

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

5-Aza-2'-Deoxycytidine	Sigma
Acrylamid	Merck
(Bacto)Agar	BD
Agarose	Cambrex
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ammoniumacetat	Merck
Amphotericin	Gibco
Ampicillin	Sigma
Amylose Resin	NEB
Bactopepton	BD
Bactotrypton	BD
Bactoyeastextract w/o aa	BD
BCIP/NBT	Sigma
Betain	Sigma
Borsäure	Roth
Bovine Serum Albumin	NEB
Bradford Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Cap Analog ($m^7G(5')ppp(5')G$)	Ambion
Chloroform	Merck
Citronensäure-1-hydrat	Merck
Coomassie Brilliant Blau	Roth
Complete Proteinaseinhibitormix	Roche

Deoxycholic acid (Sodium Salt)	Sigma
DEPC-Wasser	Roth
D-Glucose	Merck
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Roth
dNTPs	Invitek
Eisessig	Merck
Ethanol	Merck/Roth
Ethanolamin	Sigma
Ethidiumbromid	Merck
Ethylenediamin Tetraacetic Acid (EDTA)	Roth
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA-Laboratories
Formaldehyd	Roth
Formamid	Serva
Geneticin (G418)	PAA-Laboratories
Giemsa-Lösung	Fluka
Glutathion (red.)	Sigma
Glutathione Sepharose™ 4B	Amersham Biosciences
Glycerol	Sigma
Glycogen	Roche
Hoechst 33342	Cambrex
Hydrochinon	Merck
Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT)	Fluka
Isopropanol	Roth
Isopropylthio-β-D-Galactosid (IPTG)	Sigma

Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogensulfat	Merck
Kanamycin	Sigma
Lipofectamin 2000	Invitrogen
L-Methionin, (³⁵ S)	ICN
L-Tyrosin	Serva
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchlorid	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
Mowiol 4-88 Reagent	Merck
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
N'-N'- Bis-Methylenacrylamid	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumborhydrid	Roth
Natruimbicarbonatpuffer	Biochrom AG
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
Natruimhydroxid	Merck
Nonidet P40 (NP 40)	Fluka
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Phenol	Merck

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylenglycol 4000	Serva
Propidiumiodid	Sigma
S-Adenosylmethionin (SAM)	NEB
Salzsäure	Merck
Silbernitrat	Merck
SYBR Green I	Bio Whittaker
Tris HCl	Roth
Triton X-100	Roth
Trizol	Gibco
Tryptonpepton	Difco
Tween 20	Roth
Vitrogen	Cohesion Technologies
X-Gal (S-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid)	Sigma
Xylencyanol	Merck
Yeastextract	BD
Zinksulfat-Heptahydrat	Roth

2.1.2 Geräte

Absaugpumpe	HLC
Autoklav	Schütt
Bilddokumentationssystem/Transilluminator	Herolab
Durchflusszytometer Calibur	BD
Elektrophoresekammern	BioRad

Heizblock	Eppendorf
Inkubatoren	Haereus
Magnetrührer MR3001	Heidolph
Mikroliterpipetten	Gilson
Mikroskope	
Axioplan10	Zeiss
Axioplan2	Zeiss
Leica DM IRB	Visitron Systems
NIKON ECLIPSE TS 100	NIKON
Wilovert S	Hund
Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System	peqlab
Mini Trans-Blot Cell	BioRad
pH-Meter, Typ CG810	Schott
<i>Phosphoscreen</i>	GE Healthcare
Phospho-und Fluoroimager	GE Healthcare
Rotor-Gene 2000	Corbett Research
Schüttelinkubator Inova (4000) Edison	New Brunswick Scientific,
Spannungsgeräte	Biorad,
Sterilbank Nuaire	Zapf
Thermocycler:	
PTC-100	MJ Research. Inc.
Robocycler	Stratagene
MasterCyclerGradient	Eppendorf
Thermomixer	Eppendorf
UV-Spektrometer GeneQuant pro	AmershamPharmacia Biotech
Vortexer	Heidolph
Waagen	Sartorius
Zentrifugen:	
Biofuge pico	Heraeus

EBA 12 R	Hettich
Megafuge 1.0 R	Heraeus
Unicen FR	Herolab

2.1.3 Gebrauchswaren

Filterpapier	Schleicher & Schüll
Gewebekulturschalen	TPP
Glaswaren	Schott, Jena
Küvetten	Brand
Parafilm	Brand
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastikwaren	Sarstedt, Greiner, Nalgene
Sterilfilter	Sarstedt
Transfermembran (Immobilon-P)	Millipore

2.1.4 Gebrauchslösungen

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit Wasser aus dem *Milli-Q-Water-System* von Millipore hergestellt

2.1.4.1 Stammlösungen, Lösungen und Puffer

<u>Acrylamid/Bis (100ml)</u>	29,2 g Acrylamid
	0,8 g N`-N`-Bis-Methylenacrylamid

<u>Amylose Waschpuffer</u>	20 mM Tris pH 7,4
	200 mM NaCl
	10 mM β -Mercaptoethanol
	1 mM EDTA pH 8

Antibiotikastammlösungen/Fungizidstammlösungen

Amphotericin	250 μ g/ml
Ampicillin	50 mg/ml

Kanamycin	10 mg/ml
Penecilin/Streptomycin	10000 Units/ml bzw. 10000 µg/ml
Geneticin	50 mg/ml
<u>Antifading</u>	100 mg p-Phenylendiamin in 2 ml PBS pH 8,0 mit Carbonat-Hydrogencarbonat-Puffer einstellen und mit PBS auf 10ml auffüllen; 100 µl dieser Lösung zu je 900 µl sterilem Glycerin geben; bei -20°C aufbewahren
<u>Blotting Puffer (Western Blot) I</u>	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% v/v Methanol pH 8,3
<u>Blotting Puffer (Western Blot) II</u>	20 mM NaH ₂ PO ₄ 7 mM Na ₂ HPO ₄ pH 6,5
<u>CaCl₂-Mix zum Herstellen von chemisch kompetenten Zellen</u>	60 mM CaCl ₂ 15% Glycerol 10 mM PIPES (pH 7,0)
<u>Detektion mit Flag-Antikörper, Lösungen</u>	
Blockierungslösung	3% Magermilchpulver in TBS
Waschlösung	0,05% Tween 20 in TBS

Detektion mit GST-Antikörpern, Lösungen

Blockierungslösung	5% Magermilchpulver 0,1% Tween 20 in PBS
Waschlösung	0,1% Tween 20 in PBS

Glutathion-Elutionspuffer

10 mM red. Glutathion
50 mM Tris-HCl (pH 8)

Ladepuffer

Proteinladepuffer (6x)	0,35 M Tris HCl 10,28% w/v SDS 36% Glycerol 5% β -Mercaptoethanol 0,012% Bromphenolblau
------------------------	---

DNA-Ladepuffer

45% Sucrose
20 mM TrisHCl pH 7,6
50 mM EDTA
0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylene Cyanol

Laufpuffer PAGE 10x

30,3 g Tris
144,0 g Glycine
10,0 g SDS
pH 8,3
bei 4°C lagern

Lokalisation Lösungen zur Färbung

Permeabilisationslösung	0,2% Triton X 100 in PBS
Blockierungslösung	1% Magermilchpulver in PBS

<u>Mowiol</u>	10 g Mowiol in 90 ml PBS lösen, Zugabe von 2,5% DABIO (1,4-Diazabicyclo[2,2,2]-octan) und 40 ml Glycerin, über Nacht rühren, bei 20.000 rpm für 30 min. abzentrifugieren, zur Aufbewahrung aliquotieren und bei -20°C einfrieren.
<u>MPB-X-Y Bindepuffer</u>	50 mM Tris pH 7,6 150 mM NaCl 0,5% NP40 8% Glycerol 7,5 mM MgCl ₂ 0,4 mM DTT 1 mM EDTA
<u>PBS (Phosphate Buffered Saline)</u>	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,3 einstellen und autoklavieren
<u>Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol</u>	25:24:1
<u>Proteinauflösungspuffer (<i>E. coli</i>)</u>	10 ml PBS 0,1 ml PMSF (100 mM) 0,2 ml EDTA (0,5 M)
<u>Proteinextraktionspuffer (humane Zelllinien) I</u>	50 mM Tris (pH 8) 500 mM KCl

