

2. Material und Methoden

2.1. Abkürzungen

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
APAAP	Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase
β 2M	Haushalts-Gen β 2-Mikroglobulin
dATP	2-Desoxyadenosin-5-triphosphat
dCTP	2-Desoxycytidin-5-triphosphat
dGTP	2-Desoxyguanosin-5-triphosphat
dTTP	2-Desoxythymidin-5-triphosphat
dNTP	2-Desoxyribonukleosid-5-triphosphat
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	Komplementäre DNA
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ssDNA	Einzelstrang-DNA
Etbr	Ethidiumbromid
GTC	Guanidiniumthiocyanat
IHC	Immunhistochemie
LRP	Lungen-Resistenz-assoziiertes Protein
MDR	Multidrug Resistenz
MESA	MOPS-EDTA-Natrium-Acetat-Puffer
MRP	Multidrug Resistenz-assoziiertes Protein
NaCl	Natriumchlorid
NaIO ₃	Natriumjodid
NaNO ₂	Natriumnitrit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pgp	P-Glykoprotein

RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger RNA
RT	Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
TBE	Tris-Borat-EDTA
UV	Ultraviolett

2.2. Geräte

AGS-Horizontal-Elektrophorese Systeme für Agarosegele	Angewandte Gentechnologie Systeme, Heidelberg
Light Cycler	Roche Diagnostics, Mannheim
Photometer	Pharmazia, Freiburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße	Brand GmbH, Wertheim
Schüttler	GFL, Victor Recker
Sofortbildkamera (Reprostar II)	CAMAG, Berlin
Template Tamer	Oncor Appligene, Heidelberg
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

2.3. Materialien für molekularbiologische und immunhistologische Arbeiten

Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
AMV Reverse Transkriptase	Roche Diagnostics, Mannheim
Antibody Diluent	DAKO Diagnostika, Hamburg
APAAP-Klon	DAKO Diagnostika, Hamburg
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
dATP	Roche Diagnostics, Mannheim
dCTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Deckblättchen	Menzel-Gläser, Braunschweig
dGTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Diethyl Pyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
DMF	Merck, Darmstadt
DNA ladder 100 bp	Biolabs, Schwalbach
dNTP	Roche Diagnostics, Mannheim
dTTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Guadiniumthiocyanat	Sigma, Deisenhofen
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Hexamere p(dN) ₆	Roche Diagnostics, Mannheim
Kalialaun	Merck, Darmstadt
Levamisol	Sigma, Deisenhofen
Light Cycler-DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
MESA	Sigma, Deisenhofen
MgCl ₂	Roche Diagnostics, Mannheim
Na-Nitrit	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaIO ₃	Merck, Darmstadt
Naphthol-As-Bi-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Neufuchsin	

PCR grade water	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysine	Sigma, Deisenhofen
Primer	Metabion, München
Propandiol	Merck, Darmstadt
Rabbit-anti-mouse-AK	DAKO Diagnostika, Hamburg
RPMI	Biochrom KG Seromed, Berlin
RNase Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Rneasy Kit	Qiagen, Hilden
Taq-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
TBE-Puffer	Gibco BRL, England
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCl	Gibco BRL, Karlsruhe
Tween	Serva, Heidelberg
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.4. Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert. Thermolabile Verbindungen wurden sterilfiltriert. Alle Puffer wurden unter Verwendung von H₂O bidest hergestellt.

APAAP-Komplex:	1:20 mit RPMI verdünnt
DEPC-H ₂ O:	200 µl Diethylpyrocarbonat + 99,8 ml H ₂ O bidest. über Nacht rühren. + 62,5 ml Propandiol + 100 mg Levamisol + 50 mg Natriumnitrit (in 1250 µl Aqua bidest gelöst) + 500 µl Neufuchsin, 1 min reagieren lassen + 125 mg Naphthol-As-Bi-Phosphat (in 1500 µl DMF gelöst) Lösung auf pH 8,8 einstellen (steril filtrieren)
Entwicklungspuffer:	8,7 g NaCl + 1,5 g Tris-HCl + 4,9 g Tris-Base ad 1 l H ₂ O bidest
GTC-Puffer:	4 M Guanidiniumthiocyanat + 25 mM Na-Citrat (pH 7,0) + 0,5 % Lauroyl-Sarkosine über Nacht bei 37 °C lösen
Hämalaun:	1 g Hämatoxylin + 0,2 g NaIO ₃ + 50 g Kalialaun + 50 g Chloralhydrat + 1 g Zitronensäure ad 1 l H ₂ O bidest
Hexamere:	1 : 8,25 mit DEPC-H ₂ O verdünnt (Endkonzentration: 4 µM)
Neufuchsin:	5 g Neufuchsin in 100 ml HCl lösen
Primärantikörper:	JSB-1 (250 µg/ml) 1:10, LRP-56 (100 µg/ml) 1:10,

