

## **2. Methoden**

### **2.1 Patientengut und Gewinnung der Proben**

Um die Häufigkeit von Zweitneoplasien des Ösophagus bei Kopf-Hals-Tumorpatienten festzustellen, wurde von Mai 2000 bis August 2001 allen Patienten, die sich in dieser Zeit mit der Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches (genauer der Mundhöhle, der Zunge, des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx) in den Abteilungen für Kieferchirurgie, Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde oder Gastroenterologie des Campus Benjamin Franklin der Charité vorstellten, eine einmalige Screening-Videoösophagoskopie angeboten. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Patienten aktuell unter einem Kopf-Hals-Tumor litten oder ob dieser lediglich anamnestisch bekannt war. Durchgeführt wurden diese Untersuchungen in der Medizinischen Klinik I des Campus Benjamin Franklin der Charité (Titel des Studienprüfplans: „Studie zur Früherkennung von Speiseröhrentumoren und deren Vorläuferveränderungen (Dysplasien)“). Ein positives Votum der Ethikkommission lag vor, ebenso die Zustimmung des Berliner Datenschutzbeauftragten.

Ausschlusskriterien für diese Studie waren eine schwere Gerinnungsstörung (klinisch Quick <50%, Thrombozyten <50/nl) oder das Vorhandensein von Ösophagusvarizen.

Für die Ösophagoskopie wurden hochauflösende Videoendoskope (GIF-XQ 140, Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg) verwendet. Im Rahmen der Ösophagoskopie wurden routinemäßig Gewebeproben nach einem einheitlichen Biopsieprotokoll entnommen.

Dieses Biopsieprotokoll beinhaltete, dass beginnend drei Zentimeter oberhalb des gastroösophagealen Übergangs aus der ösophagealen Schleimhaut alle drei Zentimeter jeweils vier Biopsien entnommen wurden. Insgesamt wurden dem

Ösophagus somit 20-28 Biopsien entnommen. Die Entnahmeorte der Biopsien wurden dokumentiert, anschließend wurden die Biopsien jedes Entnahmeortes mit Formaldehydlösung fixiert und jede Probe von zwei oder drei Pathologen des Institutes für Pathologie des Campus Benjamin Franklin der Charité befundet. An diesen Proben wurde dann die immunhistochemische Färbung auf COX-2 durchgeführt. Zudem wurden für die COX-2-Färbung die Resektate von drei invasiven Ösophaguskarzinomen aus dieser Patientengruppe verwendet.

Während der Endoskopie wurden zudem für die COX-2-PCR Biopsien entnommen. Diese Biopsien wurden aus neoplasiesuspekten Läsionen oder, bei endoskopisch unauffällig erscheinender Speiseröhre, stets auf Höhe 30cm ab Zahnreihe entnommen. Anschließend wurden diese Proben in physiologische Kochsalzlösung verbracht und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der klinische Zustand der Patienten erlaubte es nicht immer, Biopsien für die PCR zu entnehmen. Daher konnten lediglich bei 12 der 18 Patienten mit Zweitneoplasien des Ösophagus Biopsien für die PCR entnommen werden. Ferner wurde aus Kostengründen die COX-2-mRNA lediglich bei 17 der 128 Kopf-Hals-Tumorpatienten mit endoskopisch unauffälliger Speiseröhre bestimmt.

## **2.2 Messung der COX-2-Expression auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR**

Um die mRNA-Expression von COX-2 in den Biopsien bestimmen zu können, mussten diese zunächst homogenisiert werden. Anschließend wurde die GesamtrNA isoliert, eventuelle Verunreinigungen durch genomische DNA mittels eines DNase-Verdau entfernt und der mRNA-Anteil in cDNA umgeschrieben. Die

daraus erhaltene cDNA wurde für die Real-Time-PCR verwendet. Beim Umgang mit RNA wurde speziell auf RNase-freie Arbeitsbedingungen geachtet.

### **2.2.1 Gewebehomogenisierung und Isolierung der Gesamt-RNA**

Die Homogenisierung des Biopsiegewebes wurde durch einen Ultraschall-Homogenisator (Sonoplus HD70, Bandelic Elec., Berlin) und QiaShredder-Säulen (Qiagen, Hilden) erreicht. Die Isolierung von Gesamt-RNA aus den Biopsien wurde danach unter Verwendung des RNeasy-RNA-Extraktionskits nach den Anweisungen des Herstellers (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Die tiefgekühlten Biopsien wurden zuerst vom Eis befreit und sofort in eine Lösung aus RLT-Lysepuffer und 1/100 der Puffermenge an  $\beta$ -Mercaptoethanol gegeben. Durch Wiegen der Lösung vor und nach Zugabe der Biopsie wurde das Gewicht des Biopsats festgestellt. Anschließend wurde die Biopsie durch Ultraschall zerkleinert, das Lysat wurde auf eine QiaShredder-Säule pipettiert und für 2 Minuten bei 16000G zentrifugiert.