0,5 mM EDTA

0,5 mM EGTA

2 mM DTT

1 mM PMSF

Proteinextraktionspuffer (humane Zelllinien)II (zur Präzipitation mit Flag-Agrose)

50 mM Tris HCl pH 7,4

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X 100

Complete Proteinaseninhibitormix

Proteinextraktionspuffer (humane Zelllinien)III RIPA

1 x PBS

1% NP40

0,5% Sodium Deoxycholate

0,1% SDS

Complete Proteinaseninhibitormix

Silberfärbung

Fixierer

50% v/v Methanol

10% v/v Essigsäure

Waschlösung

10% v/v Ethanol

0,5% v/v Essigsäure

Färbelösung

0,1 g AgNO₃/100ml H₂O

Entwickler

3g/200 ml H₂O

0,02 g NaBH₄/200 ml H₂O

	810 µl Formaldehyd/200 ml H ₂ O
Stopper	0,75 g Na ₂ CO ₃ /100 ml H ₂ O
<u>SSCP Stopper</u>	95% Formamid 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
<u>TBE-Puffer</u>	121,1 g/l Tris 51,4 g/l Borsäure 3,7 g/l EDTA pH 8,5
<u>TBS Tris Buffered Saline</u>	3,03 g/l Tris 8,76 g/l NaCl pH 7,5
<u>TBS-Tween</u>	TBS 0,1% v/v Tween 20
<u>TE</u>	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA pH 7,5
<u>Tris-HCl-Lösungen (PAGE)</u>	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (Trenngelpuffer) 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Sammelgelpuffer)
<u>TUNEL Lösungen</u>	
Fixationslösung	3,7% Formaldehyd in PBS

Permeabilisationslösung	10 µl Natriumcitrat-Lsg. (100 mg/ml) 10 µl Triton X-100 989 µl H ₂ O
DAPI Lösung	2 µl einer 10 mg/ml Stocklösung in 10 ml PBS

Zitronensäure/Tween 20 (Zellkernextraktion humane Zellen, 14 Tage haltbar)

2,1 g Zitronensäure/ 0,5 g Tween 20
100 ml H₂O

2.1.4.2 Medien und Nährböden

2.1.4.2.1 Medien und Nährböden zum Kultivieren von Bakterien

<u>LB (Luria-Bertani)-Medium</u>	10 g/l Tryptonpepton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 1 g/l Glucose
----------------------------------	--

Zum Anziehen von *E. Coli* auf Agarplatten werden zusätzlich 1,5% Agar zugegeben und nach dem Autoklavieren werden sterile Platten gegossen.

Meist ist eine Selektion durch Antibiotika erforderlich. Dazu wird in das Medium mit Agar nach dem Autoklavieren bei 60°C ein bestimmtes Volumen an Stammlsg. des jeweiligen Antibiotikums gegeben.

Ampicillin	1,2 ml einer 50 mg/ml Stammlsg. in einen Liter
Kanamycin	5 ml einer 10 mg/ml Stammlsg. in einen Liter

Um eine Blau-Weiß-Selektion von Bakterienkolonien nach Klonierungen zu erreichen, werden auf die schon fertige Platte je 40 µl IPTG (0,2 g/ml) und X-Gal (20 mg/ml) plattiert.

Die Lagerung von LB-Platten erfolgt bei 4°C.

<u>SOB</u>	20 g/l Baktotrypton 5 g/l Baktohefeextrakt
------------	---

0,5 g/l NaCl

10 ml einer 250 mM KCl

Nach dem Autoklavieren bzw. kurz vor Gebrauch werden 5 ml sterile MgCl₂-Lsg. (2 M) zugegeben.

SOC

SOB-Medium mit 20 mM Glucose, die in Form einer 2 M sterilfiltrierten Glucoselsg. zugesetzt wird.

NZY⁺Broth

10 g/l NZ Amin (Caseinhydrolysat)

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

pH 7,5 (mit NaOH einstellen)

nach dem Autoklavieren werden weiterhin folgende sterile Lösungen zugegeben:

12,5 ml einer 1M MgCl₂

12,5 ml einer 1M MgSO₄

10 ml einer 2 M Glucose-Lsg.

(sterilfiltriert)

2.1.4.2.2 Medien zum Kultivieren von humanen Zellen

Je nach Zelllinie werden die adhären wachsenden Zellen in 10 ml Medium/ 10 cm Ø Zellkulturschale kultiviert. Zu 500 ml Medium werden 50 ml FCS und 5 ml PS zugesetzt.

Verwendete Medien:	DMEM	Biochrom AG
	Optimem	Gibco
	RPMI	Biochrom AG

2.1.5 Sterilisation/Autoklavieren von Lösungen und Geräten

Lösungen, die keine hitzeempfindlichen Chemikalien und Stoffe enthalten, sowie Gebrauchswaren wurden bei 120°C und 10⁵ Pascal für 20 min autoklaviert.

Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert. Die Porengröße des Sterilfilters betrug 0,22 µm.

2.1.9 Vorgefertigte Systeme

ECF Western blotting Kit	Amersham Pharmacia
<i>In-Situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche
NucleoSpin [®] Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel
pGEM [®] -T und pGEM [®] -T Easy Vector Systems	Promega
QIAfilter [™] Plasmid Maxi Kit	Quiagen
QIAquick PCR Purification Kit/Nucleotide Removal Kit/Gel Extraction Kit	Quiagen
QuickChange [®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
TA Cloning [®] Kit	Invitrogen
Thermo Sequenase [™] Dye Terminator Cycle Sequencing Pre-Mix-Kit	Amersham Pharmacia
TNT [®] Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega
Wizard [®] DNA Clean-Up System	Promega
Wizard [®] <i>Plus</i> SV Minipreps	Promega

2.1.10 Vektoren

2.1.10.1 Expressionsvektoren

2.1.10.1.1 Bakterielle Expressionsvektoren

pCMVT _N T [™]	Promega
pCR [®] 2.1	Invitrogen
pGEM [®] -5Zf(+)	Promega
pGEM [®] -T	Promega
pMAL-p2X	NEB

2.1.10.1.2 Eukaryotische Expressionsvektoren

pcDNA3.1	Invitrogen
pCMV-Tag 1	Stratagene
pEBG	

2.1.10.2 Fluoreszenzvektoren

pEYFP-C2	Clontech
pEYFP	Clontech

2.1.11 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials

2.1.11.1 Bakterienstämme

Escherichia Coli	JM109	
	DH5 α	
	XL10-Gold [®] Ultracompetent Cells	Stratagene
	TAM1	Activ Motif

2.1.11.2 Humane Zelllinien

2.1.11.2.1 Krebszelllinien

6/93	Leiomyosarkomzelllinie
A204	Rhabdomyosarkomzelllinie
A549	Nicht-Kleinzell-Lungenkrebszelllinie
Capan1	Pankreaskrebszelllinie
HUP-T3	Pankreaskrebszelllinie
LMS20/93	Leiomyosarkomzelllinie
LMS6-93	Leiomyosarkomzelllinie
PaCa2	Pankreaskrebszelllinie
RD	Rhabdomyosarkomzelllinie
Saos2	Osteosarkomzelllinie
SKLMS	Leiomyosarkomzelllinie
SKMEL	Melanomzelllinie
US8-93	Zelllinie eines undifferenzierten Sarkoms
ZR75-1	Brustkrebszelllinie

2.1.11.2.2 Weitere humane Zelllinien

HEK293	Humane embryonale Nierenzellen
HF53	Humane Fibroblasten

2.1.11.2.3 Weichteilsarkomproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 84 histologisch untersuchte Weichteilsarkomproben erwachsener Patienten untersucht. Diese wurden in 22 Liposarkome, 18 Leiomyosarkome, 18 *malignant fibrous histiocytomas* (MFHs), 6 Rhabdomyosarkome, 6 neurogene Sarkome, 6 synoviale Sarkome, 3 Fibrosarkome, 3 maligne Hemangiopericytome, 1 malignes Mesotheliom und nicht klassifizierte Sarkome klassifiziert. Sie wurden von der chirurgischen Klinik I der Universität Leipzig über eine Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität zur Verfügung gestellt. Die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten liegt vor und die Studie wurde durch den Ethikrat genehmigt. Das Tumormaterial wurde direkt nach der Operation in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Klassifizierung erfolgte nach dem System von van Unnik und den UICC Richtlinien (van Unnik *et al.* 1993).

