

4 Material und Methoden

Zur Beantwortung der Fragestellung soll total-RNA aus den Tumorproben isoliert werden. Mithilfe der Sequenzen von besonders stark hochregulierten cDNA-Klonen werden Oligonucleotidprimer designed. Mittels RT-PCR (Reverser Transkriptase und Polymerasekettenreaktion (PCR) in einer Reaktion) werden die zu untersuchenden Gene und Glyceraldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) als Positivkontrolle aus der total-RNA synthetisiert. Die PCR-Produkte werden elektrophoretisch auf Acrylamid-Gelen aufgetrennt. Die densitometrische Auswertung erfolgt mit dem Programm Multi-Analyst von BioRad.

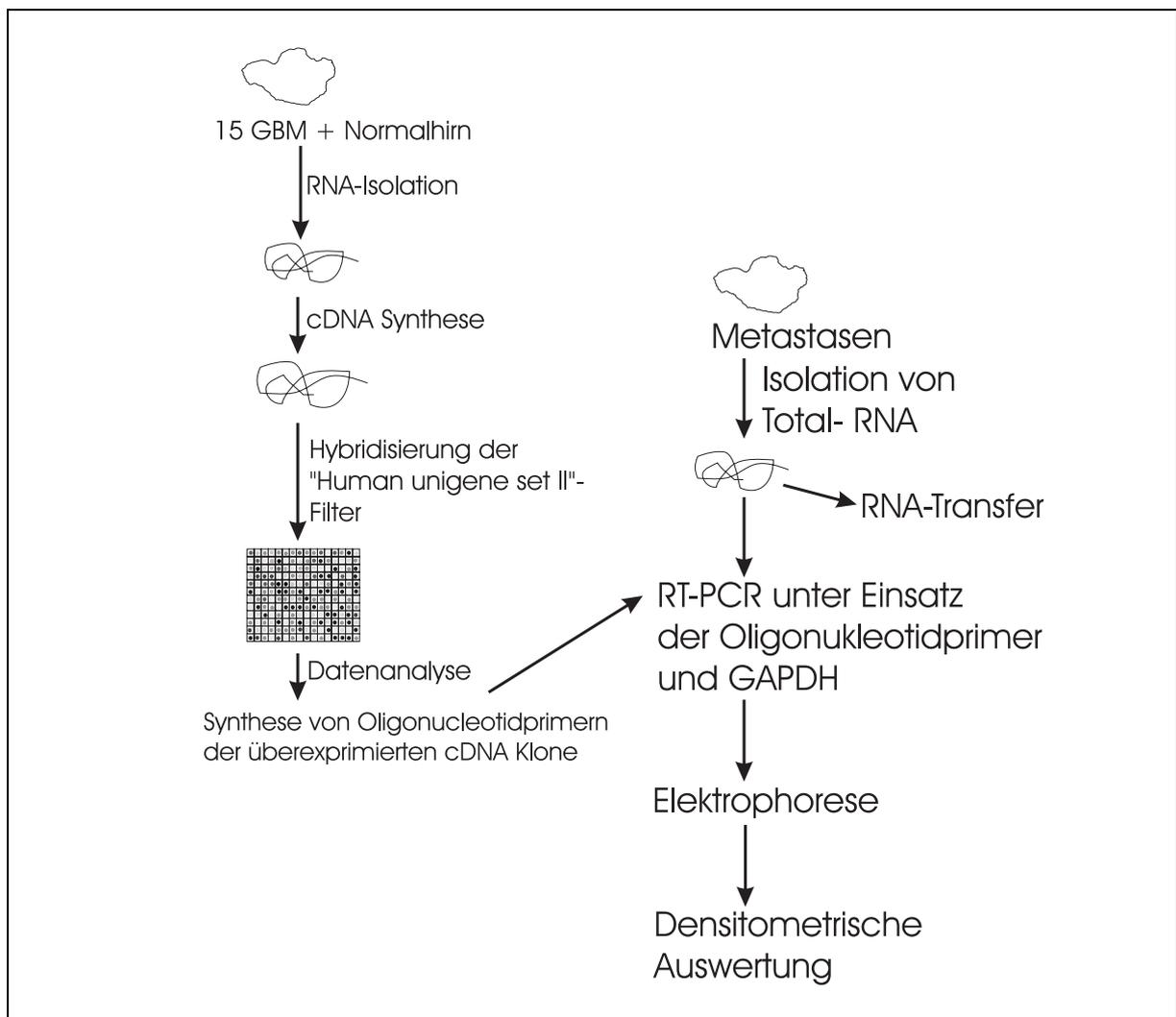


Abbildung 2: Reihenfolge der verschiedenen Arbeitsschritte

4.1 Material

4.1.1 Tumorproben

Die verwendeten Tumorproben entstammen der Hirntumorbank der Arbeitsgruppe "Drug Targeting" (Leitung Frau Dr. Regina Reszka, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin), die seit 1998 unter der Zusammenarbeit mit der Neurochirurgischen Klinik Berlin-Buch (Prof. Dr. Kiwit) geführt wird. Diese Tumorbank umfasst Astrozytome, Glioblastome, Meningeome, Ependymome, Metastasen und eine Vielzahl anderer Operationsresektate. Die Tumorproben werden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für diese Arbeit standen aus der Tumorbank 73 intrakranielle Hirnmetastasen zur Verfügung. Sie gehen auf verschiedene Primärtumore zurück: Adenokarzinome, undifferenzierte Karzinome, Bronchialkarzinome, Nierenzellkarzinome, Mammakarzinome, Plattenepithelkarzinome, maligne Melanome und Liposarcome. Die total RNA des Normalhirns stammt von der Firma Clontech.

4.1.2 Verwendete Puffer

Annealing Puffer	1M Tris-HCl (pH 7,6) und 100 mM MgCl ₂
Extension Puffer	304 mM Zitrat, 324 mM DTT und 40 mM MnCl ₂ (pH 7,5)
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl in 800 ml dH ₂ O gelöst pH 7,0 mit 1N NaOH einstellen, Volumen auf 1000 ml auffüllen und autoklaviert
