

3 Material und Methoden

3.1 Material

Sämtliche Grundchemikalien, Lösungsmittel, Puffersubstanzen und Detergenzien wurden von den Firmen Difco (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen und werden im Folgenden nicht einzeln aufgeführt. Die Sequenzierarbeiten wurden durch die Firma AGOWA (Berlin) ausgeführt.

3.1.1 Lösungen für Zellkultur und Bakterien-Nährmedien

Zellkultur

D-MEM mit L-Glutamin und 4,5 g/l Glucose	Gibco/Invitrogen
fötales Rinderserum (FBS)	Biochrom KG
L-Glutamin (100x, 200 mM)	Gibco/Invitrogen
PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (1x)	Gibco
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Gibco/Invitrogen
Trypsin-EDTA in PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (0,05%/0,02% w/v)	Biochrom KG
UltraCulture	Cambrex

Die Vollmedien enthalten zusätzlich jeweils 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin.

Bakterien-Nährmedium

Luria-Bertani-(LB-)Medium:

Trypton-Wasser	15 g
Bacto-Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Bakterien-Agarplatten:

LB-Medium + 2% Agar

3.1.2 Biologisches Material

Prokaryotische Zellen

Bakterienstamm *E. coli* TOP10 (chemisch kompetent, Invitrogen):

F- *mcrA* Δ (*mrr*-*hdsRMS*-*mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ (*ara-leu*)
7697 *galU* *galK* *rpsL* (*StrR*) *endA1* *nupG*

Eukaryotische Zellen

Tabelle 1: Verwendete humane Zelllinien mit Herkunft und Kulturmedium

Zelllinie	Beschreibung	Quelle	Kulturmedium
Aspc-1	Humane duktales Pankreasadenokarzinom-Zelllinie, adhären	ATCC	RPMI 1640 + 10% FBS
BxPc-3	Humane duktales Pankreasadenokarzinom-Zelllinie, adhären	ATCC	RPMI 1640 + 10% FBS
Capan-1	Humane duktales Pankreasadenokarzinom-Zelllinie, adhären	DSMZ, Braunschweig	RPMI 1640 + 15% FBS
DanG	Humane duktales Pankreasadenokarzinom-Zelllinie, adhären	DSMZ, Braunschweig	RPMI 1640 + 10% FBS
MiaPaCa-2	Humane duktales Pankreasadenokarzinom-Zelllinie, adhären	Schering AG	D-MEM + 10% FBS
Panc-1	Humane duktales Pankreasadenokarzinom-Zelllinie, adhären	ATCC	D-MEM + 10% FBS

Tiere

weibliche nu/nu-Maus („nackt“ homozygot)

3.1.3 Antibiotika

<u>Antibiotikum</u>	<u>Stammlösung</u>
Ampicillin (Grünentahl)	50 mg/ml in sterilem Wasser
Blasticidin (Invitrogen)	10 mg/ml in Wasser (steril filtriert)
Doxozyklin (Invitrogen)	10 mg/mg in Wasser (steril filtriert)
Geneticin G418-Sulfat (Gibco)	-
Hygromycin B (Invitrogen)	50 mg/ml in PBS
Penicillin/Streptomycin (Biochrom KG)	10000 U / 10000 μ g/ml
Zeozin (Invitrogen)	100 mg/ml

3.1.4 Enzyme und Enzympuffer

Polymerasen

Pfu DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	Stratagene
Taq DNA-Polymerase (5 U/μl)	Roche

Ligasen

T4 DNA Ligase (1 U/μl)	Gibco
------------------------	-------

Restriktionsenzyme

Bgl II (10 U/μl)	Invitrogen
Hind III (10 U/μl)	Invitrogen
Not I (10 U/μl)	Invitrogen
Pvu II (10 U/μl)	Invitrogen

Sonstige

Alkalische Phosphatase (Shrimp; 1 x 10 ³ U/ml)	Roche
RNase A (100mg/ml)	Qiagen

3.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper mit Human-Reaktivität

Tabelle 2: Verwendete Primär-Antikörper mit Herkunft und Reaktionsbedingung

Antigen	Spezies/Klon	Eingesetzte Verdünnung	Puffer	Firma
Bcl-2	anti-Maus	1 : 1000	PBS + 0,1% Tween20	Santa Cruz
β-Aktin	anti-Maus	1 : 1000	PBS + 0,1% Tween20	Sigma
CD31	anti-Human	1 : 100	PBS	BD PharMingen
CD34	anti-Human	1 : 10	PBS	BD PharMingen
CDK2	anti-Kaninchen	1 : 1000	PBS + 0,1% Tween20	Santa Cruz
CDK4	anti-Kaninchen	1 : 500	PBS + 0,1% Tween20	Santa Cruz
Flag (M2)	anti-Maus	1 : 1000	TBS; TBS + 0,05% Tween 20	Santa Cruz
K-Ras (F234)	anti-Maus	1 : 100	PBS + 0,1% Tween20	Santa Cruz
Lyve-1	anti-Human	1 : 200	PBS	RELIA Tech GmbH
p21 (Ab-1)	anti-Maus	1 : 200	PBS + 0,1% Tween20	Oncogen
p53 (DO-1)	anti-Maus	1 : 1000	PBS + 0,1% Tween20	Santa Cruz
pan-Zytokeratin	anti-Human	1 : 50	PBS	Santa Cruz

3.1.8 Vektoren

pcDNA3.1 ⁺ -wtp53	(Xirodimas et al., 2001)
pcDNA4/TO	Invitrogen
pcDNA4/TO-Luziferase	Invitrogen
pcDNA6/TR	Invitrogen
pTER ⁺	(van de et al., 2003)
pTet-on	Clontech
pTre2Hyg	Clontech
pTre2Hyg-Luziferase	Clontech

