

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Untersuchungsmaterial

3.1.1. Versuchstiere

Für die Untersuchungen zur CAR-mRNA-Expression während der Organogenese war es erforderlich, Organproben von Rattenfeteten bzw. Ratten unterschiedlichen Alters zu entnehmen. Dazu wurden weibliche Wistar-Ratten im Alter von 10 Wochen verpaart und unter Standard-Tierstallbedingungen gehalten.

Zur Organentnahme wurden vom 17. bis zum 21. Trächtigkeitstag (p.c.) jeweils ein tragendes Tier, vom Tag 1 bis zum Tag 6 nach der Geburt (p.p.) jeweils 3 Jungtiere eines Wurfes, am Tag 32 nach der Geburt ein juveniles Tier sowie ein adultes Tier im Alter von 12 Wochen (84 Tage) mittels Kohlendioxid-Inhalation getötet. Anschließend wurden von folgenden Organen ca. 5 Proben mit einem Gewicht von jeweils 30-50 mg (entspricht einem Probenwürfel von 3-5 mm Kantenlänge bzw. dem gesamten Organ bei den Rattenfeteten) entnommen: Herz, Lunge, Leber, Niere, Gehirn, Skelettmuskulatur.

Die Proben wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.1.2. Zellkultur

Es wurden drei permanente Zelllinien (EA.hy 926, CHO-K1, HT-29) sowie primäre neonatale Rattenkardiomyozyten für die Untersuchungen verwendet. Die Zelllinie EA.hy 926 wurde durch Fusion humaner Nabelschnur-Endothelzellen mit der humanen epithelialen Zell-Linie A549 entwickelt (Edgell *et al.* 1983) und hat viele biochemische und physiologische Eigenschaften der primären Endothelzellen beibehalten. Bei CHO-K1-Zellen handelt es sich um Ovarien-Fibroblasten vom chinesischen Hamster. Die HT-29-Zelllinie ist eine humane kolorektale Karzinomzelllinie. Primäre neonatale Rattenkardiomyozyten (nRKMZ) wurden freundlicherweise von Dr. Vetter (Institut für Pharmakologie des UKBF der FU Berlin) zur Verfügung gestellt. Die permanenten Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Die nRKMZ wurden nach der Isolierung aus den Herzen von 4 Tage alten Ratten bei 37°C ohne CO_2 kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte bei den permanenten Zelllinien alle 3-4 Tag, bei den Rattenkardiomyozyten täglich. Für die Zellkulturexperimente wurden die permanenten Zelllinien grundsätzlich auf 24-Well-Zellkulturplatten (Nunc), die neonatalen

Rattenkardiomyozyten sowohl auf 24- als auch auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät, wobei 1ml Medium je Well verwendet wurde.

Folgende Zellkulturmedien wurden verwendet:

Zelllinie	Zellkulturmedium
EA.hy 926	Dulbecco's HAT (Gibco BRL) mit 10% FKS (CCPRO) und 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma)
CHO-K1	NUT:MIXF-12 (HAM) (Gibco BRL) mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin
HT-29	RPIM1640 (Gibco BRL) mit 10 % FKS und 1% Penicillin/Streptomycin
primäre Rattenkardiomyozyten	CMRL 1415-ATM mit 10% FKS und 0,02 mg/ml Gentamycin (alle Reagenzien von Biochrom KG), pH 7,4 eingestellt mit 1 N NaOH (Sigma)

Zur Gewinnung der Zellen und zur Bestimmung der Zellzahl bei den permanenten Zelllinien wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums mit 1 X PBS (Gibco BRL) gewaschen und 0,5 ml 0,25%iges Trypsin-EDTA (Sigma) zugegeben, welches nach 20 s sofort entfernt wurde. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschale wurde unter einem Mikroskop kontrolliert, die Reaktion durch Zugabe von 1 ml frischem Medium gestoppt und die Zellen gezählt. Dazu wurden die in 1 ml Medium resuspendierten Zellen mit 100 µl 1 X PBS (Gibco BRL) und 100 µl Tryptophanblau (Sigma) versetzt, gevortext und anschließend in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt. Die neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden bereits im Zusammenhang mit der Isolierung in der erforderlichen Dichte ausgesät.

3.2. RNA- und DNA-Präparation

3.2.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe mit RNAClean™

Diese Methode beruht auf einer Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA. Es wurden 30 mg Gewebe in 1 ml RNAClean™ (Hybaid AGS) unter Verwendung

eines Ultra Turrax bei 22000 min^{-1} 30 s homogenisiert (Spülung des Homogenisierstabes nach jeder Probe mit 1%igem SDS* und autoklaviertem Aqua bidest.). Die weitere Präparation wurde nach dem *RNAclean Präparationsprotokoll für Gewebe* des Herstellers und auf Eis durchgeführt. Abschließend wurde das RNA-Pellet in 30 μl RNase-freiem Wasser (Amersham) gelöst, für 10 min bei 60°C inkubiert und auf Eis abgekühlt.

*Stammlösung 10% SDS:

100 g Dodecylsulfat (SDS) (Sigma)
in 1 l Aqua bidest. lösen

weitere benötigte Reagenzien: Chloroform (Sigma)

Isopropanol (Sigma)
70% Ethanol
(Mallinckrodt Baker)

3.2.2. Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen mit *RNAclean*TM

Die Zellen eines Wells wurden mit 1 ml *RNAclean*TM direkt auf der Zellkulturplatte lysiert und anschließend die RNA nach dem *RNAclean Präparationsprotokoll für adhärenente Zellen* des Herstellers auf Eis präpariert. Abschließend wurde das RNA-Pellet in 30 μl RNase-freiem Wasser (Amersham) gelöst, für 10 min bei 60°C inkubiert und auf Eis abgekühlt.

weitere benötigte Reagenzien: Chloroform (Sigma)

Isopropanol (Sigma)

70% Ethanol (Mallinckrodt Baker)

3.2.3. Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe mittels *RNeasy Mini Kit*

Das Prinzip des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen GmbH) beruht auf einer Bindung der RNA an eine Silika-Gel-Membran, auf der die RNA durch mehrere Waschschrte gereinigt und anschließend eluiert wird. Dazu wurden 30 mg Gewebe, mit Ausnahme der Leber, von der aufgrund des höheren RNA-Gehaltes nur 20 mg eingesetzt wurden, mit 600 μl des mit β -Mercaptoethanol (Sigma) komplettierten *RLT-Lysis-Puffer* versetzt und im Ultra Turrax für 30 s homogenisiert. Nach jeder Probe wurde der Homogenisierstab mit 1%igem SDS und autoklaviertem Aqua bidest. gespült. Die weitere Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers anhand des *RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues*, wobei die RNA-Elution in 30 μl des im Kit enthaltenen RNase-freien Wassers erfolgte.

