

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden mit dem Reinigungsgrad „zur Analyse“ erworben.

| | |
|---|-------------------------------------|
| Agarose Ultra Pure™ | GibcoBRL (Eggenstein, D) |
| Ampli <i>Taq</i> Gold™-DNA-Polymerase (5 U/ µl) | Perkin Elmer (Rodgau-Jüdesheim, D) |
| Bacto® Agar | Difco (Heidelberg, D) |
| Bacto® Trypton | |
| Bacto® Hefeextrakt | |
| Betain | Sigma (Steinheim, D) |
| 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid (X-Gal) | Boehringer Ingelheim (Ingelheim, D) |
| Bromphenolblau | Merck (Darmstadt, D) |
| Carbenicillin-di-Natriumsalz | Serva (Heidelberg, D) |
| Chloroform | Merck (Darmstadt, D) |
| 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) | Roche (Mannheim, D) |
| Diethylpyrokarbonat (DEPC) | Serva (Heidelberg, D) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma (Steinheim, D) |
| Dithiothreitol (DTT) | |
| Essigsäure | J. T. Baker (Griesheim, D) |
| 17-β-Estradiol | Sigma (Steinheim, D) |
| Ethanol | J. T. Baker (Griesheim, D) |
| Ethidiumbromidlösung (10 mg/ ml) | GibcoBRL (Eggenstein, D) |
| Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (EDTA) | Merck (Darmstadt, D) |
| Formaldehyd (37 %) | J. T. Baker (Griesheim, D) |
| Formamid | Merck (Darmstadt, D) |
| Glycerol | Serva (Heidelberg, D) |
| Hepes-Puffer | Biochrom AG (Berlin, D) |
| ICI 182,780 (Faslodex) | Tocris (Bristol, UK) |
| Isopropanol (2-Propanol) | J. T. Baker (Griesheim, D) |
| L-Glutamin | Biochrom AG (Berlin, D) |

| | |
|--|----------------------------|
| Methanol | J. T. Baker (Griesheim, D) |
| 3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) | Merck (Darmstadt, D) |
| Natriumchlorid (NaCl) | |
| tri-Natriumcitrat-dihydrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) | |
| Natriumhydroxid-Plätzchen | |
| Natriumphosphat (Na_3PO_4) | Biochrom AG (Berlin, D) |
| Penicillin/ Streptomycin | |
| Restriktionsenzyme: | GibcoBRL (Eggenstein, D) |
| BstEII (10 U/ μl) | |
| <i>EcoRI</i> (10 U/ μl) | |
| StyI (10 U/ μl) | Roche (Mannheim, D) |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Merck (Darmstadt, D) |
| Speiseöl | Thomy (Neuss, D) |
| Tamoxifen Citrat | Tocris (Bristol, UK) |
| Tris-Base (Tris-Aminomethan) | Merck (Darmstadt, D) |

2.1.2 Radiochemikalien

| | |
|--|--------------------------------|
| $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP (3000 Ci/ mmol) | ICN Biochemicals (Eschwege, D) |
|--|--------------------------------|

2.1.3 Kits, Fertiglösungen und Puffer

| | |
|---|----------------------------|
| Blue/Orange 6x Loading Dye | Promega (Mannheim, D) |
| DMEM/ F12 mit Phenolrot | GibcoBRL (Eggenstein, D) |
| DMEM/ F12 ohne Phenolrot | |
| ExpressHyb TM Hybridization Solution | Clontech (Heidelberg, D) |
| Fetales Kälberserum (FKS) | GibcoBRL (Eggenstein, D) |
| LightCycler - FastStart DNA Master SYBR Green I | Roche (Mannheim, D) |
| Megaprime TM DNA Labelling System | Amersham (Braunschweig, D) |
| Phosphate-buffered saline (10xPBS) | GibcoBRL (Eggenstein, D) |
| Qiagen Plasmid Maxi Kit | QIAGEN (Hilden, D) |
| QIAprep Spin Plasmid Kit | |
| QIAquick Gel Extraction Kit | |

Restriktionspuffer:

| | |
|---|----------------------------|
| Puffer H (10x) | Roche (Mannheim, D) |
| React 2 und 3 (10x) | GibcoBRL (Eggenstein, D) |
| RPMI mit Phenolrot | GibcoBRL (Eggenstein, D) |
| RPMI ohne Phenolrot | |
| SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR | |
| TOPO TA Cloning® Kit (pCR® 2.1-TOPO®) | Invitrogen (Carlsbad, USA) |
| Trizol® Reagenz | GibcoBRL (Eggenstein, D) |
| Trypsin/ EDTA-Lösung (10x) | Biochrom AG (Berlin, D) |

2.1.4 Nukleinsäuren

| | |
|--|---------------------------------|
| DNA-Längenstandard, 100 bp (1 µg/ µl) | GibcoBRL (Eggenstein, D) |
| dNTP-Set (100 mM) | Roche (Mannheim, D) |
| GeneRuler™, 1kb DNA Leiter, (0,5 µg/ µl) | MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D) |
| Oligonukleotidprimer (s.a. Tab. 2.1 und 2.2) | MWG (Ebersberg, D) |
| RNA-Längenstandard, 0,24-9,5 kb (1 µg/ µl) | GibcoBRL (Eggenstein, D) |

