

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Puffer und Lösungen

LB-Flüssigmedium: 10 g NaCl  
10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
ad 1.000 ml H<sub>2</sub>O auf pH 7,4

LB-Agar-Platten: 10 g NaCl  
10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
15 g Bacto-Agar  
ad 1.000 ml H<sub>2</sub>O auf pH 7,4

Nach Bedarf wurde dem Medium nach Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

Agaroselösung für DNA-Gele: 1-2 % (w/v) Agarose in  
1 x TAE-Puffer

Ethidiumbromidlösung: 0,001 % (w/v) Ethidiumbromid in  
1 x TAE-Puffer

50 x TAE-Puffer: 2 M Tris  
50 mM EDTA  
pH 8,0 (eingestellt mit Essigsäure)

6 x DNA-Gelladepuffer: 0,25 % (w/v) Xylencyanol  
30 % (v/v) Glycerol in 1 x TAE-Puffer

10 x PBS: 160 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
1,5 M NaCl, pH 7,5

10 x TBS: 500 mM Tris/HCl  
1,5 M NaCl  
pH 7,6

1 M Phosphat pH 7,2 60,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
21,8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1 x PBS 20 mM Phosphat  
150 mM NaCl

PBS/Tween 20 1.000 ml PBS  
6 ml 10% Tween 20

20x SSC	87,7 g NaCl 44,1g Natriumcitrat pH 7,2 auf 500 ml
1x Gal	40 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid
10x TE-Puffer	100 ml 1 M Tris (pH7,5) 20 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5) auf 1l mit Wasser
10x TBE	54,45 g Tris-Base 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA (pH8,0) auf 500 ml mit Wasser

Die an dieser Stelle nicht aufgeführten Puffer oder Lösungen sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen erwähnt.

### 3.1.1 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet und entsprechend den Angaben des Herstellers kultiviert:

Name	Nummer	Gewebe	Morphologie	Wachstum	tumorigen	metastatisch	Liferant
LNCaP.FGC	CRL-1740	Prostata, Lymphknoten Metastase	epithelial	adherent	y	leicht	ATCC
DU145	HTB-81	Prostata, Gehirnmastase	epithelial	adherent	y	?	ATCC
PC-3	CRL-1435	Prostata, Knochenmetastase	epithelial	adherent, suspension	y	?	SAG/RL
BPH-1	ACC 143	Prostata, BPH	epithelial	adherent	n	?	
PrEC		Prostata, primäre humane Zellen	epithelial	adherent	n	n	Clonetics
SK-BR-3	HTB-30	Brust, Adenocarcinom	epithelial	adherent	y	?	ATCC
MCF-10A		Brust	epithelial	adherent			SAG/RL
MCF-7	HTB-22	Brust, Adenocarcinom	epithelial	adherent	?	?	SAG/RL
T47-D	HTB-133	Brust, Ductales Carcinom	epithelial	adherent	?	?	SAG/RL
ZR-75-1		Brust	epithelial	adherent			SAG/RL
MDA-MB-231	HTB-26	Brust, Adenocarcinom	epithelial	adherent	y	?	SAG/RL
MDA-MB453	HTB-131	Brust	epithelial	leicht anhaftend	n	?	ATCC
RT4	HTB-2	Harnblase, Übergangszellpapilom	epithelial	adherent	y		Regensburg
J82	HTB-1	Harnblase, Übergangszellcarcinom	epithelial	adherent	y		Regensburg
Urotza		Urothel der Harnröhre			n	n	Regensburg
RT112		Harnblase					Regensburg

Tab. 1: Verwendete Zelllinien. Die Nummer bezieht sich auf die Bestellnummer des Lieferanten (ATCC = American Type Culture Collection (Manassas, USA); SAG/RL = Schering AG, Rosemarie Lichtner; Regensburg = Institut für Pathologie Universität Regensburg, Arndt Hartmann).

## 3.2 Plasmidisolierung

Plasmid cDNA-Klone wurde aus der von Research Genetics (Huntsville, USA) verwalteten, öffentlich zugänglichen, „I.M.A.G.E. Clone Library“ bestellt (Lennon et al., 1996), die aus Tausenden von sequenzierten cDNA Klonen der Washington Universität besteht. Die

bestellten und gelieferten bakteriellen Kulturen wurden entsprechend ihrer Antibiotikaresistenzen auf antibiotikahaltigen Agar-Platten ausgestrichen und einzelne Klone wurden in 5 ml LB Lösung angezogen.

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des „GFX Micro Plasmid Prep Kit“ (Amersham Biosciences, Freiburg) und basiert auf der alkalischen Bakterienlyse und der selektiven Bindung der Plasmid-DNA an eine Silikamatrix (Birnboim and Doly, 1979). Es wurden jeweils zweimal 2 ml der Bakteriensuspension abzentrifugiert, dem Protokoll des Herstellers folgend, die Plasmid DNA isoliert und im letzten Schritt in 100 µl Wasser aufgenommen.

Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte durch eine photometrische Messung der Absorption der Ringsysteme aromatischer Nukleinsäuren bei 260 nm oder durch eine Quantifizierung mit PicoGreen.

### **3.3 DNA und RNA Quantifizierung mit PicoGreen bzw. RiboGreen**

Die Reagenzien von Molecular Probes (Leiden, Niederlande) zur hoch sensitiven Quantifizierung von doppelsträngiger DNA und RNA in Lösung beruhen auf einer relativen Quantifizierung im Vergleich zu einer ebenfalls zu messenden Standardreihe mit bekannten Konzentrationen (Singer et al., 1997). Die Standardreihe und die zu messenden Proben wurden in 50 µl TE-Puffer aufgenommen, mit 50 µl des ebenfalls in TE-Puffer gelösten Quantifizierungs-Reagenz gemischt und in einer 96-Loch Platte wurde die Fluoreszenz nach einer Laseranregung im FluorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) gemessen. Aus den Werten der Standardreihe wurde eine Regressionsgerade berechnet, aus der die Konzentration der zu untersuchenden Probe ermittelt wurde.

### **3.4 Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode unter Verwendung von Fluoreszenz markierten Dideoxynukleotiden (Sanger et al., 1977). Die PCR-Produkte wurden auf denaturierenden Polyacrylamid-Gelen auf ABI 377A DNA Sequenzern (Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Für die PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

400-500 ng	DNA
1 µl	Primer (5 pmol/µl)
3 µl	BigDye Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt)
ad. 15 µl	H <sub>2</sub> O

Primername	Primersequenz
M13 vorwärts	5'-TGTAACACGACGGCCAGT -3'
M13 rückwärts	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3'
T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG -3'

Tab. 2: Sequenzen der verwendeten Sequenzierungsprimer. Bestellt wurden die Primer bei MWG Biotech (Ebersberg).

Der BigDye-Mix (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt) enthält Puffer, Ampli Taq DNA Polymerase, dNTPs und Fluoreszenz markierte ddNTPs. In Abhängigkeit von der zu sequenzierenden DNA wurden entsprechende Primer eingesetzt, die bei PCR-Produkten der Sequenz des Produktes entsprachen oder aber bei Plasmiden vektorspezifisch waren (s. Tab. 2).

PCR-Programm: 4 Min.	95°C	
30 s	95°C	└
10 s	50°C	└ 30 Zyklen
4 Min.	60°C	└

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden die Produkte von überschüssigen nicht eingebauten Nukleotiden durch eine Sephadex-Reinigung getrennt. Das Sephadex G50 (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde hierfür zuvor für 2 h in MultiScreen-PCR Platten (Millipore GmbH, Eschborn) mit 300 µl Wasser aufgequollen und dann für 5 Min. bei 910g zentrifugiert. Auf das Sephadex konnte dann die PCR-Reaktion aufgetragen werden und in 5 Min. bei 910g durchzentrifugiert werden. Das gereinigte PCR-Produkt wurde eingetrocknet und anschließend in 3 µl Sequenzier-Auftragepuffer durch Schütteln resuspendiert. Die Proben wurden dann für 10 Min. bei 80°C denaturiert, auf Eis gestellt und 1,5 µl auf das Gel aufgetragen.

Als Gel wurde eine 5,25 %ige Polyacrylamid-Gellösung (PAGE plus, Amresco, Solon, USA) mit 6 M Harnstoff in TBE Puffer verwendet, die zuvor entgast wurde. Zur radikalischen Polymerisation wurden zu der Gellösung 0,5% Ammonium-Persulfat (APS) und 0,05%

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) gegeben und die Lösung wurde blasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Nach Polymerisation wurden die Glasplatten in den ABI Prism 377 DNA-Sequencer eingebaut, die Pufferkammern mit TBE-Puffer befüllt und die Proben aufgetragen.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte wurden die vom Sequenzer erzeugten Rohdaten auf einen UNIX-Rechner transferiert und mit den Programmen Reap und Scope (Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena) überarbeitet und in ein Format gebracht, das einen Transfer der Daten in bereits bestehende Sequenzen in das GAP4-Programm (Bonfield et al., 1995) ermöglichte. Ein Vergleich der sequenzierten Plasmide mit den Datenbank-Sequenzen bestätigte die Identität der meisten Plasmide.

### **3.5 Isolierung von spezifischen BAC-Klonen**

Zur Isolation von genomischen BAC Klonen (Bacterial Artificial Chromosom) wurde die BAC Bibliothek von Research Genetics (Huntsville, USA) verwendet. Die verwendete Bibliothek besteht aus 384 Microtiterplatten mit jeweils 384 Vertiefungen. Die darin enthaltenen 147.456 verschiedenen BAC Klone sollten das menschliche Genom statistisch dreimal repräsentieren. Um nicht alle 384 Platten testen zu müssen, wurden entsprechende Pools zusammen gestellt, aus denen in 96 PCR-Reaktionen mit Primern aus dem interessierenden Gen die Koordinaten des gesuchten BACs bestimmt werden konnten.

Für die PCR-Reaktion wurden 2 µl der DNA-Lösung, 0,5 µM Primer, 10x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs und 1 U Tag-Polymerase in einem Volumen von 25 µl eingesetzt. Bei jeder PCR sollten als Kontrolle genomische DNA (50 ng) sowie DEPC-H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle mitgeführt werden.