3.2.4. DNase I-Behandlung der präparierten RNA

Die DNase I-Behandlung der präparierten RNA, die in der kompetitiven RT-PCR eingesetzt wurde, war erforderlich, um Rest-DNA zu entfernen. Im Anschluss an die DNase I-Behandlung wurde die RNA-Integrität durch die Darstellung der 18S- und 28S-rRNA im Agarosegel (siehe 3.4.1.) überprüft. Die Kontrolle auf DNA-Freiheit erfolgte mittels PCR (siehe 3.5.2. und 3.5.3.), wobei in einem PCR-Ansatz bis zu 4 RNA-Proben von je 0,5 µl eingesetzt wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Proben bei -80°C aufbewahrt.

3.2.4.1. Kombination von RNA-Präparation mittels *RNeasy Mini Kit* und DNase I-Behandlung

Die Präparation von Gesamt-RNA mit integrierter DNase I-Behandlung erfolgte nach dem *RNase-Free DNase Set Protocol* (Qiagen GmbH). Dabei erfolgte die DNase I-Behandlung während die RNA an die Membran gebunden ist. Die Verfahrensweise vom Homogenisieren der Gewebeprobe bis zum ersten Waschschrift der membrangebundenen RNA war dabei analog dem *RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues* (vgl. 3.2.3.) und folgte dann dem *RNase-Free DNase Set Protokoll* (Qiagen GmbH), wobei 10 µl DNase I-Stammlösung (1500 Kunitz-Einheiten lyophilisierte RNase-freie DNase I [Qiagen GmbH] in 550 µl RNase-freiem Wasser gelöst) eingesetzt wurden und die RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert wurde.

3.2.4.2. DNase I-Behandlung mit anschließender RNA-Aufreinigung mittels *RNeasy Mini Kit*

6 µl der präparierten RNA (das entspricht einer RNA-Menge von maximal 20 µg) wurden mit 10 µl 10 X DNase I-Reaktionspuffer (Gibco BRL) und 6 µl (60 Kunitz-Einheiten) DNase I RNase-frei (Boehringer Mannheim bzw. Roche) versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt. Der Ansatz erfolgte auf Eis in RNase-freien 1,5 ml-Reaktionsgefäßen. Die Proben wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt.

Die anschließende RNA-Aufreinigung erfolgte nach dem *RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup im RNeasy Mini Handbook* (Qiagen GmbH), wobei das gesamte Volumen von 100 µl eingesetzt wurde und die RNA-Elution in 30 µl RNase-freiem Wasser erfolgte.

3.2.4.3. DNase I-Behandlung ohne anschließende RNA-Aufreinigung

5 µl RNA (entspricht einer Menge von maximal 15 µg) wurde mit 2,5 µl 10 X DNase I-Reaktionspuffer (Gibco BRL) und 0,5 µl (5 Kunitz-Einheiten) DNase I RNase-frei (Gibco BRL) versetzt und auf ein Endvolumen von 25 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Der Ansatz erfolgte auf Eis in RNase-freien Reaktionsgefäßen. Die Probe wurde 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 2,5 µl 25 mM EDTA (Gibco BRL) versetzt, die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C abgestoppt und die Probe sofort auf Eis abgekühlt.

3.2.5. Präparation von genomischer DNA und Adenovektor-DNA aus transduzierten Zellen

Genomische zelluläre und AdV-DNA aus transduzierten Zellen wurde mit dem *E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II* (Peqlab Biotechnologie GmbH) anhand des *Isolierungsprotokolls für eukaryotische Zellen und Gewebe* nach den Angaben des Herstellers präpariert und in 200 µl Aqua bidest. gelöst. Anschließend erfolgte eine Aufkonzentrierung der DNA. Dazu wurde diese mit 4 µl 5 M NaCl (Sigma) und 400 µl 100%igem Ethanol (Mallinckrodt Baker) versetzt, durch Vortexen sorgfältig gemischt, für 20 min bei -20°C gefällt, danach 15 min bei 10000 min⁻¹ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde mit 700 µl 80%igem Ethanol (Mallinckrodt Baker) mittels 2-minütiger Zentrifugation bei 10000 min⁻¹ gewaschen und der Überstand verworfen. Abschließend wurde die DNA 2 min luftgetrocknet und in 20 µl Aqua bidest. gelöst.

3.2.6. Präparation von Adenovektor-DNA aus Adenovektor-Präparationen

Zur Überprüfung der korrekten Insertion der Transgene in die adenovirale DNA war es notwendig, AdV-DNA zu präparieren. Dazu wurden 200 µl AdV-Lösung (ca. 2 x 10¹¹ Partikel) mit 26,6 µl Lysispuffer* bei 37°C für 1 h inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Danach wurden 40 µl 5 M NaCl (Sigma) zugegeben und gemischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; Sigma). Das Gemisch wurde

gevoertext, bei 3000 min^{-1} für 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut mit $200 \mu\text{l}$ Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; Sigma) versetzt und bei 3000 min^{-1} für 5 min zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde anschließend nach Zugabe von 4 ml 100%igem Ethanol (Mallinckrodt Baker) für 1 h bei -20°C gefällt. Danach wurde für 20 min bei 4°C und 14000 min^{-1} zentrifugiert, das Pellet einmal mit $200 \mu\text{l}$ 70%igem Ethanol (Mallinckrodt Baker) mittels 10-minütiger Zentrifugation bei 14000 min^{-1} gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde abschließend in $20 \mu\text{l}$ TE-Puffer** gelöst.