3.1.9 Sonstige Substanzen und Materialien

AEC-Lösung	DakoCytomation
Agarose	GibcoBRL oder Serva
alamarBlue™	Biochrom
Chamber Slide with Cover, steril	Lab-TEK, Nalge Nunc International
dNTPs	Invitrogen
Ethidiumbromid	Roth
Fettstift	DakoCytomation
Hämatoxylin-Lösung	Vector Laboratories
Interferon- γ (IFN- γ) 100000 IU/ml	Roche
JC-1	Eugene, OR
Kaisers Glyceringelantine	Merck
Ketvet	Pharmacia GmbH
Microcon YM-30	Millipore
Oxidizing und Enhanced Luminol Reagent	Firma NEN
Propidiumjodid	Sigma
RNA-Bee	TEL-TEST, INC. (USA)
Rompun	Bayer
Saccharose	Sigma
SuperFrost®Objekträger	Firma Langenbring
Tissue-TEX	SakuraFinetek
Wasser, steril doppelt destilliert	DeltaSelect GmbH

3.1.10 Geräte

Autoklav Jumo Comp LS	Webco
Brutschrank für Bakterienplatten	Heraeus
Brutschrank für Gewebezellen	Forma Scientific/Heraeus

Brutschrank mit Schüttler	Edmund Bühler
Elektrophorese- u. Blotapparaturen für Minigele	Bio-Rad
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Bio-Rad
EL800 Universal Microplate Reader	Bio-TEK Instruments INC.
FACSCalibur + Computer mit Cell Quest Software	Becton Dickinson/Macintosh
Feinwaage max. 150 g	Sartorius
Filmentwicklungsgerät 45compact	Protec
GENios	TECAN GmbH
Grobwaage max. 1200 g	Kern
Heizblock mit Schüttelfunktion	Eppendorf
Kamerasystem mit UV-/Weißlichtkasten	Biometra
Kryotom 28000 Frigocut	Leica
Magnetrührer	Variomag
MicroLuminatPlus	EG Berthold
Mikroskop	Zeiss
Mikroskop mit Kameraaufsatz	Zeiss, Nikon
Mikrowelle	Siemens
Multipette	Eppendorf
Photometer	Beckman
Pipettierhilfen	Integra Biosciences
Schüttler	Heidolph
„Sonifikator“ Sonoplus	Bandelin electronic, Berlin
Spannungsgerät	Bio-Rad
Sterile Werkbank	Heraeus
Thermocycler RoboCycler Gradient 96	Stratagene
Tischzentrifugen	Beckman, Eppendorf
Trockenschrank	Memmert
Vortex Reax Control	Heidolph
Wasserbad	Julabo
Zentrifuge Allegra 64R	Beckman

3.2 Methoden

3.2.1 Gentechnische und molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle molekularbiologischen Methoden nach Sambrook und Kollegen durchgeführt (Sambrook J and Russel D.M., 2001).

3.2.1.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA/RNA

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren im elektrischen Feld aufgrund ihrer netto negativen Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrates ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Beweglichkeit der linearen Moleküle nimmt mit steigender Basenzahl (bis zu 50 kb) logarithmisch im Agarosegel ab. Je nach erwarteter Fragmentgröße werden unterschiedlich prozentige Gele angefertigt. Dazu wird eine entsprechende Menge Agarose in 1xTAE durch Kochen zum Lösen gebracht, Ethidiumbromid (8 µl einer 1%igen Lsg. in 100 ml) dazugegeben und in eine vorbereitete Kammer mit entsprechend gewünschten Kämmen gegossen. Die Proben werden mit 1/8 Volumen Ladepuffer versetzt und nach Auspolymerisieren des Gels in die vorgesehenen Taschen pipettiert. Zur Abschätzung der Fragmentgröße wird ein geeigneter Längenstandard mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in 1xTAE bei 70 – 100 V.

Da sich Ethidiumbromid (planares Molekül) zwischen die einzelnen Basen einlagert und unter UV-Licht (365 nm) stark orange-rot fluoresziert, ist eine Auswertung mittels Transilluminator und Videokamera mit angeschlossenem Bildbearbeitungssystem möglich.

Ladepuffer:	Saccharose	45%	50xTAE:	242 g Tris-Base
	Tris/HCl pH 7,6	20 mM		57,1 ml Eisessig
	EDTA	20 mM		100 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0)
	Bromphenolblau	0,25%		ddH ₂ O ad 1 l
	Xylene Cyanol FF	0,25%		
	add steriles ddH ₂ O			

3.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Nukleinsäuren absorbieren Licht mit einer Wellenlänge von 250 – 270 nm, wobei das Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Zur Konzentrationsberechnung einer DNA/RNA-Lösung wird die Formel optische Dichte $(OD)_{260nm} = 1$ verwendet. Dies entspricht einer Konzentration von 0,5 µg/ml Doppelstrang-DNA bzw. 0,4 µg/ml RNA. Zur Abschätzung der Reinheit wird zusätzlich die OD bei 280 nm gemessen, die dem Absorptionsmaximum von

Proteinen entspricht. Der Quotient von 260/280 nm sollte dabei bei einer reinen RNA- oder DNA-Lösung zwischen 1,6 und 1,8 liegen.

3.2.1.3 RNA-Isolation und Reverse Transkription

Isolation

Aus eukaryotischen Zellen (je eine Kulturschale mit 10 cm Durchmesser) wird die Gesamt-RNA mittels RNA-Bee nach Herstellerprotokoll isoliert und in 50 µl RNase-freiem Braun-Wasser gelöst.