MRP1 (20µg/ml) 1:50 mit Antibody Diluent verdünnt

Propandiol: 21 g Propandiol ad 1 l H₂O bidest

Rabbit-Anti-Mouse-AK: 1:20 mit RPMI + Humanserum (1:8) verdünnt

RPMI: 50 ml RPMI
 + 50 ml inaktiviertes Rinderserum
 + 0,5 ml Azid
 ad 450 ml H₂O bidest (pH 7,4-7,6)

Waschpuffer: 4,5 g Tris-Base
 + 34,25 g Tris-HCl
 + 43,90 g NaCl
 + 5 ml Tween
 ad 5 l H₂O bidest (pH 7,4-7,6)

Zitratpuffer: 0,5 g Zitronensäure ad 5 l H₂O bidest (pH 6,0)

2.5. Patientenmaterial

Es wurden Gewebeproben von 31 Kolonkarzinompatienten untersucht. Die Patienten waren bei Diagnosestellung im Alter zwischen 35 und 89 Jahren, der Altersmedian lag bei 70 Jahren. Davon waren zwei der Patienten im histopathologischen Stadium pT2, 22 in pT3 und sieben in pT4 (siehe 6.1).

Die Präparate wurden für die Immunhistochemie mit konventioneller Technik in Paraffin eingebettet und an einem Mikrotom geschnitten. Die 2µm dicken Schnitte wurden auf Poly-L-Lysine beschichtete Objektträger aufgezogen und anschließend im Brutschrank bei 40 °C für mindestens 24 Stunden getrocknet.

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden die Proben mit GTC-Puffer bis zur Aufbereitung bei -80 °C aufbewahrt.

2.6. RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion aus Kolonkarzinomgewebe wurde der RNeasy Kit von Qiagen verwendet. Dabei macht man sich die selektiven Bindungseigenschaften einer auf Silika-Gel basierenden Membran zu eigen. In den speziellen Säulen wird die Gesamt-RNA gebunden und Proteine und DNA werden effektiv in drei aufeinanderfolgenden Waschschrritten abgetrennt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und 8000 g.

Die Gewebeprouben wurden rasch aufgetaut, mit 5 ml GTC-Puffer versetzt und zur weiteren Homogenisierung gevortext.

Je 600 µl des Überstandes wurden mit 1 Vol. 70 % igem Ethanol versetzt.

700 µl der Mischung wurden auf eine RNeasy-Säule pipettiert und anschließend für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach Zusatz von 350 µl RW 1-Puffer auf die Säule und erneutem Zentrifugieren wurden 80 µl DNase Inkubationsmix [10 µl DNase I (1500 Kunitz units) + 70 µl RDD-Puffer] auf die Säule pipettiert.

Nach 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden erneut 350 µl RW 1-Puffer dazu pipettiert und abzentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß transferiert, mit 500 µl RPE - Puffer versetzt und anschließend für 15 s zentrifugiert.

Es wurde erneut mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und diesmal für 2 min zentrifugiert.

Zur Elution der gebundenen RNA wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt, 20 µl RNase freies Wasser dazu pipettiert und für 1 min zentrifugiert.

Bis zur Weiterverarbeitung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.7. Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit

Zur Überprüfung der Qualität und Quantifizierung der RNA wurde eine spektrophotometrische Messung durchgeführt. Hierzu wurde die RNA mit RNase-freiem-H₂O 1:25 verdünnt und die Extinktion bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm gemessen.

Der Quotient der Messung bei $\lambda = 260$ nm und bei $\lambda = 280$ nm diente als Maß für die Reinheit der RNA. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, kleinere Werte sprechen für eine Verunreinigung mit Proteinen.