Tabelle 2.1: Charakterisierung der verwendeten Oligonukleotidprimer zur Amplifikation der Östrogenrezeptoren α und β , des sauren ribosomalen Phosphoproteins *PO* und der *Aldolase*

| Primerbezeichnung | Primersequenz | Primerlänge | GC-Anteil ^a | T_M in °C ^b |
|---|---------------------------------------|-------------|------------------------|--------------------------|
| <i>ESR¹ α - fw1</i> | 5'-CGA TGA TGG GCT TAC TGA CTG-3' | 21-mer | 52,4 % | 59,8 |
| <i>ESR¹ α - rev1</i> | 5'-CAG GAC TCG GTG GAT ATG G-3' | 19-mer | 57,9 % | 58,8 |
| <i>ESR¹ β - fw1</i> | 5'-GGA GTT GGT ACA CAT GAT CAG CTG-3' | 24-mer | 50,0 % | 62,7 |
| <i>ESR¹ β - rev1</i> | 5'-CAT CAG GAG GTT AGC CAG GCG C-3' | 22-mer | 63,6 % | 65,8 |
| <i>ESR¹ β - fw2</i> | 5'-GAT GAG GGG AAA TGC GTA GA-3' | 20-mer | 50,0 % | 57,3 |
| <i>ESR¹ β - rev2</i> | 5'-CTT GTT ACT CGC ATG CCT GA-3' | 20-mer | 50,0 % | 57,3 |
| <i>PO² - fw1</i> | 5'-CCA GGC TTT AGG TAT CAC CAC T-3' | 22-mer | 50,0 % | 60,3 |
| <i>PO² - rev1</i> | 5'-GCC AGG ACT CGT TTG TAC CCG TTG-3' | 24-mer | 58,3 % | 66,1 |
| <i>Ald³ - fw1</i> | 5'-ATC CTG GCT GCA GAT GAG TC-3' | 20-mer | 55,0 % | 65,2 |
| <i>Ald³ - rev1</i> | 5'-GCC CTT GTC TAC CTT GAT GC-3' | 20-mer | 55,0 % | 60,6 |

¹ Östrogenrezeptor, ² saures ribosomales Phosphoprotein *PO*, ³ Aldolase, ^a Anteil der Basen Guanin und Cytosin, ^b Schmelztemperatur laut Synthese-Report des Herstellers (MWG, Ebersberg, D)

Tabelle 2.2: Charakterisierung der verwendeten Oligonukleotidprimer zur Amplifikation der Integrinuntereinheiten $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$

| Primerbezeichnung | Primersequenz | Primerlänge | GC-Anteil ^a | T_M in °C ^b |
|---|--------------------------------------|-------------|------------------------|--------------------------|
| <i>ITG¹ $\alpha 6$ - fw1</i> | 5'-GTC TAC ATG AAC CAG CAA GGC AG-3' | 23-mer | 52,2 % | 62,4 |
| <i>ITG¹ $\alpha 6$ - rev1</i> | 5'-CCA GCG GGG TTA GCA GTA TAT TC-3' | 23-mer | 52,2 % | 62,4 |
| <i>ITG¹ $\beta 1$ - fw1</i> | 5'-GAA CGG GGT GAA TGG AAC AG-3' | 20-mer | 55,0 % | 59,4 |
| <i>ITG¹ $\beta 1$ - rev1</i> | 5'-GCC ATT GGA TCT ATC ACA GTT G-3' | 22-mer | 45,5 % | 58,4 |
| <i>ITG¹ $\beta 1$ - fw2</i> | 5'-GGC ATC TGC GAG TGT GGT GTC-3' | 21-mer | 61,9 % | 63,7 |
| <i>ITG¹ $\beta 1$ - rev2</i> | 5'-GCA CGG GCA GTA CTC ATT TTC C-3' | 22-mer | 54,5 % | 62,1 |
| <i>ITG¹ $\beta 4$ - fw1</i> | 5'-CCT TCA AGA ACG TCA TCA GCC TG-3' | 23-mer | 52,2 % | 62,4 |
| <i>ITG¹ $\beta 4$ - rev1</i> | 5'-GGT GAC AGC AAA GAT GGG GAT G-3' | 22-mer | 54,4 % | 62,1 |
| <i>ITG¹ $\beta 4$ - fw2</i> | 5'-TGG AAG TAC TGT GCC TGC TG-3' | 20-mer | 55,0 % | 59,4 |
| <i>ITG¹ $\beta 4$ - rev2</i> | 5'-TGC ATG TTG TTG GTG ACC TT-3' | 20-mer | 45,0 % | 55,3 |
| <i>ITG¹ $\beta 4$ - fw3</i> | 5'-ATC AAC TAC TCG GCG ATC CAC C-3' | 22-mer | 54,5 % | 62,1 |
| <i>ITG¹ $\beta 4$ - rev3</i> | 5'-ACT TGG TCT GCT GGA GCT TGT G-3' | 22-mer | 54,5 % | 62,1 |