2.1.11.2.4 RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin)-Klone

cDNA	MST1	IRAKp961C0282Q
	MST2	IRAKp961I0613Q
	WW45	IRAKp961L0427Q

2.1.12 Firmen

Abcam	Cambridge	Großbritannien
Active Motif	Rixensart	Belgien
Ambion	Austin	USA
Amersham Biosciences	Uppsala	Schweden
AngioTech® Bio Materials	Palo Alto	USA
AppliChem	Darmstadt	Deutschland
BD Biosciences	Erembodegem	Belgium
Biochrom AG	Berlin	Deutschland
BioRad	Hercules	USA
BioWhittaker	Walkersville	USA
Brand	Wertheim	Deutschland
Cambrex	Rockland	USA
clontech	Mountain View	USA
Cohesion Technologies	Palo Alto	USA
Corbett Research	Cambridge	Großbritannien

eBioscience	San Diego	USA
Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Fluka	Ulm	Deutschland
GE Healthcare	München	Deutschland
Gibco	Karlsruhe	Deutschland
Gilson	Middleton	USA
Greiner	Frickenhausen	Deutschland
Haraeus	Hanau	Deutschland
Herolab	Wiesloch	Deutschland
Hettich	Tuttlingen	Deutschland
HLC	Bovenden	Deutschland
Hund Wetzlar	Wetzlar	Deutschland
ICN	Asse-Relegem	Belgien
InViTek GmBH	Berlin	Deutschland
Invitrogen	Carlsbad	USA
Macalaster Bicknell Co.	New Haven	USA
Macherey-Nagel	Düren	Deutschland
MBI Fermentas	St. Leon-Rot	Deutschland
Merck	Darmstadt	Deutschland
Millipore	Schwalbach	Deutschland
MJ Research Inc.	Waltham	Deutschland
Nalgene	Rochester	USA
NEB	Frankfurt a. M.	Deutschland
New Brunswick Scientific	Edison	USA
NIKON	Düsseldorf	Deutschland
PAA-Laboratories	Pasching	Deutschland
Peqlab	Erlangen	Deutschland
Promega	Mannheim	Deutschland
Qiagen	Hilden	Deutschland
Roche	Mannheim	Deutschland
Roth	Karlsruhe	Deutschland

Santa Cruz	Santa Cruz	USA
Sarstedt	Nümbrecht	Deutschland
Sartorius	Göttingen	Deutschland
Schott	Mainz	Deutschland
Schütt	Göttingen	Deutschland
Serva	Heidelberg	Deutschland
Sigma	Steinheim	Deutschland
Stratagene	La Jolla	USA
TPP	Trasadingen	Schweiz
Visitron Systems	Puchheim	Deutschland
Whatman Schleicher Schüll	Dassel	Deutschland
Zapf	Sarstedt	Deutschland
Zeiss	Jena	Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Untersuchung epigenetischer Inaktivierung

2.2.1.1 Bisulfit-Behandlung

Ca. 1-2 μg genomische DNA wurden in 18 μl H_2O aufgenommen, es wurden 2 μl einer 3M NaOH-Lösung (frisch, Endkonzentration 0,3M) zugegeben. Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, und anschließend wurden 208 μl einer 3,6M Natrium-Bisulfit (pH 5) und 12 μl einer 0,1 M Hydrochinonlösung zupipettiert. Bei 55°C wurden die Proben 16 h inkubiert. Eine Aufreinigung der Bisulfit-behandelten DNA erfolgte über das Wizard[®] DNA Clean-Up System, die aufgereinigte DNA wurde in 50 μl H_2O aufgenommen und nach Zugabe von 5 μl 3M NaOH für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die DNA wurde nach Zugabe von 1 μl Glycogen (2 mg/ml), 50 μl Ammoniumacetat (7,5 M) und 250 μl Ethanol bei Raumtemperatur und 13000 U/min 10 min gefällt, das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 50 μl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.2 Methylation Specific PCR (MSP)

Um die Methylierung der Promoterregion eines Genes zu untersuchen, wurden sowohl methylierungsspezifische Primer als auch Primer, die eine nichtmethylierte Sequenz nach Bisulfit-Behandlung detektieren, generiert, indem die betroffenen CpGs in der Primerregion positioniert wurden.

Tabelle 1. Primersequenzen für MSPs verschiedener Promoterregionen. Mit (m) sind die methylierungs-spezifischen Primer und mit (u) die spezifischen Primer für die unmethylierte Sequenz gekennzeichnet.

Gen	m /u	Forward Primer (5`-3`)	Reverse Primer (5`-3`)
<i>RASSF1A</i>	m	GTGTTAACGCGTTGCGTATC	AACCCCGCGAACTAAAAACGA
	u	TTTGTTGGAGTGTGTTAATGTG	CAAACCCACAAACTAAAAACAA
<i>p16</i>	m	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGCGACCGTAA
	u	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA
<i>MST1</i>	m	GCGGGGCGGGTTTAGGAGGTTC	CCAATAACCCCTCACCGACGC
	u	TTTGTGGGGTGGGTTTAGGAGGTTTGT	AACCAATAACCCCTCACCAACACAACAA
<i>MST2</i>	m	CGGGAGGGAGATTCGTCGCG	AAACCGAAACACCGACCGACCG
	u	TTTTAAGTGGGAGGGAGATTGTGTGG	AAAAACCAAAACACCAACCAACCAAAACC
<i>WW45</i>	m	GATAGTCGTAGTTCGGCGGGGAC	GCAACGCGAACCGCCG
	u	TGAGGATAGTTGTAGTTTGGTGGGGAT	AAAAACTCAACACAACACAACCAACCA
<i>LATS1</i>	m	GAACGATTAGAGTTGCGGGCGAC	AACATTTCCCGACGTCGCTTACG
	u	TGAATGATTAGAGTTGTGGGTGATGT	AAACATTTCCCAACATCACTTACACA
<i>LATS2</i>	m	TTCGTTCCGATTGGTATGCGGTC	CCATCTTCCCGAAACGCTCACG
	u	GGTGTTTTGTGGATTGGTATGTGGTT	CATCTTCCCAAAACACTCACACCACA
<i>ERα</i>	m	GATACGGTTTGTATTTGTTTCGC	AACGATTCAAAAACCTCCAACCTCG
	u	GGATATGGTTTGTATTTGTTTGT	AACAATTCAAAAACCTCCAACCTCA

Tabelle 2. PCR-Bedingungen für MSP verschiedener Promoterregionen. Mit (m) sind die methylierungs-spezifischen Primer und mit (u) die spezifischen Primer für die unmethylierte Sequenz gekennzeichnet.

Gen	m/u	Produkt in bp	T _m in °C	Zyklen
<i>RASSF1A</i>	m	93	60	34
	u	105	60	33
<i>p16</i>	m	150	65	38
	u	151	60	38
<i>MST1</i>	m	120	63	38
	u	125	63	40
<i>MST2</i>	m	99	59	39
	u	108	61	40
<i>WW45</i>	m	116	62	40
	u	131	62	40
<i>LATS1</i>	m	125	60	40
	u	125	60	40
<i>LATS2</i>	m	150	60	40
	u	150	60	40
<i>ERα</i>	m	159	55	38
	u	161	53	38

Lag eine Methylierung vor, so wurde diese methylierten Cytosine im CpG Kontext durch die Bisulfit-Behandlung nicht in Thymin umgewandelt, die Cytosine blieben erhalten und die methylierungsspezifischen Primer konnten binden. Lag keine Methylierung der Region vor, wurden die Cytosine zu Thyminen umgewandelt. Die Primer, die spezifisch an die unmethylierte Sequenz binden, gaben ein Produkt in der PCR. 100 ng Bisulfit-behandelter DNA wurden in einem 25 µl Reaktionsansatz, der 0,2 mM dNTP-Mix, 1,5 mM MgCl₂, 20 pmol jedes Primers und Taq-Polymerase (2 U) enthielt, amplifiziert und die Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Promoterregionen der Gene *RASSF1A* (Schagdarsurengin *et al.* 2002), *p16* (Herman *et al.* 1996), *MST1*, *MST2*, *WW45*, *LATS1*, *LATS2* und *ERα* (Liu *et al.* 2005) mit MSP untersucht. Die Primersequenzen, die jeweiligen PCR-Bedingungen wie *Annealing* Temperaturen sowie die Produktgröße wurden in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt. Zur Kontrolle wurden je eine unmethylierte Probe und eine *in vitro* methylierte (Siehe 2.2.1.4) Probe mitgeführt.