Für die Konzentrationsberechnung gilt: E 260 = 1 entspricht bei dsDNA 50 µg/ml

E 260 = 1 entspricht bei ss DNA oder RNA 40 µg/ml

E 260 = 1 entspricht bei Oligonukleotiden 20 µg/ml

Zusätzlich wurden je 5 µl RNA mit 5 µl Bromphenolblau-Puffer gemischt und gelelektrophoretisch untersucht (siehe 2.10.). Dabei sollten die 28s und 18s rRNA als klare Banden zu erkennen sein.

Bei schlechter Qualität wurde die Probe verworfen.

2.8. Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese erfolgte durch das aus dem Avian Myeloblastosis Virus isolierte Enzym AMV Reverse Transkriptase (AMV-RT), welches u.a. die Aktivität einer RNA-abhängigen DNA Polymerase aufweist. Eventuell vorhandene RNasen wurden durch Zusatz des RNase-Inhibitors inaktiviert

Es wurde für jeden Ansatz eine Wasser- und für jede RNA eine RT-Kontrolle (ohne AMV-RT) pipettiert.

Im Ansatz 1 (8 µl) wurden je 1,5 µg der in Wasser gelösten RNA mit 2 µl Random Hexameren (0,2 µg/µl) und x µl DEPC -H₂O gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 65 °C für 5 Minuten erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA zu lösen.

Nach der Inkubation wurde der Ansatz 1 kurz auf Eis gekühlt.

Der Ansatz 2 (17 µl) enthielt: 5,0 µl RT-Puffer (10-fach konzentriert)

1,0 µl dNTP

9,5 µl DEPC-H₂O

1,0 μ RNase-Inhibitor (40 μ l/ml)

0,5 μ l AMV-RT

Die Ansätze wurden gemischt, kurz zentrifugiert (14000 g) und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der cDNA-Synthese wurde der Mix kurz auf Eis abgekühlt und die cDNA anschließend bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

2.9. Die Polymerase–Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifizierung eines spezifischen DNA-Bereiches mit Hilfe der hitzebeständigen Taq-Polymerase, die von Saiki et al. (69) erstmals zur routinemäßigen Anwendung gebracht wurde.

2.9.1. Semiquantitative PCR

Zum semiquantitativen Expressionsnachweis der Multidrug Resistenz-assoziierten Gene wurde die PCR mit abnehmenden Zykluszahlen (von 35 bis zum Sensitivitätslimit) durchgeführt.

Zur Vermeidung von Kontamination wurde in einem DNA-freien Template Tamer (PCR-Pipettierplatz mit UV-Licht) mit speziell nur für die PCR verwendeten Pipetten und sterilen Pipettenspitzen mit Filtereinsatz gearbeitet.

Es wurden zunächst je 2 μ l cDNA in die Reaktionsgefäße vorgelegt, mit Ausnahme der Wasserkontrolle. Anschließend wurde ein Mastermix aus den für die Amplifikation benötigten Substanzen hergestellt.

Dieser setzte sich aus je 5 μ l Puffer (25 mM MgCl₂ enthalten), je 1 μ l der unten aufgeführten Primerpaare (0,2 μ g/ μ l), 5 μ l dNTP (2mM), 0,5 μ l Taq -Polymerase (4 U/ μ l) und 35 μ l H₂O zusammen.

Zu jeder cDNA wurden 48 μ l des Mastermixes pipettiert und die PCR direkt im Anschluss gestartet.

Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet:

	Denaturierung	Annealing	Elongation
Temperatur	95 °C	primerspezifisch	72 °C
Initiale Denaturierung	2,45 min	-	-
Zyklen (bis n-1)	0,45 min	0,45 min	0,5 + 1 s/Zyklus
Zyklus n	0,45 min	0,45 min	10 min

n: Anzahl der Zyklen

Zusätzlich zum Nachweis der spezifischen Multidrug Resistenz-assoziierten Gene wurde von jeder cDNA auch die Expression des β 2-Mikroglobulin Gens (Haushalts-Gen) untersucht, um unterschiedliche RNA- bzw. cDNA-Qualitäten zu kompensieren.