¹ Integrinuntereinheit, ^a Anteil der Basen Guanin und Cytosin, ^b Schmelztemperatur laut Synthese-Report des Herstellers (MWG, Ebersberg, D)

2.1.5 Biologisches Material

Die humanen Karzinomzelllinien MCF-7, UM-SCC 14A, 14B und 14C wurden vom Zellkultur-labor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, zur Verfügung gestellt. Eine zusammenfassende Charakterisierung dieser Zelllinien ist in Tabelle 2.3 gegeben.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten, chemisch kompetenten Bakterienstamm *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, USA) handelt es sich nach den Angaben des Herstellers um folgenden Genotyp: *F-mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*.

Tabelle 2.3: Charakterisierung der eingesetzten humanen Karzinomzelllinien

| Zelllinie | Patientin | Charakterisierung Primärtumor | Charakterisierung Zelllinie | Referenzen | |
|----------------------------|-----------------------------|--|--|---|--|
| UM-SCC ¹ 14A | selbe Patientin 58 Jahre | Plattenepithelkarzinom des Mundbodens (T1N0M0, G3) | Rezidiv (bisherige Therapie: S ² , RT ³) | Carey (1994), Sutherland <i>et al.</i> (1999) | |
| UM-SCC ¹ 14B | | | 59 Jahre | | Rezidiv (bisherige Therapie: S ² , RT ³ , S ²) |
| UM-SCC ¹ 14C | | | 59 Jahre | | Rezidiv (bisherige Therapie: S ² , RT ³ , S ² , CX ⁴) |
| MCF-7 | 69 Jahre | infiltrierendes duktales Mammakarzinom | Etablierung aus Pleuraerguss/ positiv für ESR ⁵ und PR ⁶ | | |

¹ University of Michigan Squamous Cell Carcinoma, ² S: chirurgische Resektion, ³ RT: Radiatio, ⁴ Chemotherapie mit 5-Fluorouracil, Velbam und Methotrexat ohne Erreichen einer Rezidivregression, ⁵ ESR: Östrogenrezeptor, ⁶ PR: Progesteronrezeptor

2.1.6 Verbrauchsmaterial

| | |
|--|---|
| Blotmembran Hybond N ⁺ | Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D) |
| Chromatographiepapier 3MM CHR | Whatman (Maidstone, UK) |
| Druckerpapier Typ II UPP-110 HD | Sony (Tokyo, J) |
| Einfrierröhrchen | Greiner Bio-One (Solingen, D) |
| Entwickler RP X-OMAT EX | KODAK (Rochester, USA) |
| Fixierer RP X-OMAT LO | |
| Handschuhe SaveSkin SatinPLUS | Kimberly-Clark (Mühlheim-Kärlich, D) |
| Haushaltsfolie Toppits | Melitta (München, D) |
| Klebeband Tesa transparent | Beiersdorf (Hamburg, D) |
| Parafilm | Roth (Karlsruhe, D) |
| Petrischalen (Ø 10 cm) | BD (Heidelberg, D) |
| Pipettenspitzen (20, 100, 1000, 2500 µl) | Eppendorf (Hamburg, D) |
| Probenröhrchen (15 ml) | Falcon (Heidelberg, D) |
| Reaktionsgefäße Safe Lock (500, 1500, 2000 µl) | Eppendorf (Hamburg, D) |
| Röntgenfilm Biomax MS | Kodak (Stuttgart, D) |
| Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml) | BD (Heidelberg, D) |

| | |
|--|--|
| Skalpell | Bectan Dickinson Acute Care (Franklin Lakes, USA) |
| Zellkulturflaschen (25, 75 cm ²) | BD (Heidelberg, D) |

2.1.7 Zusammensetzung der Versuchslösungen

Tabelle 2.4 gibt die Zusammensetzung der in dieser Arbeit eingesetzten Versuchslösungen wieder.

Tabelle 2.4: **Zusammensetzung der in dieser Arbeit eingesetzten Versuchslösungen**

| | | | |
|---------------------------------|--------------|---|--------------|
| <u>50xTAE</u> | | <u>10 % SDS</u> | |
| Tris-Acetat pH 8,0 ¹ | 2 M | SDS | 10 g |
| EDTA | 50 mM | ad 100 ml H ₂ O _{bidest.} | |
| <u>25xMOPS</u> | | <u>20xSSC</u> | |
| MOPS pH 7,0 ¹ | 5 M | NaCl | 3 M |
| Natrium-Acetat | 12,5 M | Na ₃ -Citrat | 0,3 M |
| EDTA | 0,25 M | ad H ₂ O _{bidest.} | |
| <u>LB-Medium²</u> | | <u>RNA-Auftragepuffer</u> | |
| Bacto [®] Trypton | 1 % (w/ v) | Bromphenolblau | 0,4 % (w/ v) |
| Bacto [®] Hefeextrakt | 0,5 % (w/ v) | Glycerin | 50 % (v/ v) |
| NaCl | 1 % | Na-Phosphat | 10 mM |
| <u>LB-Agar²</u> | | <u>TE-Puffer</u> | |
| Bacto [®] Agar | 1,5 % (w/ v) | Tris-Cl | 10 mM |
| ad LB-Medium | | EDTA | 1 mM |