2.2.1.3 Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

Nach Bisulfit Behandlung der DNA erfolgte die Amplifikation des zu untersuchenden DNA Fragmentes in einem 25 µl Ansatz, der 0,2 mM dNTP-Mix, 1,5 mM MgCl₂, 20 pmol jedes Primers und Taq-Polymerase (2 U) enthielt. Eingesetzt wurden 100 ng genomischer bisulfitbehandelter DNA. Von Vorteil war es bei schlechter Amplifikation, eine zweite PCR (*seminested* oder *nested*) durchzuführen, bei der als Template Produkt aus PCR 1 genutzt wurde. Die PCR Produkte wurden nach Analyse in einem 2%igen Agarose Gel mit einem Enzym (z.B. TaqI; Schnittstelle 5`TCGA`3) geschnitten, dass das zu untersuchende CpG in der Erkennungssequenz trug. Lagen die Cytosine unmethyliert vor, so erfolgte in der Bisulfitbehandlung der DNA die Umwandlung zu Thymidinen, die Restriktionsschnittstelle ging verloren. Blieben die Cytosine jedoch erhalten, d.h. war das entsprechende Cytosin methyliert, so wurde es vom Enzym geschnitten und im 2%igen Agarosegel wurden die Restriktionsfragmente analysiert.

Tabelle 3. Primersequenzen für COBRA-PCR für Promoterregionen der Gene *MLH1* und *MSH2*

Gen	Semi-nested	Forward Primer (5`-3`)	Reverse Primer (5`-3`)
<i>MLH1</i>	PCR1	GTAAGGGGAGAGGAGTTTGAGAAG	ACCTTCAACCAATCACCTCAATACCTC
	PCR2		CATCCAACCCACCCTTCAAC
<i>MSH2</i>	PCR1	GTAGTTTTGGAAGTTGATTGGGTGTGGT	ACCCATATACTTAATCACCCCTAAAT
	PCR2	GGGAAATAGTTTAGTGGGTGTGGGT	

Mittels COBRA wurden im Rahmen dieser Arbeit die Promoterregionen der Gene *MLH1* und *MSH2* untersucht. Die Primersequenzen, PCR Bedingungen und Restriktionsenzyme wurden in Tabelle 3 und Tabelle 4 zusammengefasst. Zur Kontrolle wurden je eine unmethylierte und eine *in vitro* methylierte (Siehe 2.2.1.4) Probe mitgeführt.

Tabelle 4. PCR-Bedingungen für COBRA-PCRs für Promoterregionen der Gene *MLH1* and *MSH2*

Gen	PCR1/2	Produkt in bp	T _m in °C	Zyklen	Enzym (NEB)	Schnittprod. in bp
<i>MLH1</i>	1	368	59	20		
	2	308	59	39	Taq I	120, 188
<i>MSH2</i>	1	340	60	20		
	2	270	60	39	HpyCH4IV	95, 175

2.2.1.4 *In vitro* Methylierung von DNA

Zu Kontrolle von COBRA und MSP Reaktionen wurden je eine unmethylierte und eine methylierte DNA mitgeführt. Die methylierte Kontrolle wurde mit Hilfe des Enzyms Sss I (CpG) Methylase (NEB) hergestellt. Zu 20 µg genomischer DNA (z.B. aus HF53) wurden 20 µl NEBuffer 2, 1 µl S-adenosylmethionine (SAM, 160 µM) und 15 µl Sss I (CpG) Methylase (4 U/ µl) zugegeben. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 200 µl aufgefüllt. Über Nacht erfolgte eine Inkubation bei 37°C im Wasserbad, wobei nach 2-3 h ein weiterer µl SAM zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurden 100 µl TE-Puffer zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend mit 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Nach 3 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte die Zugabe von 300 µl Chloroform und nach kräftigem Mischen die Zentrifugation für 3 min bei 13000rpm. Die obere Phase wurde abgenommen, mit 30 µl Natriumacetat (3M, pH 5,2) und 750 µl Ethanol wurde die DNA durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min gefällt. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wurde es in 40 µl TE aufgenommen, je 4 µl des Ansatzes wurden für eine Bisulfit Behandlung eingesetzt.

2.2.1.5 Analyse der Expression in epigenetisch inaktivierten Tumormaterialien und in Zelllinien ohne und nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidine

Zur Analyse der Expression von *RASSF1A* in der Rhabdomyosarkomzelllinie RD, die einen hypermethylierten *RASSF1A* Promoter trug, und der Expression von *MST1* in der Leiomyosarkomzelllinie SKLMS, die einen hypermethylierten *MST1* Promoter aufwies, wurde die Gesamt-RNA mit Trizol isoliert und die Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt. Diese beiden Zelllinien wurden zusätzlich vier Tage mit 5 µM bzw. 10 µM 5-Aza-2'-Deoxycytidine behandelt und es wurde ebenfalls RNA isoliert. Zusätzlich wurde aus Tumormaterial, das eine Methylierung im entsprechenden Promoter aufwies, RNA isoliert. 1 µg RNA wurde in einem 20 µl Ansatz eingesetzt, der 0,9 mM dNTP-Mix, 20 pmol eines oligo dT Primers, 20 Units RNasin (Promega), 100 Units AMV-Reverse Transkriptase (Promega) enthielt, für eine Stunde bei 42°C inkubiert, es erfolgte ein Umschreiben der mRNA in cDNA. Für die quantitative PCR zur Untersuchung der Expression von *RASSF1A* wurden 2 µl des RT-Ansatzes in 25 µl eingesetzt, 0,2 mM dNTP-Mix, 1,5 mM MgCl₂, 20 pmol der Primer L27111 (5'TCCTGCAAGGAGGGTGGCTTC`3) und HeU2αβ

(5`GGCTGGGAACCCGCGGTG`3) und FastStart Taq DNA Polymerase (2 U) wurden zugegeben. Die Annealing Temperatur betrug 60°C und es wurde in 33 Zyklen amplifiziert (Schagdarsurengin *et al.* 2002). Bei Analyse durch *real-time*-RT-PCR wurde dem Reaktionsansatz 0,2x SYBR Green zugesetzt. Die gleichen PCR Bedingungen galten für die RT-PCR zur Expressionsanalyse von *MST1*, die Primer MST1FW (5`CATGCAGCCTGCGAAACCATCC`3) und MSTRW (5`TGGGGTCCAGGGCCAAGAGC`3) wurden in 27 Zyklen zur Amplifikation eingesetzt. Die Analyse erfolgte über 2%ige Agarosegele bzw. bei *real-time*-RT-PCR in einer komparativen Auswertung. Zur Kontrolle wurde eine *real-time*-RT-PCR durchgeführt, die die Expression des Gens *GAPDH* analysierte und damit den mRNA Gehalt verifizierte. Verwendet wurden dazu die Primer LGAP535 (5`GACCTTGGCCAGGGGTGCTA) and UGAP389 (5`TGGAGAAGGCTGGGGCTCAT) bei einer *Annealing* Temperatur von 60°C.

2.2.2 Mutationssanalyse mittels SSCP

In Weichteilsarkomen wurde die Mutationsrate verschiedener Gene in bestimmten Codons mittels *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) Analyse im Polyacrylamidgel untersucht. Dabei wurde die Mutationsraten des Codons 133 des Gens *RASSF1A* (Schagdarsurengin *et al.* 2005), des Codons 600 des Gens *B-RAF* (Davies *et al.* 2002) und des Codons 12 von *K-RAS* (Dammann *et al.* 2003) ermittelt.