Reverse Transkription

Entdeckt wurde die Reverse Transkriptase in RNA-Tumorviren, die ihre RNA-Genome zur Replikation in der Wirtszelle in komplementäre DNA (cDNA) umschreiben müssen (Baltimore, 1970; Temin and Mizutani, 1970). Die verwendete SuperScript II RNase H Reverse Transkriptase aus dem Moloney Leukämievirus der Maus stellt den „First-Strand“-cDNA mit hoher Ausbeute und einem großen Anteil vollständiger Produkte her.

Abfolge:

1 µg RNA in 8 µl RNase-freies ddH ₂ O	
Oligo dT Primer (0,5 µg/µl)	1 µl
dNTPs (10 mM jedes)	1 µl
→ 5 min bei 65°C denaturieren und danach sofort auf Eis stellen	
10 x First-Strand Buffer	2 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
RNaseOut (40 U/µl)	1 µl
→ 2 min bei 42°C inkubieren	
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
→ 50 min 42°C, danach 15 min 75°C	
RNase H (2 U/µl)	1 µl
→ 20 min 37°C	

Bis zur weiteren Verwendung wird die cDNA bei -20°C gelagert.

3.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis and Faloona, 1987) ist eine enzymatisch katalysierte *in vitro*-Reaktion, die zur Amplifizierung gewünschter DNA-Bereiche führt. Unter Verwendung zweier sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) synthetisiert die thermostabile DNA-Polymerase das spezifische DNA-Fragment.

Hier kommen zwei verschiedene Polymerasen zum Einsatz: Zum einen die Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, die einen A-Überhang am synthetisierten Strang produziert und zum anderen die Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, die aufgrund ihrer *proof reading* Funktion etwa achtmal genauer arbeitet. Die verwendeten Primer werden mit Hilfe eines Design-Programms ausgewählt, von der Firma TIB Molbiol synthetisiert und HPLC aufgereinigt. Die Annealing-Temperatur wird mittels Gradientencycling optimiert.

Tabelle 3: Verwendete Primer

Name	Annealing-Temperatur (verwendete)	Sequenz
krasleft	60°C	5'-GAG AGA GGC CTG CTG AA-3'
krasright	60°C	5'-TAC TGG CAC TTC GAG GA-3'
Notlp53-5'	48°C und 60°C	5'-GCG GCC GCA TGG AGG AGC CGC AGT CA-3'
FlagNotlp53-3'	48°C und 60°C	5'-GCG GCC GCT CAC TTA TCG TCG TCA TCC TTG TAA TCG TCT GAG TCA GGC CC-3'

Ansatz 25 µl

x µg Plasmid-DNA bzw. 3 µl cDNA

10 x PCR-Puffer 2,5 µl

dNTP-Mix (10 mM jedes) 0,5 µl

Primer 1 (10 mM) 1 µl

Primer 2 (10 mM) 1 µl

Pfu-Polymerase (2,5 U/µl) 0,6 µl

steriles ddH₂O ad 25 µl

PCR-Programm für K-Ras

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

PCR-Programm für p53

Da die Primer komplementäre und nichtkomplementäre Abschnitte enthalten, wird ein Zwei-Stufen PCR-Programm mit verschiedenen Annealing-Temperaturen verwendet.

Fenster	1	2	3	Zyklen
WIN 1	95°C, 4 min	-	-	1
WIN 2	95°C, 45 sec	48°C, 45 sec	72°C, 2,5 min	2
WIN 3	-	-	-	-
WIN 4	-	-	-	-
WIN 1	95°C, 30 sec	-	-	1
WIN 2	95°C, 45 sec	60°C, 45 sec	72°C, 2,5 min	28
WIN 3	-	-	72°C, 10 min	1
WIN 4	-	-	-	-

3.2.1.5 Klonierungstechniken

Restriktion

Doppelsträngige DNA ist durch Restriktionsendonukleasen, die spezifische Sequenzen erkennen, in Fragmente zerlegbar. Eine Einheit Enzym wird dabei als Menge definiert, die in einer Stunde 1 µg DNA schneiden kann. Die verwendeten Restriktionsenzyme werden mit entsprechendem Puffer im Überschuss mit 10 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Die Reaktionstemperatur wird der Anleitung des jeweiligen Restriktionsenzym entnommen. Bei präparativen Ansätzen wird 3-4 h, bei Testrestriktionen 1 h inkubiert, danach die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Dephosphorylierung

Die alkalische Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung des 5'-Phosphats von DNA und RNA. Hier kommt dieses Enzym zur Dephosphorylierung eines geschnittenen Plasmids zum Einsatz, was die Ligation mit dem DNA-Fragment vereinfacht. Der Restriktionsansatz für das Plasmid wird zur Vorbereitung 15 min bei 65°C inkubiert, um die Restriktionsendonuclease zu inaktivieren. Danach werden 0,9 µl Dephosphorylierungspuffer und 1 µl alkalische Phosphatase hinzugefügt und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Enzym bei 65°C inaktiviert (15 min).

Ligation

Mit Hilfe des Enzyms Ligase (T4 DNA Ligase mit Puffer) werden überhängende komplementäre oder glatte Enden doppelsträngiger DNA miteinander verbunden. Das Insert wird im Verhältnis 3 : 1 zum Vektor eingesetzt. Der Ansatz wird 16 h in einem Eisbad bei 4°C inkubiert.