Dann wurden die einzelnen Schritte der Isolierung der Gesamt-RNA durchgeführt. Anschließend wurde die RNA in sterilem, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser eluiert.

### **2.2.2 DNase-Verdau und cDNA-Synthese**

Die gesamte cDNA-Synthese wurde mithilfe des Superscript<sup>TM</sup> RT-Kits (Fa. GIBCO BRL, Karlsruhe) in einem 20 $\mu$ l-Ansatz durchgeführt. Es wurde stets das für den Kit maximale Volumen von 8 $\mu$ l Gesamt-RNA-Lösung eingesetzt, da dies für einen RNA-Gehalt in der Probe von bis zu 1,5 $\mu$ g ausreichte und damit für die umzuschreibende RNA-Menge aus Ösophagusbiopsien geeignet war. Der cDNA-

Synthese wurde ein DNase-Verdau zum Abbau eventueller Verunreinigungen mit genomischer DNA vorgeschaltet.

Der DNase-Verdau wurde durchgeführt, indem zunächst 1µl (1U/µl) DNase I-Lösung sowie 1µl 10xDNase-Puffer (beides Fa. GIBCO RBL, Karlsruhe) in die Gesamt-RNA-Lösung gegeben wurde. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNase durch Zugabe von 1µl 25mM-EDTA-Lösung und Inkubation bei 65°C für 10 Minuten wieder inaktiviert.

Anschließend wurde 1µl (0,5mg/ml) Oligo-d(T)-Primer-Lösung zum Reaktionsansatz hinzugefügt und der gesamte Ansatz für 10 min bei 70°C inkubiert, damit sich die Primer anlagern konnten. Oligo-d(T)-Primer binden selektiv an den Poly-A-Schwanz der mRNA und ermöglichen so deren Umschreibung in cDNA durch eine Reverse Transkriptase (RT).

Danach erfolgte die Zugabe von 2µl 10xPCR-Puffer (bestehend aus 200mM-Tris-HCl und 500mM-KCl), 2µl 25mM-MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 2µl 0,1M-DTT sowie 1µl 25mM-Desoxynukleotidtriphosphat-Lösung, bestehend aus dGTP, dATP, dCTP und dTTP in gleichen Mengen.

Nach 5 Minuten bei 42°C wurden 1µl (200U/µl) Superscript II Reverse Transkriptase hinzugegeben und der gesamte Ansatz zunächst für 50 Minuten bei 42°C inkubiert, der optimalen Temperatur für die Umschreibung der RNA durch die RT. Als nächstes wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 72°C inkubiert, um die Reaktion wieder zu stoppen. Anschließend wurde der Ansatz auf 4°C heruntergekühlt und nicht umgeschriebene RNA (rRNA, tRNA) durch Zugabe von 1µl (2U/µl) RNase H abgebaut (20 Minuten Inkubation bei 37°C).

Danach wurde der Reaktionsansatz auf 4°C heruntergekühlt und bis zur Durchführung der PCR bei -20°C aufbewahrt.

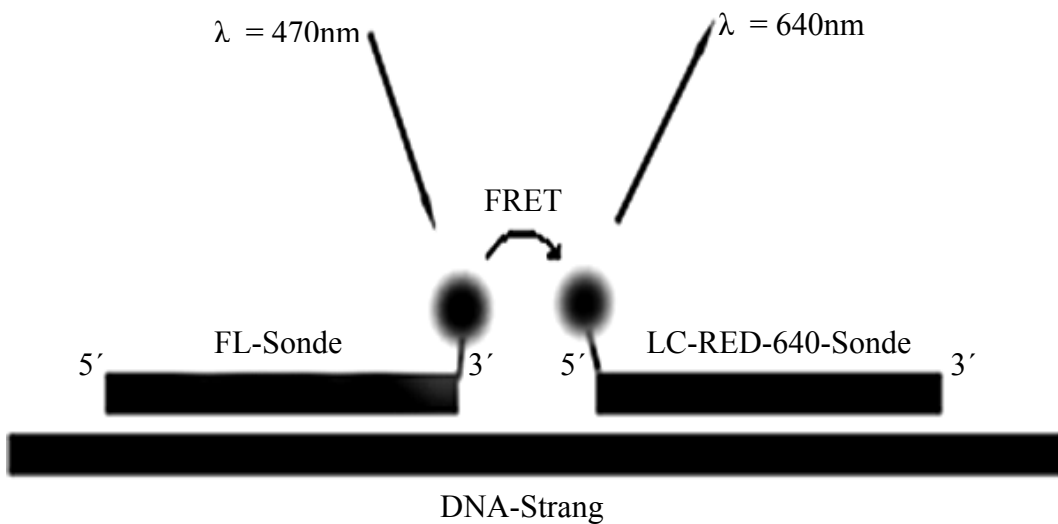
### 2.2.3 Real-time PCR

#### 2.2.3.1 Prinzip der Real-Time PCR

Die PCR (Polymerase chain reaction) ist eine von Kary B. Mullis beschriebene Methode zur selektiven enzymvermittelten Amplifikation eines bestimmten DNA-Sequenzabschnitts (Saiki et al. 1985). Bei der Real-Time-PCR wird amplifizierte DNA durch einen Anstieg an Fluoreszenz einer bestimmten Wellenlänge nachgewiesen und/oder quantifiziert.