2.2.2.1 PCR zur Amplifikation von *RASSF1A*, *B-RAF* und *K-RAS* Fragmenten

100 ng genomischer DNA wurde in einem 25 µl Ansatz, der 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, je 10 pmol der jeweiligen Primer und Taq Polymerase (2 U) enthielt, amplifiziert (Tabelle 5, Tabelle 6). Bei der Amplifikation des Abschnittes von *K-RAS* wurde eine weitere PCR durchgeführt, bei der das Produkt aus der ersten PCR als Template diente und ein Primer ausgetauscht wurde (*seminested*). Die Amplifikation wurde in einem 2% Agarosegel kontrolliert. In Tabelle 5 und Tabelle 6 wurden die Primersequenzen und PCR-Bedingungen zusammengestellt. Als Kontrollen dienten für die SSCP von *RASSF1A* genomische DNA aus Blut von heterozygoten Trägern des Polymorphismus im Codon 133, für die SSCP von *B-RAF* die Melanomzelllinie SKMEL und für die SSCP von *K-RAS* die Pankreaskrebszelllinien PaCa2, Capan1 und HUP-T3.

Tabelle 5. Primersequenzen für PCRs zur Amplifikation vor SSCP-Analyse

Gen		Forward Primer (5`-3`)	Reverse Primer (5`-3`)
<i>RASSF1A</i>		ACGAGCCTGTGGAGTGGGAG	AGAGGTTGCTGTTGATGTGGGC
<i>B-RAF</i>		TCATAATGCTTGCTCTGATAGGAAAA	GTAAGTCTCAGCAGCATCTCAGGG
<i>K-RAS</i>	PCR1	CCTTATGTGTGACATGTTCTAATATA	CGTCCACAAAATGATTCTGAATTAGCTGTA
	PCR2	GTCAC	TC AGGCCTGCTGAAAATGAC

Tabelle 6. PCR Bedingungen der PCR-Amplifikationen vor SSCP-Analyse

Gen		Produkt in bp	T _m in °C	Zyklen	Formamid in %
<i>RASSF1A</i>		93	58	28	6
<i>B-RAF</i>		243	55	27	-
<i>K-RAS</i>	PCR1	156	60	20	4
	PCR2	104	57	30	8

2.2.2.2 Aufarbeitung des PCR Produktes

Die PCR Produkte wurden mit Natriumacetat und Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung des Pellets in 2 µl H₂O aufgenommen. Nach Lösung der DNA wurden 8 µl SSCP Stopper (Siehe 2.1.4.1) zugesetzt. Der Ansatz wurde 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert.

2.2.2.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Je 5 µl des denaturierten Ansatzes wurden auf ein Polyacrylamidgel geladen. Für ein 15% PAGE Gel wurden 5 ml Acrylamid/Bis (30%)-Lösung, 1 ml 10 x TBE, 3,9 ml H₂O, 70 µl APS und 10 µl TEMED vermischt und das Gel wurde gegossen. Die Laufbedingungen variierten stark für die Auftrennung der verschiedenen Produkte. Sie wurden in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7. SSCP Laufbedingungen der PAGE

Gen	Acylamid/Bis in %	Spannung in V	Zeit in min
<i>RASSF1A</i>	16	350 (4°C)	90
<i>B-RAF</i>	17	200 (4°C)	225
<i>K-RAS</i>	15	200	120

2.2.2.4 Silberfärbung der Acrylamidgele

Nach Auftrennung der Fragmente im SSCP-PAGE Gel, wurde das Gel 10 min im Fixierer inkubiert, 2 x 5 min mit Waschlösung gewaschen und 10 min in der Färbelösung belassen. Die Entwicklung (Entwickler) erfolgte so lange, bis die Banden deutlich und stark sichtbar waren, dann wurde die Färbung in der Stopperlösung abgebrochen. Die Zusammensetzungen der Lösungen wurden in Kapitel 2.1.4.1 beschrieben.

2.2.3 Funktionelle Untersuchungen zur Funktion von RASSF1

2.2.3.1 Mutagenesen zur Veränderung von RASSF1

Um die Auswirkung von bestimmten Aminosäuren und Domänen von RASSF1A und RASSF1C auf die Funktionsfähigkeit zu untersuchen, wurden mit Hilfe des QuickChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit Aminosäuren ausgetauscht und Domänen deletiert. Als Grundlage wurden die Konstrukte pCMV-Tag1-RASSF1A und

pCMV-Tag1-RASSF1C genutzt. In Tabelle 8 wurden die Primersequenzen zur Mutation bzw. Deletion von Domänen von RASSF1A aufgeführt.

Tabelle 8. Primersequenzen zum Einfügen von Mutationen/Deletionen in RASSF1A

Mutation/ Deletion	Codon/Domäne	Primer (5`-3`)
52	CAC→CAA	CCCTGGCCGTGGCCAA CGCTTCCAGCCC
53	CGC→TGC	GGCCGTGGCCACTGCTTCCAGCCCGCG
90	CAC→CAG	GCAAGTTCACCTGCCAGTACCGTGCCGC
131	TCT→TTT	GGGAGACACCTGACCTTTTTC AAGCTGAGATTGAGC
132	CAA→GCA	GGGAGACACCTGACCTTTCTGCAGCTGAGATTGAGC
133	GCT→TCT	GGAGACACCTGACCTTTCTCAATCTGAGATTG
203	TCC→TTC	GTCAGGCGCCGCACTTTCTTTTACCTGCC
246	GAG→AAG	CGCAAGTTTGCACCTCTTTAAGCGCGCTGAGC
257	CGG→CAG	GCCAAGTGTACTTG CAGAAGCTGTTGGATGATGAGC
DelC1	Deletion der C1-Domäne	GGGCCCCGGGACCAGATCTGGGAACCCGCGG
DelC1ATM	Deletion der C1- und ATM-Domäne	GGAGTACAATGCCCAGATCTACAGCAACCTCTTC
DelSARAH	Deletion der SARAH-Domäne	AGGAAAATGACTCTGGGCCCCTGGGTGACCTCT
RASSF1F	Spleißvariante	GGCCTGCAGTGCGCGCGACGAGCCTGTGGAGTGG

Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung verifiziert. Bei der Deletion der C1- bzw. C1-ATM-Domänen wurde durch die Mutagenese eine Schnittstelle eingefügt. Die entsprechenden Plasmide wurden mit der Restriktionsendonuklease BglII geschnitten und religiert, um die Domänen zu deletieren. Zur Deletion der SARAH-Domäne und für die Generierung von RASSF1F wurden Primer kreiert, die die Deletion der entsprechenden Fragmente während der PCR-Reaktion verursachten. Nach erfolgter Mutagenese bzw. Deletion wurden die Ansätze in XL10-Gold E.Coli transformiert und aus Einzelkolonien Minipreps angeimpft. Aus den Übernachtskulturen wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit die Plasmid DNA isoliert und der Erfolg der Mutagenese durch Sequenzierung verifiziert. Unter Verwendung des QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit wurde eine hochkonzentrierte, für die Transfektion in humane Zellen geeignete Plasmidlösung aus E.Coli isoliert und die DNA Konzentration spektralphotometrisch bestimmt.

2.2.3.2 Transfektion in humane Zelllinien

Zur Transfektion einer 10 cm Ø Zellkulturschale wurden 8 µg Plasmid DNA in 1,5 ml Optimem gelöst. 25 µl Lipofectamin 2000 wurden in 2 ml Optimem aufgenommen. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lösungen vereinigt und wiederum für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium der zu transfizierenden Zellen wurde abgesaugt und die Zellkulturschale mit den Zellen wurde mit 5 ml PBS gewaschen. Die DNA-Lipofectamin 2000-Optimem Lösung wurde auf

die Schale gegeben und 6 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Optimum abgesaugt und frisches Medium (zellabhängig) zugegeben.