* Lysispuffer:

3 μl Proteinase K (10 mg/ml)(Boehringer Mannheim)
 17,6 μl 10 % SDS (Sigma)
 6 μl 0,5 M EDTA (Sigma)
 mit Aqua bidest. auf 300 μl auffüllen

**TE-Puffer:

10 mM Tris.HCl (pH 8,0) (Merck)
 1 mM EDTA (pH 8,0)(Sigma)

3.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten nach Agarosegelelektrophorese

Die durch Agarosegelelektrophorese (3.4.1.) unter Einsatz eines Größenmarkers charakterisierten DNA-Fragmente wurden während der Sichtbarmachung auf dem Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Die Aufarbeitung erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen GmbH) anhand des *QIAquick Gel Extraction Kit Protocol* unter Verwendung einer Mikrozentrifuge nach den Angaben des Herstellers. Die DNA-Fragmente wurden abschließend in $30 \mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser gelöst.

3.2.8. RNA- und DNA-Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA und der DNA erfolgte fotometrisch mit dem UV-Spektrometer. Dabei wurden die RNA-Proben in Abhängigkeit von der erwarteten Konzentration 1:10 bis 1:70, die DNA-Proben im allgemeinen 1:70 mit Aqua bidest. verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) bestimmt (eine A_{260} -Einheit entspricht dabei einer Konzentration von $40 \mu\text{g RNA/ml}$ bzw. $50 \mu\text{g DNA/ml}$).

Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

RNA-Konzentration der Probe in $\mu\text{g}/\mu\text{l} = (A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40 \mu\text{g/ml}):1000$.

Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

DNA-Konzentration der Probe in $\mu\text{g}/\mu\text{l} = (A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 \mu\text{g}/\text{ml}):1000$.

Der Quotient A_{260}/A_{280} erlaubt in Abhängigkeit vom pH-Wert der Verdünnungslösung eine Aussage über den Reinheitsgrad der RNA bzw. DNA. Hochreine RNA bzw. DNA hat bei einem pH-Wert von 7,5 einen A_{260}/A_{280} -Quotienten von 1,8 bis 2,1.

3.3. Konstruktion der verkürzten RNA-Längenstandards

Verkürzte RNA-Längenstandards (Kompetitoren) für rCAR1, rCAR2 und GAPDH wurden zur Quantifizierung der rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression mit Hilfe der kompetitiven quantitativen RT-PCR benötigt. Diese Längenstandards weisen eine Deletion von 10 bp auf, die notwendig ist, um die daraus entstehenden Standard-PCR-Produkte von den nativen PCR-Produkten unterscheiden zu können. Der verkürzte RNA-Längenstandard für GAPDH war bereits im Labor vorhanden (Fechner *et al.* 1999). Ein Schema zur Konstruktion des verkürzten Längenstandards befindet sich im Anhang (9.3.).

3.3.1. Mutagenese- und Overlap-PCR

Die Mutagenese-PCR erfolgte nach Methode 3.5.2., wobei spezielle Mutagenese-Primer zum Einsatz kamen (Primerpaare rCAR:969s/rCAR:Mut2a, rCAR:Mut1s/rCAR1:1097a, rCAR:Mut1s/rCAR2:1096a [siehe 9.1.]).

Als DNA-Matrize dienten rCAR1- bzw. rCAR2-cDNA-Fragmente, die durch eine PCR (3.5.2.) und anschließende Gelextraktion (3.2.7.) gewonnen wurden [Primerpaare mCAR:704s/hCAR:1157a für CAR1 bzw. mCAR:334s/hCAR:1130a für CAR2 (siehe 9.1.), DNA-Matrize: cDNA-Fragmente, die aus Ratten-Gesamt-RNA revers transkribiert wurden, nachdem die RNA aus Lebergewebe nach Methode 3.2.1. präpariert worden war].

Die mittels Mutagenese-PCR erhaltenen Fragmente wurden nach Agarosegelelektrophorese (3.4.1.) aus dem Gel isoliert (3.2.7.) und dienten als Matrize in der sich anschließenden Overlap-PCR. Deren PCR-Ansatz erfolgte ebenfalls nach Methode 3.5.2., wobei jedoch die als Matrize für die PCR dienenden Fragmente rCAR:969s-rCAR:Mut2a und rCAR:Mut1s-rCAR1:1097a bzw. rCAR:969s-rCAR:Mut2a und rCAR:Mut1s-rCAR2:1096a gleichzeitig eingesetzt wurden. Folgende Primerpaare wurden verwendet: rCAR:969s/rCAR1:1097a und rCAR:969s/rCAR2:1096a. Die erhaltenen PCR-Fragmente konnten nach

Agarosegelelektrophorese (3.4.1.) und Isolierung aus dem Gel (3.2.7.) für die Ligation und Transformation eingesetzt werden.

3.3.2. Ligation und Transformation

Die Ligation der Längenstandard-PCR-Produkte und deren Transformation erfolgte mittels *pCR 2.1.TOPO vector-Kit* (Invitrogen).

Zur Herstellung der *TOPO cloning*-Reaktionslösung wurden 20 ng DNA mit sterilem Wasser (im Kit enthalten) auf ein Volumen von 4 µl gebracht, mit 1 µl *pCR-TOPO-vector* durch Umrühren gemischt, nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur kurz zentrifugiert und auf Eis aufbewahrt. 2 µl dieser Lösung wurden zu dem zuvor auf Eis aufgetauten und mit 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol (eisgekühlt; Sigma) versetzten Reaktionsgefäß mit den kompetenten *one shot*-Zellen (Invitrogen) gegeben und durch Umrühren vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C. Anschließend wurden 250 µl *SOC-Medium* (im Kit enthalten) zugegeben, 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert und der Ansatz auf Eis aufbewahrt. Auf zwei, der auf 37°C erwärmten und zuvor mit 40 µl *X-gal* (Stammlösung 40 mg/ml; Stratagene) bestrichenen LB-Agar-Platten* mit 50 µg Ampicillin (Sigma) /ml wurden 50 und 100 µl Transformationsansatz ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 weiße oder hellblaue Kolonien mit einem autoklavierten Holzzahnstocher abgenommen (gepickt), je eine Kolonie in ein Röhrchen mit 1,5 ml LB-Medium** mit 50 µg Ampicillin (Sigma) /ml überführt und bei 37°C über Nacht geschüttelt (225 min⁻¹).