Alle Lösungen wurden in H₂O_{bidest.} angesetzt. ¹ Die pH-Werte wurden mit Natriumhydroxid bzw. Salzsäure eingestellt und beziehen sich auf eine Lösungstemperatur von 20 °C. ² LB-Medium und LB-Agar wurden nach Fertigstellung autoklaviert.

2.1.8 Geräte

| | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Analysenwaage MC1, Laboratory LC6200S | Sartorius (Göttingen, D) |
| Autoklav (Technoclav 50) | Tecnomara (Fernwald-Steinbach, D) |

| | |
|--|--|
| Brutschrank B6120 | Heraeus (Hanau, D) |
| Filmentwickler Hyperprocessor Amersham Pharmacia | Biotech (Freiburg, D) |
| Gelelektrophoresekammern: | |
| Mini-Sub Cell GT | BioRad (Richmond, USA) |
| Wide Mini-Sub Cell GT | |
| Heizblock TCR 100 | Roth (Karlsruhe, D) |
| Hybridisierungssofen OV1 | Biometra (Göttingen, D) |
| LightCycler | Roche (Mannheim, D) |
| Magnetrührer RCT Basic | Ika Labortechnik (Staufen, D) |
| Netzgeräte: | |
| Power Pac 300 | BioRad (Richmond, USA) |
| Constant Power Supply EC PS 3000/ 150 | Pharmacia (Erlangen, D) |
| PCR-Gerät TRIO-Thermoblock™ | Biometra (Göttingen, D) |
| Phasenkontrastmikroskop ULWCD 0.30 | Olympus (Hamburg, D) |
| pH-Meter 320 | Mettler Toledo (Schwerzenbach, CH) |
| Pipetboy acu Integra | Bioscience (Fernwald, D) |
| Pipetten Reference (0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 50-250 µl; 200-1000 µl; 500-2500 µl) | Eppendorf (Hamburg, D) |
| Schwenker WT16 | Biometra (Göttingen, D) |
| Spektrophotometer Gene Quant II | Pharmacia (Erlangen, D) |
| Steril-Bank Lamin Air HBB 2472 | Heraeus (Hanau, D) |
| Strahlendetektor β-γ LB 122 | Berthold (Bad Wildbad, D) |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf (Hamburg, D) |
| UV-Transilluminator | MWG-Biotech (Ebersberg, D) |
| Vortexer VF2 | IKA-Labortechnik (Staufen, D) |
| Wasseraufbereiter Milli-Q Plus | Millipore (Schwalbach, D) |
| Wasserbad 1012 und 1083 | GFL (Burgwedel, D) |
| Zentrifugen: | |
| Tischzentrifuge 5415C, ohne Kühlung | Eppendorf (Hamburg, D) |
| Tischzentrifuge 5417R, mit Kühlung | |
| Zentrifuge GS-6KR (GH 3.8 Rotor) | Beckman-Coulter (Unterschleißheim-Lohhof, D) |

2.1.9 Software

Das Betriebssystem *Microsoft® Windows 2000* war Grundlage jeglicher Software.

Internet-Recherche

Netscape Navigator, Version 7.01

Netscape (Mountain View, USA)

Sequenzabgleich (BLAST)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

LightCycler Software Version 3.0

Roche (Mannheim, D)

Primer Analysis Software Oligo 4.0

MBI (Cascade, USA)

Text-, Tabellen-, Abbildungsbearbeitung

Adobe Photoshop 5.0

Adobe (San José, USA)

GraphPad Prism® 3.02

GraphPad Software (San Diego,
USA)

Microsoft® Excel 2000

Microsoft (Redmont, USA)