Vektor	100 ng
Insert	3:1 zum Vektor
5 x Ligasepuffer	4 µl
T4 DNA Ligase (0,1 U)	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Transformation

Bei der chemischen Transformation werden Plasmide in Bakterienzellen geschleust, deren Membran dafür durchlässig gemacht wurden ist, so genannte „kompetente“ Zellen. Hier werden *E. coli* (TOP10) verwendet. Für jede Transformation wird ein Aliquot (50 µl) Zellen langsam auf Eis aufgetaut und vorsichtig gemischt. Von der durchgeführten Ligation werden 2 µl zu den Zellen gegeben, vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wird der Ansatz für 30 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, sofort wieder auf Eis heruntergekühlt und

mit 500 µl LB-Medium versetzt. Um das Wachsen der Zellen zu gewährleisten werden diese für 1 h bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Je 25 µl, 50 µl und 475 µl der Suspension werden auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen und nach dem Einziehen der Flüssigkeit auf dem Deckel 16 h bei 37°C inkubiert.

Klonierung des pTER⁺-K-Ras-Vektors

Name	Sequenz
Oligo 1	5'-GAT CCC CGT TGG AGC TGT TGG CGT AGT TCA AGA GAC TAC GCC AAC AGC TCC AAC TTT TTG GAA A-3'
Oligo 2	5'-AGC TTT TCC AAA AAG TTG GAG CTG TTG GCG TAG TCT CTT GAA CTA CGC CAA CAG CTC CAA CGG G-3'

Der pTER⁺-Vektor wurde von der Arbeitsgruppe van de Wetering (Lit) bereitgestellt und ist eine Abwandlung des pcDNA4/TO-Vektors, bei dem der CMV-Promotor gegen einen H1-Promotor ausgetauscht wurde (van de et al., 2003). Außerdem enthält dieser H1-Promotor nur eine *TetOperator2*(*TetO₂*)-Sequenz. Die spezifischen ss cDNA-Oligos für die mutierte *K-Ras*-Form der DanG-Zelllinie werden nach Brummelkamp et al. (2002) designt und von der Firma TipMolBiol hergestellt. Zum Annealen werden je 2 µM der spezifischen Oligos, 5 µl steriler Annealing-Puffer (100 mM Kalium-Acetat; 30 mM Hepes KOH pH 7,4; 2 mM Magnesium-Acetat) und 43 µl steriles ddH₂O gemischt, 5 min bei 99°C inkubiert und langsam auf Raumtemperatur (RT) wieder abgekühlt. Der Vektor pTER⁺ wird mit Hilfe von Bgl II und Hind III linearisiert, anschließend auf einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel eluiert. Die hergestellte ds cDNA für den mutierten Bereich der *K-Ras*-Sequenz der DanG-Zelllinie wird nach dem Annealen in den pTER⁺-Vektor ligiert.

3.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-Mini-Präparation

Für die Analyse rekombinanter DNA werden Plasmide mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits aus *E. coli*-Zellen isoliert. Nach Transformation und Klonbildung auf Agarplatten werden diese mit Hilfe von sterilen Spitzen gepickt. Diese Klone werden zum einen auf einer Masterplatte abgestrichen und zum anderen in einem 12 ml Röhrchen mit 3 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin überführt. Die Röhrchen werden 16 h bei 37°C und 225 rpm geschüttelt, die Masterplatte bei 4°C gelagert. Je 2 ml Kultur werden zur Plasmidisolierung nach Protokoll eingesetzt. Die DNA wird am Ende mit 50 µl sterilem ddH₂O eluiert.

Plasmid-Maxi-Präparation

Die Maxi-Präparation wird genutzt, um ausreichende Mengen von Plasmid-DNA aus *E. coli* für Transfektionen von Zellen zu gewinnen. Dabei werden die *E. coli* eines gewünschten

Klons von dem zuvor hergestellten Glycerinstock bzw. dem verbliebenen Medium der Plasmid-Mini-Präparation, 16 h in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin herangezuchtet. Die Plasmide werden mit Hilfe des Plasmid-MAXI-Kits isoliert und am Ende wird das DNA-Pellet in 200-500 µl sterilem ddH₂O gelöst.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

Die humanen Karzinom-Zelllinien (Tabelle 1) werden mit entsprechendem Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Weitere Methoden wie Passagieren, Einfrieren, Auftauen und Zellzahlbestimmung wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach dem Zellkultur-Handbuch der Firma SIGMA-ALDRICH durchgeführt.

3.2.2.1 Stabile Transfektion

Die Pankreaskarzinom-Zelllinien lassen sich mittels Effectene Transfection Kit, einer auf Lipid-DNA-Komplex-Bildung basierenden Transfektionsmethode, transfizieren. Hierbei wird die eingebrachte Plasmid-DNA dauerhaft in das Genom der Zellen integriert. Diese genetisch modifizierten Zellklone werden durch einen Selektionsdruck unter Antibiotikagabe, deren Resistenz über das aufgenommene Plasmid vermittelt wird, isoliert und herangezogen.

In einer 8,5 cm Schale werden ein Mal 10⁶ Zellen ausgesät. Am darauf folgenden Tag wird der Transfektionsansatz mit 5 µg DNA, 300 µl EC-Puffer, 40 µl Enhancer, 50 µl Effectene und 3 ml Kulturmedium mit den entsprechenden Inkubationszeiten hergestellt. Dieser Ansatz wird tropfenweise auf die Zellen gegeben, welche zuvor mit PBS gewaschen und mit 7 ml Kulturmedium versehen werden. Nach 24 h Inkubation wird das Transfektionsgemisch entfernt, zwei Mal vorsichtig mit Kulturmedium gewaschen und nochmals 24 h mit Kulturmedium ohne Selektionsantibiotikum kultiviert. Die transfizierten Zellen werden mittels Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, gut resuspendiert und in unterschiedlichen Verhältnissen (1:10; 1:8; 1:5; 1:2,5) auf 14 cm Schalen verteilt, welche mit Kulturmedium und dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versehen werden. Die nach zwei bis drei Wochen gewachsenen Klone werden mit einer sterilen Filterspitze gepickt und in einer 48-Lochplatte mit dem spezifischen Selektionsmedium herangezogen.

