung (C.3.2, S.35) durchgeführt und der Proteingehalt des Überstandes wird mit dem im Test-Kit enthaltenen *Sample Diluent*® auf 0,5 mg Protein/ml eingestellt.

Bestimmung des EGFR-Gehaltes in den Tumorzellen

Eine mit EGFR-Antikörpern (Maus, monoklonal) beschichtete 96-Lochplatte wird in Zweifachwerten mit 100 µl Probenflüssigkeit pro Loch für vier Stunden bei RT inkubiert. Für eine Eichgerade wird aus einer im Test-Kit mitgelieferten Standardprobe mit definiertem Rezeptorgehalt eine Verdünnungsreihe im Bereich von 0-100 fmol EGFR/mg Protein hergestellt. Je 100 µl dieser Verdünnungen werden ebenfalls als Zweifachwerte in die Löcher der Lochplatte pipettiert und für vier Stunden bei RT inkubiert. Der Antikörper bindet die extrazelluläre Domäne des humanen EGFR ligandenunabhängig, d.h. auch in Anwesenheit von epidermalen Wachstumsfaktoren. Nach Absaugen der Flüssigkeit und Waschen der Platte wird ein zweiter Antikörper (Kaninchen) eingesetzt (100 µl pro Loch für 1h bei RT). Er bindet an den EGFR („Sandwich“-Prinzip). Die Platte wird erneut gewaschen und je 100 µl eines Konjugats (Anti-Kaninchen/Ziegen IgG, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase) wird in die Löcher hineinpipettiert. Die Platte wird 30 Minuten bei RT inkubiert, gewaschen und mit 100 µl Substratlösung (OPD) pro Loch umgesetzt. Die Farbreaktion, gestoppt mit 100 µl *Stop Solution*® (2,5 N Schwefelsäure), wird innerhalb von 30 Minuten am Spektralphotometer bei einer dualen Wellenlänge von 490/595 nm quantifiziert. Anhand der Eichgeraden werden die EGFR-Konzentrationen in den Proben durch die Software *TECAN easyCurveFitting*® (Fa. Rainbow) berechnet. Innerhalb des Meßbereiches von 0-100 fmol EGFR/mg Protein liegt die Sensitivität des Assays bei 0,3 fmol EGFR/mg Protein.

C.3.5 Bestimmung der Cyclin D1- und p21-Expression in Tumorzellen

Die Expression der Proteine Cyclin D1 und p21 in den Tumorzellen wird mit dem Westernblot untersucht (Towbin et al. 1979).

Gewinnung von Proben aus endometrialen Adenokarzinomzellen zur Westernblotanalyse

Nach dreitägiger Estrogenablation werden die Tumorzellen einer 75cm² Kulturflasche mit den Testsubstanzen behandelt. Zum Versuchsende nach 8, 24 und 72 Stunden werden die Zellen mit Trypsin von dem Flaschenboden abgelöst und zentrifugiert (C.1.2 *allgemeine Kulturbedingungen*, S.25). Das Pellet wird in 1 ml PBS resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Nach Zentrifugation (2 min. bei 14.000 UpM, RT) wird der Überstand abgesaugt und das trockene Pellet eingefroren (−80°C).

Aufarbeitung der Proben zur Westernblotanalyse

Lysis-Puffer:

2,5 ml Tris-HCl aus 1 M SL

1,5 ml NaCl aus 5 M SL

2,5 ml Igepal 20%

5,7 ml Glycerin 87%

0,75 ml MgCl₂ aus 100 mM SL

0,25 ml EGTA aus 200 mM SL

5,0 ml NaF aus 500 mM SL

31,8 ml Aqua dest., in dieser Form ist der Puffer bei −20°C lagerbar.

Dazu kommen 5,0 ml NaF aus 500 mM SL sowie 1,0 ml Na-o-vanadat aus 100 mM SL. Kurz vor Gebrauch werden pro 10 ml Puffer Proteaseinhibitoren dazugegeben (3 µl Endonuklease I (1,5 U/µl) + 1 Tablette Complete®).