Die gelieferten Agar-Kulturen von Research Genetics wurden ausgestrichen und einzelne Klone durch eine Kolonie-PCR mit spezifischen Primern auf ihr Insert überprüft. Dazu wurde ein Klon von einer LB-Platte heruntergepickt, in die vorbereitete PCR-Reaktionslösung getaucht und anschließend in einer Flüssigkultur angezogen. Der PCR-Mix wurde wie zuvor angesetzt und mit gleichen PCR-Bedingungen amplifiziert. Nach einer anfänglichen Denaturierung von 5 Min. bei 95°C wurde in 35-40 Zyklen für 15 s bei 95°C denaturiert, für 15 s bei 55-68°C angelagert und für 1 Min. bei 72°C das Produkt verlängert. An den letzten Zyklus wurde ein Schritt von 5 Min. bei 72°C angehängt. Von positiven Klonen wurde eine Bac-DNA Präparation vorgenommen

### 3.6 Northern Hybridisierung

Zur Untersuchung der RNA Expression wurden Filter der Firmen BD Biosciences Clontech (Heidelberg) und Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die Hybridisierungen erfolgten nach modifizierten Protokollen der Hersteller.

#### 3.6.1 Sondenherstellung

Nach Auswahl des zu untersuchenden Sequenzbereiches des betreffenden Gens wurde die Sequenz durch das Programm RepeatMasker auf Sequenzwiederholungen überprüft. Wurden keine sich wiederholenden Sequenzmotive identifiziert, wurden aus der „I.M.A.G.E. Clone Library“ von Research Genetics (Huntsville, USA) Klone bestellt, die den betreffenden Bereich enthielten oder es wurde eine Sonde aus cDNA durch PCR amplifiziert. Die Plasmide und PCR-Produkte wurden vor einer Hybridisierung durch Sequenzierung verifiziert.

Die cDNA Fragmente in den Plasmiden wurden durch Restriktionsverdau aus dem Vektor ausgeschnitten. Für den Restriktionsverdau wurden etwa 1 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 25 µl mit jeweils 1 µl des entsprechenden Restriktionsenzym für 2 h bei 37°C verdaut. Ausgewählt wurden Restriktionsenzyme der multiplen Klonierungsstelle, die keine weitere Schnittsequenz im Vektor oder cDNA Fragment enthielten. Nach Angaben des Herstellers wurde der für das Enzym optimale Puffer, oder bei einem Mehrfachverdau der Puffer, in dem die Enzyme die höchsten Effizienz besitzen, ausgewählt.

Gen	GenBank Nummer	MAGE-Nummer	Genlänge	Klon Position	Klonlänge (bp)
Cytokeratin 18	R69055	142049	1500	870-1500	700
sfrp	W21306	307831	4500	240-2720	2500
Ponsin	AA663829	969862	6000	1600-2950	1300
beta-Actin	PCR-Fragment	-	1800	3'-UTR	724

Tab. 3: Aufstellung verwendeter Klone für Sonden zur Northern Hybridisierung. Bestellt wurden die Klone bei Research Genetics (Huntsville, USA).

Die DNA Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel eluiert (s. Kap. 3.9.5) und die DNA Konzentration durch PicoGreen Messung (s. Kap. 3.3) bestimmt.

### 3.6.2 Konzentrationsreihe von DNAs auf Membranen

Zur Abschätzung der Effizienz der Markierung wurden unterschiedliche Konzentrationen der Sonden-DNA auf Membranen punktförmig aufgetragen.

Es wurde eine Verdünnungsreihe in 10X SSC mit Konzentrationen von 1 ng/μl bis 100 fg/μl hergestellt. Die verdünnten DNA-Lösungen wurden für 5 Min. bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Die unterschiedlichen Konzentrationen wurden auf eine Hybond-N+ Membran aufgetragen (Amersham Biosciences, Freiburg). Anschließend wurde die DNA 5 Min. in die Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und 1 Min. in die Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,2, 1mM EDTA) gegeben und für 2 Stunden bei 80°C gebacken.

### 3.6.3 Sondenmarkierung und Aufreinigung

Zur Hybridisierung wurden radioaktiv markierte Sonden verwendet, die mit dem „Megaprime<sup>TM</sup> DNA Labeling System“ von Amersham Biosciences (Freiburg) markiert wurden.

25 ng der als Sonde zu verwendenden DNA wurden in 28 μl Wasser aufgenommen, 5 μl des zufälligen Nonamer PrimerMixes wurden zugegeben und für 5 Min. bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden 10 μl Markierungspuffer, 5μl α-P<sup>32</sup>dCTP (10 mCi/ml, Amersham Biosciences, Freiburg) und 2 μl Klenov-Enzym (1 U/μl) zugegeben, leicht gemischt, abzentrifugiert und für 30 Min. bei 37°C inkubiert.

Die markierte Sonde wurde durch Reinigung über eine Sephadex G50 Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences, Freiburg) von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Die Säulenmatrix wurde gut durchgeschüttelt, die untere Spitze abgebrochen, der Deckel leicht aufgedreht und in ein 2 ml Eppi gestellt. Nach Zentrifugation für 1 Min. bei 3.000 rpm wurde die Säule in ein 1,5 ml Safe-Lock Eppi gestellt und die 50 μl der Markierungsreaktion wurden auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde für 2 Min. bei 3.000 rpm zentrifugiert, um die aufgereinigte Sonde zu erhalten.

Die Bestimmung der ungefähren Einbaurrate erfolgte über eine Szintillationsmessung durch Messung der Aktivität vor und nach Säulenreinigung.

### 3.6.4 Hybridisierung der Membranen

Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit Lachs-Hoden-DNA prähybridisiert. 1.5 mg der Lachs-Hoden-DNA (Sigma, München) wurden für 5 Min. bei 95°C denaturiert, für 1 Min. auf Eis gestellt und dann zu 15 ml der auf 60°C vorgewärmten ExpressHyb Lösung (Ambion, Huntingdon Großbritannien) gegeben. Die Membran und die selbst hergestellten Filter mit der Konzentrationsreihe der Sonde wurden mit der DNA bzw. RNA Seite nach oben in die Hybridisierungsröhren gegeben und für etwa 1h bei 65°C in 10 ml Lösung inkubiert.

Die markierte Sonde wurde mit 50 µl 20x SSC, 15 µl (ca. 150 µg) Lachs-Hoden-DNA und 30 µl (30µg) Cot-1 DNA und Wasser auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach einer fünfminütigen Denaturierung bei 95°C und 30 Min. bei 68°C wurde die Sonde zu den verbliebenen 5 ml ExpressHyb gegeben. Nach Abgießen der Prähybridisierungslösung und Zugabe der Lösung mit der markierten Sonde wurde über Nacht bei 65°C hybridisiert.

### 3.6.5 Waschen der Membranen

Nach Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und für eine mögliche weitere Hybridisierung bei -20°C verwahrt. Die Membran wurde zweimal mit 2x SSC, 1% SDS für 5 Min. und zweimal für 30 Min. bei 65°C gewaschen. Membranen mit noch hoher Aktivität nach den Waschgängen wurden noch einmal für 30 Min. mit 0,1x SSC, 0,5 % SDS bei 65°C gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Klarsichtfolie eingewickelt und in einer PhosphorImager Kassette exponiert. Die photostimulierbaren Oberflächen speichern die durch den radioaktiven Zerfall emittierten Strahlungen und erlauben eine 15-250fach sensitivere Detektion von  $^{32}\text{P}$  als übliche Röntgenfilme (Johnston et al., 1990). Die Kassette wurde dann in einem PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) gescannt und die beobachteten Signale mit der Software ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) ausgewertet.

Zur mehrfachen Verwendung der Filter wurde die Markierung durch 5 minütige Inkubation in kochendem 0,5% SDS heruntergewaschen und der Filter zur Kontrolle der Effizienz der Dehybridisierung erneut über Nacht in der PhosphorImager Kassette exponiert.



### 3.7 Mikrodissektion

Ein inhärentes Problem für die Untersuchung des Prostatakrebses ist die Heterogenität des Gewebes, da Tumorepithelien sich stark mit den vorgegebenen Strukturen vermischen. Eine Gesamtuntersuchung der Prostata zur Identifikation von tumorassoziierten Gebieten ist daher oft ungenau. Auch die Verwendung von Gewebeblöcken ist häufig nicht geeignet für die detaillierte Analyse, besonders wenn reines Tumor- oder Normalgewebe benötigt wird. Aus diesen Gründen ist die Mikrodissektion zur Generierung homogener Gewebeproben notwendig. Aus den mikrodissezierten Arealen der Prostatanormal und –tumorgewebe sollte RNA isoliert werden, so dass für eine gute Ausgangs-Qualität der Gewebe kryokonserviertes Material verwendet wurde.

#### 3.7.1 Auswahl des Patientenkollektivs zur Expressionsuntersuchung von Prostatatumoren

Das Gewebe wurde bei radikalen Prostatektomien von Patienten mit Prostatakrebs in der Abteilung Urologie des Universitäts-Krankenhauses Charité im Zeitraum von 1998 bis 2000 entfernt. Die Patienten waren im Alter von 47-72 Jahren, hatten einen Tumorgrad nach Gleason von 4-9 und ein Stadium von pT2a-4. Die präoperativen PSA Werte lagen zwischen 2 und 30 ng/ml Serum. Die Prostatektomie-Proben wurden direkt nach chirurgischer Entfernung in die Gefrierschnittabteilung gegeben und von einem Pathologen entsprechend diagnostischer Standards sektioniert. Geeignete Gewebeschnitte wurden zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur anschließenden weiteren Bearbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für die Mikrodissektion und die daran anschließende Extraktion und Amplifikation der RNA wurden von jedem Patienten sowohl Bereiche aus dem Tumor als auch aus dem umgebenden Normalgewebe ausgewählt.

#### 3.7.2 Durchführung der manuellen Mikrodissektion

Das sterile Vorgehen während der Mikrodissektion sollte sicherstellen, dass die Bearbeitung des Gewebes die Qualität der RNA nicht beeinflusst. Aus einem Gewebeblock wurden 30 aufeinanderfolgende Gesamtschnitte mit der Dicke von 10  $\mu\text{m}$  angefertigt, luftgetrocknet, leicht mit Hämatoxylin gefärbt und auf Trockeneis wieder gefroren. Jeder zehnte Schnitt wurde zur Dokumentation mit Hämalaun-Eosin gefärbt (5  $\mu\text{m}$ ), die zur Mikrodissektion

geeigneten Bereiche wurden markiert. Von den gefrorenen Schnitten wurden unter dem Mikroskop mit einer Nadel die markierten Bereiche herausgeschnitten, in GTC-Puffer transferiert und bis zur RNA-Präparation bei  $-80^{\circ}\text{C}$  verwahrt.

### 3.8 Poly-A<sup>+</sup>-RNA Präparation

Die Poly-A<sup>+</sup>-RNA Präparation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des Poly-A-Tract 1.000 Kits von Amersham Biosciences (Freiburg).