Microsoft® Word 2000

2.2 METHODEN

2.2.1 Zellkultur

Die humanen Tumorzelllinien MCF-7, UM-SCC 14A, UM-SCC 14B und UM-SCC 14C wurden in einem Zellkulturschrank bei 37 °C und 95 %iger Luftfeuchtigkeit in Gegenwart von 5 % CO₂ in phenolrothaltigem DMEM/ F12 mit 10 % fetalem Kälberserum (GibcoBRL, Eggenstein, D) angezogen. Nach mikroskopischer Beurteilung (Zelldichte, eventuelle Infektionen oder abgestorbene Zellen) erfolgte ein Mediumwechsel alle 2-3 Tage; eine Passagierung der Zellen bei 70 – 90 %iger Konfluenz nach einem Standardprotokoll in PBS-Lösung versetzt mit Trypsin (0,5 %) und EDTA (5 %). Die Arbeiten fanden unter einer sterilen Zellkulturbank mit sterilen Lösungen statt. Zur Detektion von Infektionen mit Fremd-DNA wurde vierzehntäglich eine Anfärbung der Zellen mit DAPI (Roche, Mannheim, D) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Zweiundzwanzig Stunden vor RNA-Isolation erfolgte der Austausch des Kulturmediums gegen phenolrotfreies DMEM/ F12 mit 10 % kohlebehandeltem fetalen Kälberserum (GibcoBRL, Eggenstein, D). Zwei Stunden vor Versuchsbeginn erfolgte der Austausch gegen phenolrotfreies DMEM/ F12 ohne fetales Kälberserum (GibcoBRL, Eggenstein, D). Weiterhin wurde allen Medien Penicillin und Streptomycin (1 %) als Antibiotikaprophylaxe untergemischt. Die sterile Vorbereitung der Zellkulturmedien erfolgte nach Standardprotokollen der Zellbiologie (Sambrook *et al.*, 1989). Die phenolrotfreien Medien erhielten außerdem 17-β-Estradiol, ICI 182,780 (Faslodex) oder Tamoxifen aus vorgefertigten Stocklösungen zugesetzt, so dass die in Tabelle 2.5 dargestellten Endkonzentrationen erreicht wurden. Sie wurden anhand von Titrationen bestimmt, da bei 1 μM und 5 μM die ausgeprägtesten Modulationen auf Proteinebene zu beobachten waren.

Tabelle 2.5: Hormonkonzentrationen in phenolrotfreiem DMEM/ F12

| Hormon/ Antihormon | Konzentration der Stocklösung | Zusatz zu 10 ml <i>phenolrotfreiem DMEM/ F12 mit bzw. ohne FKS¹</i> | Endkonzentration in <i>phenolrotfreiem DMEM/ F12 mit bzw. ohne FKS¹</i> |
|-----------------------|--|---|---|
| 17-β-Estradiol | 50 mg/ 3,67 ml H ₂ O _{bidest.} = 5 mM | 2 μl | 1 μM |
| | | 10 μl | 5 μM |
| ICI 182,780 | 10 mg/ 3,29 ml 100% Ethanol = 5 mM | 2 μl | 1 μM |
| | | 10 μl | 5 μM |
| Tamoxifen | 100 mg/ 35,48 ml 100 % Ethanol = 5 mM | 2 μl | 1 μM |
| | | 10 μl | 5 μM |

¹ fetales Kälberserum

2.2.2 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Spektrophotometer Gene Quant II. Dieses Gerät misst die Absorption der Nukleinsäurelösung bei 260 nm (OD_{260}) und berechnet die Konzentration unter der Bedingung, dass eine OD_{260} von 1,0 einer Konzentration von 40 μg RNA oder einzelsträngiger DNA bzw. 50 μg doppelsträngiger DNA je μl Messlösung entspricht. Zur Qualitätssicherung wurde RNA oder DNA in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Klare Banden unter UV-Licht wiesen auf intakte Nukleinsäuren hin.

2.2.3 Arbeiten mit Ribonukleinsäuren (RNA)

2.2.3.1 Isolation von RNA

Die Isolation der zellulären Gesamt-RNA erfolgte bei 80 %iger Konfluenz nach Spülung der Zellen mit *PBS*. Pro Petrischale wurden jeweils 2 ml *TRIzol*[®] Reagenz zugegeben und analog den Anweisungen des Herstellers verfahren. Nach abschließender Resuspension des RNA-Pellets in 50 μl H_2O_{DEPC} erfolgte die Lagerung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.3.2 Reverse Transkription von RNA

Die Synthese von cDNA aus RNA erfolgte mit dem *SuperScript*[™] *First-Strand Synthesis System for RT-PCR*, wobei dem Herstellerprotokoll gefolgt wurde. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.3.3 RNA-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von RNA erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel. Mittels Aufkochen wurde 1 g *Agarose* in 78,2 ml $H_2O_{bidest.}$ und 4 ml *25xMOPS* gelöst. Nach kurzer Abkühlung wurden 17,8 ml *37 %iges Formaldehyd* zugegeben. Nach Polymerisation in einem horizontalen Gelträger bei Zimmertemperatur erfolgte die Überschichtung mit *1xMOPS* in einer Gelelektrophoresekammer. Die gewünschte Menge vakuumgetrockneter Gesamt-RNA wurde in RNA-Ladepuffer (57 μl $H_2O_{bidest.}$, 8 μl *25xMOPS*, 100 μl *Formamid*, 35 μl *37 %iges Formaldehyd*,

1 μl *Ethidiumbromid*) gelöst, bei 70 °C denaturiert (10 min) und auf Eis inkubiert (2 min). Nach abschließender Zugabe von 1 μl *RNA-Auftragepuffer* erfolgte die Auftrennung der Proben bei 90 V. Die Sichtbarmachung der Gesamt-RNA erfolgte unter UV-Licht. Bei geplanter Northern Blot-Analyse erfolgte die Überschichtung mit 24 ml *25xMOPS* und 106,8 ml *37 %igem Formaldehyd* ad 600 ml *H₂O_{bidest.}*. Ethidiumbromid wurde ausschließlich dem Ladepuffer des RNA-Größenstandards zugesetzt.