Um die Fluoreszenz während einer PCR zu messen wurden in dieser Arbeit Hybridisierungssonden verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Paar von farbstoffmarkierten Oligonukleotiden, die sich bei einer bestimmten Temperatur spezifisch an ihren komplementären DNA-Sequenzabschnitt anlagern (= hybridisieren). Die eine Sonde ist am 3'Ende mit dem Farbstoff Fluorescein verbunden, die andere am 5'Ende mit dem Farbstoff LC-Red-640. Durch die Hybridisierung geraten die beiden Farbstoffe in räumliche Nähe (siehe Abbildung 1), was einen Fluoreszenzenergietransfer (engl. "fluorescence resonance energy transfer" (FRET)) ermöglicht (Cardullo et al. 1988). Fluorescein wird von Licht mit einer Wellenlänge  $\lambda = 470\text{nm}$  zur Fluoreszenz angeregt, was sich durch FRET auf das LC-Red-640 der unmittelbar benachbarten zweiten Hybridisierungssonde überträgt und dieses zur Fluoreszenz von Licht mit einer Wellenlänge  $\lambda = 640\text{nm}$  anregt (siehe Abbildung 1). Dieses emittierte Licht mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 640\text{nm}$  wird von dem für die Real-Time-PCR verwendeten Thermocycler, dem LightCycler<sup>®</sup> (Fa. Roche, Mannheim), gemessen. Derjenige Amplifikationszyklus in einer PCR, in dem die gemessene Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz der Probe signifikant überschreitet, wird als Schwellenwert (= Ct-Wert) bezeichnet, registriert und für eine Quantifizierung verwendet.

Der Ct-Wert hängt davon ab, wie viele Kopien der Zielsequenz vor Beginn der PCR in der Probe vorhanden waren. Waren nur wenige Kopien vorhanden, so wird die Hintergrundfluoreszenz erst in einem späten PCR-Zyklus (beispielsweise im 34. von 40 PCR-Zyklen) überschritten, was in einem hohen Ct-Wert (z.B. 34,00) resultiert.



**Abbildung 1:** Schematischer Ablauf des Fluorescence-Resonance-Energy-Transfers (FRET). FL = Fluorescein

Die Menge an Zielsequenz kann unter Verwendung eines Standards entweder absolut oder relativ bestimmt werden. Bei der in dieser Arbeit verwendeten relativen Quantifizierung wird der DNA-Gehalt einzelner Verdünnungsstufen in  $\text{ng}/\mu\text{l}$  als Bezugspunkt genutzt (Johnson et al. 2000, Yuan et al. 2000). Zur Bestimmung der COX-2-Expression in Biopsien wurde die relative Quantifizierung im Vergleich zu dem house-keeping-Gen Porphobilinogendeaminase (PBGD) ausgewählt, da PBGD im Vergleich zu  $\beta$ -Aktin relativ gering exprimiert

wird und so der Vergleich zu der erwarteten niedrigen Expression von COX-2 eher möglich erschien.

### **2.2.3.2 Auswahl der Primer**

Für die relative Quantifizierung sowohl von COX-2 als auch von PBGD wurde zunächst jeweils ein Fragment der mRNA-Sequenz amplifiziert, welches das später in der Real-Time-PCR amplifizierte Fragment einschloss (siehe Abbildung 2 und Abbildung 3, gelb unterlegte Sequenzen). Diese Fragmente wurden in der Real-Time-PCR als externer Reaktionsstandard verwendet und werden im Folgenden als Standardfragmente bezeichnet. Die Standardfragmente umfassten im Falle von PBGD eine Länge von 382 Basen, im Falle von COX-2 438 Basen.

Die eigentlichen PCR-Produkte, also die Sequenzabschnitte, die später in der Real-Time-PCR detektiert werden sollten, hatten im Falle von PBGD eine Länge von 282 Basen, im Falle von COX-2 eine Länge von 198 Basen. Primer und Hybridisierungssonden wurden von der Firma Tib Molbiol (Berlin) erstellt.