#### 3.8.1 RNA Präparation aus Gewebeproben

Das Patientengewebe wurde nach Microdissection in 150  $\mu\text{l}$  GTC-Puffer + 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur RNA-Präparation wurde das Zellysate durch etwa 30 s vortexen homogenisiert. Zu dem Lysat wurden auf  $70^{\circ}\text{C}$  vorgewärmte 300  $\mu\text{l}$  Verdünnungspuffer + 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol und 10 pmol biotinyliertes Oligo-dT zugegeben. Die Proben wurden für 5 Min. auf  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzt und anschließend für 5 Min. bei RT inkubiert. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurden die Lysate für 10 Min. bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert. 120  $\mu\text{l}$  der an Streptavidin gekoppelten paramagnetischen Partikel (SA-PMP) wurden dreimal mit 500  $\mu\text{l}$  0,5x SSC gewaschen, indem sie in einem magnetischen Ständer an der Wand des Eppis abgeschieden wurden und die Flüssigkeit abgenommen wurde. Der klare Überstand der Zentrifugation wurde zu den gewaschenen SA-PMPs gegeben und die Bindung an das biotinylierte Oligo-dT mRNA Hybride durch Inkubation für 5 Min. bei RT ermöglicht. Nach Abtrennung der gebundenen SA-PMPs im magnetischen Ständer von dem genomische DNA enthaltenden Überstand wurden die Partikel dreimal mit 0,5x SSC gewaschen. Nach letzter sorgfältiger Abnahme der Waschlösung wurden zur Elution 80  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser zu den SA-PMPs gegeben, für 5 Min. bei RT inkubiert und die Poly-A<sup>+</sup>-RNA Lösung von den Partikeln getrennt. Anschließend wurde die RNA in der Speed-Vac einrotiert, in 11  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser eluiert und von 1  $\mu\text{l}$  die RNA-Konzentration durch RiboGreen Messung bestimmt.

Verdünnungspuffer:

6x	SSC
10 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
1 mM	EDTA
0,25 %	SDS

GTC Puffer:

4 M	Guanidine Thiocyanat
25 mM	Natriumcitrat (pH 7,1)

### 3.8.2 RNA Präparation aus Zellkultur

Die Vorgehensweise bei der Präparation von RNA aus Zellkultur verlief analog zu der Präparation aus Geweben, jedoch mit anderen Volumen der verwendeten Lösungen.

Von den Zellen einer Zellkulturflasche wurde die Nährlösung abgezogen und GTC-Puffer zugegeben. Zur Homogenisierung des Zelllysates wurde es mehrmals durch eine Kanüle aufgezogen. Für die Präparation von etwa 5 ml GTC-Zelllysate aus einer Zellkulturflasche wurden 8 ml des Verdünnungspuffers 3 ml SA-PMPs, die mit 3 ml 0,5x SSC gewaschen wurden, und 500 pmol biotinyliertes Oligo-dT zugegeben. Eluiert wurde die cRNA mit 475 µl DEPC-Wasser, anschließend mit doppeltem Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M NaAc für 1 Stunde bei RT gefällt. Nach 30 Min. Zentrifugation bei 14.000 rpm, Waschen mit 100 µl 70% Ethanol und erneuter Zentrifugation für 20 Min. bei 14.000 rpm wurde das Ethanol abgenommen, das Pellet getrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

## 3.9 cDNA Synthese

Die isolierte Poly-A<sup>+</sup>-RNA wurde zu weiteren Untersuchungen für Affymetrix Chipexperimente oder auch quantitative Taqman Untersuchungen in cDNA umgeschrieben. Zur Chiphybridisierung wurde die cDNA durch eine *in vitro* Transkription linear amplifiziert und durch den Einbau Biotin markierter Nukleotide markiert (Van Gelder et al., 1990).

### 3.9.1 Erststrangsynthese aus isolierter Poly-A<sup>+</sup>-RNA

Für die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde eine MMLV Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA Polymerase, verwendet. Die benutzte Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco Life Technologies) hat durch eine Punktmutation ihre RNase H Aktivität verloren und besitzt eine besonders hohe Syntheseleistung.

Die isolierte und quantifizierte Poly-A<sup>+</sup>-RNA wurde in 10 µl DEPC-Wasser aufgenommen, 1 µl T7-dT<sub>24</sub>- Primer (100 pmol/µl) wurde zugegeben. Nach 10 Min. erhitzen bei 70°C wurde die RNA auf Eis gestellt und der Erststrangansatz zugegeben, der sich folgendermaßen zusammensetzt:

- 4 µl 5x Erststrang-Puffer (Gibco Life Technologies)
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl 10 mM dNTP's
- 1 µl ANTI-RNase (28 U/µl, Ambion)

Nach Zugabe des gesamten Ansatzes und Temperierung auf 37°C wurde 1 µl Superscript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (200 U/µl, Gibco Life Technologies) zugegeben, kurz gevortext und abzentrifugiert sowie für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Sequenz des T7-dT<sub>24</sub>- Primers:

5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGGT<sub>24</sub>-3'

### 3.9.2 cDNA Synthese für Taqman Untersuchungen

Aus der Poly-A<sup>+</sup>-RNA von 22 verschiedenen Normalgeweben und 9 verschiedenen Prostata-, Blasen- und Brustzelllinien wurde eine einzelsträngige cDNA hergestellt, wie im zuvor beschriebenen Abschnitt dargestellt wurde. Ausgehend von der quantifizierten Poly-A<sup>+</sup>-RNA wurde die cDNA auf eine Konzentration von 1 ng/µl verdünnt. Von jeder cDNA wurden die C<sub>T</sub>-Werte für das zu untersuchende Gen und für das Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gemessen.

Von der RNA der Patientenproben wurde nach einer ersten Runde der Amplifikation, von der quantifizierten cRNA ausgehend eine Erststrangsynthese angefertigt (s. Kap.3.9.3) und der eingesetzten cRNA entsprechend ein Aliquot der cDNA auf 1 ng/µl verdünnt.

### 3.9.3 cDNA Synthese aus cRNA

Die Erststrangsynthese erfolgte im Gegensatz zur Synthese bei Poly-A<sup>+</sup>-RNA nicht mit einem Oligo-dT-Primer sondern mit 1 µl Random Hexamer Primer (250 ng/µl), da die cRNA nicht der Sequenz des Sense-Stranges entspricht wie die der mRNA, sondern der Sequenz des Antisensestranges. Das cRNA-cDNA-Hybrid wurde mit 1µl RNaseH (2U/µl) für 20 Min. bei 37°C verdaut und anschließend wurde die RNaseH-Aktivität für 2 Min. bei 95°C inaktiviert.

Zum Primen des Zweitstranges wurden zusätzlich 1µl T7-(dT)<sub>24</sub>-Primer (100pmol/µl) zugegeben, zur Denaturierung von Sekundärstrukturen auf 70°C erwärmt und dann für 10 Min. bei 42°C inkubiert. Die weitere Reaktion der Zweitstrangsynthese erfolgte analog dem Protokoll der Zweitstrangsynthese, natürlich unter Streichung einer nochmaligen RNaseH-Behandlung.

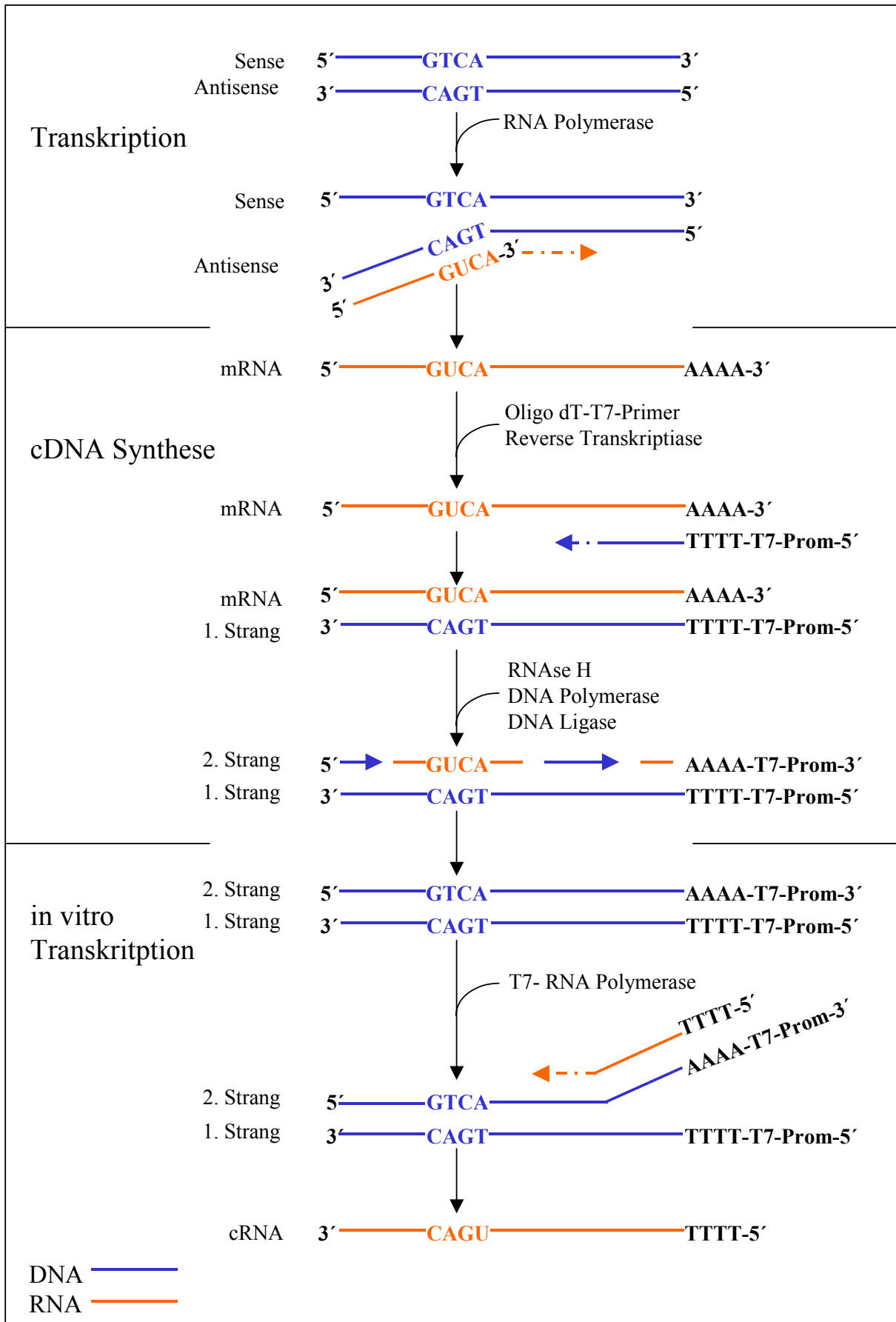


Abb. 4: Flussdiagramm der cDNA Synthese und linearen Amplifikation durch *in vitro* Transkription.