2.2.3.4 Northern Blot-Analyse

Nach elektrophoretischer RNA-Auftrennung (10-25 μg / Probe) wurde das Gel mit *20xSSC* unter leichtem Schütteln äquilibriert (20 min); zuvor die Wegstrecke des RNA-Größenstandards unter UV-Licht bestimmt. Der RNA-Transfer auf eine *Nitrozellulosemembran* erfolgte durch Aufwärtsdiffusion von *20xSSC* über Nacht. Dazu wurde das Gel auf *Chromatographiepapier* gelagert, die dem Gel aufliegende Nitrozellulosemembran mit weiterem *Chromatographiepapier* und *Zellstoff* überschichtet und mit einem *Wasserkolben* beschwert. Nach Vakuumtrocknung (80 °C, 2 h) erfolgte die Lagerung der Membran bei Raumtemperatur.

Die Prähybridisierung der Nitrozellulosemembran wurde in *ExpressHybTM Hybridization Solution* in einem Hybridisierungs-ofen (58 °C, 30 min) durchgeführt. Nach Zugabe von radioaktiv markierter, denaturierter DNA-Sonde erfolgte die Hybridisierung bei 58 °C über Nacht. Waschgänge à 30 Minuten schlossen sich an – zweimalig nichtstringent mit *2xSSC*, *0,1 % SDS* bei Raumtemperatur und dreimalig stringent mit *0,1xSSC*, *0,1 % SDS* bei 55 °C. Die so erhaltenen Membranen wurden in Klarsichtfolie eingewickelt und einem *Kodak BioMax MS Film* aufliegend in einer Fotokassette bei –80 °C gelagert. Zur Sichtbarmachung der autoradiographischen Signale wurden die Filme nach ausreichender Zeit (Minuten bis Tage) entwickelt. Mittels des simultan aufgetrennten RNA-Längenstandards konnte die Größe der detektierten RNA abgeschätzt werden.

Zur Enthybridisierung wurden die Membranen zweimalig in *0,1xSSC/ 0,1 % SDS* auf 100 °C in einer Mikrowelle erhitzt. Nach Ausschluss radioaktiver Restspuren mittels eines Szintillationsmessgerätes konnte die Membran einer erneuten Hybridisierung zugeführt werden.

2.2.4 Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

2.2.4.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Für ein 2 %iges Gel wurden 2 g *Agarose* in 100 ml *1xTAE* in einer Mikrowelle aufgekocht. Nach Zugabe von 2,5 µl *Ethidiumbromid* wurde das Gel in einen horizontalen Gelträger gegossen. Nach Abkühlung und Polymerisation wurde das Gel in einer Elektrophoresekammer mit *1xTAE* überschichtet. Pro 3 µl DNA-Probe erfolgte die Zugabe von 1 µl *DNA-Auftragepuffer*. Die Proben wurden in die Geltaschen eingebracht und bei 70 bis 80 V (ca. 90 min) aufgetrennt. Anschließend konnten die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Als Größenstandards wurden DNA-Leitern gleichzeitig aufgetrennt.

2.2.4.2 DNA-Elution aus Agarosegelen

Die Elution von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit*, wobei nach den Angaben des Herstellers gearbeitet wurde. Abschließend wurde die DNA in 30 µl *Puffer EB* gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.4.3 Die klassische Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für den Reaktionsansatz wurden ad 25 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$, 2,5 µl *10xPCR Puffer*, 2,5 µl *dNTPs* (10 mM), 1 µl *forward-Primer* (5 pmol/ µl), 1 µl *reverse-Primer* (5 pmol/ µl), 100 ng *cDNA-Matrix* und 0,2 µl *AmpliTaqGoldTM-DNA-Polymerase* (5 U/ µl) zusammengegeben und mit 20 µl *Speiseöl* überschichtet. Zur Reaktionsoptimierung wurden gegebenenfalls *Betain* (Endkonzentration: 1 M) und *DMSO* (Endkonzentration: 5 %) zugegeben. Im PCR-Gerät *TRIO-ThermoblockTM* schlossen sich Zyklen folgenden Profils an:

- | | |
|---|--------------|
| 1. 94 °C/ 12 min (thermische Aktivierung) | 36-40 Zyklen |
| 2. 94 °C/ 90 s (Denaturierung) | |
| 3. T _{ann} / 90 s (Annealing) | |
| 4. 72 °C/ 90 s (Elongation) | |
| 5. 72 °C/ 5 min (Extension). | |

Die Reaktionsbedingungen der jeweiligen Oligonukleotidprimerpaare sind in Tabelle 2.6 wiedergegeben.