2.2.3.2.1 Transiente Transfektion

Experimente, Proteinisolation oder eine Untersuchung am Mikroskop erfolgten zwei bis drei Tage nach der Transfektion.

2.2.3.2.2 Stabile Transfektion

Nach erfolgter Transformation wurde zur Zellkulturschale mit A549 Zellen Geneticin (Endkonzentration 1 mg/ml) zugegeben. Das verwendete Plasmid pCMV-Tag1 trug eine entsprechende Antibiotikaresistenz, so dass nur Zellen, die transformiert wurden, auswachsen konnten. Es erfolgte eine Koloniebildung aus den transformierten Zellen, nach 3-4 Wochen unter Selektion wurden die Kolonien gepickt und in je ein Well einer 6-Well-Schale überführt und wiederum unter Selektion gehalten. Klone die auswachsen wurden weiter kultiviert, es erfolgte eine RNA Isolation und jeder Klon wurde eingefroren.

2.2.3.2.2.1 RNA Isolation und RT-PCR zur Kontrolle der stabilen Expression

Zur RNA Isolation aus transformierten A549 Zellen wurden die Zellen in 500 µl Trizol aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wurde der Ansatz kräftig geschüttelt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 min bei 4°C, woraus eine deutliche Phasentrennung resultierte. In der unteren, organischen Phase befanden sich die Proteine, in der oberen, wässrigen Phase die RNA, die Zwischenphase bildete die DNA. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 250 µl Isopropanol und Zentrifugation bei 10000 rpm für 10 min bei 4°C gefällt. Nachdem das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen wurde und nach Trocknung des Pellets, wurde es in DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen. Die RNA Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt.

1 µg RNA wurden in der reversen Transkriptionsreaktion in cDNA umgeschrieben. Der 20 µl Reaktionsansatz enthielt 0.9 mM dNTP-Mix, 20 pmol eines oligo dT Primers, 20 Units RNasin und 100 Units AMV-Reverse Transkriptase und wurde für 1 h bei 42°C inkubiert. Für die quantitative PCR zur Untersuchung der Expression der entsprechenden Konstrukte wurden 2 µl des RT-Ansatzes in 25 µl eingesetzt, 0.2 mM dNTP-Mix, 1.5 mM MgCl₂, 1,5 M Betain, 20 pmol der Primer FlagF (5'TGGATTACAAGGATGACGACG'3) und L27111 (5'TCCTGCAAGGAGGGTGGCTTC'3) und Taq Polymerase wurden zugegeben. Die Annealing Temperatur betrug 60°C und es wurde in 35 Zyklen amplifiziert. Die PCR Produkte wurden in einem 2%igem Agarosegel analysiert.

2.2.3.3 Proliferationsuntersuchungen

2.2.3.3.1 Aufzeichnen von Wachstumskurven

Die stabil transfizierten Zelllinien wurden auf Unterschiede in der Proliferationsrate untersucht. Dazu wurden je 150000 Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte gesät, es wurden je 6 Wells pro Klon angesetzt. Alle 24 h wurden die Zellen eines Wells abtrypsiniert und die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen des jeweiligen Wells wurden verworfen und am nächsten Tag ein weiteres Well zur Bestimmung genutzt. Zum Aufzeichnen von Wachstumskurven in zinkfreiem Optimum, wurde dem Medium 1% FCS zugesetzt und zur Kontrolle der Auswirkung von Zinkionen 5 μ M bzw. 10 μ M Zinksulfat (Stocklösung 100 μ M) zugesetzt.

2.2.3.3.2 Wachstum in weichem Agar

In 6 cm \varnothing Zellkulturschalen wurde eine Agarose-Nährmedium-Unterschicht gegossen, die ein Anwachsen der Zellen an der Zellkulturschale verhindern sollte. Dazu wurden für 5 Platten 9,2 ml Medium (für A549 DMEM, vorgewärmt auf ca. 70°C), 2,5 ml 3% Agaroselösung (ca. 70-80°C), 1,6 ml FCS, 1,12 ml Geneticin, 140 μ l Penicillin/Streptomycin (PS) Lösung und 140 μ l Amphotericin (AP) gemischt und zügig je 3 ml pro Platte gegossen. Zum Giessen der Oberschicht, die die Zellen enthalten sollte, wurde zunächst für wieder 5 Ansätze 4,88 ml Medium, 1,6 ml FCS, 560 μ l Geneticin, 80 μ l PS, 80 μ l AP gemischt und im Wasserbad auf ca. 60°C vorgewärmt. Je 5000, 10000 und 20000 Zellen wurden in Reaktionsgefäße vorgelegt, 0,8 ml heiße 3% Agaroselösung wurde zum Nährmediumgemisch gegeben und durchmischt. Je 1,5 ml des Agarose-Nährmedium-Gemisches wurden zu je einem Zellansatz gegeben und nach erneutem Mischen wurde die Oberschicht gegossen. Im weichen Agar wurde das Wachstum der Zellen ohne Zell-Zell-Kontakte über 4-5 Wochen analysiert. Die Kolonien wurden durch Anfärbung über Nacht mit Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT, 5 mg/ml, 400 μ l/Schale) sichtbar gemacht. Die Bestimmung der Koloniegröße erfolgte am Mikroskop LEICA DMIRB mit Hilfe des Programmes MetaVue (Molekular Devices GmbH, München, Deutschland). Es wurden pro Ansatz 25 Kolonien vermessen.

2.2.3.4 Migrationsverhalten

Um die Auswirkung einer stabilen Transfektion von RASSF1A und mutagenisierten Varianten von RASSF1A in A549 hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens zu untersuchen, wurden die Zellen in eine dreidimensionale, künstliche Kollagenmatrix gegossen und die Migrationsgeschwindigkeit über 2 Tage mit Hilfe einer Zeitraffer videomikroskopischen Aufnahme beobachtet. Der Reaktionsansatz bestand aus 50 μ l Medium (DMEM), 25 μ l Bicarbonatpuffer und 375 μ l Vitrogen (enthält aufgereinigtes, natives Kollagen). 66 μ l dieses Mix wurden zu 33 μ l Zellsuspension gegeben, wobei die Ablösung der Zellen zuvor mit Accutase (schonendes Gemisch aus proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen) erfolgte. Diese Ansätze wurden bei 4°C gekühlt und unter

sterilen Bedingungen angesetzt. In eine Migrationskammer bestehend aus Objektträger und Deckgläschen, das durch ein Paraffin/Vaseline-Gemisch auf dem Objektträger befestigt wurde, wurde das Zell-Kollagen-Gemisch gegossen und zum Erstarren 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Migrationskammer wurde anschließend mit DMEM aufgefüllt und mit dem Paraffin/Vaseline-Gemisch abgedichtet. Die Migration der Zellen wurde bei 37°C unter dem Mikroskop (NIKON, ECLIPSE TS 100) bei 10facher Vergrößerung für 2 Tage verfolgt, wobei durch das Programm Multitrack 4.2 (Mediquant, Halle, Deutschland) alle 10 min eine Aufnahme gemacht wurde.

2.2.3.5 Bestimmung der Apoptoserate mittels TUNEL

Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte 1-2 Tage nach transienter Transfektion von verschiedenen Plasmiden in A549 mit Hilfe des *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red*. Eine Eigenschaft apoptotischer Zellen, nämlich die Fragmentierung der DNA wurde genutzt, um diese Zellen sichtbar zu machen. Dabei wurden an die Fragmentenden durch die *Terminal deoxynucleotidyl transferase* rot fluoreszierende Nucleotide gekoppelt, die Zellen waren durch rote Färbung am Fluoreszenzmikroskop erkennbar. Die Zellen wurden nach Ablösung von der Zellkulturschale auf Objektträger zentrifugiert und mit 3,7% Formaldehyd (in PBS) für eine Stunde fixiert. Anschließend wurde 2 x mit PBS gewaschen. Die Permeabilisationslösung (4°C) wurde auf die Zellen gegeben und für 2 min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde das Enzym/Labelling-Gemisch (vor Zugabe gründlich durchmischt) bestehend aus je 22,5 µl Reagenz 2 (enthält das Fluoreszenz markierte Nucleotidgemisch in Reaktionspuffer) und 2,5 µl Reagenz 1 (enthält die *Terminal deoxynucleotidyl transferase*) auf je einen aufzentrifugierten Zellspot, der ca. 15000 Zellen enthält, pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Anschließend wurde 2 x mit PBS gewaschen, die DAPI Lösung auf die Zellen gegeben und für 5 min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Objektträger getrocknet und mit *Antifading* und einem Deckgläschen bedeckt. Die Analyse erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan 2). Es wurden ca. 1000 Zellen pro Ansatz ausgewertet.