3.2.2.2 Transiente Transfektion und Transienter Luziferase-Reporter-Gen-Assay

Kalziumphosphat-Präzipitation

Zur transienten Transfektion von Pankreaskarzinom-Zelllinien werden pro 35 mm-Schale 0,5 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Bezogen auf die 35 mm-Schale wird die zu transfizierende

Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 109,5 μl H_2O aufgenommen und tröpfchenweise mit 15,5 μl 2 M CaCl_2 und 125 μl 2 x DNA-Präzipitationspuffer (50 mM HEPES; 1,5 mM Na_2HPO_4 ; 10 mM KCl; 280 mM NaCl; 12 mM Glucose; pH 7,05) versetzt. Dieser Ansatz wird 30 min bei RT inkubiert, damit diese für die Transfektion notwendige Komplexe bilden. Die Zellen werden anschließend vorsichtig mit 250 μl des Ansatzes versetzt und 4 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Transienter Luziferase-Reportergen-Assay

Die stabil transfizierten Pankreaskarzinom-Zellklone, die unter Selektionsdruck herangewachsen sind, werden auf die TetRepressor(TetR-)-Expression getestet. Dazu wird ein zweites Plasmid (pcDNA4/TOLuziferase oder pTre2HygLuziferase) transient in die Zellen transfiziert. Dieses Plasmid enthält das Luziferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* und in den Promotor eingebaute TetO_2 -Sequenzen, an die der TetR bindet und somit die Luziferasegen-Expression unterdrückt. Durch Zugabe von Doxzyklin (Dox) wird der Repressor von der Operator-Sequenz gelöst, Luziferase exprimiert und das Substrat Luziferin umgesetzt, wobei ein optisch messbares Signal entsteht (Abb. 7). Dafür werden je Zelllinie sechs Mal 2×10^5 Zellen pro 35 mm-Schale ausgesät und nach 24 h mit dem pcDNA4/TOLuziferase- oder pTre2HygLuziferase-Plasmid mit Hilfe einer Kalziumphosphat-Präzipitation transfiziert. Nach 4 - 6stündiger Transfektionszeit werden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und mit 2 ml UltraCulture versehen. In drei Schalen werden zur Induktion 2 μl Dox [1 mg/ml] zum Medium gegeben und die anderen drei Schalen als uninduzierte Kontrolle mitgeführt. Die Inkubationszeit beträgt 48 h bei 37°C und 5% CO_2 . Die Zellernte und Messung von Leuchtkäfer-Luziferase-Aktivität erfolgen mit Hilfe des Luciferase Assay Systems nach Angaben der Hersteller in dem MicroLuminatPlus. Die Luziferase-Aktivitäten (*relative light units* – RLU) werden als x-fache Anstiege in Bezug auf die Dox freie Kontrolle berechnet. Zur Hintergrundbestimmung dienen Zelllysate, die keine Transfektion durchlaufen haben.

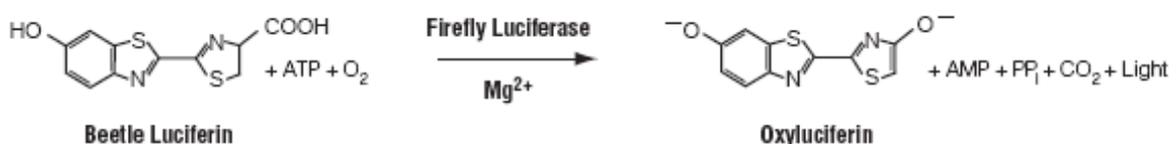


Abb. 7: Leuchtkäfer-Luziferase katalysierte Enzymreaktion

Während der Oxidation des Substrates (Beetle Luciferin) durch die Leuchtkäfer-Luziferase werden Photonen emittiert, die vom Messgerät quantifiziert werden können. [aus Luciferase Assay System, Technical Manual (No. 281) von Promega, Mannheim]

3.2.2.3 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung) dient der Auftrennung spezifisch markierter Zellen. Diese werden beispielsweise an Fluoreszenz-markierte Moleküle gebunden und anschließend in einer Fließkammer an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Von jeder Zelle ist so Größe, Granularität, Fluoreszenzart und -intensität bestimmbar (Herzenberg et al., 2002).

Zellzyklus-Analyse

Zur Analyse des Zellzyklus wird die DNA eukaryotischer Zellen durch Einlagerung von Propidiumiodid, das unter UV-Licht (365 nm) fluoresziert, markiert. Die DNA-Mengen einer Zelle variieren während des Zellzyklus und somit können die Zellen den einzelnen Phasen anhand der eingelagerten Propidiumjodidmenge zugeordnet werden.

Hierfür werden der Zellüberstand und die mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelösten Zellen (mind. 2×10^5) in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 900 μ l PBS gelöst. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren werden die Zellen vereinzelt, bevor sie unter Mixen drei Mal mit 700 μ l absolutem, eiskaltem Ethanol fixiert werden. Die Zellsuspension muss mind. 30 min bei -20°C gelagert werden, bevor diese nach einem Waschschrift mit PBS in 300 μ l Färbelösung (50 μ l Propidiumjodidlösung (1mg/ml), 3 μ l RNase A (100 mg/ml), PBS ad 1 ml) resuspendiert wird. Nach 30 min Inkubation bei 37°C im Dunkeln werden je ein Mal 10^4 Zellen mit Hilfe der CellQest Software im FACSCalibur-Gerät analysiert.