1 caattgtcat acgacttgca gtgagcgtca ggagcacgtc caggaactcc tcagcagcgc  
 61 ctcttcage tccacagcca gacgcctca gacagcaaag cctacccccg cgcgcgccc  
 121 tgeccgccgc teggatgctc gcccgcccc tgctgctgtg cgcggctctg gcgctcagcc  
 181 atacagcaaa tccttgctgt tcccacccat gtcaaaaccg aggtgtatgt atgagtgtgg  
 241 gattgacca gtataagtgc gattgtacc ggacaggatt ctatggagaa aactgctcaa  
 301 caccggaatt ttgacaaga ataaaattat ttctgaaacc cactccaaac acagtgcact  
 361 acatacttac ccaactcaag ggattttgga acgttgtgaa taacattccc tccttcgaa  
 421 atgcaattat gagttatgct ttgacatcca gatcacattt gattgacagt ccaccaact  
 481 acaatgctga ctatggctac aaaagctggg aagcctctc taacctctcc tattatacta  
 541 gagcccttc tctgtgctt gatgattgcc cgactccctt ggggtgcaaa ggtaaaaage  
 601 agcttctga ttcaaatgag attgtggaaa aattgcttet aagaagaaag ttcacccctg  
 661 atccccagg ctcaaacatg atgttgcatt tctttgcca gcacttcacg catcagttt  
 721 tcaagacaga tcataagcga gggccagctt tcaccaacgg gctgggccc ggggtggact  
 781 taaatcatat ttacgggtgaa actctggcta gacagcgtaa actgcccctt tcaaggatg  
 841 gaaaaatgaa atatcagata attgatggag agatgtatcc tcccacagtc aaagatactc

**Abbildung 2:** Abschnitt aus der mRNA-Sequenz der humanen COX-2. Gelb unterlegt sind die Sequenzen, an denen die Primer für das Standardfragment binden, grün unterlegt die für das eigentliche Real-Time-PCR-Produkt, dunkel- und hellblau unterlegt die Sonden für die Fluoreszenzdetektion

1 cacacagcct acttccaag cggagccatg tctggtaacg gcaatcgggc tgcaacggcg  
 61 gaagaaaaca gcccaaagat gagagtgatt cgcgtgggta ccgcaagag ccagcttgc  
 121 cgcatacaga cggacagtgt ggtggcaaca ttgaaagcct cgtaccctgg cctgcagttt  
 181 gaaatcattg ctatgtccac cacaggggac aagattcttg atactgcaact ctetaagatt  
 241 ggagagaaaa gctgtttac caaggagcct gaacatgccc tgagaagaa tgaagtggac  
 301 ctggtgttc actcctttaa ggacctgccc actgtgette ctctggctt caccatcgga  
 361 gccatctgca agcgggaaaa ccctcatgat gctgttgtct tcacccaaa atttgttggg

**Abbildung 3:** Abschnitt aus der mRNA-Sequenz der humanen PBGD – die Farbwahl entspricht der Farbwahl in Abbildung 2



GEN		PRIMER (5'→3')	ORT auf der mRNA	GENBANK
<b>PBGD</b>				
<b>Standardfragment</b>	<b>sense</b>	ATgTCTggTAACggCAATgC	28 to 47	NM_000190
	<b>antisense</b>	TTgggTgAAAgACTTCTgCATC	388 to 409	
<b>Produkt</b>	<b>sense</b>	AgAgTgATTcGcTgggTACC	82 to 102	
	<b>antisense</b>	ggCTCCgATggTgAAgCC	346 to 363	
<b>Hybridisierungssonden</b>	<b>fluorescein</b>	AgTggACCTggTTgTTCACCTTgAA-FL	294 to 320	
	<b>LC 640</b>	LC640-ACCTgCCCCTgTgCTTCCTCCT-p	323 to 345	
<b>COX-2</b>				
<b>Standardfragment</b>	<b>sense</b>	CATTCCCTTCCTTCgAAATgC	404 to 424	NM_000963
	<b>antisense</b>	CCATCCTTgAAAaggCgCAG	822 to 841	
<b>Produkt</b>	<b>sense</b>	CCTCCTgTgCCTgATgATTgC	549 to 569	
	<b>antisense</b>	TggCCCTCgCTTATgATCTg	727 to 746	
<b>Hybridisierungssonden</b>	<b>fluorescein</b>	ATCCCCAaggCTCAAACATgATgT-FL	661 to 684	
	<b>LC 640</b>	LC640-CATTCTTTGCCCAgCACTTCACgC-p	688 to 711	

**Abbildung 4:** Sequenz der verwendeten Primer und Hybridisierungssonden

Bevor die Primer verwendet wurden, wurde ihre Funktion durch eine PCR mit anschließender Gelelektrophorese getestet. Für PBGD wurde cDNA aus Ösophagus-Biopsien verwendet, für COX-2 kam cDNA aus HT-29-Zellen, die bekanntermaßen COX-2 exprimieren, zum Einsatz. Diese PCR wurde in einem 50 µl-Ansatz auf einem Thermocycler (Modell PTC-200, Fa. MJ Research, San Francisco, USA) durchgeführt. Die Annealingtemperatur für diese PCR wurde zwischen 57°C und 63°C variiert. Die PCR umfasste 30 Zyklen, der Ansatz bestand aus:

5µl 10xPCR-Puffer (Inhalt: 50mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-HCl[pH9,0])

4µl 2,5mM dNTP-Mix

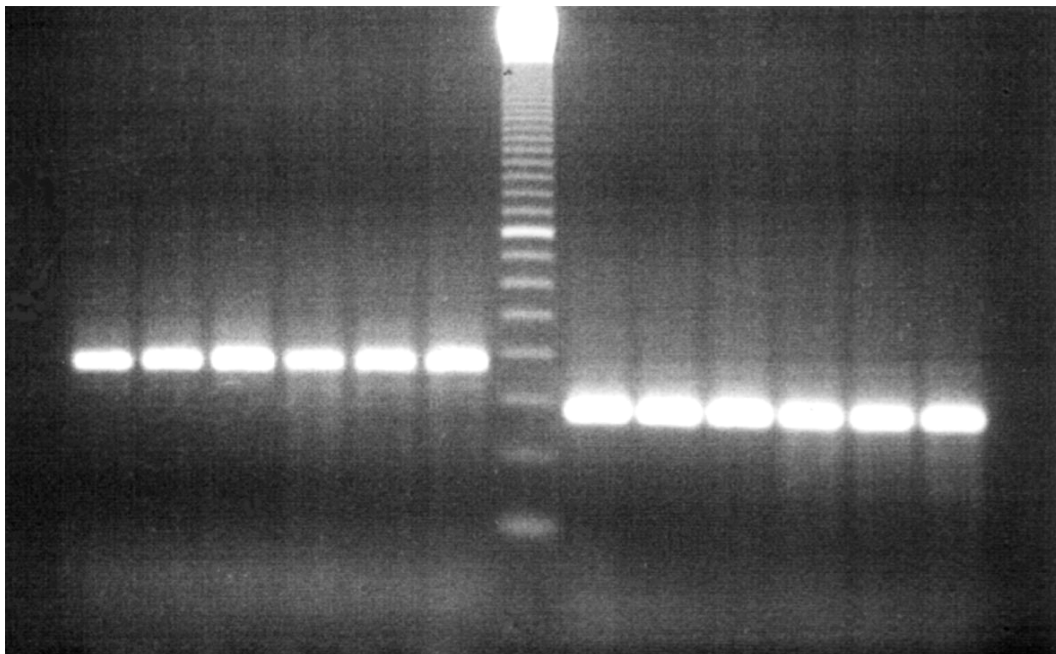
4µl 5µM-Primer-Mix (enthielt beide Primer in gleicher Konzentration)