10xNorthern running Puffer	0,2 M MOPS, 10 mM EDTA, 50 mM NaAcetat pH 7,0 mit 1N NaOH einstellen) Volumen auf 1000 ml auffüllen
Puffer P1	6,06 g Tris und 3,72 g NaEDTA in 800 ml dH ₂ O lösen pH 8,0 mit HCl einstellen, Volumen auf 1000 ml auffüllen 100 mg RNase A pro Liter Puffer P1 zugeben
Puffer P2	8 g NaOH in 950 ml dH ₂ O und 50 ml 20% SDS lösen
Puffer P3	294,5 g Kaliumacetat in 500 ml dH ₂ O pH 5,5 Eisessig einstellen Volumen auf 1000 ml auffüllen
QBT Puffer	43,83 g NaCl und 10,46 g MOPS in 800 ml dH ₂ O lösen pH 7,0 mit 1N NaOH einstellen) 150 ml Isopropanol und 15 ml 10% Triton X-Lösung zugeben Volumen auf 1000 ml auffüllen
QC Puffer	58,44 g NaCl und 10,46 g MOPS in 800 ml dH ₂ O lösen pH 7,0 mit 1N NaOH einstellen) 150 ml Isopropanol zugeben Volumen auf 1000 ml auffüllen
QF Puffer	73,05 g NaCl und 6,06 g Tris in 800 ml dH ₂ O lösen pH 8,5 mit HCl einstellen) 150 ml Isopropanol zugeben Volumen auf 1000 ml auffüllen
Sample Puffer	50 µl 10xNorthern running Puffer, 250 µl deionisiertes Formamid,

	108 μl DEPC- H_2O
SSC	bei Gebrauch 2 μl EtBr und 90 μl Formaldehyd dazugeben 3 M NaCl und 0,3 M NaCitrat in 1000 ml dH_2O lösen pH 7,0 mit HCl einstellen)
Stop Solution	100% deionisiertes Formamid und Dextran Blau 2000 (5 mg/ml)

4.2 Methoden

4.2.1 Isolation von total-RNA

Die total-RNA wird mithilfe des Reagenz "Trizol" der Firma (Fa.) Invitrogen nach folgendem Protokoll aus den Tumorproben isoliert. Alle Arbeiten mit RNA werden unter möglichst RNase-freien Bedingungen ausgeführt. Dazu gehören insbesondere das Tragen von Einweghandschuhen und das Autoklavieren von Pipettenspitzen und Eppendorfgefäßen. Um dH_2O frei von RNasen zu bekommen, wird Diethylpyrocarbonat (DEPC) bis zu einer Konzentration von 0,01% zugesetzt und die Lösung anschließend autoklaviert.