Das Zellpellet wird durch Zugabe von 300 µl Lysis-Puffer und mehrmaligem Resuspendieren auf Eis aufgelöst. Nach der Zentrifugation (5 min. bei 10.000 UpM und 4°C) wird von dem Überstand der Proteingehalt bestimmt (C.3.2, S.35). Der Überstand kann bei −80°C eingefroren werden und ist jahrelang verwendbar. Mit Lysis-Puffer und 30 µl Natriumdodecylsulfat (SDS) enthaltendem Rotiload® werden die Proben auf 25 µg Protein/100 µl eingestellt.

Auftrennung der Proteine in der Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt in einer Laufkammer auf diskontinuierlichen Vertikalgelen (NuPage® Bis-Tris-Gel) in Running Puffer® unter denaturierenden Bedingungen. Hierzu werden die Proteine bei 96°C für sechs Minuten gekocht. Die Erhitzung führt zur Denaturierung der Proteine, so dass das Detergenz SDS (Rotiload®) gebunden wird. Die Menge an gebundenem SDS ist dabei proportional dem Molekulargewicht des Proteins. Diese SDS-gebundenen Proteine sind negativ geladen. Dadurch wird der spätere Proteintransfer auf die Polyvinylmembran ermöglicht. Nachdem je Geltasche 10 µl SDS-Proteinkomplex oder Markerlösung auf das Gel aufgetragen sind, erfolgt in dem Sammelgel des diskontinuierlichen Vertikalgels zunächst die Fokussierung der Proteinbande (30 min. bei 60 V) und in dem anschließenden Trenngel die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe (ca. 1,5 h bei 100 V).

Proteintransfer auf eine Membran: Westernblot

Ein Stück Polyvinylmembran und zwei Filterpapiere werden auf die Größe des Gels geschnitten. Die Membran wird eine Minute in Methanol, fünf Minuten in Aqua dest. und dann in Transfer Puffer® getaucht. Membran, Filterpapiere und Gel werden in Transfer Puffer zwischengelagert. In Stromlaufrichtung von der Kathode zur Anode werden Schaumstofflage, Filterpapier, NuPage® Bis-Tris-Gel, Polyvinylmembran, Filterpapier und eine weitere Schaumstofflage in das Blottinggitter aufeinandergelegt, ohne daß Luftblasen entstehen. Das Gitter wird in die Blottingkammer gestellt und im Kühlraum (4°C) bei 100 V und 120 A werden die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe innerhalb einer Stunde vom NuPage® Bis-Tris-Gel auf die Polyvinylmembran transferiert.

Detektion der Proteine Cyclin D1 und p21

TBS (Tris buffered Saline) (10X)-Puffer:

24,2 g Tris-HCl + 80,0 g NaCl in 800 ml Aqua dest.

mit rauchender HCl auf pH 7,6 einstellen

ad 1000 ml.

Die Membran wird für fünf Minuten in TBST (TBS(1X) + 0,1% Tween 20) bei RT unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgt eine einstündige Inkubation bei RT in Magermilchpulver (5% in Aqua dest.) zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen. Anschließend wird die

Membran mit dem Primärantikörper (Cyclin D1, monoklonal Maus oder p21, polyklonal Kaninchen) verdünnt in Magermilchpulver (1:1000) über Nacht auf dem Schüttler bei 10-13 Drehungen/min. inkubiert und am nächsten Tag dreimal für fünf Minuten in TBST unter Schütteln gewaschen. Die Membran wird mit dem Sekundärantikörper (anti-Maus bzw. anti-Kaninchen), der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, für eine Stunde bei RT inkubiert (1:10.000 in Magermilchpulver). Nach erneutem Waschen wird die Substratlösung ECL(*enhanced chemiluminescent*)-Plus® auf die Membran gegeben (3-5 min. bei RT im Dunkeln). Durch die an den Sekundärantikörper konjugierte POD wird das Substrat in der Lösung zu einem chemilumineszierenden Stoff umgesetzt. Durch diesen Stoff werden die Proteine Cyclin D1 und p21, markiert durch den Primärantikörper, an den der Sekundärantikörper bindet, detektiert. Die Membran wird in Folie gewickelt und in eine Filmkammer gelegt. Ein Blaulicht-sensitiver Autoradiographiefilm wird für wenige Minuten aufgelegt und dann entwickelt.