* LB-Agar-Platten: 32 g Lennox L Agar (Gibco BRL) mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen, für 15 min auf 121°C erhitzen und gießen

** LB-Medium: 20 g Lennox L Broth Base (Gibco BRL) mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen, für 15 min auf 121°C erhitzen

3.3.3. Plasmidpräparation

Die Präparation und Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem *Flexi Prep Kit* (Pharmacia Biotech). Dazu wurden die 1,5 ml der Übernachtskultur 30 s bei 14000 min⁻¹ zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Der Bodensatz wurde mit 200 µl *Solution I* durch Vortexen resuspendiert und mit 200 µl der mit 130 ml Aqua bidest. komplettierten *Solution II* durch

Schwenken gemischt. Nach der Zugabe von 200 µl *Solution III* und Mischen durch Schwenken wurde 5 min bei Raumtemperatur und 14000 min⁻¹ zentrifugiert. Der in ein neues Röhrchen überführte Überstand wurde mit 420 µl Isopropanol (Sigma) durch Vortexen gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 10 min bei 14000 min⁻¹ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vollständig entfernt (Röhrchen umdrehen und auslaufen lassen), das verbleibende DNA-Pellet mit 150 µl der *SephaglasTM FP-Suspension* (im Kit enthalten) für 1 min vorsichtig gevortext und 15 s bei 14000 min⁻¹ zentrifugiert. Nach der vorsichtigen Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit 200 µl Waschpuffer durch vorsichtiges Vortexen und Zentrifugieren für 15 s bei 14000 min⁻¹ gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, 300 µl 70%iges Ethanol (Mallinckrodt Baker) zugegeben, vorsichtig gevortext und 15 s bei 14000 min⁻¹ zentrifugiert. Das nach Abnahme des Überstandes verbleibende Pellet wurde gevortext, 10 min luftgetrocknet und nach der Zugabe von 25 µl Aqua bidest. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei gelegentlich gevortext wurde. Der nach 1-minütigem Zentrifugieren bei 14000 min⁻¹ entstandene, die DNA enthaltende Überstand wurde abschließend in ein neues Röhrchen überführt und bei -20°C gelagert.

3.3.4. RNA-Transkription

Vor der Transkription der DNA in RNA wurden je 3-5 µl der erhaltenen Plasmid-DNA zum einen mit *EcoRI* geschnitten (siehe 3.4.2.), um sie mittels Agarosegelelektrophorese auf das Vorhandensein des eingebauten deletierten Fragmentes zu überprüfen und zum anderen mit *HindIII* geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Gelextraktion durch Sequenzierung (3.4.3.) auf das Vorhandensein der 10 bp-Deletion überprüft. Dann erfolgte eine PCR (3.5.2.) mit den Primerpaaren M13fo/rCAR1:1097a bzw. M13fo/rCAR2:1096a mit anschließender Gelextraktion der DNA (3.2.7.). Diese DNA wurde für die Transkription in RNA verwendet und dazu in einem Reaktionsgefäß mit folgenden Komponenten gemischt:

Komponenten	Menge
template-DNA	2 µl (100 ng)
Nukleotide (NTP; Boehringer Mannheim) je 100 mM	je 0,2 µl
10 X Transkriptionspuffer (Boehringer Mannheim)	2 µl
T7 RNA-Polymerase 20 Einheiten/µl (Boehringer Mannheim)	2 µl
RNase-Inhibitor 40 Einheiten/µl (Boehringer Mannheim)	0,5 µl
Aqua bidest.	ad 20 µl

Anschließend wurden die Proben 2 h bei 37°C inkubiert und danach die Reaktion durch die Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0; Sigma) und Erhitzen auf 65°C abgestoppt. Im Anschluss daran wurde noch vorhandene DNA durch eine DNase I-Behandlung nach Methode 3.2.4.3. entfernt und die RNA in einer PCR (3.5.2.) auf DNA-Freiheit überprüft. Die Quantifizierung der RNA erfolgte fotometrisch (3.2.8.), der Konzentrationsvergleich zwischen rCAR1- und rCAR2-Längenstandard mittels Dot-blot-Hybridisierung (3.6.1., 3.6.2.2., 3.6.3.). Die Lagerung der RNA-Längenstandards erfolgte bei –80°C.

3.4. Analyse von Nukleinsäuren

3.4.1. Agarosegelelektrophorese

Die horizontale Gelelektrophorese wurde sowohl zur Kontrolle der RNA-Integrität nach der Präparation durch Nachweis der 18S- und 28S-rRNA als auch zur Charakterisierung von PCR-Produkten und zur Isolierung einzelner DNA-Fragmente eingesetzt. In Abhängigkeit von der erwarteten Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8 bis 3,5%ige, zur RNA-Kontrolle 1%ige Agarosegele [Lösung der Agarose (Saekem LE Agarose; FMC Bio-Products) in 100 ml 1 X TAE-Puffer* durch Erhitzen und Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (Konzentration 10 mg/ml; Sigma)] verwendet. 2 µl (RNA, Charakterisierung und Konzentrationsbestimmung von PCR-Produkten) bzw. 40-50 µl (Isolierung von DNA-Fragmenten) der Probe wurden mit 1/10 Volumen Ladepuffer** versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der RNA bzw. DNA erfolgte in 1 X TAE-Puffer* bei 120 V. Anschließend konnte die RNA bzw. DNA auf dem Transilluminator sichtbar gemacht werden. Durch Vergleich mit einem gleichzeitig aufgetragenen DNA-Marker X (Boehringer Mannheim) konnte die DNA-Fragmentgröße kontrolliert werden.

* Stammlösung 20 X TAE (pH 8,0)

0,8 M (96,8g) Tris-Base (Trizma-Base; Sigma)
22,8 ml Essigsäure (Sigma)
40 ml 0,5 M EDTA (Sigma)
Aqua bidest. ad 1000 ml

** Ladepuffer

4 g D(+)Sucrose (Sigma)
25 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung (Sigma)
Aqua bidest. ad 1 ml

3.4.2. Restriktionsfragmentanalyse

Die Restriktion von 500 ng Plasmid-DNA erfolgte in einem 20 µl-Reaktionsansatz unter Verwendung des entsprechenden 10 X-Reaktionspuffers (New England Biolabs) und 5 Einheiten *EcoRI* bzw. *HindIII* (New England Biolabs) über 2 h bei 37°C .