- Homogenisierung

Zur Homogenisierung wird auf Trockeneis mit einem Skalpell ein Teil der Tumorprobe (50 -100mg) abgeschabt. Anschließend wird es in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermahlen. Das "Mehl" wird in 1,5 ml Trizol resuspendiert und 2 - 3 mal durch eine 2 ml-Einwegspritze gezogen.

- Phasentrennung

Um eine vollständige Trennung der Nukleinsäure/Proteinkomplexe zu erreichen, wird die Lösung 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dann werden 0,3 ml Chloroform dazugegeben und nach 15 s vortex, 2 - 3 min bei RT inkubiert. Die Proben werden dann 15 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Die Lösung trennt sich in eine untere rötliche Phenol/Chloroform Phase, eine Interphase und eine obere wässrige Phase, die die RNA enthält (sie entspricht etwa 60 % der eingesetzten Trizolmenge).

- RNA Fällung

Die wässrige RNAhaltige Phase wird in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Zur Fällung werden 0,75 ml Isopropylalkohol dazugegeben und nach Vortexen 10 min bei RT inkubiert. Das Resultat von erneutem Zentrifugieren für 10 min bei 12000 g und 4°C ist ein gelartiges Pellet.

- RNA waschen

Der Überstand wird entfernt und das Pellet mit 1 ml 80 % Ethanol (EtOH) überschichtet. Es wird wieder 5 min bei max. 7500 g und 4°C zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wird das Pellet an der Luft getrocknet und dann in DEPC-Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wird anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt. Die isolierte RNA wird bei -80°C gelagert.

4.2.2 RNA-Transfer

Die Erkennung spezifischer RNAs und die Kontrolle der RNA-Qualität setzt eine Auftrennung der total RNA-Lösung voraus. Die Trennung erfolgt durch die Agarosegelelektrophorese. Dabei wird die RNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Zusatz von Ethidiumbromid (EtBr) wird die RNA in UV-Licht sichtbar. Anschließend werden die verschiedenen RNA-Banden unter Erhaltung ihrer relativen Positionen zueinander auf ein festes Medium (in der Regel eine Nylonmembran) übertragen. Nach dem Transfer muss die RNA auf der Membran fixiert werden. Dadurch erhält man den Northern Blot: eine Membran, auf der die RNA-Fractionen nach ihrer Größe aufgetrennt sind.

- Probenvorbereitung

Es wird eine Menge von 20 μg RNA eingesetzt und das Volumen mit DEPC Wasser auf 30 μl aufgefüllt. Dann werden 15 μl Sample Puffer dazugegeben und die Proben 5 min bei 65°C inkubiert. Dem Sample Puffer werden 90 μl Formaldehyd hinzugefügt, um zu gewährleisten, dass die RNA einzelsträngig vorliegt und keine Sekundärstrukturen ausbildet. Um die Proben im UV-Licht sichtbar zu machen werden außerdem 2 μl EtBr dazugegeben. EtBr bindet an RNA und seine Fluoreszenz wird dadurch im Vergleich zum freien Farbstoff intensiviert. Des Weiteren werden zu jeder Probe 3 μl RNA-Loading Puffer hinzugegeben.

- Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophoreseapparatur wird durch 15-minütiges Einwirken von 0,2 M NaOH-Lösung RNase frei gemacht. Das Gel ist ein 1%iges Agarosegel. 1,25 g Agarose werden in 1xNorthern running Puffer geschmolzen, anschließend werden 6 ml Formaldehyd dazugegeben und in den Gelträger gegossen. Den Laufpuffer bildet 1xNorthern running Puffer. Das Gel läuft bei 5 V/cm 5 min bevor die RNA Proben aufgetragen werden. Bei ebenfalls 5 V/cm trennen sich die RNA Moleküle nach ihrer Größe im elektrischen Feld auf. Der Lauf ist beendet, wenn eine hellblaue Bande (Xylencyanol-Front) zu einem Drittel und eine dunkelblaue Bande (Bromphenolblau-Front) zu zwei Dritteln im Gel gelaufen sind. Das Gel wird aus der Apparatur genommen und unter UV-Licht wird ein Photo gemacht. Das UV Licht macht die an EtBr gebundene RNA sichtbar, da der RNA-EtBr-Komplex im UV Licht fluoresziert. Dann wird das Gel 15 min in 20x SSC gewaschen.