Actin-Gegenfärbung

Um die Proteinmengen in den Proben zu prüfen, wird eine Actin-Gegenfärbung durchgeführt. Der Stripping-Puffer besteht aus 1 ml Tris-HCL, 2 ml Mercaptoethanol (100mM), 25 ml SDS und 222 ml Aqua dest.. Durch das Strippen werden die vorher verwendeten Antikörper von der Membran abgelöst. Das ECL-Plus® wird mit VE-Wasser von der Membran gespült und die Membran dann bei 60°C 30 Minuten unter Schütteln mit dem Stripping-Puffer inkubiert. Nach dreimaligen Waschen in TBST werden die unspezifischer Bindungsstellen mit Magermilchpulver abgeblockt (1 Std. bei RT). Die Membran wird mit dem Primärantikörper Actin (1:1000 in Magermilchpulver) für eine Stunde bei RT inkubiert, anschließend gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen) ebenfalls für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wird die Membran mit ECL-Plus® inkubiert (3-5 min. bei RT im Dunkeln), in Folie gewickelt und in eine Filmkammer gelegt. Ein Blaulicht-sensitiver Autoradiographiefilm wird für wenige Minuten aufgelegt und dann entwickelt.

C.3.6 Auswertung und Statistik proteinbiochemischer Methoden

Die Medianwerte und Quantile von ER und PgR werden mit Microsoft Excel© Version '98 berechnet. Liegen die Einzelwerte unterhalb der Mindestsensitivitäten, dann werden sie mit 0,75 fmol ER/mg Protein und 0,85 fmol PgR/mg Protein in die Berechnung einbezogen. Liegen jedoch 2/3 der Werte und mehr unterhalb der Mindestsensitivität, dann wird kein Median

berechnet, sondern 'unter dem Detektionslimit' angezeigt. In diesem Fall wird die ER/PgR-Expression als negativ bezeichnet. Mit der Software SigmaStat© werden die Medianwerte statistisch ausgewertet. Es wird der Dunn's Test, dem das nicht parametrische Verfahren von Kruskal-Wallis zugrunde liegt, angewendet (Dunn 1964). Medianwerte der EGFR und die Ergebnisse der Cyclin D1- und p21-Expression werden wegen der geringen Probenzahl nicht statistisch ausgewertet.

C.4 Molekularbiologische Methoden

C.4.1 Material und Geräte

Verbindungen und Lösungen

EDTA, (#108418, Fa. Merck, Darmstadt)

FACS(*Fluorescent attended cell sorting*)Save®, (#340345, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)

FACSFlow™, (#342003, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)

FACSRinse®, (#340346, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)

PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺, (#1825, Fa. Biochrom, Berlin)

Propidiumjodid, (#P-4170, Fa. Sigma Chemical CO, St. Louis-MO))

Ribonuklease A, (#R-4875, Fa. Sigma, Steinheim)

Trypsin/EDTA 0,05%/0,02%, (#L2143, Fa. Biochrom, Berlin)

Zellkulturgefäße und -zubehör

Rundbodenröhrchen 5ml FALCON®, (#35-2052, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)

Rundbodenröhrchen 5ml mit integriertem Zellsieb FALCON®, (#35-2235, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)

Zellkulturflaschen (25 cm²), (#3056, Fa. Costar, New York, USA)

Geräte

FACScan 82239, (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)

Vortex REAC 1R, (Fa. Heidolph)

Zentrifuge Megafuge 1,0R (Fa. Hereaus, Hanau) + Rotor Sepatech® #2705

C.4.2 Bestimmung der Zellverteilung einzelner Proben auf verschiedene Zellzyklusstadien

Diese Methode (Spector et al. 1998) bestimmt die Menge an Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus durch Messung der phasenabhängigen, unterschiedlichen DNA-Gehalte. Nach Permeabilisierung der Zell- und Kernmembran ist der DNA-Gehalt der Einzelzellen durch Anfärbung mit einem DNA-spezifischen Fluorochrom (Propidiumjodid) durchflußzytometrisch quantifizierbar.