Zur Restriktion adenoviraler Vektor-DNA wurde 1 µg DNA mit 20 Einheiten *HindIII* über Nacht bei 37°C in einem 50 µl-Reaktionsansatz unter Verwendung des entsprechenden 10 X-Reaktionspuffers geschnitten. Die Größe der sichtbaren Banden wurde mittels Agarosegelelektrophorese (3.4.1.) überprüft.

3.4.3. DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung der rCAR1- und rCAR2-Längenstandards wurden 400 ng geschnittene Plasmid-DNA, für die Sequenzierung zur Überprüfung der AdV 50-100 ng PCR-Fragment verwendet, 2 µl *Big Dye Prämix* (Applied Biosystems) und 1 µl 10 µM Primer zugefügt und mit Aqua bidest. auf 10 µl aufgefüllt. Die Sequenzierung der rCAR1- und rCAR2-Längenstandards erfolgte unter Verwendung des Primers M13fo (siehe 9.1.). Zur Überprüfung der korrekten Insertion und der Sequenz der hCAR-cDNA im Ad5CMVhCARs wurden PCR-Fragmente mit dem Primerpaar *CMV480s/pZS2-3'UTRA* aus der AdV-DNA amplifiziert (Methode 3.5.2.) und mit diesen sowie mit internen transgenspezifischen Primern in beide Richtungen sequenziert. Die Sequenzreaktion erfolgte im Gene Amp Thermocycler 9700 über 25 Zyklen mit jeweils:

96°C 10 s

50°C 5 s

60°C 4 min.

Nach dem letzten Zyklus wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

Im Anschluss daran wurde die DNA für die Sequenzierung aufgearbeitet. Dazu wurden 90 µl Aqua bidest., 10 µl 3M Natriumazetat (pH 4,8; Merck) und 250 µl 100%iges Ethanol (Mallinckrodt Baker) zur DNA gegeben und 15 min bei 14000 min⁻¹ zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgenommen, 400 µl 70%iges Ethanol (Mallinkrodt Baker) zugegeben, gevortext und 5 min bei 14000 min⁻¹ zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen, die DNA 10 min im Vakuum getrocknet, mit 25 µl *Template Supression Reagent (TSR)* (Applied Biosystems) gemischt und für 2 min auf 90°C erhitzt. Nach dem Abkühlen erfolgte die Detektion mit Hilfe des Gene

Analyzer ABI 310 (Applied Biosystems) unter Verwendung der *ABI DNA Sequencing Analysis Software*.

3.5. Quantitative kompetitive RT-PCR

3.5.1. Reverse Transkription

100 ng Gesamt-RNA (DNase I-behandelt und in PCR kontrolliert) wurden in einem Kühlblock bei 4°C mit einer definierten Menge rCAR1- bzw. rCAR2- und GAPDH-Standard-RNA und 1 µl Random-Primer (Gibco BRL) gemischt und mit RNase-freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Die Proben wurden für 10 min auf 70°C erhitzt, anschließend sofort auf Eis abgekühlt und nach Abzentrifugieren des Kondenswassers mit einem ebenfalls auf einem Kühlblock (4°C) hergestellten Mix aus 4µl 5 X-First-Strand-Puffer (Gibco BRL), 2µl 0,1 M DTT (Gibco BRL), 1µl 10mM dNTP-Mix (Boehringer Mannheim) und 1µl Superscript II RNaseH⁻ Reverse Transkriptase (Gibco BRL) versetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte unter folgenden Bedingungen im Trio Thermoblock V2.23:

25°C	10 min
42°C	50 min
70°C	15 min.

Die Proben wurden auf 4°C abgekühlt, bei einer späteren Verwendung bei -20°C gelagert oder sofort in der PCR eingesetzt.

3.5.2. PCR mit *Taq*-Polymerase

Die PCR mit *Taq*-Polymerase wurde für verschiedene Zielsetzungen eingesetzt. In Abhängigkeit davon kamen unterschiedliche Reaktionsansätze (Reaktionsvolumen) und Reaktionsbedingungen (Zykluszahl, Annealingtemperatur) zum Einsatz. Die für GAPDH, rCAR1 und rCAR2 jeweils separat durchgeführte kompetitive PCR und die PCR zur Kontrolle von RNA auf Rest-DNA nach Dnase I-Behandlung erfolgte in Reaktionsansätzen von 20 µl, die PCR zur Amplifikation und späteren Isolierung spezifischer DNA-Fragmente, die Mutagenese- und die Overlap-PCR in 50 µl-Reaktionsansätzen.

Für die GAPDH-, rCAR1- und rCAR2-PCR wurden unterschiedlich fluoreszenz-markierte Primer verwendet, die eine spätere gleichzeitige Analyse der Amplifikate im Genetic Analyzer ABI 310 ermöglichten (Primerpaare GAPDH.682s/GAPDH.826a,

rCAR.981s/rCAR1.1097a, rCAR.981s/rCAR2.1097a (siehe 9.1.), wobei der fluoreszierende Farbstoff (FAM bzw. TAMRA) an das 5'-Ende des *sense*-Primers gekoppelt war).

Die PCR-Ansätze erfolgten nach den in Tab. 3.1. aufgeführten Protokollen.