2µl (0,5U/µl) Taq-Polymerase

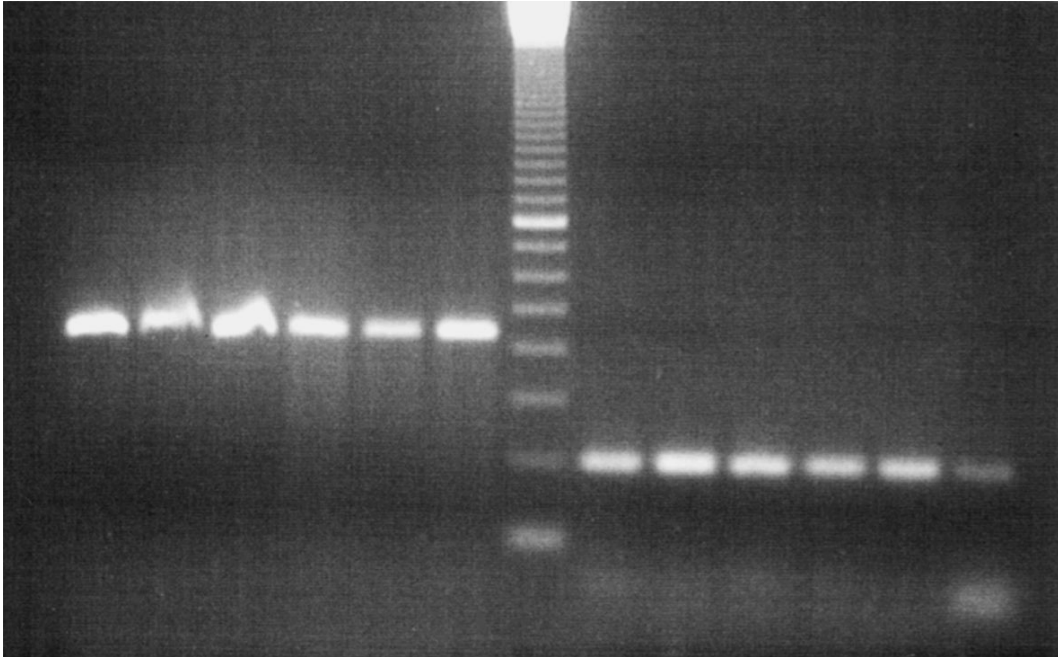
1µl cDNA

ad 50µl mit sterilem H<sub>2</sub>O

Bis auf die Primer wurden alle Reagenzien über Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, USA) bezogen. Für die Gelelektrophorese wurde ein 2%iges Agarose-Gel verwendet, dem 3,3 $\mu$ l einer 10mg/ $\mu$ l-konzentrierten Ethidiumbromid-Lösung pro 100ml Gel hinzugefügt wurde. Die PCR-Probe wurde mit Probenpuffer versetzt und parallel zu einer 100 Basenpaar-Leiter (Fa. Amersham, Piscataway, USA) aufgetragen, um die Größe des erhaltenen PCR-Produktes abzuschätzen. Diesem Gel wurde eine Spannung angelegt (10V pro 10cm Gellänge), anschließend wurde die Auftrennung der PCR-Produkte unter UV-Licht ausgewertet. Sämtliche verwendeten Primer zeigten im Vergleich mit der 100bp-Leiter eine Bande auf dem Gel, die auch der jeweils errechneten Fragmentlänge entsprach.



**Abbildung 5:** PCR mit PBGD-Standard (links), 100bp-Leiter (Mitte) und PBGD-Produkt (rechts) während der Etablierung unter verschiedenen Reaktionsbedingungen



**Abbildung 6:** PCR-Gel mit COX-2-Standardfragment (links), 100bp-Leiter (Mitte) und COX-2-Produkt (rechts) während der Etablierung unter verschiedenen Reaktionsbedingungen

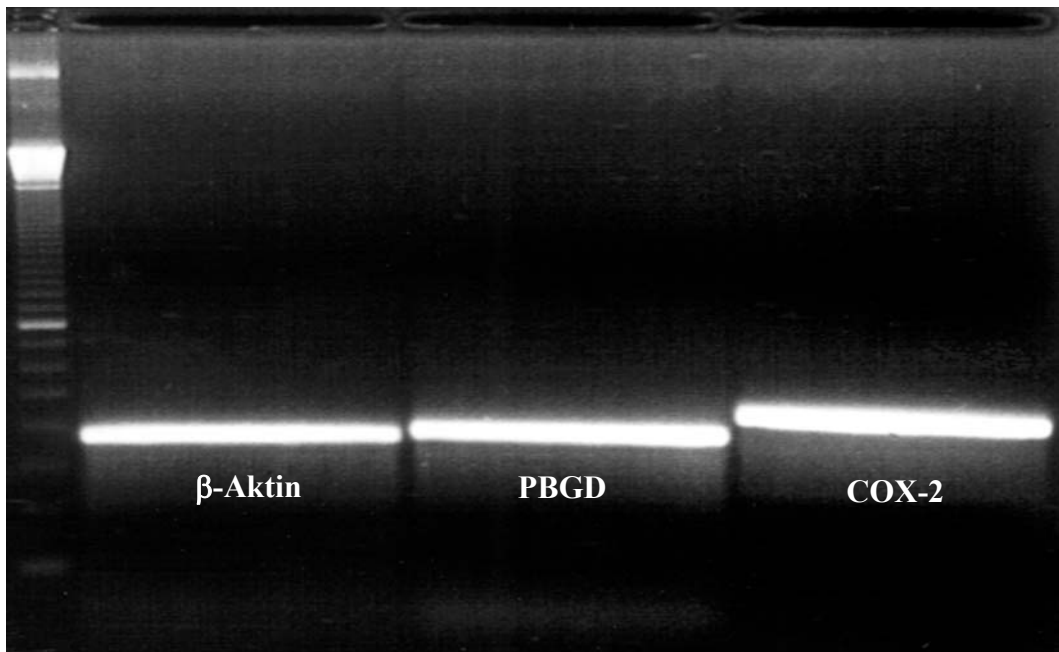
### 2.2.3.3 Herstellung eines Reaktionsstandards

Um eine ausreichend hohe Menge an Standardfragment in ausreichender Reinheit zu erhalten, wurde RNA aus COX-2-exprimierenden HT-29-Zellen mithilfe der zuvor beschriebenen RNeasy- bzw. Superscript<sup>TM</sup>-RT-Kits isoliert und in cDNA umgeschrieben.

Anschließend wurde für PBGD und COX-2 separat jeweils eine PCR mit den zugehörigen Standardfragmentprimern auf dem Thermocycler durchgeführt, das Produkt wurde auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen. Aus dem Gel wurde die Bande der cDNA des Standardfragmentes ausgeschnitten und anschließend unter

Verwendung des Qiagen Gel-Extraction-Kits in 100µl sterilem H<sub>2</sub>O nach Anweisung des Herstellers extrahiert.

Um eine ausreichende Menge an Standardfragment zu erhalten, wurde mit der eluierten cDNA nochmals zweimalig eine PCR mit anschließender Gelextraktion durchgeführt, statt 50µl PCR-Ansatz wurden 700µl verwendet (siehe Abbildung 7). Die aus diesen beiden PCR-Läufen erhaltene cDNA jedes einzelnen Standardfragments wurde zu einer Lösung vereinigt.