### 3.9.4 Zweitstrangsynthese

Direkt zum Ansatz der Erststrangsynthese wurde folgender Ansatz gegeben:

- 91 µl DEPC- H<sub>2</sub>O
- 30 µl 5x Zweitstrang Puffer (Gibco Life Technologies)
- 3 µl 10 mM dNTP's
- 1 µl *E. coli* DNA-Ligase (10 U/µl, Gibco Life Technologies)
- 4 µl *E. coli* DNA Polymerase I (10 U/µl, Gibco Life Technologies)
- 1 µl RNase H (2 U/µl, Gibco Life Technologies)

Die Zweitstrangsynthese wurde für 2 Stunden bei 16 °C durchgeführt. Anschließend wurden noch 2 µl T4 DNA Polymerase (5 U/µl, Gibco Life Technologies) zugegeben und für weitere 5 Min. bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 µl 0,5 mM EDTA abgestoppt.

### 3.9.5 Reinigung von cDNA

Die doppelsträngige cDNA wurde nach modifiziertem Protokoll mit dem „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgereinigt. Zu 500 µl des Aufnahme-Puffers wurde der gesamte Zweitstrangsynthese-Ansatz gegeben, auf eine Säule überführt und für 30s bei 14.000 rpm zentrifugiert. Durch die Säule wurden mittels Zentrifugation für 30 s bei 14.000 rpm 500 µl Waschpuffer gespült. Die an die Säulenmatrix gebundene cDNA wurde durch erneute Zentrifugation für 30s bei 14.000 rpm mit 2 mal 30 µl DEPC Wasser eluiert. Die cDNA wurde in der Speed Vac einrotiert und das Pellet anschließen in 9 µl DEPC- H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Konzentration der cDNA wurde durch eine Picogreen Messung bestimmt.

### 3.9.6 Lineare Amplifikation von cDNA durch *in vitro* Transkription (IVT)

Die Amplifikation der doppelsträngigen cDNA erfolgte über die in der Erststrangsynthese eingeführte T7-RNA-Polymerase Transkriptionsstartstelle (Dunn and Studier, 1983). Die T7-RNA-Polymerase ist in der Lage, von doppelsträngiger DNA als Matrize, bei Zugabe von Ribonukleotiden, die komplementäre RNA (cRNA), auch amplifizierte antisense RNA (aRNA) genannt (Van Gelder et al., 1990), zu synthetisieren. Nach Bindung der RNA-Polymerase an die doppelsträngige Promotorsequenz werden die beiden DNA-Stränge

getrennt, der 3'-5'-Strang dient als Matrize zur Erzeugung eines komplementären 5'-3'-RNA-Stranges (s. Abb. 4).

Die IVT wurde nach folgendem modifiziertem Protokoll der Firma Ambion (Huntingdon, Großbritannien) durchgeführt:

7,5 µl	NTPs (75mM)
8 µl	cDNA (maximal 500 ng)
2 µl	Ambion 10 x Reaktionspuffer
2 µl	Ambion 10 x T7 Enzyme Mix
0,5 µl	Anti-RNase (28 U/µl, Ambion)

Die Reaktion lief für 6 Stunden bei 37 °C. Bei Verwendung von Biotin markierten Nukleotiden für die cRNA Synthese wurde folgender Ansatz verwendet:

2 µl	Ambion T7 10xATP (75mM)
2 µl	Ambion T7 10xGTP (75mM)
1,5 µl	Ambion T7 10xCTP (75mM)
1,5 µl	Ambion T7 10xUTP (75mM)
3,75 µl	Bio-11-CTP (10mM) (Enzo Diagnostics, Farmingdale USA)
3,75 µl	Bio-16-UTP (10mM) (Enzo Diagnostics, Farmingdale USA)

Das erhöhte Volumen der Nukleotide wurde durch eine Reduktion des Volumens der cDNA ausgeglichen.

### 3.9.7 Aufreinigung der cRNA

Die Aufreinigung der cRNA nach der IVT erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen (Hilden). Der IVT Ansatz wurde mit DEPC- H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt, zu 350 µl RLT Puffer hinzugegeben, mit 250 µl 100% EtOH gemischt und auf die Säule überführt. Nach einminütiger Inkubation wurde für 15s bei 10.000 rpm zentrifugiert, anschließend der Durchfluss erneut auf die Säule geben, noch einmal inkubiert und zentrifugiert. Die gebundene cRNA wurde mit 500 µl RPE Waschpuffer gewaschen. Auf die trockene Säule wurde zur cRNA Elution 2 mal 25 µl DEPC-Wasser gegeben, 1 Min. inkubiert und bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Die eluierte cRNA wurde in der Speed Vac einrotiert und in 11 µl DEPC Wasser resuspendiert, wovon 1µl für die Quantifizierung in der Ribogreen Messung eingesetzt wurde.

### 3.10 Affymetrix Chipexperimente

Für die Hybridisierung von mRNA auf Affymetrix Chips (Santa Clara, USA) musste diese mit Biotin markiert und auf 15 µg amplifiziert werden. Dies wurde für Zelllinien mit einer Poly-A<sup>+</sup>-RNA Menge von mehr als 100 ng durch eine cDNA-Synthese mit anschließender Markierung und linearen Amplifikation in einer *in-vitro* Transkription (IVT) erreicht. Die durch die Mikrodissektion und anschließende RNA-Extraktion isolierte Poly-A<sup>+</sup>-RNA Menge lag zum Teil unter 1 ng, so dass die einmalige Amplifikation nicht ausreichte. Alle untersuchten Prostataprobe wurden zur Vergleichbarkeit untereinander in drei aufeinander folgenden Runden amplifiziert und auf die Chips hybridisiert (s. Abb. 5).

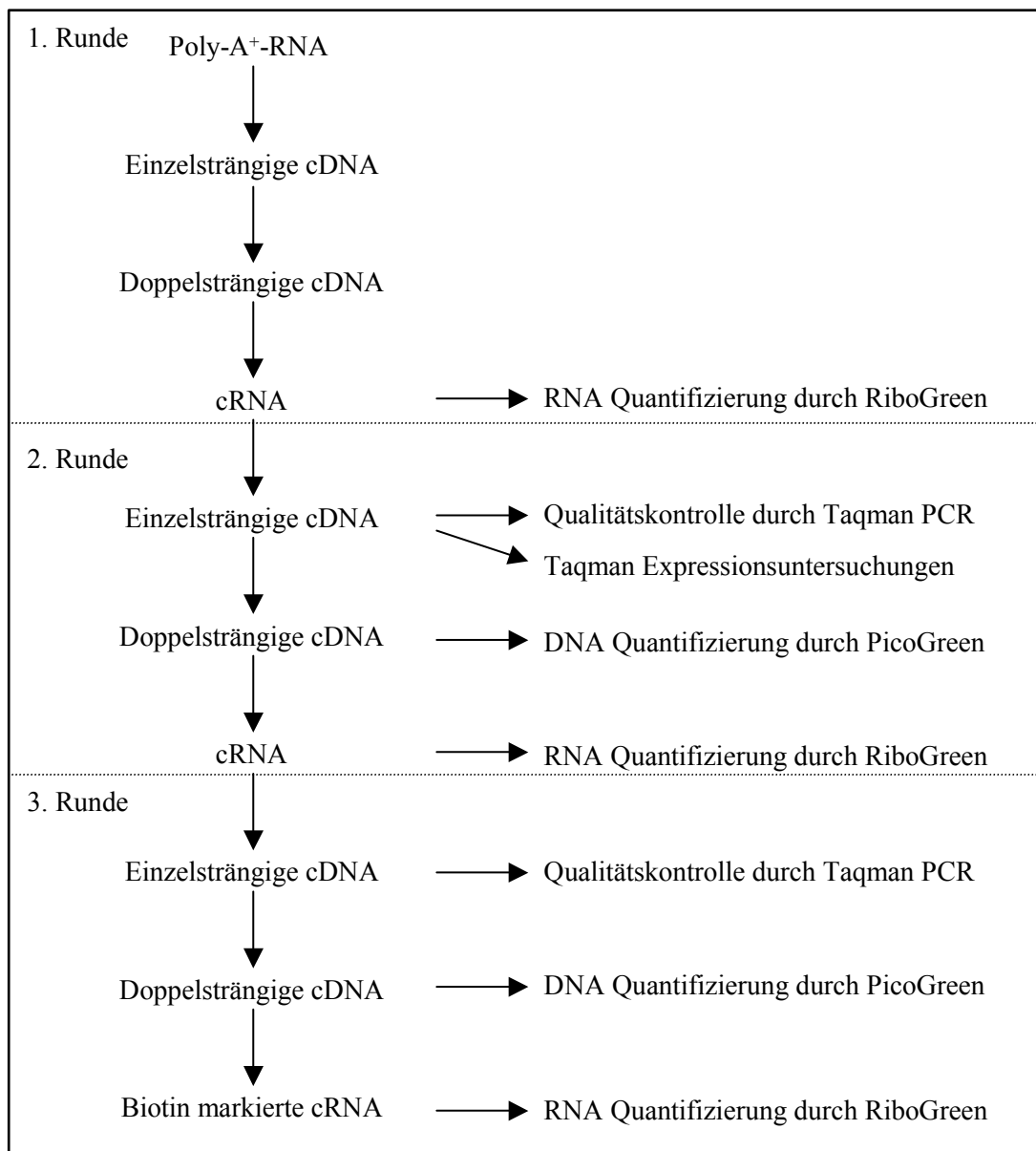


Abb. 5: Flussdiagramm der aufeinander folgenden Runden der RNA-Amplifikation. Die einzelnen Schritte wurden durch Quantifizierungen oder indirekte Qualitätskontrollen durch Amplifikation von GAPDH in der Taqman-PCR kontrolliert.