Messung des mitochondrialen Potentials

Aufgrund der oxidativen Reaktionen der Atmungskette entsteht ein negativer elektrochemischer Gradient entlang der mitochondrialen Membran, somit entsteht ein polarisiertes mitochondriales Potential. Zu einem frühen Zeitpunkt der Apoptose werden aktive Mitochondrien zerstört und damit die Ionenkanäle geöffnet, was eine Depolarisation des mitochondrialen Potentials zur Folge hat. Dabei finden ein Ionenausgleich und eine Cytochrom C-Entlassung statt. Dieses mitochondriale Potential ist durch Zugabe von JC-1 (*1st J-aggregate-forming cationic dye*) messbar. JC-1 hat die Eigenschaft als Monomer bei 527 nm zu emittieren (grün fluoreszierend). In gesunden Zellen wird JC-1 in die Mitochondrien aufgenommen, akkumuliert und bildet Aggregate, die rot fluoreszieren (Emissionsmaximum bei 590 nm). Bei Apoptose-durchlaufenden Zellen entstehen keine höheren JC-1-Konzentrationen in den Mitochondrien, die zur Aggregatbildung führen würden. Somit fluoreszieren diese Zellen nicht (Mathur et al., 2000).

Zur Messung des mitochondrialen Potentials werden der Zellüberstand und die mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelösten Zellen (nur kurz trypsiniert) in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml JC-1-Lösung (JC-1-Stammlösung 2 mg/ml in DMSO; mit warmen Medium auf 5 µg/ml verdünnt) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37°C im Dunklen werden die Zellen zwei Mal mit 500 µl kaltem PBS gewaschen, bevor es in 250 µl PBS resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt wird. Die Messung des mitochondrialen Potentials der Zellen erfolgt im FACSCalibur-Gerät und die Auswertung mit der CellQuest Software. Dabei werden Apoptose-durchlaufende Zellen in Prozent von der Gesamtzellzahl angegeben.

3.2.2.4 Zellproliferationstest

Die alamarBlue™-Reduktionsmethode macht sich zu Nutzen, dass die Umgebung sich teilender Zellen stärker reduziert ist als die sich nicht teilender Zellen. AlamarBlue™ wird durch ein Elektron (aus Redox-Reaktionen der Zelle) reduziert und wechselt dabei von oxidiertem, nicht-fluoreszierendem Indigo-Blau zum reduzierten fluoreszierenden Pink. Diese Fluoreszenz wird mit Hilfe des GENios/TECAN-Gerätes gemessen. Zur Bestimmung der Proliferation werden drei Mal 2×10^5 Zellen in einer 24-Lochplatte ausgesät und eine Negativkontrolle ohne Zellen als Blank-Wert mitgeführt. Pro Messzeitpunkt wird eine Platte angelegt, da der Ansatz nach der Messung unsteril ist und Verunreinigungen durch Bakterien weitere Messungen beeinflussen können. Am Messtag werden die Zellen mit 50 µl alamarBlue™ versetzt und 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die gemessenen Fluoreszenz-Emission-Intensitätseinheiten (Anregungswellenlänge: 535 nm, Emissionswellenlänge: 590 nm) werden als *relative fluorescence units* (RFU) in Abhängigkeit der Zeit als Wachstumskurve aufgetragen.

3.2.3 Proteinanalytische Methoden

3.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Zelllysate mit RIPA (modified radioimmunoprecipitation)-Puffer

Die adhärent gewachsenen Zellen werden auf Eis mit kaltem PBS gewaschen, mit dem RIPA-Puffer versetzt und dann mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellsuspension wird in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 10 – 15 Impulsen bei 58% Power sonifiziert. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wird die Lösung bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird als Proteinlysate abgenommen und steht für weitere Versuche zur Verfügung oder wird in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

RIPA-Puffer: 5 x Ansatz

NaCl	750 mM
Tris (pH 8)	50 mM
NP-40	5%
SDS	0,5%
NaDoc	2,5%

Der Puffer wird vor Gebrauch auf einen 1 x Ansatz mit ddH₂O verdünnt und mit den folgenden Protease- und Phosphataseinhibitoren (Endkonzentrationen) versetzt:

DTT (1 mM); Aprotinin (3,2 µg/ml); Leupeptin (2 µM); PMSF (2 mM); NaF (10 mM); Na₃VO₄ (1 mM).

Zelllysate mit SDS-Lysepuffer

Hierfür werden der Zellüberstand und die mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung abgelösten Zellen mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. $0,3 - 1,5 \times 10^6$ Zellen werden in 200 µl SDS-Lysepuffer (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 6 M Harnstoff, 10% Glycerin, 2% SDS, 0,00125% Bromphenolblau), dem kurz vor Gebrauch 5% β-Mercaptoethanol hinzugefügt werden, resuspendiert und bei 58% Power mit 15 Impulsen sonifiziert. Anschließend wird das Lysat für 15 min bei 65°C inkubiert. Dieses wird direkt für die SDS-PAGE verwendet oder wird bei -20°C gelagert. Aufgrund der Zellzahlbestimmung ist es möglich, gleiche Proteinmengen in einer SDS-PAGE aufzutragen.

3.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen ist durch eine Farbreaktion in Lösung photometrisch bestimmbar. Hier findet die Methode nach Lowry Anwendung (LOWRY et al., 1951), wobei die Reagenzien von der Firma BioRad laut Vorschrift verwendet werden. Pro Probe werden 10 µl Proteinlysate angesetzt. Die Proben und die BSA-Standardreihe werden in Doppelbestimmung gegen einen Leerwert bei 750 nm im EL800 Universal Microplate Reader vermessen. Mit Hilfe der Standardreihe werden die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet.