Reagenzien	Einsatz in 20 µl-PCR	Einsatz in 50 µl-PCR
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (PE Applied Biosystems)	0,2 µl	0,25 µl
10 X-PCR-Reaktionspuffer mit 15 mM MgCl ₂ (PE Applied Biosystems)	2,0 µl	5,0 µl
dNTP-Set 10 mM (Boehringer Mannheim)	0,5 µl	1,0 µl
PCR-Primer (siehe 9.1.) (TIB MOL BIOL)	je 1,0 µl eines 10 µM Primers	je 1,0 µl eines 100 µM Primers
Matrize (Template-DNA)	1 µl cDNA bzw. bis 4 mal 0,5 µl RNA	5-10 ng DNA
Aqua bidest.	ad 20 µl	ad 50 µl

Tab. 3.1.
PCR-Reaktionsansätze

Die PCR erfolgte im Gene Amp Thermocycler 9700 unter diesen Reaktionsbedingungen:

1. Initialdenaturierung bei 94°C für 2 min
2. unterschiedliche Anzahl Zyklen (im allgemeinen 40, für kompetitive PCR siehe Ergebnisse) mit jeweils:
 - Denaturierung bei 95°C 30 s
 - Primeranlagerung (Annealingtemperatur siehe 9.1.) 30 s
 - Extension bei 72°C 30 s
3. Inkubation bei 72°C für 5 min
4. Kühlung bis zur Probenentnahme bei 4°C

3.5.3. Quantitative Analyse der PCR-Produkte

Die fluoreszenz-markierten Amplifikationsprodukte wurden, nachdem je 0,5 µl CAR- und GAPDH-PCR-Produkt in 12 µl *TSR* (4°C; Applied Biosystems) im Trio-Thermoblock für 2

min auf 95°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt wurden, durch Kapillarelektrophorese mit Polymer 4 (PE Applied Biosystems) im Genetic Analyzer ABI 310 nachgewiesen. Dabei zeigt die ABI 310 *Collection Software* einen Ausschlag in Form einer schnell an- und absteigenden Kurve (peak) für jedes Signal, der in Abhängigkeit von der Art der verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe unterschiedliche Farben besitzt (siehe Ergebnisse Abb. 4.4.). Die Fläche und die Höhe jedes Peaks sind abhängig von der Intensität des Signals und werden durch die Software *GeneScan 2.1.1* (ABI) errechnet, wobei nur die Peakfläche zur Auswertung genutzt wurde. Zur Überprüfung der Fragmentgröße wurde ein Größenmarker (GS-350-TAMRA; Applied Biosystems) mitgeführt.

Das Verhältnis zwischen nativem CAR-PCR-Produkt und Standard-CAR-PCR-Produkt wurde zur Berechnung der CAR-mRNA-Konzentration im entsprechenden Gewebe genutzt. Unterschiede bei den in der reversen Transkription eingesetzten RNA-Mengen wurden durch Berücksichtigung des Verhältnisses zwischen nativem GAPDH-PCR-Produkt und Standard-GAPDH-PCR-Produkt korrigiert. Die folgende Formel wurde zur Berechnung genutzt:

$$\frac{\text{Wert (Peakfläche) CAR}}{\text{Wert CAR-Standard}} \times \text{Konzentration CAR-Standard} \\ \frac{\text{Wert GAPDH}}{\text{Wert GAPDH-Standard}} \times \text{Konzentration GAPDH-Standard} = \text{relative CAR-Expression}$$

Die so ermittelte relative CAR-Expression wurde dann durch die Multiplikation mit einem GAPDH-Korrekturfaktor (siehe 4.1.7.) korrigiert, um mögliche entwicklungs- oder organbedingte Unterschiede in der GAPDH-Expression auszugleichen.

3.6. DNA- und RNA-Hybridisierungstechniken

3.6.1. Herstellung von Einzelstrang-DNA-Sonden mittels „PCR-like“-Markierung

Als Sonde für die Hybridisierung diente mit ³²P-dCTP radioaktiv markierte Einzelstrang-DNA, die unter Verwendung des entsprechenden *antisense*-Primers hergestellt wurde.

Dazu wurde folgendes Protokoll verwendet:

Reagenzien	eingesetzte Menge
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μ l) (PE Applied Biosystems)	0,25 μ l
10X-PCR-Reaktionspuffer (PE Applied Biosystems)	2,5 μ l
1 mM dNTPs (dATP, dGTP, dTTP) (Boehringer Mannheim)	0,5 μ l
³² P-dCTP (10 μ Ci/ μ l) (Amersham)	abhängig von der Expressionsstärke der gesuchten RNA
Primer (100 μ M)(TIB MOL BIOL)	0,25 μ l
DNA-Matrize (50 ng/ μ l)	2,0 μ l
Aqua bidest.	ad 25 μ l
Mineralöl (Sigma)	überschichten mit 20 μ l

- Für die Herstellung der GAPDH-spezifischen Sonde wurde der Primer GAPDH.826a und das mit den Primern GAPDH.381s/GAPDH.826a hergestellte PCR-Fragment verwendet. Es wurden 1 μ l ³²P-dCTPs eingesetzt.
- Für die Herstellung der 18S-rRNA-spezifischen Sonde wurde der Primer 18S-rRNA.685a und das mit den Primern 18S-rRNA.216s/18S-rRNA.685a hergestellte PCR-Fragment verwendet, dem Reaktionsgemisch 0,1 M dCTP zugemischt und 1 μ l ³²P-dCTPs eingesetzt.
- Für die Herstellung der rCAR-spezifischen Sonde wurde der Primer rCARMut2a und das mit den Primern hCAR704s/hCAR1157a hergestellte PCR-Fragment verwendet und 3 μ l ³²P-dCTPs eingesetzt.
- Für die Herstellung der Luciferase-spezifischen Sonde wurde der Primer Luc1071a und das mit den Primern Luc334s/Luc1071a hergestellte PCR-Fragment verwendet und 3 μ l ³²P-dCTPs eingesetzt.

Die PCR erfolgte im Cetus DNA Thermal Cycler entsprechend der unter 3.5.2. aufgeführten Bedingungen über 33 Zyklen.

Die Sonden wurden über eine Sephadex G50 (Sigma)-Lösung enthaltende Säule aufgereinigt und die radioaktive Markierung der aufgefangenen Sonde durch die Messung der Radioaktivität mit dem Bioscan QC-2000 überprüft.