Gewinnung der Proben für Zellzyklusstudien

Nach dreitägiger Estrogenablation und 24-stündiger Inkubation mit 0,5% CCS zur Arretierung der Zellen in der G0/G1-Phase werden die Zellen in 25cm²-Kulturflaschen mit den Testsubstanzen behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 8, 24 und 72 Stunden werden sie mit Trypsin/EDTA (0,05/0,02%) von den Kulturflaschen abgelöst. Zellüberstand und die abtrypsinieren Zellen werden zusammen mit 1 ml FCS zentrifugiert (5 min. bei 800 UpM, RT). Das Zellpellet wird in 5 ml PBS/EDTA (5 mM) resuspendiert und in FACS(*Fluorescent attended cell sorting*)-Röhrchen pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min. bei 1000 UpM, RT) wird das Zellpellet wiederum in 5 ml PBS/EDTA (5 mM) resuspendiert. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal wiederholt. Danach werden die Zellen in 50 µl PBS/EDTA resuspendiert und unter Rühren mit 1 ml 70%igem ETOH gemischt. Die so ETOH-fixierten Zellen werden durch das Zellsieb der FACS-Röhrchen filtriert und bei -20°C mindestens für 24 Stunden gelagert.

Aufarbeitung der Proben für Zellzyklusstudien

Die bei -20°C gelagerten, fixierten Zellen werden bei RT aufgetaut. Dann werden sie mit 3 ml PBS versetzt, gut gemischt und fünf Minuten bei 1100 UpM zentrifugiert. Nach Aufnahme des Pellets in 200 µl PBS erfolgt eine 10-30-minütige Inkubation mit 50 µl RNase (1%) bei RT. Unter Rühren werden 200 µl Propidiumjodid (100 µg/ml in PBS) dazupipettiert und die Proben anschließend für 24 Stunden bei -4°C gelagert.

Messung der Zellverteilung von Tumorzellproben auf verschiedene Zellzyklusstadien

Am Durchflußzytometer wird der mit Propidiumjodid angefärbte DNA-Gehalt der Zellen gemäß der Herstelleranweisung gemessen. Durch Messung von 10.000 Zellen pro Probe entsteht ein lineares DNA-Histogramm. Die Größe des DNA-Fluoreszenzsignals (x-Achse) ist gegen die Anzahl der gemessenen Teilchen pro Intensitätsklasse (y-Achse) aufgetragen, so daß das Histogramm —indirekt über den DNA-Gehalt— Aufschluß über die Verteilung der Zellpopulation in den verschiedenen Zellzyklusstadien gibt.

C.4.3 Auswertung und Statistik molekularbiologischer Methoden

Die Software Cellquest© berechnet den prozentualen Anteil an Zellen in der jeweiligen Phase des Zellzyklus. Diese Prozentzahlen der unterschiedlich behandelten Zellproben werden pro

Zellzyklusphase in einer grafischen Darstellung veranschaulicht. Die Ergebnisse werden wegen der geringen Probenzahl statistisch nicht ausgewertet.