Die markierte cRNA musste vor Hybridisierung auf den von Affymetrix Inc. einsatzbereit hergestellten Chip noch fragmentiert werden. Zu 15 µg cRNA mit einer Konzentration > 0,6 µg/µl wurde das entsprechende Volumen des 5x Fragmentierungspuffers zugegeben und bei 94°C für 35 Min. inkubiert. Aus der fragmentierten cRNA wurde folgender Hybridisierungscocktail hergestellt:

x µl	fragmentierte cRNA
3 µl	Kontroll-Oligonukleotid B2 (5 nM)
3 µl	Heringsperma DNA (10 mg/ml)
3 µl	100x Kontroll cRNA-Cocktail
3 µl	acetyliertes BSA 50 mg/ml
150 µl	2x MES Hybridisierungspuffer
auf 300 µl	mit DEPC- H <sub>2</sub> O auffüllen

Der Chip wurde vor Hybridisierung mit 1x MES Hybridisierungspuffer für 10 Min. bei 45°C inkubiert. Der Cocktail wurde für 5 Min. auf 99°C erhitzt und anschließend für 5 Min. bei 45°C inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 5 Min. bei 14.000 rpm abgetrennt. Von dem Überstand wurden 200 µl in den Chip pipettiert und über Nacht bei 45°C im Hybridisierungssofen hybridisiert.

Nach Hybridisierung wurde der Hybridisierungscocktail abgenommen, zu dem verbliebenen Rest gegeben und bei -20°C eingefroren. Der Cocktail konnte nun ein wiederholtes Mal auf einen Chip hybridisiert werden. Der Chip wurde dann in die Fluidics-Waschstation gegeben und gewaschen. Nach 10 Waschsritten bei 25°C mit Puffer A und 4 Waschsritten mit Puffer B bei 50°C wurde die SAPE-Färbelösung für 10 Min. bei 25°C auf den Chip gegeben. Im Anschluss wurde mit 10 Waschsritten mit Puffer A bei 25°C gewaschen, sowie für 10 Min. mit der Anti-Streptavidin Antikörper (biotinyliert) Lösung bei 25°C und dann noch einmal mit der SAPE-Färbelösung inkubiert. Zum Abschluss wurde in 15 Waschsritten bei 30°C mit Puffer A gewaschen und der Chip in den Scanner gegeben. Bei einer Anregungswellenlänge von 570 nm wurde die Fluoreszenz des gebundenen Phycoerythrin mit einer Pixelgröße von 3 µm gemessen. Aus drei aufeinander folgenden Scans wurde ein Mittelwert der Pixelintensitäten gebildet, der für die folgenden Auswertungen verwendet wurde.

## 3.10.1 Lösungen für Affymetrix Chipexperimente

5x RNA Fragmentierungspuffer:

200 mM Trisacetat pH 8.1  
 150 mM MgOAc  
 500 mM KOAc  
 ad 20ml DEPC-H<sub>2</sub>O

Der Puffer wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt

2x MES Hybridsations Puffer:

200 mM MES  
 2 M NaCl  
 40 mM EDTA  
 0,02 % Tween 20

12x MES Färbelösung:

0,33 M MES saures Monohydrat  
 0,89 M MES Natriumsalz

mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt

Der pH-Wert sollte zwischen 6,5 und 6,7 liegen. Die Lösung wurde durch einen 0,2 µm Sterilfilter filtriert (nicht autoklaviert!) und bei 2-8°C im Dunkeln gelagert. Wenn sie sich gelb verfärbte, wurde sie verworfen!

Nicht-Stringenter Waschpuffer (Wash A):

6x SSPE  
 0,01% 10% Tween 20  
 0,005% 5% Antifoam

Stringenter Waschpuffer (Wash B):

100 mM MES  
 0,1 M NaCl  
 0,5 ml 10% Tween 20 0,01%

mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt und Lösung bei 2-8°C gelagert

2x Färbepuffer:

100 mM MES  
 1 M NaCl  
 0,05 % Tween 20  
 0,005 % Antifoam

Dehybridisierungslösung:

100 mM MES  
 0,1 M NaCl  
 0,01 % 10% Tween 20  
 2 % SDS

mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt

SAPE Färbelösung:

300 µl 2x Färbepuffer  
 24 µl BSA (50 mg/ml)  
 6 µl Streptavidin, R-phycoerythrin  
 (1 mg/ml, Molecular Probes(Leiden, Niederlande))

Antikörper Lösung:

300 µl 2x Färbepuffer  
 24 µl BSA (50 mg/ml)  
 6 µl Ziege IgG (10 mg/ml)  
 3,6 µl bioAnti (0,5 mg/ml)

mit DEPC Wasser auf 600 µl auffüllen

### 3.11 Quantitative „TaqMan<sup>TM</sup>“ PCR

Für den TaqMan PCR Ansatz wurden der vorgefertigte "2x TaqMan Universal PCR-Mastermix" von Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet, zu dem nur noch die cDNA, Primer und Sonden hinzugegeben wurden und mit DEPC-Wasser auf 25 µl aufgefüllt wurde. Der Mastermix beinhaltet die AmpliTaq Gold DNA Polymerase, AmpErase UNG, dNTPs mit dUTP, eine passive Referenz und einen angepassten Puffer mit MgCl<sub>2</sub>. Die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase ist eine modifizierte Form der rekombinanten AmpliTaq DNA-Polymerase, die bei Raumtemperatur keine Aktivität zeigt und zu ihrer Aktivierung anfänglich für 10 Min. auf 95°C erhitzt werden muss und so die Bildung von Primer-Dimer verhindert. Zum Schutz vor Carryover-Kontamination bei der Pipettierung der Ansätze ist dem Mastermix AmpErase UNG (Uracil N-Glykosylase) hinzugefügt worden. Bei Verwendung von dUTPs in den PCR-Reaktionen wird durch die Glykosylase eingebautes UTP von Carryover-Kontaminationen in einem anfänglichen 50°C Schritt gespalten. Die anschließenden 10 Min. bei 95°C inaktivieren das Enzym, um in der folgenden PCR-Amplifikation nicht zu stören. Als passive Referenz wurde der Farbstoff Rox hinzugegeben, der keinen Einfluß auf die PCR hat und Fluoreszenzfluktuationen in der Normalisierung der Fluoreszenzsignale ausgleicht.

Die Auswahl der Primer und der Sonde erfordert einige grundlegende Voraussetzungen. Um eine möglichst hohe Effizienz der PCR-Reaktion zu ermöglichen, sollte das Amplikon eine Länge von ungefähr 100 bp haben. Bei der Auswahl der Primer sind die üblichen Kriterien mit einem G/C-Gehalt von etwa 20-80% und einem T<sub>m</sub> von 58-60°C zu beachten. Bei der Sonde ist vor allem zu beachten, dass sie eine um ungefähr 10°C höhere Schmelztemperatur als die Primer besitzt, da sie in der Hybridisierung an die Template-DNA nicht durch die DNA-Polymerase stabilisiert wird. Die Länge sollte etwa 24-30 Nukleotide betragen und der G/C-Gehalt sollte zwischen 40-60 % liegen. Das 5'-Ende der Sonde darf kein G tragen, da es sonst zu einem Quenchen des gebundenen Reporterfarbstoffs kommt. Die Sonde sollte relativ nahe am 3'-Ende des PCR-Primers liegen. Die Kombinationen der Konzentrationen der Primer und Sonden wurden zuvor in separaten Primer- und Sondenmatrices ausgetestet.

Die Primer wurden in Konzentrationen von 100 bis 900 nM und die Sonden von 50 bis 200 nM getestet. Es wurde die Primer-/ Sondenkombination gewählt, die einen möglichst frühen Fluoreszenzanstieg, ein hohes Endniveau und einen möglichst geringen Sondenverbrauch ermöglicht (s. Tab. 4).

	vorwärts Primer / Sonde	rückwärts Primer / Produktgröße in bp
sFRP 3500	5'-AGGTCCTTGGCAGAAGCTCAGTT-3'	5'-AGCCAAGTGTTACACAGGATATTTAAA-3'
300/300/100 nM	5'-FAM-TTAGAAGATAGCATGGGAGGTGAGGATCCAAAA-Tamra-3'	121
sfrp 890	5'-GACGTCTGCATCGCCATG-3'	5'-ATGGCCTCAGATTTCAACTCGT-3'
300/300/200 nM	5'-FAM-CAAGCCCAAGGCCACAACGGTG-Tamra-3'	103
Ponsin	5'-CTCCTCCCAAGTCGCAGT-3'	5'-CCATGACATCAACGATATCTCCA-3'
300/300/200 nM	5'-FAM-AGCGAAGAGTCACCCCGACAGGA-Tamra-3'	181
Wif-1	5'-TAAAAGGTACGAAGCCAGCCTC-3'	5'-GCGTGTGCTGCCTGAGC-3'
300/300/50 nM	5'-FAM-CCTGAGGCCAGCAGGCGCC-Tamra-3'	67
Chimerin-1	5'-CCGGTACCTCATGGCACATC-3'	5'-TCCAAGTTCTCTGCATTCATAAG-3'
300/300/100 nM	5'-FAM-AGAGAGTGACCCTCCACGAAAAGGAGAA-Tamra-3'	75
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTGGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
300/300/100 nM	5'-FAM-CAAGCTTCCCCTTCTCAGCC-Tamra-3'	206
beta-Aktin	5'-TGCATTGTTACAGGAAGTCCCTT-3'	5'-GGGAGAGGACTGGGCCAT-3'
300/300/100 nM	5'-FAM-CCATCCTAAAAGCCACCCACTTCTCTCTA-Tamra-3'	79
Suc	5'-TGTCATCGCACTGTGCATAGAG-3'	5'-CCGTAGCCTCCTGTGGCA-3'
300/900/100 nM	5'-FAM-CCATCCATCGCATAAGAGCAAAGAAGACTG-Tamra-3'	80

Tab. 4: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden sowie ihre jeweiligen Endkonzentrationen und Produktgrößen. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) und die Sonden von der Firma metabion (Planegg-Martinsried) bestellt.

Die PCR-Reaktion und die parallel verlaufende Detektion wurden mit dem „GeneAmp 5700 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die speziellen „ABI PRISM Optical Tubes and Caps“ ermöglichen einer im Deckel des PCR-Blocks installierten Optik, während der PCR-Zyklen die Sonden anzuregen und die resultierende Fluoreszenz zu messen.