3.6.2. Nukleinsäure-Transfertechniken

3.6.2.1. Northern-Blot

Zur Herstellung des 1%igen Agarosegels wurde die Agarose (Seakem LE Agarose; FMC Bio-Products) in autoklaviertem 1 X MOPS-Puffer* gelöst, nach dem Abkühlen auf 60°C 6% Formaldehyd (Formaldehyd, 37%; Sigma) zugegeben und das Gel in die zuvor mit 1%igem SDS gründlich gereinigte und mit Aqua bidest. gespülte Kammer, einschließlich Kamm, gegossen. 10 bis 25 µg Gesamt-RNA wurden auf Eis mit 10 µl Ladepuffer** und 0,1 µl Ethidiumbromid (Ethidiumbromid 10 mg/ml; Sigma) versetzt und auf ein Volumen von 25 µl mit RNase-freiem Wasser (Amersham) aufgefüllt. Die Proben wurden 5 min auf 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt, kurz anzentrifugiert um entstandenes Kondenswasser zu entfernen und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gestellt. Die elektrophoretische Auftrennung der aufgetragenen Proben erfolgte in 1 X MOPS-Puffer bei 100-120 V. Nach Kontrolle der 18S- und 28S-rRNA-Banden mit dem Transilluminator wurde das Gel 2 mal für 30 min in Aqua bidest. gewässert. Der Aufbau der Bloteinrichtung erfolgte anhand der Abb. 3.2., wobei das Gel mit den Geltaschen nach unten auf 3MM Chromatographiepapier (Whatman International Ltd.) liegt. Als Transferpuffer diente 10 X SSC***. Der RNA-Transfer auf den Filter (Hybond™ N-Hybridization Membrane; Amersham) erfolgte in 12 bis 16 Stunden.

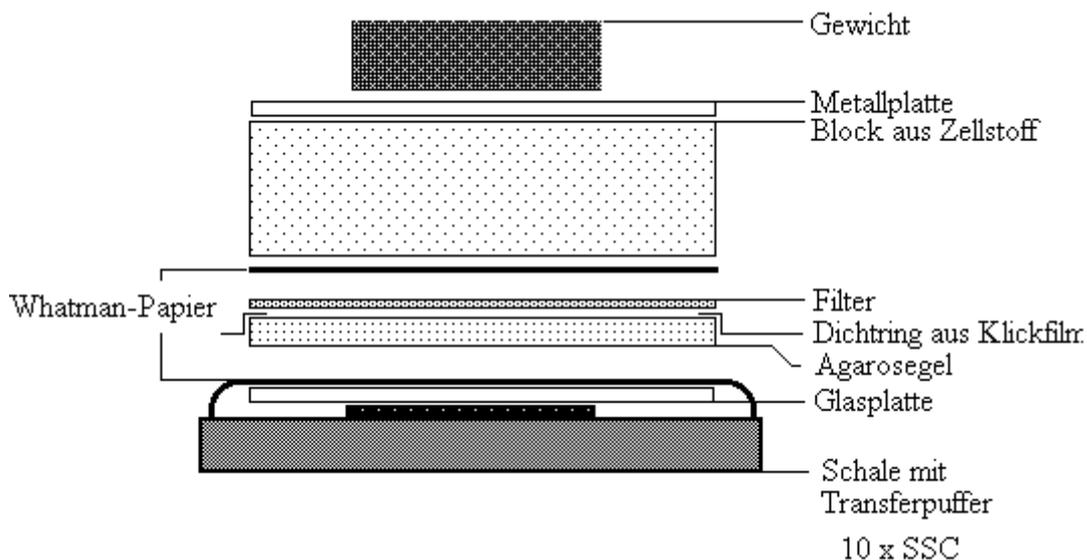


Abb. 3.2.

Schematische Darstellung zum Aufbau des Northern/Southern-Blot-Transfers (modifiziert nach Sambrook *et al.* 1989)

Danach wurde der vollständige Transfer der RNA durch eine Überprüfung des Gels unter dem Transilluminator kontrolliert. Die Position der 18S- und 28S-rRNA-Bande wurde auf dem Filter markiert, der Filter beschriftet, 30 min an der Luft getrocknet und anschließend die RNA durch 2-maliges Cross-linken unter UV-Licht bei 1200 $\mu\text{J} \times 100$ an den Filter gebunden. Die Aufbewahrung des Filters erfolgte in einer sterilen Klarsichttüte bei 4°C.

* Stammlösung 10 X MOPS-Puffer (autoklavieren, abgedunkelt lagern)

0,2M MOPS (6-Morpholinpropansulfonsäure)(Sigma)

0,05 M Na-Acetat (Merck)

0,01 M EDTA (pH 7,0; Sigma)

** Ladepuffer (pro 1,5 ml)

720 μl deionisiertes Formamid (Amresco)

260 μl Formaldehyd 37% (Sigma)

160 μl 10X MOPS-Puffer

80 μl gesättigtes Bromphenolblau (Sigma)

180 μl RNase-freies Wasser (Amersham)

*** Stammlösung 20 X SSC-Puffer

3 M (175,3 g/l) NaCl (Sigma)

0,3 M (88,2 g/l) Na-zitrat (Sigma)

3.6.2.2. Dot-Blot

Die Dot-Blot-Hybridisierung wurde zur Überprüfung der Konzentration der verkürzten RNA-Längenstandards für rCAR1 und rCAR2 durchgeführt. Dazu wurden 2 μl einer definierten Menge (10 pg, 100 pg, 1 ng) Längenstandard für 5 min auf 65°C erhitzt, kurz zentrifugiert und davon 1 μl auf eine HybondTM N-Hybridization Membrane (Amersham) aufgetropft, getrocknet, durch 2-maliges Cross-linken unter UV-Licht bei 1200 $\mu\text{J} \times 100$ fixiert und anschließend unter Verwendung einer rCAR-spezifischen Einzelstrang-antisense-Sonde hybridisiert (3.6.1., 3.6.3., 3.6.4.). Der für die Markierung der Sonde verwendete Primer rCAR-Mut2a und das eingesetzte DNA-Fragment gestatteten sowohl für den rCAR1- als auch für den rCAR2-RNA-Längenstandard eine vollständige Homologie zur Sonde.