C.5 Pathohistologische Methoden

C.5.1 Material und Geräte

Antikörper, Nukleotide:

Anti-human Estrogen Receptor Clone 1 D5, (#M7047, Fa. DAKO, Glostrup- Dänemark)

Anti-human Ki-67 Clone S5, (#M7187, Fa. DAKO, Glostrup- Dänemark)

Biotin-14-CTP Cytidintriphosphat, (#19519-016, Fa. Gibco, Paisley- Schottland)

Biotin-14-dATP Adenosintriphosphat, (#19524-016, Fa. Gibco, Paisley- Schottland)

Biotin-16-UTP Uridintriphosphat, (#1388908, Fa. Roche, Schweiz)

TdT terminale Desoxynukleotidyltransferase, (#600138, Fa. Stratagene, La Jolla, CA)

Puffer und Lösungen:

DNase I, (#600032, Fa. Stratagene, La Jolla, CA)

Eosin alcohol soluble®, (#199540, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

Ethanol absolut, (#1.00983, Fa. Merck, Darmstadt)

Fast Red®, (#F-4648, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

Hematoxylin Solution, Gill No.3, (#GHS332, Fa. Sigma, Steinheim)

Na-Citrat, (#6448, Fa. Merck, Darmstadt)

PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺, (#L1825, Fa. Biochrom, Berlin)

Pepsin, (#108057, Fa. Boehringer, Mannheim)

TDT 5X-Puffer, (#600137, Fa. Stratagene, La Jolla, CA)

Xylol, (#108685, Fa. Merck, Darmstadt)

TechMate®- Zubehör (Fa. DAKO, Glostrup- Dänemark):

Antibody Diluent®, (#S2022)

Detection-Kit POD/DAB®, (#K5001)

Hämatoxylin, (#S2020)

Negativkontrolle, (#H0960)

POD-Blockierungsreagenz, (#S2023)

Puffer-Kit, (#K5006)

Retrieval Puffer®, (#S2031)

Sekundärantikörper, (siehe #K5001)

Histologisches Zubehör:

Deckgläschen

Glycergel®, (#C563, Fa. DAKO, Carpinteria-CA)

Histomount® Eindeckelmedium, (#9999122, Fa. Shandon, Pittsburg, PA)

Küvetten

Objekträger SuperFrost®, (Fa. Menzel)

Objekträger ChemMate™ Capillary Gap Microscope, (#S2024, Fa. DAKO, Glostrup- Dänemark)

Objekträger Silanized Slides, (#S3003, Fa. DAKO, Glostrup- Dänemark)

Objekträgergestelle

Geräte:

Brutschrank HERAccl®, (Fa. Heraeus, Hanau)

Färbeautomat TechMate® 500, (Fa. DAKO)

Mikrowelle

C.5.2 Gewinnung, Aufarbeitung und Vorbereitung der mikroskopischen Schnitte des Tumormaterials endometrialer Adenokarzinomzellen

Maximal 10x10 mm große Tumormaterialstücke (C.2.3, S.31) werden in Formalin (4%) fixiert und 24 Stunden später in Paraffin eingebettet. Eine Woche vor der Färbung werden 5 µm dicke Schnitte auf mit Silan beschichtete Objektträger gezogen und nach einer Trockenzeit (24 h bei RT) bei 4°C gelagert. Die Schnitte werden entparaffiniert und gewässert. Hierfür werden sie für 15 Minuten in Xylol inkubiert und danach in einer absteigenden Alkoholreihe in 100% -; 96% -; 70% -; 50% -ETOH jeweils für zwei Minuten und anschließend für eine Minute in Aqua dest. oder VE-Wasser inkubiert.

C.5.3 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Tumorgewebschnitten

Tumordifferenzierungsgrad und Tumorzellen/Stroma-Verhältnis werden in einer Kern-Plasma-Färbung untersucht. Für die Färbung (modifiziert nach Romeis 1989) werden die entparaffinierten Schnitte für eine Minute in VE-Wasser gelagert. Danach werden die Schnitte zehn Minuten lang in Hämatoxylin inkubiert und anschließend für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Nachfolgend werden die Schnitte für zwei Minuten in Eosin (60% in ETOH) inkubiert und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (Aqua dest.- 1 min.; 50% -; 70% -; 80% -; 96% - und 100% ETOH- je 2 min.; Xylol- mindestens 5 min.). Die Schnitte werden mit Histomount®-Medium überschichtet und mit Deckgläschen versiegelt.