3.2.3.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli

Denaturierte Proteine werden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese (PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die durch SDS negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode, anfangs in einem Sammelgel zur Fokussierung der Banden und anschließend in einem Trenngel. Die Größe der Proteine ist durch einen mitlaufenden Molekulargewichtsstandard abschätzbar.

Dabei kommt das Elektrophoresesystem für Minigele zur Anwendung. Zuerst wird ein Trenngel mit der gewünschten Acrylamid-Konzentration gegossen und mit Butanol oder ddH₂O überschichtet. Nach dem Polymerisieren wird die Flüssigkeit entfernt und das Sammelgel darüber gegossen. Hierfür wird der Stammlösung SDS (0,1% Endkonzentration), APS (0,1% Endkonzentration) und Temed zugesetzt und nach dem Gießen ein Kamm eingesetzt, der die Taschen für die Proteinlysate bildet. Für die Auftragung von RIPA-Proteinlysaten werden diese auf Eis aufgetaut und Aliquots mit gleicher Proteinmenge und gleichem Volumen hergestellt. Die Lysate werden mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und sofort wieder auf Eis gestellt. Zelllysate mit SDS-Lysepuffer werden auf Eis aufgetaut, ehe diese auf das Gel aufgetragen werden. Der Kamm wird vorsichtig aus dem Gel gezogen, das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit Laufpuffer bedeckt. Die Taschen werden gespült, bevor Proben und Standard mit einer Hamilton-Spritze eingefüllt werden. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt bei 100 - 180 V bis die Probenpufferfront aus dem Gel herausgelaufen ist.

Laufpuffer nach	192 mM Glycin	5 x Probenpuffer:	250 mM Tris-HCl
Lämmli:	25 mM Tris		10% SDS
	0,1% SDS		50% Glycerin
			500 mM DTT
			0,5% Bromphenolblau

Sammelgel:	Acrylamid (30%)	12,6 ml	} Stammlösung
	Tris-HCl (2 M, pH 6,8)	37,3 ml	
	ddH ₂ O	ad 200 ml	

Trenngel:	x% Acrylamid	
	Tris-HCl (2 M, pH 8,8)	1,875 ml
	SDS (10%)	100 µl
	APS (10%)	100 µl
	Temed	5 µl
	ddH ₂ O	ad 10 ml

3.2.3.4 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden elektrophoretisch auf eine Membran transferiert und können dort indirekt detektiert werden. An spezifische Primär-Antikörper binden Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Sekundär-Antikörper, wobei durch die Peroxidase ein Chemilumineszenz-Reagenz umgesetzt und auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht wird.

Der Blot wird luftblasenfrei in Transferpuffer für eine Nass-Blot-Kammer für Minigele nach Anleitung von BioRad zusammengebaut und bei 100 V für 45-90 min (je nach Proteingröße)

mit Eiskühlung geblottet. Nach dem Proteintransfer auf die Membran werden die folgenden Schritte zur Immunodetektion durchgeführt. Die Membran wird zunächst für 30 min bis 2 h bei RT in einer 3 bzw. 5%igen Magermilch-Pufferlösung blockiert und anschließend 16 h bei 4°C oder für 30 min bei RT mit einem Primär-Antikörper (spezifisch verdünnt in Magermilch-Pufferlösung, Tabelle 2) inkubiert. Anschließend wird drei Mal für 10 – 15 min in Pufferlösung gewaschen und dann wird die Membran in der Sekundär-Antikörper-Lösung (1:10000 Verdünnung in Magermilch-Pufferlösung) für 30 bzw. 60 min inkubiert. Danach wird wieder, wie bereits beschrieben, gewaschen und die Membran in ECL-Reagenzlösung inkubiert. Zur Darstellung des Signals, das durch die Umsetzung des ECL-Substrats durch die POD entsteht, wird ein Röntgenfilm in einer Filmkassette aufgelegt. Je nach Signalstärke erfolgt dies wenige Sekunden bis zu Stunden. Das Signal wird optisch ausgewertet.

Pufferlösungen:

10 x TBS (pH 7,4):	24,2 g Tris-Base	}	für Gebrauch auf 1 x TBS verdünnen und 0,05% Tween20 hinzugefügen
	79,5 g NaCl		
	ddH ₂ O ad 1 l		
10 x PBS/Tween:	191 g PBS		
	20 ml Tween20	→	1 x PBS/Tween verwenden

3.2.3.5 Zymogramm

Zur Detektion von Proteasen oder Kollagenasen werden Acrylamidgele mit Gelatine verwendet, da diese als Substrat der Proteasen oder Kollagenasen abgebaut werden und als helle Bande gegen einen dunklen Hintergrund dargestellt werden können. Hier kommen Novex® Zymogramm-Gele (10%) und dazugehörige Pufferlösungen zur Anwendung. Dazu werden Zellüberstände von verschiedenen Versuchen und Marker nach Anleitung auf das Gel aufgetragen und unter denaturierenden Bedingungen die Proteine nach Größe aufgetrennt. Die weitere Behandlung des Gels erfolgt laut Protokoll, wobei Färbe- und Entfärbelösungen selbst hergestellt werden. Das Gel wird eingescannt und optisch ausgewertet.