**Abbildung 7:** Agarose-Gel einer PCR zur Gewinnung von Standardfragmentlösung – das hier ebenfalls abgebildete  $\beta$ -Aktin wurde in dieser Arbeit nicht in der Real-Time-PCR verwendet

### 2.2.3.4 Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes der Reaktionsstandards

In den beiden nach den PCR-Durchläufen erhaltenen Standardfragment-Lösungen wurde photometrisch der jeweilige DNA-Gehalt bestimmt.

Hierfür wurden die Standardfragment-Lösungen in sterilem H<sub>2</sub>O 1:10 verdünnt und in einer Küvette die Adsorption bei Licht mit einer Wellenlänge von 260nm und 280nm gegen den Leerwert (H<sub>2</sub>O) gemessen. Daraus wurde die Ratio 260nm/280nm gebildet.

Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren liegt bei 260nm. Nimmt die Ratio 260nm/280nm für eine Nukleinsäurelösung einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 an, so liegt eine hochreine Nukleinsäurelösung vor. Da das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280nm liegt, verringern Proteinverunreinigungen die Ratio auf unter 1,8. Eine Ratio von mehr als 2,0 weist auf eine Verunreinigung durch Salze hin.

Die gemessene Ratio betrug für PBGD 1,82 und für COX-2 1,97. Gemessen wurde mit dem Photometer Beckmann DU-600.

Anschließend wurde die DNA-Konzentration nach folgender Formel berechnet, wobei der Faktor 50 einen Korrekturfaktor für die Bestimmung von DNA darstellt:

$$\text{DNA-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = \frac{\text{Extinktion (260nm)} \times 50}{\text{Verdünnung (1:10)}} \quad [\text{ng/}\mu\text{l}]$$

Die beiden Standardfragmentlösungen wurden auf eine Konzentration von 10 ng/μl verdünnt und von dieser Konzentration aus eine Verdünnungsreihe angelegt, die in der Real-Time-PCR als externer Standard benutzt wurde. Zum Verdünnen wurde Poly-A-DNA mit einer Konzentration von 10 ng/μl benutzt, um den

Nukleinsäuregehalt insgesamt in jeder Verdünnungsstufe konstant zu halten und so die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen zu erhöhen.

### **2.2.3.5 Ablauf der Real-Time PCR**

Für den Reaktionsansatz wurde der FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit (Fa. Roche, Mannheim) verwendet. Dieser enthielt die Polymerase, dNTP-Lösung, MgCl<sub>2</sub>-Lösung sowie steriles, PCR-geeignetes H<sub>2</sub>O.

Der Reaktionsansatz bestand aus:

0,8 µl (25mM) MgCl<sub>2</sub>

1 µl Sondenmix (beide Sonden je 0,2mM)

1 µl Primermix (beide Primer je 300mM)

1 µl FastStart-Mix

ad 10 µl mit sterilem H<sub>2</sub>O

Die durchgeführte Real-Time-PCR umfasste 40 Zyklen (Aufbau eines Zyklus: Annealingphase bei 63°C für 12 sek, Elongationsphase bei 72°C für 12 sek, Denaturierungsphase bei 95°C für 0 sek). Vor dem ersten PCR-Zyklus wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 95°C denaturiert, um die Taq-Polymerase des FastStart-Kits zu aktivieren.

Bei jedem Lauf auf dem Thermocycler wurden fünf Verdünnungsstufen der Standardfragmentlösung eingesetzt. Die Ct-Werte dieser Verdünnungsstufen wurden durch die Software (LightCycler-Software, Version 3.3) mit den Ct-Werten der Proben verglichen und so der relative cDNA-Gehalt ermittelt.

Aus den Quantitäten für die COX-2-Expression und die PBGD-Expression wurde nach folgender Formel die relative Expression von COX-2 für die einzelnen Proben ermittelt und miteinander verglichen:

$$\text{Relative COX-2-Expression} = \frac{\text{COX-2-Expression [ng/}\mu\text{l]}}{\text{PBGD-Expression [ng/}\mu\text{l]}}$$

Standardkurve und Proben wurden in jedem Lauf doppelt angesetzt und bestimmt. Aus den doppelt bestimmten Werten wurde der Mittelwert gebildet. Eine Ct-Abweichung von weniger als einem halben Zyklus (entspricht einer Ct-Abweichung von kleiner gleich 0,5) wurde als Pipettiergenauigkeit toleriert. Bevor die Quantifizierung begonnen wurde, wurden die Bedingungen für die Real-Time-PCR optimiert. Hierfür wurden im Reaktionsansatz verschiedene Kombinationen von Primerkonzentrationen (50nM, 300nM und 900nM) getestet. Zudem wurde die Annealingtemperatur zwischen 57°C und 63°C variiert und getestet, wie sich verschiedene MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen (2, 3 und 4 µmol/l) auf die Real-Time-PCR auswirken. Diese Optimierungen wurden bereits auf dem LightCycler durchgeführt.