Das PCR Programm bestand aus folgendem Zweischnitt-PCR Mechanismus:

2 Min.	50°C	
10 Min.	95°C	
15 s	95°C	⌋
1 Min.	60°C	⌋ 40 Zyklen

### 3.11.1 Vergleichende C<sub>T</sub>-Methode

Gemessen wurde der Zyklus der Reaktion, in dem die Amplifikation des PCR-Produkts zuerst detektiert wurde. Der Parameter C<sub>T</sub> (Threshold Cycle) ist definiert als die Zyklusnummer, ab der die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellwert oberhalb der Basislinie überschreitet. Wird ein Gen in einem Gewebe stark exprimiert, liegen zu Beginn der PCR-Reaktion schon eine große Anzahl von cDNA-Kopien vor und der festgelegte Schwellwert wird nach weniger Zyklen erreicht als in einem Gewebe mit niedrigerer Expression. Durch Vergleich der C<sub>T</sub>-Werte ist eine relative Quantifizierung zwischen verschiedenen Geweben oder zwischen Normal- und Tumorgewebe möglich. Nach der vergleichenden C<sub>T</sub>-Methode wurden die C<sub>T</sub>-

Werte für das Haushaltsgen GAPDH und das zu untersuchende Gen bestimmt (Fink et al., 1998). Zur Normalisierung wurde der  $C_t$ -Wert des GAPDH vom  $C_t$ -Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen. Dieser  $\Delta C_t$ -Wert bildete den normalisierten Expressionswert des Gens in dem untersuchten Gewebe.

Zum Vergleich der Expressionshöhen des Gens in verschiedenen Geweben wurde die Expression des Gens im Prostata Normalgewebe als 1 definiert. Die relative Expression des Gens in anderen Geweben in Bezug auf das Prostata Normalgewebe wurde durch Subtraktion des  $\Delta C_t$ -Expressionswertes des Gewebes vom  $\Delta C_t$ -Expressionswert der Prostata bestimmt.

### 3.12 LOH-Untersuchung

Zur Untersuchung der Patientenproben auf den Verlust eines Allels in der Tumorprobe wurden Mikrosatelliten, repetitive DNA Sequenzen mit hoher Heterozygotität, amplifiziert. Die genomische Variation in der Tumorprobe kann auf verschiedene Weisen detektiert werden, wobei sich die Verwendung von Fluoreszenz markierten Produkten sensitiver als die Detektion durch Autoradiographie oder silbergefärbte Gele zeigte (Christensen et al., 1999). Vor Einsatz eines aus der „Genome Database“ ([www.gdb.org](http://www.gdb.org)) ausgewählten Markers an den Patientenproben wurde die Qualität und Aussagekraft des Markers an der genomischen DNA von 10 Probanden getestet.

#### 3.12.1 Extraktion genomischer DNA aus den Überständen der RNA-Extraktion

Für die LOH-Untersuchung wurde die DNA jeweils aus den korrespondierenden Normal- und Tumorproben eines Patienten extrahiert. Bei der vorangegangenen Extraktion von Poly-A<sup>+</sup>-RNA aus Gewebe oder Zellkultur wurde die Poly-A<sup>+</sup>-RNA als Hybrid mit Oligo-dT an die SA-PMPs gebunden, so dass die genomische DNA in der abgenommenen Lösung enthalten ist. Zu der DNA-Lösung (ca. 525  $\mu$ l) wurde folgendes hinzugegeben:

385 $\mu$ l	30x SSC
115,5 $\mu$ l	6 M GTC
24,5 $\mu$ l	DEPC- H <sub>2</sub> O
400 $\mu$ l	Ethanol 95%

Der gesamte Ansatz wurde in 2 Portionen auf die Säule des "SVTotalRNA Isolations Systems" gegeben und für 1 Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 600 µl SV RNA Waschlösung und anschließender Zentrifugation für 1 Min. bei 14.000 rpm wurde die genomische DNA mit zweimal 25 µl Wasser von der Säule eluiert und die Konzentration mit einer Picogreen Messung bestimmt.

### 3.12.2 LOH-PCR

Für die LOH-PCR wurden Primerpaare bekannter Marker sowie eines von der Sequenz des BAC AL158165 abgeleiteten Markers ausgewählt (s. Tab. 5) und auf genomischer Placenta DNA von Sigma (München) getestet. Bevor die Patienten-DNAs verwendet wurden, wurde die genomische DNA von 10 anonymisierten metaGen Probanden mit den Markern amplifiziert, markiert und auf dem Gel aufgetrennt. Nur Marker mit einer Heterogenizität > 60 % und mit deutlich voneinander zu unterscheidenden Allelen wurden für weitere Untersuchungen genutzt.

Ansatz:	PCR-Programm:
5 µl genomische DNA ( 2 ng/µl)	4 Min. 95°C
2 µl vorwärts Primer (10 pmol/µl)	1 Min. 95°C
2 µl rückwärts Primer (10 pmol/µl)	1 Min. ca. 55- 64°C } ca. 35 Zyklen
2,5 µl 10xPCR-Puffer (MgCl <sub>2</sub> 15mM)	1 Min. 72°C } ↓
0,5 µl dNTP-Mix (je 2.5 mM)	8 Min. 72°C
0,125 µl Ampli Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	
2,875 µl DEPC- H <sub>2</sub> O	

Marker Name	ca. bp	Variations Typ	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer
D10S609	340	Tetranukleotid	CGTGTGCATGTGTGTATG	GCACCAATGGTAACCACTTC
D10S1432	175	Tetranukleotid	CAGTGGACACTAAACACAATCC	TAGATTATCTAAATGGTGGATTCC
D10S583	210	Dinukleotid	TCTGACCAAATACCAAAGAAC	AGAGACTCCAGATGTTTGATGA
D10S2491	155	keine Angaben	GTTAGATAGAGTACCTGCACTC	TTATAAGGACTGAGTGAGGGA
D10S200	300	Dinukleotid	TCTGGTTATTTGTCTGGGGA	GCATGGTGTCTGTGCTGTAG
D10677	206	Tetranukleotid	AAGATACACAGGAAGAAAGAAAGG	AGGGTCAAAGGAGATTGCT
AL158165	190	Tetranukleotid	ATCTGCTGCACAGAAGAGCA	GGCTGAGACAGGAGAATTGC
D10S1758	190	Dinukleotid	ATAATGCACACGCTGCC	AATCCCGTGGAGGTTTT
D10S587	180	Dinukleotid	CCCAGATTCATGGCTTTC	TTCTGCTGACACGGGC
D10S1723	170	Dinukleotid	GCCTTCATTTGCATAGGG	CATGCTGAGACCCAGTG
D10S1223	280	Trinukleotid	CCTGGCCAGCTACTTTGTTA	GCAGCACACCATTTCATGG
D10S212	195	Dinukleotid	GAAGTAAAGCAAGTTCTATCCACG	TCTGTGTACGTTGAAAATCCC

Tab. 5: Verwendete LOH Marker. Die Angaben sind der „Genome Database“ entnommen worden. Die Größenangaben (bp) entsprechen den mittleren beobachteten Werten.

### 3.12.3 Post-PCR-Markierung und Produktaufreinigung

Zur Kostenersparnis wurden die PCR-Produkte im Anschluss an ihre Amplifikation endständig markiert. Nur im Fall einer wiederholt misslungenen Markierung wurden FAM-markierte Primer bei der Firma metabion (Planegg-Martinsried) bestellt.

Zur Fluoreszenzmarkierung von PCR-Produkten wurden diese durch endständiges Anhängen von Farbstoff-tragenden Nukleotiden markiert. In einer Austauschreaktion wurden die 3'-Enden des PCR-Produkts durch die 3'-5'- Exonukleaseaktivität des Klenow-Fragments entfernt und durch Nutzung der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität durch Fluoreszenz-markierte Nukleotide ersetzt (Klenow and Henningsen, 1970). Zur Erleichterung der Austauschreaktion wurden vor die komplementäre Sequenz des auszutauschenden Nukleotids zwei Thyminе als Abstandhalter in die Primersequenz eingebaut.

Hierzu wurde folgender Ansatz verwendet:

5 µl	PCR-Fragment
1,0 µl	50 mM Tris/HCl pH 8,7
1,0 µl	100 mM MgCl <sub>2</sub>
0,04 µl	100µM R6G-dUTP
2,76 µl	DEPC- H <sub>2</sub> O
0,2 µl	Klenow DNA Polymerase (5U/µl)

Inkubiert wurde bei 37°C für 1 Stunde, abgestoppt wurde die Reaktion mit 1 µl 0,2 M EDTA. Die Auftrennung der PCR-Produkte mit einer möglichst großen Auflösung und einer anschließenden Fluoreszenzdetektion wurde in ABI 377A Sequenzern vorgenommen. Verwendet wurde ein denaturierendes 5,25 %iges Polyacrylamid Gel mit 6 M Harnstoff von 48 cm Länge und einer Gellaufzeit von 12 Stunden. Nach Markierung der PCR-Produkte wurden sie mit 30 µl deionisiertem Formamid versetzt, 1 µl wurde mit 0,4 µl GS500 (Applied Biosystems, Weiterstadt) und 0,6 µl Dextran Blau gemischt. Der Ansatz wurde für 2 Min. bei 90°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Zum besseren Vergleich der PCR-Produkte der Tumor- und Normalgewebe eines Patienten und auch zum Vergleich unter verschiedenen Patienten wurde zu jeder Probe der Größenstandard GS500 hinzugegeben. Um ihn besser von den PCR-Produkten unterscheiden zu können, war der Größenstandard mit gelb fluoreszierendem Tamra markiert, im Gegensatz zur grünen oder blauen Fluoreszenz der PCR-Produkte. Um die Anzahl der nötigen Gelläufe zu reduzieren wurden immer drei verschiedene PCR Produkte mit deutlichen Fragmentgrößenunterschieden eines Patienten vermischt und in eine Gelbahn aufgetragen.

### 3.12.4 LOH Auswertung

Eine Analyse der genomischen DNA auf Verlust eines der beiden vorhandenen Allele im Tumor ist durch Untersuchung hoch polymorpher Elemente möglich. Hierfür wurden Mikrosatellitenmarker, repetitive DNA Sequenzen, die mit großer Häufigkeit über das gesamte Genom verteilt sind, amplifiziert und bei Heterogenität auf Grund ihrer unterschiedlichen Amplikongrößen unterschieden.

Zur Auswertung des PCR Produktes eines bestimmten Markers in einem Patienten war es wichtig, das der Patient für den entsprechenden Marker heterozygot ist, um über einen möglichen Verlust eines der beiden Allele in der Tumorprobe urteilen zu können.