- RNA-Transfer

Für den RNA-Transfer wird das Gel auf einen mit 10x SSC getränkten Streifen Filterpapier gelegt, der auf beiden Seiten in eine Kammer mit Transferpuffer hängt (10x SSC). Auf das Gel wird eine Membran aus Nitrozellulose gelegt (Hybond-NX, Fa. amersham pharmacia), die vorher mit dH_2O befeuchtet und dann 15 min in 10x SSC eingelegt wird. Darauf kommen trockene Filterpapiere. Durch Kapillarkräfte wird die in dem Gel befindlich RNA auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer dauert ca. 16 Stunden. Im UV crosslinker wird die RNA anschließend irreversibel an die Membran gebunden. Die Membran wird bis zum weiteren Gebrauch trocken und RNase-frei gelagert.

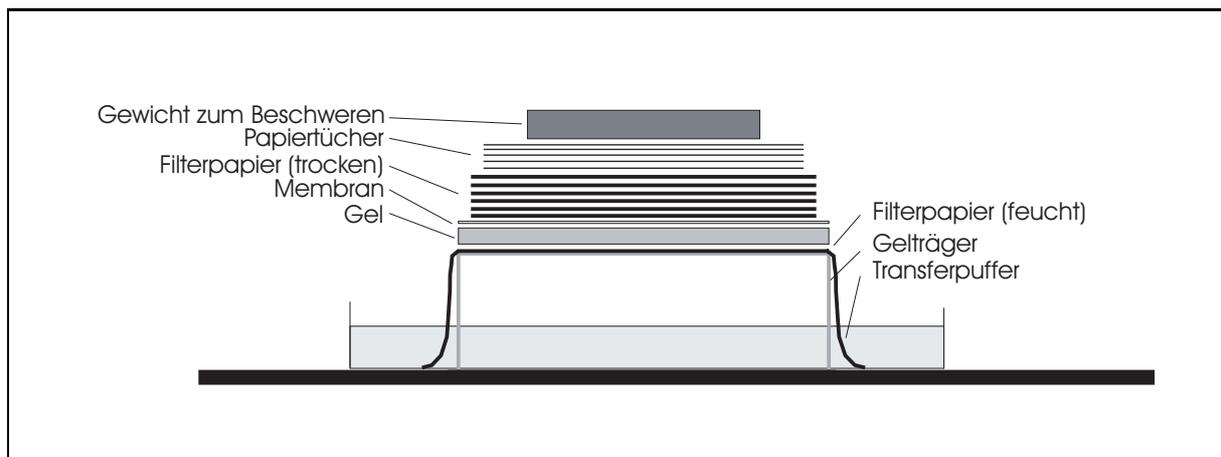


Abbildung 3: Systematischer Aufbau einer RNA- Transfer- Apparatur

4.2.3 Plasmid Maxi-Präparation

Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgt mit dem QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kit (Fa. QIAGEN) nach dem vorgegebenen Protokoll.

Zu 150ml Luria Bertani (LB)-Medium werden 75 μ l Ampicillin und 100 μ l Minikultur zugesetzt und über Nacht bei