Tabelle 2.6: PCR-Bedingungen für die Oligonukleotidprimerpaare der Tab. 2.1 und 2.2

| 5'-/3'-Primer (s.a. Tab. 2.1 und 2.2) | PCR | | |
|--|-------------|-----------------|-----------------|
| | T_{ann}^a | Zyklusanzahl | Amplifikatlänge |
| <i>ESR</i> ¹ α - fw1/ rev1 | 54 °C | 40 ^b | 416 Basenpaare |
| <i>ESR</i> ¹ β - fw1/ rev1 | 62 °C | 40 ^b | 469 Basenpaare |
| <i>ESR</i> ¹ β - fw2/ rev2 | 54 °C | 36 | 321 Basenpaare |
| <i>ITG</i> ² $\alpha 6$ - fw1/ rev1 | 60 °C | 36 | 440 Basenpaare |
| <i>ITG</i> ² $\beta 1$ - fw1/ rev1 | 54 °C | 36 | 470 Basenpaare |
| <i>ITG</i> ² $\beta 1$ - fw2/ rev2 | 58 °C | 36 | 540 Basenpaare |
| <i>ITG</i> ² $\beta 4$ - fw1/ rev1 | 54 °C | 36 | 374 Basenpaare |
| <i>ITG</i> ² $\beta 4$ - fw2/ rev2 | 52 °C | 36 | 200 Basenpaare |
| <i>ITG</i> ² $\beta 4$ - fw1/ rev2 | 54 °C | 36 ^b | 1792 Basenpaare |
| <i>ITG</i> ² $\beta 4$ - fw3/ rev3 | 60 °C | 40 ^b | 760 Basenpaare |
| <i>PO</i> ³ - fw1/ rev1 | 54 °C | 36 | 336 Basenpaare |
| <i>Ald</i> ⁴ - fw1/ rev1 | 58 °C | 36 | 249 Basenpaare |

¹ Östrogenrezeptor; ² Integrinuntereinheit; ³ saures ribosomales Phosphoprotein PO; ⁴ Aldolase; ^a Annealingtemperatur, ^b unter Zusatz von Betain (Endkonzentration: 1 M) und DMSO (Endkonzentration: 5 %)

2.2.4.4 Quantitative real time PCR

Zur Durchführung der quantitativen *real time* PCR kamen die *LightCycler*-Technologie der Firma Roche und das *FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit* zum Einsatz. Zunächst wurde Plasmid-DNA in *EB-Puffer* aufgenommen und die Konzentration [g/ μ l] spektrophotometrisch bestimmt. Die Einheit [g/ μ l] wurde mit Formel 1.1 in [Moleküle/ μ l] umgerechnet. Anschließend wurde in $H_2O_{bidest.}$ eine Faktor 10 Standardverdünnungsreihe (10^8 - 10^1 Moleküle/ μ l) angefertigt.

Formel 1.1: Berechnung der Plasmid-DNA-Konzentration mit der Einheit [Moleküle/ μ l]

$$Menge \text{ [Moleküle/ } \mu\text{l]} = K_{Avo} \text{ [Moleküle/ mol]} \times \text{Konzentration [g/ } \mu\text{l]} / MW \text{ [g/ mol]}$$

K_{Avo} : Avogadro-Konstante (6×10^{23} Moleküle/ mol); MW : Molekulargewicht = $(3900 \text{ bp}^1 + X \text{ bp}^2) \times 660 \text{ g/ mol/ bp}^3$; ¹ Länge des *pCR 2.1 TOPO-Vektors*; ² Länge des klonierten PCR-Produktes (s.a. Tab. 2.6); ³ Faktor für dsDNA

Anschließend wurden die zu vermessenden Proben unbekannter cDNA-Konzentrationen im Verhältnis 1:5 mit $H_2O_{bidest.}$ verdünnt. Der Oligonukleotidprimermix, bestehend aus *forward*- und *reverse*-Primern, wurde in einer Verdünnung von 1:20 mit $H_2O_{bidest.}$ hergestellt. Analog den

Angaben des Herstellers wurden ad 18 μl Reaktionsmix 12,4 μl $H_2O_{bidest.}$, 2 μl *Oligonukleotidprimermix* (1:20), 2 μl *SYBR Green* und 1,6 μl 25 mM $MgCl_2$ für eine 3 mM $MgCl_2$ -Konzentration, entsprechend 2,4 μl für einen 4 mM und 3,2 μl 25 mM $MgCl_2$ für einen 5 mM Reaktionsmix pipettiert und in eine *LightCycler*-Kapillare überführt. Zwei μl Proben-cDNA bzw. 2 μl der Standardverdünnungsreihe wurden den *LightCycler*-Kapillaren hinzugefügt und nach Zentrifugation (2000 rpm, 1 min) im *LightCycler*-Gerät platziert. Die Auswertung der Läufe erfolgte mit der Option *Second Derivative Maximum* der *LightCycler*-Software, wobei Läufe mit einem Fehler $> 0,3$ bezogen auf die Standardverdünnungsreihe verworfen wurden. Drei unabhängige Läufe für spezifisches Gen und Behandlungsmodus wurden für die jeweilige Zelllinie durchgeführt, so dass anschließend 9 Quotienten gebildet werden konnten: spezifisches $Gen_{\text{Lauf 1-3}}$ / endogene Kontrolle $PO_{\text{Lauf 1-3}}$. Die erhaltenen Werte wurden durch den Mittelwert der unbehandelten Kontrolle dividiert und somit normiert. Die Bestimmung der Standardabweichung und der statistischen Signifikanz (t-Test) erfolgte mit der Software *Microsoft® Excel 2000*. Die Erstellung der Balkendiagramme erfolgte mit Hilfe der Software *GraphPad® Prism 3.02*.