Färbelösung:	Coomassie Blue staining 0,5% (bei RT in dunkler Flasche lagerbar)	
	Coomassie Blue R-250	1,25 g
	Ethanol (99%)	100 ml
	ddH ₂ O	100 ml
	→ Farbstoff lösen lassen	
	Essigsäure (100%)	25 ml
	ddH ₂ O	ad 250 ml

Entfärbelösung:	Ethanol (99%)	400 ml
	Essigsäure (100%)	100 ml
	ddH ₂ O	ad 1 l

3.2.4 *In vivo*-Experimente

3.2.4.1 Tumorbildung in der Nacktmaus

Für die orthotope Transplantation von Pankreaskarzinom-Zellen wird die Methode von Alves und Kollegen verwendet (Alves et al., 2001b). Dabei werden die Tiere mit einem Gemisch aus Ketvet (100 mg/kg Tier) und Rompun (20 mg/kg Tier) narkotisiert und ungefähr 1 cm median geöffnet. Mit Hilfe einer Insulinspritze (29 Gauge x ½, Becton Dickinson, Heidelberg) werden ein Mal 10⁶ Zellen in 15 µl PBS in den Pankreaskopf appliziert, wobei eine sichtbare Blase entstehen muss. Anschließend wird der Pankreas zurückverlagert und die Bauchwand schichtweise verschlossen. Weitere peri- oder postoperative Medikamentengaben sind nicht notwendig. Wegen der Gefahr einer peritonealen Aussaat von Tumorzellen, die später eine sichere Interpretation der Versuchsergebnis verhindert, werden die Tiere, bei denen während der Tumorzellinokulation ein Austritt der Flüssigkeit in die freie Bauchhöhle oder eine nicht adäquate Zunahme des Pankreasvolumens unter Injektion zu beobachten ist, noch während der Operation durch zervikale Dislokation getötet.

Die Tiere mit erfolgreich implantierten Tumorzellen werden ab der dritten Woche ein Mal wöchentlich zum Abschätzen der Tumorgroße durch Tasten des Abdomens untersucht. Am Ende des Versuches werden die Tiere schmerzlos getötet, die Tumore entnommen, das Gewicht und Volumen bestimmt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C zwischengelagert. Weiterhin werden suspekta intraabdominelle Läsionen und intraabdominelle Lymphknoten entnommen.

3.2.4.2 Immunhistologische/-zytologische Untersuchungen

Mit immunhistologischen/-zytologischen Untersuchungen an Gewebeschnitten bzw. an *in vitro*-Zellen ist die Expression verschiedener Proteine durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers detektierbar.

Für die Untersuchungen an Gewebe wird dieses mit einem Kryotom in 7 µm dünne Scheiben geschnitten. Dazu werden die zuvor entnommenen Tumorbiospien in gefrorenem Zustand mit Tissue-Tex eingebettet und die erhaltenen Schnitte auf SuperFrost®-Objekträger übertragen. Nach Lufttrocknung von 2 - 24 h können die Schnitte direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C eingelagert werden. Zur Weiterverarbeitung werden die eingefrorenen Schnitte aufgetaut, mit einem Fettstift umrandet und in einer 4% PFA/PBS-Lösung (pH 7) für

20 min fixiert. Die weitere Vorgehensweise hängt davon ab, aus welcher Spezies der primäre Antikörper stammt.

Für primäre Antikörper, die aus dem Kaninchen oder dem Schwein stammen, wird folgendes Protokoll angewendet: Nach der Fixierung werden die Schnitte drei Mal 5 min mit PBS gewaschen, mit 0,3% H₂O₂/PBS 10 min zur Blockierung endogener Peroxidasen behandelt und danach zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Inkubation des in PBS verdünnten ersten Antikörpers (Tabelle 2) erfolgt bei RT für eine Stunde in einer feuchten Kammer. Anschließend werden die Schnitte ausgiebig mit PBS gewaschen und mit einem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt in PBS) behandelt. Nach weiteren Waschschritten mit PBS werden die Schnitte mit der ABC-Lösung 30 min bei RT inkubiert und nach dem Waschen mit der AEC-Lösung entwickelt. Durch Sichtkontrolle mittels Lichtmikroskop wird die Entwicklungszeit abgeschätzt und die Reaktion in ddH₂O abgestoppt. Zur besseren Darstellung werden die Schnitte für 2 min mit Hämatoxylin gegengefärbt und anschließend kräftig mit Wasser gespült. Am Ende des Versuches werden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelantine und Deckgläschen eingedeckt und optisch im Mikroskop ausgewertet.

Für Primär-Antikörper aus der Maus wird der Animal Research Kit nach Anleitung verwendet. Dieses System hat den Vorteil, dass Maus-Antikörper auf Tumorgewebe aus dieser Spezies verwendet werden können, da der Antikörper separat biotinyliert und die Mausbindungsstelle blockiert wird. Wie im vorhergehenden Absatz beschrieben, erfolgt auch hier die Entwicklung mit Hilfe der AEC-Lösung.

Zur immunzytologischen Untersuchung von Zellen *in vitro* werden je nach Versuchsansatz und -dauer 2 – 3 x 10⁵ Zellen je Kammer auf einem Achtkammer-Objektträger ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Darstellung der Proteinexpression mittels spezifischen Antikörpers wird hier der Animal Research Kit verwendet. Dazu werden die Zellen nach der Inkubationszeit mit 4% PFA/PBS-Lösung fixiert und laut Herstellervorschrift weiter behandelt. Zur besseren Antigendarstellung erfolgt nach der Peroxidasebehandlung noch ein Permeabilisierungsschritt mit 0,2% TritonX in PBS für 10 min bei RT. Die Entwicklung erfolgt wie bei den Gewebeschnitten mit der AEC-Lösung, was eine Rotfärbung des spezifischen Signals ergibt.

3.2.5 Statistische Auswertung

Alle erhobenen Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen werden mit Hilfe des Students t-Test

(*unpaired*) auf Signifikanz untersucht. Die Analyse der mikroskopischen Metastasierung erfolgte mit Hilfe der Kontingenz (*Fischer's exact Test*). P-Werte $\leq 0,05$ gelten als signifikant.