Die Übernacht-Kultur wird bei 6000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und die Bakterienpellets in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Dies erfolgt durch kreisende Bewegung im Handgelenk, da so das Pellet am besten ohne Bildung von Zellklumpen gelöst wird. Nachdem sich das Pellet vollständig gelöst hat, werden 10 ml Puffer P2 (NaOH-SDS) dazugegeben. Die Bakterienzellmembran wird durch SDS lysiert und Natriumhydroxid (NaOH) denaturiert Proteine, chromosomale und Plasmid DNA. Die optimale Lyse erfolgt bei RT 5 min lang. Zur Neutralisation werden dann 10 ml bei 4°C vorgekühlter Puffer P3 dazugegeben. Die Lösung wird 4 - 5 mal kräftig geschüttelt und für 20 min auf Eis inkubiert. Durch die hohe Salzkonzentration bilden sich aus den denaturierten Proteinen, der chromosomalen DNA und den übrigen zellulären Bestandteilen Komplexe. Die Plasmid DNA renaturiert, da sie kleiner und kovalent gebunden ist. Nach Zentrifugieren bei >20000g, 4°C für 30 min befindet sich die Plasmid DNA im klaren Überstand und die Präzipitationsprodukte befinden sich am Boden des Zentrifugenröhrchens. Die QIAGEN-tip 500 Säulen werden mit 10 ml QBT Puffer äquilibriert. Dann wird der Plasmid DNAhaltige Überstand in die Säulen gegossen. Durch optimale pH Bedingungen und Salzkonzentrationen wird nur die Plasmid DNA in der Säule zurückgehalten. Die degradierte RNA, Proteine und andere Zellbestandteile werden nicht gebunden und erscheinen in der durchgelaufenen Flüssigkeit. Um eventuell zurückbleibende Verunreinigungen zu eliminieren, wird die Säule zweimal mit je 30 ml QC Puffer gewaschen. Da QC Puffer einen geringen Alkoholanteil enthält, werden unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen aufgehoben. Die DNA wird mit QF Puffer von der Säule eluiert. Um die DNA zu reinigen und von Salz zu befreien, wird der Lösung 10,5 ml Isopropylalkohol zugesetzt. Nach dem Zentrifugieren für 30 min bei >15000g und 4°C ist am Boden des Gefäßes ein Pellet sichtbar. Der Überstand wird abgegossen und das Pellet

mit 5 ml 80 % EtOH überschichtet und anschließend noch einmal 10 min bei $>15000g$ und $4^{\circ}C$ zentrifugiert. Das Pellet wird nach dem Entfernen des Ethanols an der Luft getrocknet und dann in $300 \mu l dH_2O$ gelöst. Die Plasmid DNA Konzentration wird durch Absorption bei 260nm bestimmt.

4.2.4 Sequenzanalyse

Die durch die Maxi-Präps gewonnene Plasmid- DNA wird durch Sequenzanalyse auf die Richtigkeit ihrer Basensequenz überprüft. Dazu wird nach der Strangabbruch-Methode nach Sanger et al. 1972 vorgegangen. Dabei wird die zu sequenzierende DNA in einer Synthesereaktion analysiert. Die Methode gliedert sich in zwei Schritte: Zuerst findet die Anlagerung des Primers statt, anschließend folgt die Sequenzierung mit Terminationsreaktion.

- Primeranlagerung

Durch die Wahl eines spezifischen Primers wird der Startpunkt der zu sequenzierenden DNA-Sequenz festgelegt. Durch die Zugabe von Polymerase wird ein neues Stück cDNA synthetisiert. Dazu müssen neben der DNA-Matrize, dem Primer, der Polymerase und Puffer, die Nucleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP im Reaktionsansatz vorliegen.

- Terminationsreaktion

Der Ansatz wird nach der Primeranlagerung auf vier neue Reaktionsansätze aufgeteilt. Neben den oben aufgeführten Komponenten enthalten die neuen Reaktionsansätze eine zusätzliche Art von Nucleotiden: Didesoxyribonucleosid-Triphosphate (ddNTP). Wird ein solches "modifiziertes" Nucleotid in die neue Sequenz eingebaut, kommt es an dieser Stelle zu einem Kettenabbruch, da das Verknüpfen mit einem nächsten Nucleotid durch die veränderte chemische Struktur verhindert ist. Der Kettenabbruch findet zufällig statt, so dass unterschiedlich lange Fragmente entstehen. Durch Gelelektrophorese können die Kettenfragmente sichtbar gemacht werden und die DNA-Sequenz kann so rekonstruiert werden (siehe Abb. 4).

Sequenzierungsprotokoll

Die Sequenzierung erfolgt nach Protokoll und mit den Komponenten des "AutoRead Sequenzierung Kit" (Fa. amersham pharmacia).