2.2.4.5 Klonierung spezifischer PCR-Produkte und Vermehrung von Bakterienklonen

Zur Anwendung kamen das *TOPO TA Cloning® Kit*, der linearisierte *pCR®2.1-TOPO-Vektor* und chemisch kompetente *TOP10 Escherichia coli*-Bakterien. Zuvor wurden LB-Platten (ca. 25 ml in Petrischalen mit \varnothing 10 cm) hergestellt, für welche 1000 ml *LB-Agar* ($< 60^\circ\text{C}$), 2 ml *Ampicillin* (50 mg/ ml) und 1 ml *X-Gal* (40 mg/ ml) zusammengegeben wurden. Deren Lagerung erfolgte mit Parafilm abgedichtet bei 37°C . Nach Klonierung gemäß den Angaben des Herstellers wurden etwa 100 μl der Bakteriensuspension ausplattiert und bei 37°C inkubiert (12 – 24 h). Zur weiteren Vermehrung eines sich weiß darstellenden transformierten Bakterienklons wurde dieser mit einer Pipettenspitze steril aufgenommen und in ca. 50 ml *LB-Medium*, welchem 6 ml *Carbenicillin* (50 μg / ml) zugesetzt waren, überführt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht und eine abschließende Zentrifugation (4°C , 3500 rpm, 13 min). Zuvor wurde zur Anlage einer Stocklösung 800 μl Bakterienkultur mit 200 μl *Glycerol* bei -80°C tiefgefroren.

2.2.4.6 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*-Bakterien erfolgte bei einer Menge von bis zu 20 μg mit dem *QuiaPrep Spin Plasmid Kit* (MiniPrep); bei einer Menge von bis zu 500 μg

mit dem *Quiagen Plasmid Maxi Kit* (MaxiPrep). Es wurde gemäß der Herstelleranleitung verfahren. Die abschließende Aufnahme der Plasmid-DNA erfolgte in 30 µl *Puffer EB* (MiniPrep) bzw. in 100 µl *TE-Puffer* (MaxiPrep). Die Lagerung erfolgte jeweils bei -20°C .

2.2.4.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte erfolgte durch Herrn Dr. Martin Meixner am Institut für Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin. Es wurden der *ABI-373 DNA Sequenzierungsautomat* und das *ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* verwendet. Als für den *pCR[®]2.1-TOPO-Vektor* spezifische Primer kamen *M13-forward* und *-reverse* zum Einsatz. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden auf Homologien zu bekannten Sequenzen untersucht. Dazu wurden Abgleiche mittels *BLAST* am *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) durchgeführt.

2.2.4.8 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP. Dabei wurde das *MegaprimeTM DNA Labelling System* analog den Herstellerangaben verwendet.

2.2.4.9 Enzymatische Restriktion von DNA

Restriktionspuffer, optimale Reaktionstemperatur und -dauer wurden vom Hersteller für das jeweilige Restriktionsenzym vorgeschrieben. In Tabelle 2.7 sind die eingesetzten Restriktionsendonukleasen und deren Reaktionsbedingungen dargestellt. Für den Reaktionsansatz wurden jeweils ad 20 µl *H₂O_{bidest.}*, 2 µl *10xReaktionspuffer*, 0,5 µl *Plasmid-DNA* und 1 µl *Restriktionsenzym* zusammengegeben. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -20°C .

Tabelle 2.7: In dieser Arbeit eingesetzte Restriktionsenzyme und Reaktionsbedingungen

| Restriktionsenzym | Schnittstelle (↓) in der Basensequenz | Reaktionsbedingungen (Reaktionspuffer/ -temperatur/ -dauer) |
|-------------------|---------------------------------------|---|
| BstEII | G↓GTNACC | Puffer React 2 ¹ / 60 °C/ 1 h |
| <i>EcoRI</i> | G↓AATTC | Puffer React 3 ² / 37 °C/ 1 h |
| <i>SlyI</i> | C↓C(A,T)(A,T)GG | Puffer H ³ / 37 °C/ 1 h |

1xRestriktionspuffer enthalten: ¹ 50 mM Tris-HCL (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl; ² 50 mM Tris-HCL (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl; ³ 50 mM Tris-HCL (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM Dithiothreitol