2.2.3.6 Medikamenteninduzierte Apoptose

2.2.3.6.1 Behandlung transient transfizierter Zellen mit Nocodazol

Die Zelllinien HEK293 und A549 wurden mit YFP-RASSF1A-Konstrukten transient transfiziert und nach einem Tag 1 h mit 20 µM Nocodazol behandelt. Anschließend wurden die Zellen, die auf Deckgläschen kultiviert worden waren fixiert und wie in 2.2.3.7. beschrieben mit Anti- α -Tubulin-Antikörpern und DAPI gefärbt. Mit Nocodazol behandelte Zellen wurden mit unbehandelten Zellen am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan 2) verglichen und ausgewertet.

2.2.3.6.2 Behandlung der stabil transfizierten Klone mit Paclitaxel

Die stabil transfizierten Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und 18 h mit 0,1 μ M Paclitaxel (Stamlösung: 1 mg/ml DMSO) inkubiert. Anschließend wurde mit PBS gewaschen und die Zellen wurden mit 70% Ethanol 1h fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden mit 1 mM Hoechst 33342 in PBS 30 min die Zellkerne gefärbt. Es wurde gründlich mit PBS gewaschen und mit Antifading wurden die Deckgläschen auf Objektträger gebettet. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan 2), ca. 1000 Zellkerne wurden ausgezählt.

2.2.3.7 Lokalisationsuntersuchungen

Zur Untersuchung der Lokalisation von RASSF1A, RASSF1C, RASSF1F und mutagenisierter Formen wurden die Konstrukte in den Vektor pEYFP-C2 kloniert bzw. darin mutagenisiert. Diese Konstrukte wurden transient in A549 transfiziert, die zuvor auf Deckgläschen angewachsen waren. 1-2 Tage nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 15 min in 3,7% Formaldehyd Lösung (in PBS) fixiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Permeabilisationslösung zugegeben, für 20 min inkubiert und 3 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen in Blockierungslösung 15 min abgesättigt. Es erfolgte die Antikörperkolorierung gegen α -Tubulin, wobei der erste Antikörper *anti- α -Tubulin (bovine) Mouse IgG 1: 200* in Blockierungslösung verdünnt wurde. Je 100 μ l pro Deckgläschen wurden aufgetragen. Die Inkubation erfolgte 45-60 min bei Raumtemperatur, anschließend wurde 3 x mit Blockierungslösung gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper *Alexa Fluor[®] goat anti mouse IgG* wurde 1: 250 verdünnt in Blockierungslösung eingesetzt, wobei wiederum 100 μ l pro Deckgläschen zugegeben wurden. Auch hier erfolgte die Inkubation über 45-60 min jedoch im Dunkeln. Nach einem Waschschrift mit Blockierungslösung wurde 2 x mit PBS gewaschen und anschließend die DAPI Färbung durchgeführt. Nachdem 3 x mit PBS gewaschen wurde, wurden die Deckgläschen mit je einem Tropfen Mowiol verkehrt herum auf einen Objektträger gelegt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan 2).

2.2.3.8 Interaktionsstudien

Um Interaktionen von RASSF1A mit anderen Proteinen darzustellen, wurde ein *in vitro* System und ein *in vivo* System genutzt.

2.2.3.8.1 Interaktionsstudien im *in vitro* System

Zur Untersuchung der Interaktion von RASSF1A und K-RAS wurde das *TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System* genutzt. Dabei wurde RASSF1A radioaktiv markiert und in einem Präzipitationsansatz mit MPB und MPB-K-RAS auf Interaktion untersucht.

2.2.3.8.1.1 mRNA Synthese und Aufreinigung

RASSF1A wurde in den Vektor pCMV_NTTM (Promega) kloniert und das Konstrukt wurde mit der Restriktionsendonuklease BamH1 linearisiert. Die Aufreinigung erfolgte durch Ausschütteln mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Ethanol Fällung. Das Pellet wurde in DEPC- H₂O aufgenommen. In einem 50 µl Reaktionsansatz, der je 0,5 mM ATP, CTP und UTP, 50 µM GTP, 0,5 mM Cap Analog (m7G(5')ppp(5')G, Ambion), 5 x BSA, 150 Units T7 RNA Polymerase, 60 Units RNasin und 1 x RNAPol Reaktionspuffer enthielt, wurde RNA von 2,5 µg linearisiertem Vektor synthetisiert. Die Inkubation erfolgte 90 min bei 37°C. Zum 50 µl Ansatz wurden 100 µl TE, 700 µl Trizol und 70 µl Chloroform gegeben, es wurde stark durchmischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 14000 U/min bei 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mit einem Volumen Isopropanol gefällt 10 min auf Eis gefällt. Der Ansatz wurde erneut 20 min bei 14000 U/min und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl DEPC-H₂O und 20 Units RNasin aufgenommen. Die Effizienz der RNA-Synthese wurde in einem 1% Agarosegel verifiziert.

2.2.3.8.1.2 In vitro Translation mit radioaktiver Markierung durch ³⁵S-Methionin

Zur *in vitro* Translation von radioaktiv markiertem Protein wurde der TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System Kit eingesetzt. Der 50 µl Reaktionsansatz enthielt 33 µl Rabbit Reticulocyte Lysate, 1 µl Aminosäuremix (1 mM) ohne Methionin, 3 µl ³⁵S-Methionin (10 mCi/ml), 1,4 µl KCl-Lösung, 20 Units RNasin und 10 µl der synthetisierten RNA. Es wurde 90 min bei 30°C inkubiert und anschließend wurden 5 µl des Ansatzes denaturiert und in Proteinladepuffer aufgenommen. In einem 10% Polyacrylamidgel wurde die Probe aufgetrennt, das Gel wurde anschließend getrocknet. Auf einem Phosphoscreen wurde die radioaktive Strahlung visualisiert und mit dem Phospho- und Fluoroimager ausgewertet.

2.2.3.8.1.3 Expression und Aufreinigung von in E.Coli exprimierten MPB-Fusionsproteinen

K-RAS wurde in den Vektor pMAL-p2X kloniert. In LB (100 µg/ml Ampicillin) wurde eine 10ml Übernackkultur der E.Coli Stämme, die pMAL-p2X allein und pMAL-p2X-K-RAS trugen, angeimpft, die am nächsten Tag in eine 50 ml Kultur überimpft wurde. Hatte diese Kultur eine OD von 0,9 erreicht, wurde mit 24 µl IPTG (0,5 M) induziert. Nach 5-6 h Wachstum wurden die E.Coli durch Zentrifugation geerntet. Das Pellet wurde in 2,5 ml PBS (0,5 M EDTA, 0,1 M PMSF) aufgenommen. Zur Kontrolle der Expression wurden während des Wachstums alle 2 h 2 ml Probe entnommen, abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl PBS (0,5 M EDTA, 0,1 M PMSF) aufgenommen. Der Aufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung bei 4°C.

100 µl Proben: 3 x 30 sek Pulsstufe 1 bei 40% und je 30 sek. Pause

2,5 ml Proben: 3 x 1 min Pulsstufe 1 bei 60% und je 1 min Pause

Anschließend wurde 1% Triton X 100 zugegeben und 1 h unter Schütteln bei 4°C inkubiert, zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand wurde aliquotiert eingefroren. Die Gesamtproteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt. 20 bis 50 µg Gesamtprotein wurden in einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung visualisiert.