Die in dem Sequenzer bestimmten Fluoreszenzsignale der einzelnen PCR Produkte wurden graphisch gegen die Produktlänge aufgetragen und mit der Software GeneScan (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert. Für die beiden identifizierten Allele eines Markers wurde durch die Software die Fluoreszenz sowie ein Quotient aus der Fluoreszenz des längeren durch das kürzere Allel berechnet. Dieser Quotient wurde für die Tumor- wie auch für die korrespondierende Normalprobe gebildet und anschließend dividiert (Niederacher et al., 1997).

$$Q(T / N) = \frac{\frac{\text{langesAllel}_{Tumor}}{\text{kurzesAllel}_{Tumor}}}{\frac{\text{langesAllel}_{Normal}}{\text{kurzesAllel}_{Normal}}}$$

Wenn kein Verlust eines Allels vorliegt, sollte der resultierende Quotient der Fluoreszenzen einen Wert von ungefähr 1 haben. Der theoretische Wert des Quotienten sollte bei kompletten Verlust eines Allels bei 0 bzw. im Unendlichen liegen. Da aber trotz der Mikrodissektion nicht davon auszugehen ist, dass wirklich 100% Tumormaterial in der Tumorprobe enthalten ist, wurde als Schwellwert für die Identifikation eines Verlustes eines Allels im Tumor ein Quotient von  $< 0,5$  oder  $> 2$  gewählt.



### 3.13 *In silico* Analysen

#### 3.13.1 BLAST Programme

Das BLAST Programm (Basic Local Alignment Search Tool), zurückgehend auf Altschul et al. (1990), ist ein Ähnlichkeits-Suchprogramm, das mit einer spezifischen Suchsequenz die zur Verfügung stehenden Nukleotid- oder auch Proteinsequenz-Datenbanken nach Sequenzähnlichkeiten durchsucht. Das BLAST Programm wurde für eine schnellere Suche in großen Datenmengen erstellt, hat dadurch jedoch einen geringen Verlust der Sensitivität bezüglich entfernter Sequenzbeziehungen. Die vergebenen Punkte und e-Werte haben eine wohl definierte statistische Interpretation und ermöglichen eine leichtere Unterscheidung wirklicher Ähnlichkeiten von zufälligen Ähnlichkeiten. BLAST benutzt einen heuristischen Algorithmus, der lokale im Gegensatz zu globalen Ähnlichkeiten bewertet und dadurch Beziehungen zwischen Sequenzen aufzeigt, die nur Ähnlichkeiten in isolierten Regionen besitzen. So können einzelne Bereiche der Suchsequenz zu unterschiedlichen Datenbank-Sequenzen verglichen werden.

#### 3.13.2 Automatische Verlängerung von Sequenzen (Autex)

Für die Untersuchung der differentiellen Expression von Genen, die in der Krebsentstehung, -wachstum und -differenzierung eine Rolle spielen, wurde durch bioinformatische Analysen aus der Gesamtheit der bekannten und der bis dahin noch nicht identifizierten Gene eine Untergruppe ausgewählt.

Grundlage für den Auswahl-Prozess waren öffentliche und kommerzielle (Incyte Genomics, Palo Alto, USA) EST-Datenbanken (Expressed Sequence Tag), die durch die zufällige Sequenzierung von Tausenden cDNA-Sequenzen einen Eindruck von der Genexpression im jeweiligen Gewebe geben.

Diese Datenbanken verschiedener ESTs wurden in einem ersten Schritt zur Identifikation von Genen auf Grund ihrer bekannten Transkripte genutzt. Ein Satz nicht redundanter Start-EST Sequenzen wurde in einem iterativen Prozess mit Hilfe des Programms BLAST gegen die Gesamtheit aller zur Verfügung stehenden ESTs verglichen (Altschul et al., 1990), Sequenzen mit einer Sequenzhomologie größer 95% wurden durch das Programm GAP mit der Startsequenz zusammengelagert. Die daraus resultierende Verlängerung der

Konsensussequenz wurde, wie in Abb. 6 zu sehen, in einer nächsten Runde benutzt, erneut mit der Datenbank verglichen und führte auf diese Weise zu einer automatischen Verlängerung der Startsequenz (AUTEX, automatic extension) (Schmitt et al., 1999).

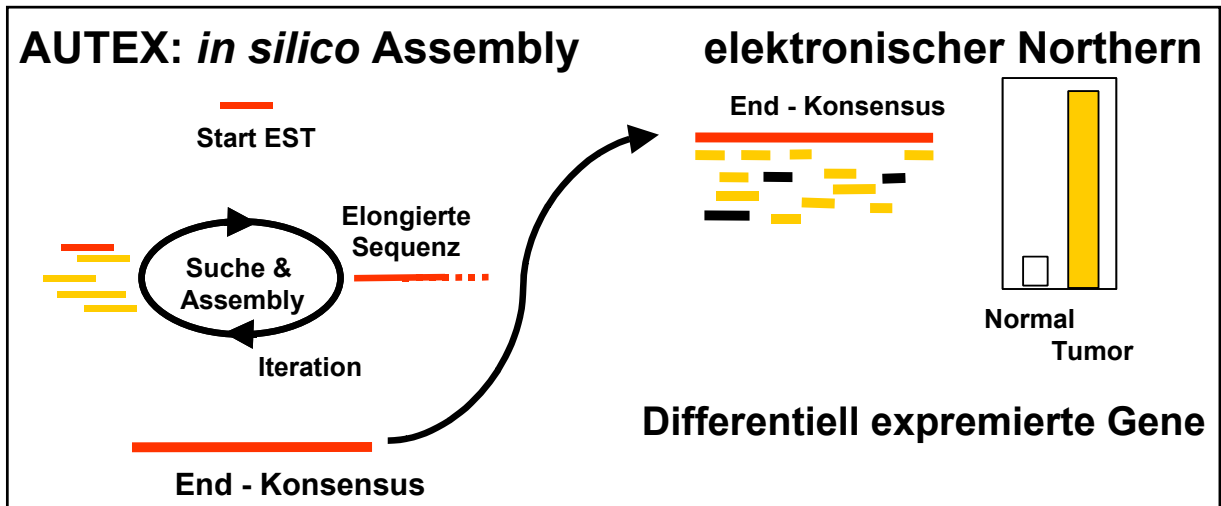


Abb. 6: Identifizierung von Genen aus EST-Datenbanken und Bestimmung des *in silico* Expressionsprofils.

Die Sequenzen wurden zur Identifikation durch das Programm BLAST (s. Kap. 3.13.1) mit Nukleotid- und Proteindatenbanken verglichen. Bei fehlender Homologie zu bekannten Genen wurde in der Sequenz nach Proteinmotiven für eine mögliche Funktionszuweisung durch Abgleich mit der Protein-Motivdatenbank Pfam gesucht. Pfam ist eine Sammlung von multiplen Sequenz Alignment und „Hidden Markov Modellen“ (HMM) und beinhaltet in der Version 6.6 vom August 2001 3071 verschiedene Domänen-Familien, die in der überwiegenden Anzahl bekannter Proteine wiederzufinden sind (Bateman et al., 1999).

### 3.13.3 e-Northern

Die Stärke der Expression einzelner Gene in unterschiedlichen Geweben und die Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe wurden *in silico* durch die Verteilung homologer EST-Sequenzen auf verschiedene EST-Bibliotheken bewertet. In einem ersten Schritt wurden durch Homologievergleiche mit dem Programm BLAST die EST-Datenbanken mit den verlängerten Sequenzen verglichen. Den Angaben ihrer Herkunftsbibliothek entsprechend wurden die verschiedenen EST-Sequenzen nach ihrem Gewebersprung und noch zusätzlich in Normal- oder Tumorbibliotheken unterteilt. Die daraus resultierende Verteilung der EST-Sequenzen auf die Normal- oder Tumorbibliotheken gab unter Berücksichtigung der jeweils unterschiedlichen Datenbankgrößen einen Hinweis auf eine mögliche differentielle Expression des betrachteten Gens (s. Abb. 6).

### 3.14 Proteinchemische Methoden

#### 3.14.1 Expression der klonierten Ponsinfragmente

Von dem Gen Ponsin wurden zwei Fragmente kloniert. Die beiden Fragmente wurden durch PCR von cDNA Klonen amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen NcoI/XhoI geschnitten und in den Expressionvektor pET-30a von Novagen (Madison, USA) einkloniert. Die beiden Fragmente enthielten die beiden verschiedenen Peptide, die dem Kaninchen injiziert wurden. Nach Bestätigung einer erfolgreichen Klonierung durch Sequenzierung der resultierenden Klone wurden die Vektoren in die Zellen BL21(DE3) transformiert. Eine mit den Klonen angeimpfte Kultur von 50 ml 2x LB + Kanamycin wurde auf eine optische Dichte von  $OD_{600} = 0,9$  herangezogen, anschließend die Proteinexpression durch Zugabe von 500  $\mu$ l 0,1 M IPTG induziert. Aufgereinigt wurde das Protein durch Bindung des fusionierten His-Anhangs an eine Talonmatrix. Nach Waschen der Talonpartikel und Abspülen nicht gebundener Proteine wurde das gebundene Fusionsprotein durch Zugabe von 100 mM Imidazol von der Matrix gelöst. Quantifiziert wurde das Protein mit dem „BCA-200 Protein Assay Kit“ (Pierce, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers. Bei dieser konzentrationsabhängigen Farbreaktion wird die Proteinkonzentration anhand einer BSA-Eichgeraden ermittelt.  $Cu^{2+}$  Ionen werden in alkalischer Proteinlösung reduziert und bildet als  $Cu^{1+}$  mit 2 Molekülen BCA einen violetten wasserlöslichen Komplex, der bei 562 nm stark absorbiert.

#### 3.14.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid durch den Radikalbildner Ammonium-Persulfat (APS) und den Radikalstabilisator N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) entsteht in Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten Acrylamid ein Gel mit unterschiedlichen Porengrößen. Auf das eigentliche Trenngel wird ein schmales Sammelgel gegossen, das die Taschen für die Probenauftragung beinhaltet. Der in diesem Gel verwendete Puffer ist leicht sauer (pH 6,8), während der pH-Wert des Trenngels und Laufpuffers leicht basisch ist (pH 8,8). Bei Anlegen eines Stroms an das Gelsystem laufen die Pufferionen des Sammelgels in Richtung Anode. Bei Eintritt des im Laufpuffer enthaltenen Glycins in das Sammelgel wird die Aminogruppe zur Ammoniumgruppe protoniert, während die Carboxylgruppe deprotoniert bleibt. Die ausgeglichene Ladung des Glycins bewirkt einen elektrophoretischen Stillstand im

Sammelgel. Die vorauslaufenden Ionen des Sammelgels bewirken so einen lokalen Ladungsträgermangel und dadurch einen hohen Widerstand. Bei konstantem Strom führt die erhöhte Feldstärke zu einem schnelleren Lauf der anionischen Proteine, bis diese die vorauslaufende Ionenfront erreichen. Durch diese Aufkonzentration der Proteine im Sammelgel ergeben sie bei ihrer Auftrennung im daran anschließenden Trenngel diskrete scharfe Banden. Durch Zugabe des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und bekommen durch Anlagerung von SDS-Ionen ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis, so dass sie in dem Gel entsprechend ihrer Größe getrennt werden können.