#### **2.2.4 Bestimmung der COX-2-Expression auf Proteinebene durch eine immunhistochemische Färbung**

Zur Darstellung der COX-2-Expression auf Proteinebene wurde die Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP) verwendet, die 1984 von Cordell et al. erstmals beschrieben wurde.

##### **2.2.4.1 Prinzip der APAAP-Methode**

Bei der APAAP-Methode wird der zu untersuchende Gewebeschnitt mit einem IgG-Antikörper inkubiert, der gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist (sog. Primärantikörper). Danach wird ein zweiter IgG-Antikörper im Überschuss hinzugefügt, der gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist (sog.

Brückenantikörper). Anschließend wird ein dritter IgG-Antikörper hinzugefügt, dessen zwei Fab-Teile mit Alkalischer Phosphatase verbunden sind (sog. Sekundärantikörper). Damit er an den Brückenantikörper bindet, muss der Sekundärantikörper von derselben Spezies wie der Primärantikörper stammen.

In einer nun folgenden Enzymreaktion entsteht das sichtbare und auswertbare Reaktionsprodukt, ein Farbstoff. Die Alkalische Phosphatase hydrolysiert in dieser Reaktion Naphtolbiphosphat, einen organischen Phosphatester, zu Phosphaten und Phenolen. Die Phenole reagieren wiederum mit farblosen Diazoniumsalzen zu Azofarbstoffen. Das von uns verwendete Chromogen Fast-Red (DAKO, Heidelberg) führt zur Entstehung eines roten Farbstoffes.

#### **2.2.4.2 Ablauf der APAAP-Färbung**

Aus den in Paraffin eingelegten Biopsieblöcken wurden zunächst 2-3 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden entparaffiniert und in einer Alkoholreihe von absteigender Konzentration rehydriert. Dann wurden die Schnitte für 2 Minuten in Citratpuffer (pH 6,0) erhitzt und in eine spezielle Färbemaschine (ChemoMate, DAKO, Heidelberg) verbracht, in der der eigentliche Färbeprozess vollautomatisch ablief.

Die Schnitte wurden dabei mit einem monoklonalen COX-2-Antikörper (Katalog-Nr.: 160112, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, auch verwendet in Sinicrope 1999) in der Konzentration 5 µg/ml für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem Waschen wurden die Schnitte mit einem anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper (Verdünnung 1:20) ebenfalls für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der APAAP-Komplex wurde für 30 Minuten hinzugefügt (bei einer Verdünnung von 1:50 in RPMI-Medium, welches 10% FBS und 1% Natrium-azid



enthielt). Danach wurde die COX-2-Färbung durch das Fast-Red-System (DAKO, Heidelberg, D) sichtbar gemacht.

#### **2.2.4.3 Auswertung der Färbung**

Für die Auswertung der auf COX-2 gefärbten Schnitte wurde ein Färbescore angewendet, in dem die Färbeintensität mit der Prozentzahl der gefärbten Zellen multipliziert wurde (auch verwendet in Krajewska et al. 1996). Ein Präparat wurde als positiv angesehen, wenn  $\geq 1\%$  der Zellen positiv gefärbt waren.

Die Intensität der Färbung wurde hierfür in drei Stufen eingeteilt: schwach positiv (= 1 Punkt), positiv von mittlerer Intensität (= 2 Punkte) und stark positiv (= 3 Punkte). Der Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen wurde in vier Stufen eingeteilt: 1-25% (= 1 Punkt), 26-50% (= 2 Punkte), 51-75% (= 3 Punkte), 76-100% positive Zellen (= 4 Punkte).

Wenn in einem Präparat verschieden intensiv gefärbte Zellen vorlagen, wurde für jede Färbeintensität ein anteiliger Score ermittelt. Diese Scores wurden anschließend addiert, sodass der maximal mögliche Score 12 Punkte betrug.

### **2.3 Statistische Auswertung**

Für die Auswertung der Daten der Real-Time PCR und der Immunhistochemie wurde das Programm PRISM Statistic Package, Version 2.0 verwendet (GraphPad Software Inc. San Diego, USA).

Dabei wurde zum Vergleich der Proben aus den einzelnen Gruppen der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test verwendet. Ein festgestellter Unterschied zwischen den Gruppen wurde ab einem  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

Wenn in einem Kruskal-Wallis-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den zu analysierenden Wertegruppen gefunden wurde, so wurde ein nichtparamet-

rischer post-Test (Dunn's multiple comparison test) eingesetzt, um darzustellen, welche der getesteten Wertegruppen signifikant verändert waren.

Um die Korrelation zwischen der COX-2-Expression auf mRNA- und Proteinebene zu berechnen, wurde der nichtparametrische zweiseitige Spearman-Test verwendet.