Die Aufreinigung der MPB-Proteine erfolgte mit Hilfe der Amylose *Resin*, die jedoch zuvor mit Amylose Waschpuffer gewaschen werden musste. Zu 200 µl Gesamtproteinlösung wurden je 15 µl Amylose *Resin* gegeben und bei 4°C unter Schütteln 1 h inkubiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C, 3000 U/min für 3 min. Es wurde anschließend 3 x mit je 400 µl Amylose Waschpuffer und 1 x mit 200 µl MPB-X-Y Bindepuffer gewaschen.

2.2.3.8.1.4 Bindungsassay

Zum Säulenmaterial, dass die MPB-Proteine gebunden hatte (2.2.3.8.1.4.), wurden 200 µl MPB-X-Y Bindepuffer und 10 µl des *in vitro* Translationsansatzes (2.2.3.8.1.2.), der das radioaktiv markierte Protein enthielt, gegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 4°C unter Schütteln für 1 h. Nach Zentrifugation für 3 min bei 3000 U/min bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und das Säulenmaterial 5 x mit Amylose Waschpuffer gewaschen. 8 µl Proteinladepuffer wurden zum Säulenmaterial gegeben und der Ansatz wurde 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte im 10% PAGE-Gel und nach Trocknung des Gels wurde es auf einem *Phosphoscreen* inkubiert, der dann wiederum am Phospho- und Fluoroimager ausgewertet wurde.

2.2.3.8.2 Interaktionsstudien in humanen Zelllinien *in vivo*

Für die Interaktionsstudien wurden HEK293 genutzt.

2.2.3.8.2.1 Klonierung von *MST1*, *MST2* und *WW45*

Beim RZPD wurden EST-Klone bestellt, die die entsprechenden cDNAs der Gene trugen. Mit cDNA spezifischen Primern (Tabelle 9), die zusätzlich Schnittstellen zur Klonierung in den Vektor pCMV-Tag1 trugen, wurden die cDNAs mit *Pfu Turbo* DNA-Polymerase amplifiziert, mit Taq DNA Polymerase wurde ein A-Anhang generiert und mit Hilfe der Kitsysteme pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems und TA Cloning® Kit wurden die PCR-Fragmente kloniert.

Tabelle 9. Primersequenzen zur Klonierung der Gene *MST1*, *MST2* und *WW45* aus EST-Klonen

Gen	Forward Primer (5`-3`)	Reverse Primer (5`-3`)
<i>MST1</i>	GAGGATCCCGCCATGGAGCAG	TGGGTCGACTCAAAAGTTTTGCTGCCTTCTTT
<i>MST2</i>	GAAGATCTGCGCCATGGAGACGGTACAGC	TGGGTCGACAGCCTGGCCTTGCTCAGAAGTT
<i>WW45</i>	GAAGATCTGAAGGATGCTGTCCCAGAAAGAAA	TGGGTCGACTCAGCTCAAAAATTTTTCCATGTTG

Die Vektoren wurden dann mit den Restriktionsendonukleasen BamHI bzw. BglII und SalI geschnitten und die Inserts in den Vektor pCMV-Tag1 kloniert. Bei dem Klon für MST1 befand sich ein Intron im Klon, das durch gerichtete Mutagenese mit dem QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit deletiert wurde. Ebenso musste ein Stopcodon bei dem Klon WW45 mutiert werden.

2.2.3.8.2.2 *Transfektion und Proteinisolation in und aus humanen Zellen*

Die Transfektion in HEK293 wurde wie in 2.2.3.3. mit Hilfe von Lipofectamin 2000 vorgenommen.

2.2.3.8.2.2.1 Proteinisolation mit RIPA-Puffer

Zum Aufschluss der Zellen wurde RIPA-Puffer verwendet, dem ein Proteininhibitormix (Complete) zugesetzt wurde. Nachdem das Medium abgesaugt wurde und mit PBS gewaschen worden war, wurde 1 ml RIPA-Puffer auf die Zellkulturschale mit den Zellen gegeben. Die Platte mit RIPA-Puffer wurde 10 min bei 4°C inkubiert und anschließend wurde die Zell-Protein-RIPA-Puffer-Lösung durch eine 21 gauge Kanüle (mit Spritze) auf und abgezogen, was zum Aufschluss der Zellen führte. Die Proteinlösung wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 30 min bei 4°C unter Invertieren inkubiert. Die Zellmembranen und Rückstände wurden bei 10000 U/min und 4°C für 10 min abzentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.3.8.2.2.2 Proteinisolation mit Flag-Aufschlusspuffer

Zellen, deren Protein isoliert werden sollte, wurden von der Zellkulturschale abtrypsiniert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 1 ml Flag-Proteinaufschlusspuffer aufgenommen und 30 min bei 4°C invertiert. Die Zellmembranen und Rückstände wurden bei 10000 U/min und 4°C für 10 min abzentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.3.8.2.3 *(Immuno)Präzipitation*

2.2.3.8.2.3.1 Präzipitation mit GSH-Sepharose

Pro Ansatz wurden 75 µl Glutathion-Sepharose genutzt, die durch zweimaliges Waschen mit PBS vorbereitet wurde. Je 75 µl GSH-Sepharose wurden zu 1 ml Proteinlösung (in RIPA-Puffer) zugegeben und 1 h bei 4°C invertiert. Anschließend wurde 4 min bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Glutathion-Sepharose, die GST-Fusionprotein gebunden haben sollte, wurde 2 x mit 300 µl PBS gewaschen, anschließend mit je 25 µl Proteinladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.3.8.2.3.2 Präzipitation mit Flag-Agarose

Pro Ansatz wurden 50 µl Flag-Agarose eingesetzt, die durch zweimaliges Waschen mit TBS vorbereitet wurde. 50 µl Flag-Agarose wurden zu 1 ml Proteinlösung (in Flag-Proteinauflösungspuffer) gegeben und über Nacht bei 4°C invertiert. Anschließend wurde 5 sek bei 10000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Flag-Agarose, die die Flag-Fusionsproteine gebunden haben sollte, wurde 2 x mit 300 µl TBS gewaschen, anschließend mit je 25 µl Proteinladungspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.3.8.2.4 Western Blot Analyse

20 µl der mit Ladepuffer versetzten und denaturierten Präzipitationsansätze wurden auf einem 10% PAGE-Gel aufgetrennt. Die Gele wurden in einem Western Blot eingesetzt und die Proteine wurden bei 4°C und 350 mA für 1 h in Western-Blot-Puffer II im *Mini Trans-Blot Cell System* (Biorad) auf eine PVDF-Membran übertragen.

2.2.3.8.2.4.1 Detektion mit GST-Antikörpern

Zur Detektion mit GST-Antikörpern wurde die Membran mindestens 1 h in Blockierungslösung geblockt und 3 x mit Waschlösung für je 5 min gewaschen. 25 µg GST-Antikörper wurden in 5 ml Waschlösung verdünnt und der Blot wurde 1 h invertiert. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, gewaschen, 1,4 µg des *Anti-mouse IgG alkaline phosphatase* Antikörpers wurden in 5 ml Waschlösung verdünnt und der Blot wurde 1 h invertiert. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, gewaschen und die Detektion erfolgte mit BCIP/NBT.

2.2.3.8.2.4.2 Detektion mit Flag-Antikörpern

Zur Detektion mit Flag-Antikörpern wurde die Membran mindestens 1 h in Blockierungslösung geblockt und mit Waschlösung für 5 min gewaschen. 180 µg Flag-Antikörper wurden in 25 ml Blockierungslösung verdünnt und der Blot wurde 30 min geschüttelt. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, gewaschen, 1,4 µg des *Anti-mouse IgG alkaline phosphatase* Antikörpers wurden in 25 ml Blockierungslösung verdünnt und der Blot wurde 1 h invertiert. Anschließend wurde 4 x 5 min mit Waschlösung gewaschen und die Detektion erfolgte mit BCIP/NBT.

2.2.3.8.2.4.3 Detektion mit Phospho-Serinspezifischen Antikörpern

Zur Detektion mit Phospho-serinspezifischen Antikörpern wurde die gleichen Bedingungen genutzt, wie bei der Detektion mit GST-Antikörpern (2.2.3.8.2.4.1). Der phospho-serinspezifische Antikörper wurde in einer Konzentration von 1,5 µg/ml eingesetzt.