Für die PCR wurden folgende Primerpaare eingesetzt:

Name	Primer	Sequenz	Größe
<i>mdr</i>	Mdr1.1	5'- CTA ATA AGA AAA AGA TCA ACT - 3'	170 bp
	Mdr1.2	5'- AAT CTT TGA AAA TAT TAT TGC - 3'	
<i>mrp</i>	MRP.1	5'- GGT CAC GCA CAG CAT G - 3'	417 bp
	MRP.2	5'- GTA CAC GGA AAG CTT GAC - 3'	
<i>lrp</i>	LRP.1	5'- CCC CCA TAC CAC TAT ATC CAT GTG - 3'	405 bp
	LRP.2	5'- TCG AAA AGC CAC TCA TCT CCT G - 3'	
β 2 M	β 2M (1)	5'- TAT CCA GCG TAC TCC AAA GA - 3'	135 bp
	β 2M (2)	5'- GAC AAG TCT GAA TGC TCC AC - 3'	

2.9.2. Quantitative Real-Time online PCR

Das Light Cycler System erlaubt eine quantitative und qualitative online PCR mit Hilfe des Farbstoffes Sybr Green I. Dieser fluoresziert nur, wenn er an Doppelstrang DNA (dsDNA) gebunden ist.

Der Beginn der exponentiellen Produkt-Zunahme, der linearen Logphase der PCR, wird aufgrund der Fluoreszenzzunahme bestimmt und entspricht dem sogenannten crossing point. Dieser korreliert mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden cDNA-Sequenz und kann deshalb zur Quantifizierung der Transkripte herangezogen werden.

Im Anschluss an die letzte Elongationsphase der PCR wurde jeweils eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung des spezifischen Produktes durchgeführt. Jedes PCR-Produkt besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur T_M , die sowohl von seiner Länge als auch vom GC-Gehalt abhängig ist. Durch die Ermittlung der T_M einer Probe ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte (post PCR Schritt) überflüssig.

Die optimalen Light Cycler Bedingungen für die Expressionsanalysen der Multidrug Resistenz-assoziierten Gene wurden maßgeblich von Birthe Spott erarbeitet.

Es wurde ein Mastermix angefertigt, von dem jeweils 18 μl in den speziell für den Light Cycler konzipierten Glaskapillaren vorgelegt wurden. Dazu wurden je 2 μl cDNA bzw. H_2O für die Wasserkontrolle pipettiert.

Der Mastermix setzte sich, je nach verwendeter MgCl_2 -Konzentration, wie folgt zusammen:

MgCl_2	(μl)	0,8 (2mM)	1,6 (3mM)	2,4 (4mM)
Wasser	(μl)	13,2	12,4	11,6
Primer 1	(μl)	1	1	1
Primer 2	(μl)	1	1	1
Sybr Green Mix	(μl)	2	2	2

Um zu vermeiden, dass auftretende Primerdimere bei der Fluoreszenzmessung der Marker-Transkripte mit erfasst werden, wurde die Messung bei einer Temperatur oberhalb des

Schmelzpunktes der Primerdimere und unterhalb des T_M der von den spezifischen cDNAs generierten PCR-Produkte vorgenommen.

Primer (Annealing- und Messtemperaturen, $MgCl_2$ -Konzentrationen):

Primer	Sequenz	Annealing	Messung	$MgCl_2$
Mdr1.1	5'- CTA ATA AGA AAA AGA TCA ACT - 3'	50 °C	78 °C	4 mM
Mdr1.2	5'- AAT CTT TGA AAA TAT TAT TGC - 3'			
MRP.1	5'- GGT CAC GCA CAG CAT G - 3'	65 °C	87 °C	3 mM
MRP.2	5'- GTA CAC GGA AAG CTT GAC - 3'			
LRP.1	5'- CCC CCA TAC CAC TAT ATC CAT GTG - 3'	65 °C	86 °C	2 mM
LRP.2	5'- TCG AAA AGC CAC TCA TCT CCT G - 3'			
$\beta 2M$ (1)	5'- TAT CCA GCG TAC TCC AAA GA - 3'	60 °C	-	3 mM
$\beta 2M$ (2)	5'- GAC AAG TCT GAA TGC TCC AC - 3'			

2.10. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Identifizierung und Trennung von DNA-Fragmenten bzw. Gesamt-RNA und beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld.

Als Referenz für das Molekulargewicht diente ein DNA-Längenstandard (100 bp Marker, MW), der zusammen mit den Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde.

Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelen mit 2 % Agarose, die durch Kochen in 1x TBE-Puffer gelöst wurde. Nach Abkühlung auf ca. 40 °C wurden 0,5 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt, das in dsDNA interkaliert, die dadurch im UV-Licht fluoresziert.

Je 10 μ l der Amplifikate wurden mit 5 μ l Bromphenolblau-Puffer gemischt und in die Slots pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei RT unter einer konstanten Spannung von 2-9 V/cm. Die Gele wurden unter UV-Licht (302 nm) analysiert und zur Dokumentation durch einen Gelbfilter mit einer Sofortbildkamera fotografiert.

2.11. Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase-Technik (APAAP)

Die 1984 durch Cordell et al. (11) beschriebene APAAP-Methode ist eine Antikörper-Brücken-Technik für monoklonale Antikörper.

Dabei wird die Bindung des spezifischen Primärantikörpers an das Antigen indirekt über die Farbreaktion des APAAP-Komplexes mit einem Substrat nachgewiesen.

Nach der Inkubation des Gewebeschnittes mit dem Primärantikörper wird der unkonjugierte Zweitantikörper, der polyklonale Brückenantikörper, aufgetragen. Anschließend fügt man den APAAP-Komplex und als letztes die Substratlösung hinzu.

Für die Färbung der Multidrug Resistenz-assoziierten Proteine wurden monoklonale Antikörper verwendet.

Für das P-Glycoprotein diente der Klon JSB-1, für MRP der Klon MRP-1 und für LRP der Klon LRP-56. Pgp und LRP wurden in einer Verdünnung von 1:10, MRP von 1:50 angewendet.

Als Kontrolle dienten Schnitte, die ohne Primärantikörper mitgefärbt wurden.

Die Entparaffinierung erfolgte für je 10 Minuten in Xylol (2x), 96%, 80%, 70% Alkohol und tweenhaltigem NaCl-Puffer (Waschpuffer). Anschließend wurden die Schnitte für ca. zwei Minuten in Citratpuffer gekocht.

Für die Färbung wurden die Schnitte jeweils 30 Minuten zuerst mit dem Primärantikörper, anschließend mit dem Brückenantikörper und danach mit dem APAAP-Komplex bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schritte 2 und 3 wurden für je 10 Minuten anschließend wiederholt. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Präparate mit Waschpuffer gründlich gespült.

Die Präparate wurden für 20 Minuten auf einem Schüttler in der Entwicklungslösung inkubiert. Danach erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun für ca. eine Minute. Die Präparate wurden im Anschluss mit der vorher bei 50-60 °C heißgestellten Gelatine eingedeckt.

Zur Beurteilung der Expressionsstärke des jeweiligen Multidrug Resistenz-assoziierten Proteins wurden die Präparate anschließend dreimal von einander unabhängig durchmikroskopiert und entsprechend der Anzahl positiv gefärbter Tumorzellen pro Schnitt in Zehnerschritten von 0 bis 100 % bewertet.

2.12. Statistische Auswertung

Um einen Zusammenhang zwischen den ermittelten Messdaten festzustellen, wurden im Anschluss an die Datenerhebungen Korrelationsanalysen mit dem SPSS-Programm durchgeführt.

Es kamen dabei sowohl der Pearson'sche Maßkorrelationskoeffizient als auch der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient zur Anwendung.

Die Anwendung des Pearson'schen Maßkorrelationskoeffizienten r unterliegt der Bedingung, dass der Zusammenhang zwischen x und y linear ist und beide Variablen normalverteilt sein müssen.

Der Wert der Korrelation wird stark von eventuellen Ausreißern beeinflusst.

Für den Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten R müssen die oben dargestellten Bedingungen nicht erfüllt werden, d.h. diese Berechnung findet auch bei unregelmäßig verteilten Daten mit Ausreißern und bei nicht linear verteilten Variablen ihre Berechtigung und ist somit weniger empfindlich.

Um sowohl im Falle linear verteilter Werte als auch bei Werten mit Ausreißern gute Korrelationsaussagen machen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit beide Tests angewendet.

Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Für die Korrelationskoeffizienten wurde ab einem Wert von 0,37 ein schwacher und ab 0,45 ein eindeutiger statistischer Zusammenhang angenommen.

Zur besseren optischen Darlegung der Korrelationstests wurde zusätzlich jeweils ein Punktdiagramm mit den erhobenen Daten erstellt.