C.5.4 Immunhistochemische Färbungen von Tumorgewebschnitten

Die immunhistochemischen Färbungen werden gemäß der Herstelleranweisungen für die Antikörper ER α und Ki-67 der Firma DAKO durchgeführt.

Vorbereitung der Tumorschnitte zur Immunhistochemie

Nach der Entparaffinierung werden die Schnitte im letzten Schritt in VE-Wasser gelagert und einer Antigendemaskierung unterzogen. Hierzu werden die Schnitte in Retrieval Puffer® (1:10 in VE-Wasser) in der Mikrowelle so erhitzt, daß für mindestens zehn Minuten eine Puffertemperatur von 96°C erreicht wird. Nach einer Abkühlzeit von 30 Minuten werden sie maximal für zwei Stunden in PBS gelagert.

Bestimmung des ER alpha- und Ki-67-Gehaltes in Tumorgewebschnitten

Für die immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis von ER α und dem Proliferationsmarker Ki-67 in den Zellkernen wird die Avidin-Biotin-Methode verwendet. Das Gewebsantigen wird zunächst mit dem Primärantikörper ER α (Klon 1D5) oder Ki-67 (Klon S5) gebunden. Ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet an diesen ersten Antikörper. Das dritte Reagenz ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Avidin besitzt vier Bindungsstellen, von denen drei Peroxidase-konjugiertes Biotin gebunden haben. Die freie, vierte Bindungsstelle bindet das Biotin des Sekundärantikörpers, wodurch letztendlich an einen Primärantikörper mehrere Peroxidase-Enzyme gekoppelt sind und so eine Signalverstärkung bewirken. Das zugesetzte Chromogen DAB wird durch die Peroxidase-reaktion mit dem Substrat Wasserstoffperoxid oxidiert und färbt sich braun. Im Anschluß erfolgt eine Hämatoxylin-Gegenfärbung. Nach der Färbung werden die Schnitte wieder in PBS gelagert. Über eine aufsteigende Alkoholreihe werden sie entwässert (VE-Wasser- 1 min.; 50% -; 70% -; 80% -; 96% - und 100% ETOH- je 2 min.; Xylol- mindestens 5 min.), mit Histomount®-Medium überschichtet und mit Deckgläschen versiegelt. Die Färbung wird im Färbeautomaten der Firma TechMate durchgeführt. Die Schnitte werden mit dem Primär- und Sekundärantikörper jeweils für 30 Minuten inkubiert. Beide Primärantikörper werden mit *Antibody Diluent*® im Verhältnis 1:50 verdünnt. Zur Gegenfärbung werden die Schnitte für 15 Sekunden mit Hämatoxylin inkubiert.

C.5.5 Nachweis von Apoptosen in histologischen Tumorgewebschnitten

Bei der Apoptose-Färbung werden die freien 3`OH-Enden der DNA-Oligonukleotidfragmente in den Zellkernen detektiert. Die freien OH-Enden werden durch biotinylierte Nukleotide gebunden. Eine terminale Deoxynucleotidyltransferase (TdT) katalysiert diese Polymerisation (TUNEL) (Gavrieli et al. 1992). In einem weiteren Schritt bindet alkalische Phosphatase (AP)-konjugiertes Streptavidin das Biotin der Nukleotide. Das zugesetzte Chromogen Fast Red® färbt sich durch die AP-Reaktion rot. Die Färbemethode nach Schilli et al. 1998 wird in dieser Arbeit modifiziert durchgeführt.