4x Sammelgelpuffer: 0,4% SDS; 0,5 M Tris/HCL pH 6,8  
 4x Trenngelpuffer: 0,4% SDS; 1,5 M Tris/HCl pH 8,8  
 Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung: 30%/0,8%  
 Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 3,5 mM SDS

Gelzusammensetzung:	Trenngel 8% (8ml)	Sammelgel 4,5% (3,5ml)
4x Trenngelpuffer	2ml	-
4x Sammelgelpuffer	-	0,83 ml
H <sub>2</sub> O	3,84 ml	2,07 ml
Acrylamid/Bisacrylamidstammlösung	2,13 ml	0,43 ml
APS	54 µl	40 µl
TEMED	2,7 µl	3 µl

### 3.14.3 Peptidantikörper

Für die Auswahl geeigneter Bereiche zur Herstellung von synthetischen Peptiden zur Kaninchen-Immunisierung wurden in der Proteinsequenz des Antigens Bereiche ausgewählt, die keine hoch homologen Domänenmotive enthielten und auf Grund ihrer Hydrophobizität vermutlich exponiert vorlagen. Die Peptidherstellung, Kaninchen-Immunisierung und Antikörperaufreinigung wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt.

Peptid	Position	Sequenz (NH <sub>2</sub> - COOH)	Gen	Exon
Ponsin-AKa	175-189	QDSAPTQEKTSPGKC	Ponsin	10
Ponsin-AKb	610-624	QRRVTPDRSQTSQDL	Ponsin	20
sFRP-AKa	171-186	PPNATEASKPQGTTVC	sFRP	1
sFRP-AKb	285-299	HKWDKKNKEFKNFM	sFRP	3

Tabelle 1: Peptide für die Kaninchen-Immunisierung.

#### 3.14.4 Beladung von Membranen mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen

Als erster Spezifitätsnachweis der angefertigten polyklonalen Kaninchen-Antikörper wurden diese auf ihre Bindung an verschiedene Mengen des bakteriell hergestellten Proteins getestet (s. Kap. 3.14.1).

In einer Konzentrationsreihe von 10 bis 160 ng wurden die beiden Proteinefragmente auf die zuvor in Methanol aktivierten und im Transferpuffer äquilibrierten PVDF-Membranen aufgetragen. Nach Trocknen der Membran wurde sie für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in TBS/Tween20 mit 0,36% Gelatine geblockt. Anschließend wurde die Membran einmal ca. 1 Min. und zweimal für 20 Min. mit PBS/Tween20 gewaschen. Der primäre Antikörper wurde in verschiedenen Konzentrationen in 5 ml PBS, das 2 µl 10% Tween80 und 50 mg BSA enthielt, für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für 20 Min. wurde der sekundäre Antikörper in 5 ml TBST zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach weiterem dreimaligen Waschen wurden die Antikörperbindungen mit dem ECL+ System von Amersham Biosciences (Freiburg) detektiert.

#### 3.14.5 Western-Hybridisierung

Zum Transfer von Proteinen mit einem relativ hohen Molekulargewicht wurde die Nassblot-Methode verwendet. Eine PVDF Membran wurde kurz in Methanol aktiviert, in Wasser abgespült und für 5 Min. mit dem Gel in Nassblotpuffer äquilibriert. Die Membran wurde blasenfrei auf das Gel aufgelegt und zwischen zwei getränkten Filterpapieren zur Katodenseite in die Transferkammer eingespannt. In die Pufferkammer wurde ein Kühlakku eingehängt und bei 4°C und 100 V wurden die Proteine in 100 Min. transferiert.

Nach dem Transfer wurde die Membran getrocknet und im Kühlschrank verwahrt oder direkt in 20 ml 5% Trockenmilch/TBST für 60 Min. bei RT blockiert. Nach einmaligem Waschen für 10 Min. in PBST wurde der primäre Antikörper in der zuvor ausgewählten Verdünnung in 10 ml TBST für 90 Min. zugegeben. Gewaschen wurden die Membranen dreimal für 10 Min. in PBST. Der sekundäre Anti-Kaninchen-Antikörper wurde für 90 Min. in einer Verdünnung von 1:100.000 in 1% Trockenmilch/TBST bei RT auf der Membran inkubiert. Nach wiederholtem dreimaligem Waschen mit PBST für jeweils 10 Min. waren die Membranen für die Signal-Detektion bereit. Zur Detektion wurde das ECL+ System von Amersham Biosciences (Freiburg) nach Angaben des Herstellers benutzt.

### 3.14.6 Immunzytochemie

Für die Immunzytochemie wurden die Zellen in speziellen „Lab-Tek Chamber Slides“ (Nunc GmbH, Wiesbaden) ausgesät und bis zu einer mittleren Dichte wachsen gelassen. Nach dreimaligem Waschen mit 10 mM Tris/HCl + 0,05% Tween20 (pH 7-8) wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd für 5 bis 10 Min. bei RT fixiert. Nach Entfernung des Fixierungsmittels wurden die Zellen für 20 Min. mit 10 mM Tris/HCl + 0,05% Tween20 (pH 7-8) inkubiert.

Anschließend wurde die endogene Peroxidase der Zellen in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Isopropanol für 10 Min. inhibiert, die Zellen wurden in einer absteigenden Reihe von 80% Isopropanol, 70% Isopropanol und H<sub>2</sub>O rehydriert und in PBS Puffer überführt. Zur Absättigung unspezifischer Wechselwirkungen wurde für 5 Min. mit einer Protein Blockierungslösung von DAKO Diagnostika GmbH (Hamburg) inkubiert.

Nach Abgießen der Blockierungslösung wurden die Zellen mit 100 µl der Verdünnung des primären Antikörpers für 60 Min. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS + 0,05% Tween20 und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einem Tropfen des sekundären Antikörpers aus dem „4plus<sup>TM</sup> Universal Immunoperoxidase Detections System“ (Biocarta, Hamburg) für 10 Min. inkubiert und mit PBS + 0,05% Tween20 gewaschen. Zu den Zellen wurde ein Tropfen des Tertiärreagenzes (Streptavidin HRP) hinzugegeben, für 10 Min. inkubiert und anschließend wie zuvor gewaschen. In jede Kammer des Objektträgers wurde ein Tropfen des Färbereagenz Romulin AECChromogen (Biocarta, Hamburg) gegeben, die Färbung unter dem Mikroskop verfolgt und mit H<sub>2</sub>O abgestoppt. Als Negativ-Kontrolle wurde jeweils eine Kammer genau wie die übrigen behandelt, jedoch lediglich mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Antikörper mit bekanntem Färbeprodukt wie z. B. das basalzellspezifische Zytokeratine (34βE12) oder PSA für die Prostata benutzt. Für Konkurrenzexperimente wurde der primäre Antikörper für 30 Min in der gebrauchsfertigen Verdünnung mit der entsprechenden Konzentration des Peptids bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Färbelösung des alkohollöslichen AEC wurde mit Wasser abgespült und mit Hämatoxylin nach Mayer gegengefärbt. Je nach Schichtdicke und Färbeintensität wurde für 30 sec. bis 2 Min. gefärbt und anschließend mit Wasser gebläut.

Mit einem wässrigen Eindeckmittel wurden die Schnitte luftblasenfrei mit einem Deckgläschen abgedeckt. Das Färbeergebnis mit AEC zeigte ein orangerotes Färbeprodukt mit blauvioletten Zellkernen.

### 3.14.7 Immunhistochemie

Die Lokalisation der Proteinexpression im Gewebeverband wurde durch immunhistologische Untersuchungen an Schnitten von Patientengeweben vorgenommen. Dazu werden spezifische Antikörper auf die Schnitte hybridisiert und durch einen sekundären Antikörper mit einer enzymatischen Farbreaktion sichtbar gemacht.

Für die Immunhistologie auf Gefrierschnitten wurden die Gewebeschnitte 2-5 Min. in 4% Formalin fixiert und anschließend 5 Min. mit Wasser gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität, bei Verwendung eines Peroxidase Detektionssystems, wurden die Schnitte in 70% und 80% Ethanol dehydriert, für 10 Min. mit 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in absolutem Ethanol inkubiert und anschließend wieder über 80% und 70% Ethanol rehydriert. Die Antigendemaskierung bei formalinfixierten Schnitten vor der Hybridisierung erfolgte durch 10 Min. kochen in 10 mM Zitronensäurepuffer pH6 in der Mikrowelle. Hierbei war darauf zu achten, dass die Schnitte nicht austrocknen. Nach Abkühlen der Schnitte wurden sie in TBS-Puffer überführt.

Blockiert wurden die Schnitte für 3-6 Min. mit etwa 2 Tropfen Protein-Block-Serum (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg), das im Anschluß abdekantiert wurde.

Die Schnitte wurden für 40 Min. bei Raumtemperatur mit 100 µl des mit TBS-Puffer verdünnten primären Antikörpers inkubiert. Nach Spülen mit Tris-Puffer + 0,25% Tween und wiederholtem Spülen mit einfachem TBS-Puffer, wurde der sekundäre Antikörper (Labeld Polymer AP/ anti-mouse and anti-rabbit, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg) hinzugegeben und für 10 Min. inkubiert. Die Antikörperlösung wurde wiederholt zuerst mit TBS-Puffer + 0,25% Tween gewaschen, anschließend zweimal nur mit TBS-Puffer abgespült.

An den biotinierten Antikörper wurde durch 10 minütige Inkubation bei RT ein Avidin-Enzym-Komplex gebunden. Nicht gebundene Komplexmoleküle wurden durch Waschen mit TBS-Puffer + 0,25% Tween und anschließendem wiederholten Waschen mit TBS-Puffer abgespült. Die Detektion erfolgte mit der Chromogen Lösung 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC) von der Firma Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, USA), von der je ein Tropfen der Lösungen A, B und C mit 1 ml Wasser aufgefüllt wurden. Etwa 200 µl der Lösung wurden für 3-12 Min. unter mikroskopischer Kontrolle auf den Schnitten inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Schnitt ohne Primärantikörper bei gleicher übriger Behandlung verwendet.