- DNA-Vorbereitung

Pro Ansatz wird $10 \mu g$ DNA eingesetzt. Das dafür notwendige jeweilige Volumen wird mit H_2O dest auf $32 \mu l$ aufgefüllt. Nach Zugabe von $8 \mu l$ 2N NaOH und Vortexen werden die Proben 10 min bei RT inkubiert. Danach werden $7 \mu l$ 3 M NaAcetat (pH 4,8), $4 \mu l$ H_2O dest und $120 \mu l$ 100% EtOH zugegeben. Nach erneutem Vortexen werden die Proben für 15 min bei $-80^{\circ}C$ gelagert. Die Ansätze werden dann 10 min bei $4^{\circ}C$ und 13.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird nach Entfernung des Überstandes in 1 ml 80% EtOH gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren für 5 min bei $4^{\circ}C$ und 13.000 rpm wird das Pellet gut getrocknet und dann in $10 \mu l$ H_2O dest gelöst. (Man erhält eine Konzentration von $1 \mu g/\mu l$ DNA)

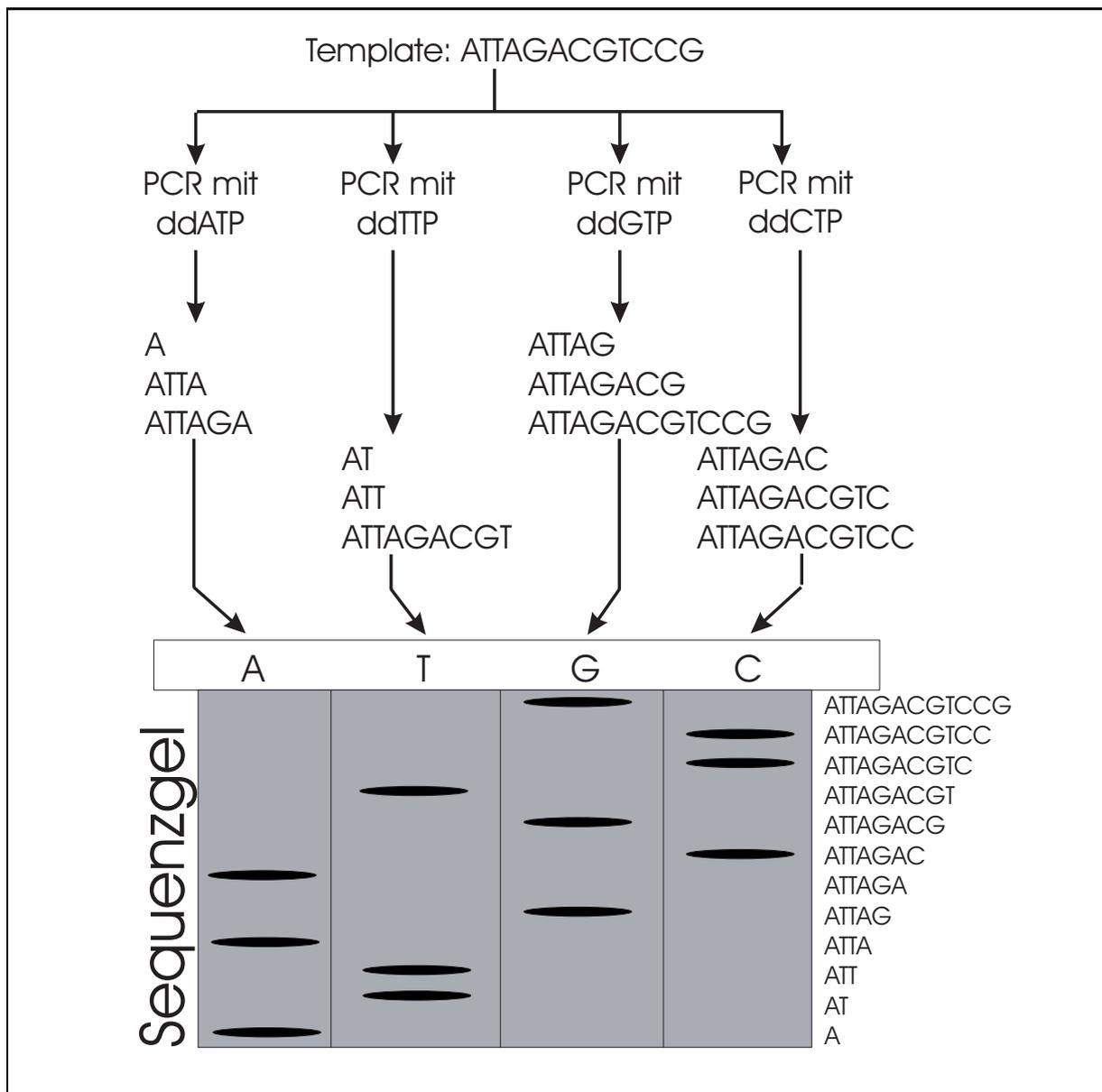


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Sequenzgels

- Primerannealing

Zu den 10 μ l Template DNA werden 2 μ l Primer und 2 μ l Annealing Puffer zugegeben. Nach Vortexen und sofortigem Runterzentrifugieren, werden die Ansätze 5 min bei 65°C inkubiert, anschließend sofort 10 min bei 37°C und dann 10 min bei RT. Nach kurzem Abzentrifugieren werden 1 μ l Extension Puffer und 3 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO) zugefügt.

- Sequenzierungsreaktion

Pro Template müssen vier Eppendorfgefäße mit A, C, T und G markiert werden. In die entsprechenden Gefäße werden 2,5 μ l von A-Mix, C-Mix, G-Mix und T-Mix

pipetiert und anschließend 1 min bei 37°C inkubiert. Zu den vorbereiteten DNA-Ansätzen werden jeweils 2 μl T7 DNA Polymerase zugefügt. Von diesem Ansatz werden dann sofort 4,5 μl zu jedem vorgewärmten Sequenzierung-Mix dazupipetiert. Die Proben werden 5 min bei 37°C inkubiert. Dann wird in jedes Eppendorfgefäß 5 μl Stop Solution gegeben. Nach 3 min bei 90°C werden die Proben sofort auf Eis gestellt.

- Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wird mit der A.L.F.Apparatur der Fa. Pharmacia durchgeführt. Es wird unter Verwendung der "Long Ranger Gel Solution for DNA-Sequenzierung and Fragment Analysis" ein Acrylamid-Gel gegossen. Dazu werden für 75 ml Gellösung 37,5 g Harnstoff, 31 ml H_2O dest und 7,5 ml Long Ranger Solution gelöst. Mit einer Einmalspritze wird die Lösung durch einen 0,45 μm Filter gedrückt und anschließend 375 μl 10% APS und 52,5 μl TEMED hinzugefügt. Das Gel muß 2 Stunden auspolymerisieren. Pro Bahn werden 5 μl Ansatz auf das Gel aufgetragen.

4.2.5 Semiquantitative RT-PCR

Mit der Methode der semiquantitativen RT-PCR können Unterschiede im mRNA-Expressionsniveau nachgewiesen werden. Die reverse Transcriptase bindet an die mRNA und synthetisiert cDNA. Die cDNA wird durch PCR amplifiziert. Die Konzentration der cDNA und der PCR-Produkte ist also direkt von der mRNA-Konzentration in der Probe abhängig. Nach elektrophoretischer Auftrennung gibt die optische Dichte der PCR-Produkte im Gel Aufschluß über die ursprüngliche Konzentration der mRNA in der Probe. Um mit der semiquantitativen RT-PCR valide Aussagen treffen zu können, müssen zwei Voraussetzungen gegeben sein.

Die erste Voraussetzung ist, dass die Amplifikation während der PCR im linearen Bereich stattfinden muss. Bei einer zu hohen Anzahl von Zyklen erreicht die Konzentrationskurve der PCR-Kurve einen Sättigungswert, so dass unterschiedliche Ausgangskonzentrationen an cDNA immer zu ähnlich maximalen Konzentrationen an PCR-Produkt führt.