DNase I-Puffer (1 Liter in Aqua dest.):

10mM Tris-HCl, (#108382, Fa. Merck, Darmstadt)
 10mM NaCl, (#106404, Fa. Merck, Darmstadt)
 5mM MgCl₂, (#105833, Fa. Merck, Darmstadt)
 0,1mM CaCl₂, (#31307, Fa. Riedel-deHaen, Seelze)
 25mM KCl, (#4936, Fa. Merck, Darmstadt)

TDT- Puffer (0,5 Liter in Aqua dest.):

10mM Tris-HCl, (#108382, Fa. Merck, Darmstadt)
 140mM Cacodylsäure, (#103256, Fa. Merck)
 1mM Kobalt(II)chlorid, (#802540, Fa. Merck, Hohenbrunn)
 0,4mM Mercaptoethanol, (#62736, Fa. Riedel-de Haen, Seelze)

Pro Objektträger werden drei Schnitte einer Tumorgewebsprobe aufgenommen, um von jeder Probe einen Positivkontrollschnitt, einen Negativkontrollschnitt und einen Reaktionsschnitt anzufertigen. Die Tumorgewebschnitte werden entparaffiniert und nach der absteigenden Alkoholreihe in Aqua dest. gelagert. Anschließend werden die Schnitte einzeln mit einem Fettstift umrandet. Für alle weiteren Schritte werden die Objektträger in die feuchte Kammer gelegt. Um die DNA in den Zellkernen für die Markierungsreaktion freizulegen, werden die Schnitte für 60 Minuten bei 37°C mit 0,5% Pepsin in 100mM Na-Citrat (pH 3,5) inkubiert. Die Objektträger mit den Schnitten werden anschließend in Aqua dest. viermal für jeweils zwei Minuten gewaschen und zweimal für fünf Minuten in DNase I-Puffer (1:10 in Aqua dest.) gespült. Der Positivkontrollschnitt jedes Objektträgers wird für weitere 15 Minuten mit DNase I (1:10 in DNase I-Puffer) inkubiert, um die DNA unspezifisch in Oligonukleotide mit freien 3`OH-Enden zu spalten. Nach einer Spülung in TDT-Puffer (2 x 5 min.) erfolgt die eigentliche Markierungsreaktion mit dem Nukleotidmix, der für eine Stunde bei 37°C auf die Schnitte gegeben wird.

Nukleotidmix auf Eis:

1 µl Biotin-14-ATP,
1 µl Biotin-14-CTP,
0,5 µl Biotin-16-UTP,
10 µl TDT 5x-Puffer,
1,9 µl TdT (nicht beim Negativschnitt) und
63,1 µl Aqua dest.

Die Schnitte werden danach zweimal mit Aqua dest. für drei Minuten gewaschen. Zweimal fünf Minuten lang werden sie mit FCS (2% in PBS) und dann für 60 Minuten mit Streptavidin-AP bei 37°C inkubiert. Dem dreimaligen PBS-Waschvorgang für je drei Minuten folgt eine zehnmünütige Substratreaktion mit Fast Red®. Die erneut gewaschenen Schnitte werden für zehn Sekunden in Hämatoxylin gegengefärbt, unter fließendem Leitungswasser zehn Minuten gespült, dann mit Glycergel®-Medium überschichtet und mit Deckgläschen versiegelt.

C.5.6 Auswertung und Statistik pathohistologischer Methoden

Von den Schnitten wird das Tumorzellen/Stroma-Verhältnis und der ER-Gehalt mikroskopisch bei geringer Vergrößerung (10x) quantitativ geschätzt. Die Fläche, die von Tumorzellen oder ER-positiven Zellen ausgefüllt ist, wird bezogen auf die gesamte Fläche des Tumorschnittes in Prozent geschätzt. Apoptotische Zellen und Zellen, die durch den Proliferationsmarker Ki-67 markiert sind, werden pro Gesichtsfeld manuell gezählt. Insgesamt werden zwischen 3000-6000 Zellen in nicht nekrotischem Gewebe betrachtet. Hierbei werden die Gesichtfelder so ausgewählt, daß jeder mögliche Einfluß auf die Parameter Ki-67 und Apoptose berücksichtigt wird. Die ausgezählten Gesichtsfelder liegen im Bereich neben Nekrosen oder Gefäßen, im Bereich von Tumorzell- oder Stromadichte und im Bereich des Tumorrandes oder der Tumormitte. Eine Statistik wird wegen der geringen Anzahl histologischer Schnitte pro Gruppe bei Auswertung durch einen Beobachter nicht angefertigt.