Die zweite Voraussetzung ist, dass Konzentrationsschwankungen der cDNA in den Proben berücksichtigt werden müssen. Durch die exponentielle Vervielfachung der cDNA während der PCR haben geringe Konzentrationsunterschiede eine starke Verzerrung der Ergebnisse zur Folge. Um die Bedingung dennoch zu erfüllen, muss eine interne Kontrolle, ein sogenanntes "House-Keeping-Gen", eingesetzt werden. Dabei handelt es sich um ein konstant exprimiertes Gen. Auf das Expressionssignal der Positivkontrolle können die gewonnenen Daten bezogen werden.

Als Positivkontrolle wurde GAPDH verwendet. Bei GAPDH handelt es sich um ein konstant exprimiertes Gen, mit dem die Konzentrationsmessung der cDNA überprüft werden kann. Die sequenzspezifischen Primer sind in Tabelle 2 angegeben.

- Probenansätze

Es werden 10 ng/ μl RNA eingesetzt. Dazu werden 1,5 dNTP-Mix (10 mM), Puffer, Titanium-Taq DNA Polymerase (1 u/ μl), Superscript II Reverse Transkriptase (200 u/ μl) und zwei DNA-Primer hinzugefügt.

		Gen	Primer
39	01153- 22	HIF- 3 α 1	ACT GGA TGC CTG CTA CCT GAA G
40	01154- 21	HIF- 3 α 2	CCC AGG TGT TTG CTG ACA TTC
47	01874- 19	GAPDH 1	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C
48	01875- 20	GAPDH 2	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC

Tabelle 2: Primersequenzen

- RT-PCR-Bedingungen

Das Programm zur Amplifikation der cDNA ist:

- 1 Zyklus mit 48°C für 30 min
- 1 Zyklus mit 95°C für 10 min
- 30 Zyklen mit 95°C für 15 s, 60°C für 1 min
- 1 Zyklus mit 60°C für 10 min
- Pause bei 4°C

- Elektrophorese

Die Produkte der semiquantitativen RT-PCR werden mittels Elektrophorese aufgetrennt. Dazu wird ein Acrylamidgel von 6,5 cm x 8,5 cm Größe verwendet. Das Gel wird aus folgenden Reagenzien gegossen:

- 2,25 ml 30% AA/Bis
- 0,25 ml 50x TAE-Puffer
- 0,125 ml APS (1 mg/ml)
- 12,5 ml TEMED
- 10,25 ml H_2O

Vor dem Auftragen wird zu jeder Probe 10 μ l 6x DNA loading Puffer dazugegeben. Von den Probenansätzen werden 25 μ l aufgetragen. Das Gel läuft in 1x TAE- Puffer bei 40 V für 105 min. Die Gele werden nach der elektrophoretischen Auftrennung für 10min in EtBr-Lösung (10 μ l EtBr (10 mg/ml) und 100ml H_2O) gefärbt. Anschließend kann durch den Einsatz eines UV-Transilluminators ein Foto von dem Gel gemacht werden.

4.2.6 Auswertungsmethode

Die Bilder werden digital als TIFF-File erfasst. Die differentielle Expression der PCR-Produkte erfolgt durch den Vergleich der gemessenen optischen Dichte. Für die densitometrische Auswertung wird das Programm Multi-Analyst (BIORAD) verwendet. Das Programm sucht alle lanes und Banden auf dem Gel. Pro lane existieren zwei Banden. Die Banden werden für alle Proben auf allen Gelen gleich groß definiert. Aus allen Messwerten für GAPDH (Positivkontrolle) wird ein Mittelwert gebildet. Anschließend wird jeder einzelne Messwert durch diesen Mittelwert dividiert. Dadurch erhält man für jede Probe einen Normierungsfaktor. Um normierte Messwerte zu erhalten, wird jeder

einzelne Messwerte mit dem Normierungsfaktor multipliziert. Von allen HIF-Werten des Normalhirn wird ein Mittelwert gebildet, auf den alle Tumor-HIF-Werte bezogen werden. Da für jede Probe drei PCRs durchgeführt werden, können Mittelwert und Standardabweichung berechnet werden. Aus diesen Werten lässt sich der Expressionsfaktor wie folgt bestimmen: $(\text{HIF-Tm} / \text{HIF-Nh}) + \text{SD}$. Mit allen Proben, die einen Expressionsfaktor >2 aufweisen, wird die RT-PCR auch im Serum durchgeführt. Ein Expressionsfaktor >2 wird als signifikant definiert.