3.6.2.3. Southern-Blot

Von der nach Methode 3.3.5. präparierten DNA wurden 5 μg mit 20 Einheiten *EcoRI* (New England Biolabs) in einem 50 μl -Reaktionsansatz über Nacht geschnitten (siehe 3.4.2.) und anschließend mit 1/10 Volumen DNA-Ladepuffer (siehe 3.4.1.) auf ein 1,5%iges Agarosegel

mit Ethidiumbromid (10 µg/100 ml Agarosegel) aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung (120 V, 60 min) und der Markierung der Markerbanden anhand des mitgeführten Markers X (Boehringer Mannheim) wurde das Gel 1 h mit Puffer I* unter leichtem Schütteln denaturiert, wobei der Puffer 2 mal gewechselt wurde und danach 1 h mit Puffer II** unter leichtem Schütteln neutralisiert, wobei der Puffer ebenfalls 2 mal gewechselt wurde. Der Aufbau der Bloteinrichtung erfolgte anhand der Abbildung 3.2.. Als Transferpuffer diente 10 X SSC. Der DNA-Transfer auf den Filter (Hybond™ N-Hybridization Membrane; Amersham) erfolgte über 12 bis 16 h. Der Filter wurde anschließend 1 h luftgetrocknet und die DNA durch 2-maliges Cross-linken unter UV-Licht bei 1200 µJ x 100 an den Filter gebunden. Die Aufbewahrung des Filters erfolgte in einer sterilen Klarsichttüte bei 4°C.

* Puffer I

1,5 M NaCl (Sigma)
0,5 M NaOH (Merck)

** Puffer II

1 M Tris-HCl (pH 8,0; Merck)
1,5 M NaCl (Sigma)

3.6.3. Hybridisierung

Die Filter wurden in den zuvor mit 1%igem SDS und Aqua bidest. gereinigten Hybridisierungsröhren (Biometra) mit 5-10 ml pro 100 cm² Filter der auf 68°C erwärmten *ExpressHyb Hybridization Solution* (Clontech) für 30 min bei 68°C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und die Filter mit 5 ml der auf 68°C erwärmten *ExpressHyb Hybridization Solution* unter Zugabe von ca. 0,4 ml der entsprechenden Einzelstrang-*antisense*-Sonde (3.6.1.) für 1 Stunde bei 68°C hybridisiert. Nach Verwerfen der Hybridisierungslösung wurden die Filter 3 mal für 10-15 min mit je 10-20 ml Waschlösung 1* bei Raumtemperatur gewaschen.

Die Waschlösung 1 wurde verworfen und 2 mal für 20 min mit je 10-20 ml der Waschlösung 2** bei 50°C gewaschen. Die Waschlösung 2 wurde verworfen, die Filter entnommen und noch feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen.

* Waschlösung 1:

2 X SSC
0,05% SDS

** Waschlösung 2:

0,1 X SSC
0,1% SDS

Zum Nachweis der 18S-rRNA erfolgte die Prähybridisierung mit 5 ml der auf 50°C erwärmten Prähybridisierungslösung [#] pro 150 cm² Filter bei 50°C unter ständigem Schwenken. Anschließend wurden 0,4 ml der 18S-rRNA-Einzelstrang-*antisense*-Sonde direkt in die Prähybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über 12-16 Stunden bei 50°C. Die Hybridisierungslösung mit der restlichen Sonde wurde abgossen, aufgefangen und bis zur möglichen Wiederverwendung bei -20°C gelagert. Die Filter wurden 3 mal für je 10 min mit 10 ml Waschlösung I ^{##} pro 150 cm² Filter bei 50°C unter Schwenken gewaschen. Nach Verwerfen der Waschlösung I wurde 10 min mit 10 ml Waschlösung II ^{###} pro 150 cm² Filter bei 55°C gewaschen. Die Filter wurden entnommen und noch feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen.

[#] Prähybridisierungslösung:

<u>absolut</u>	<u>pro 10 ml</u>
1,0% BSA	0,1 g bovines Serumalbumin Fraktion V (Boehringer Mannheim)
350 mM Na ₂ HPO ₄	3,5 ml 1M Na ₂ HP O ₄ (Merck)
7,0% SDS	3,5 ml 20% SDS
30,0% desionisiertes Formamid	3,0 ml desionisiertes Formamid (Amresco)

^{##} Waschlösung I

30 mM Na₂HPO₄ (Merck)
0,1% SDS

^{###} Waschlösung II

150 mM Na₂HPO₄ (Merck)
0,5% SDS

3.6.4. Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte

Die hybridisierten Filter wurden in eine Kassette eingelegt und die Fuji Film-Platte BAS-1500 in Abhängigkeit von der Expressionsstärke der gesuchten RNA 20 min bis 4 Stunden bei Raumtemperatur exponiert. Die Intensität des Hybridisierungssignals wurde mittels Phosphoimaging unter Verwendung der Software BAS Reader 2.21 bestimmt. Nach Auswertung der Filter wurde die Sonde mit Hilfe eines Wasserbades bei 95-98°C durch 3-minütiges Schwenken in 0,5%igem SDS vom Filter gelöst (strippen). Die Filter konnten anschließend für eine weitere Hybridisierung genutzt werden oder wurden in Klarsichtfolie eingeschlagen und bei -20°C gelagert.

3.7. Adenovirale Transduktion von Zellen

3.7.1. Adenovirale Vektoren

Es wurden vier verschiedene Adenovektoren (AdV) verwendet:

AdV	exprimiertes Transgen	Konzentration in Partikel/ μ l
Ad5CMVhCARs	hCAR	$5,6 \times 10^8$
Ad5CMVrTTP	Tocopherol-Transfer-Protein der Ratte	$2,1 \times 10^9$
Ad5CMVGFP	green fluorescent protein	$1,2 \times 10^9$
Ad5CMVluc	Luciferase	$1,86 \times 10^9$

Die AdV waren im Labor vorhanden. Sie wurden mittels *in vitro*-Ligation der jeweiligen Shuttle Plasmide (Abb. 3.3.: Shuttle-Plasmid pZS2-hCARs) mit dem 3'Ende der Adenovirus 5-Mutante RR5 (ca. 33 kb) über eine singuläre *Xba*I-Schnittstelle hergestellt (Marienfeld *et al.* 1999; Fechner *et al.* 2000). Ihnen fehlt die adenovirale E1-Genregion von Nukleotidposition 445 bis 3333 sowie Abschnitte der E3-Region (Nukleotidposition 30005 bis 30750). Der Ad5CMVluc wurde freundlicherweise von Robert Gerard (Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA) zur Verfügung gestellt.

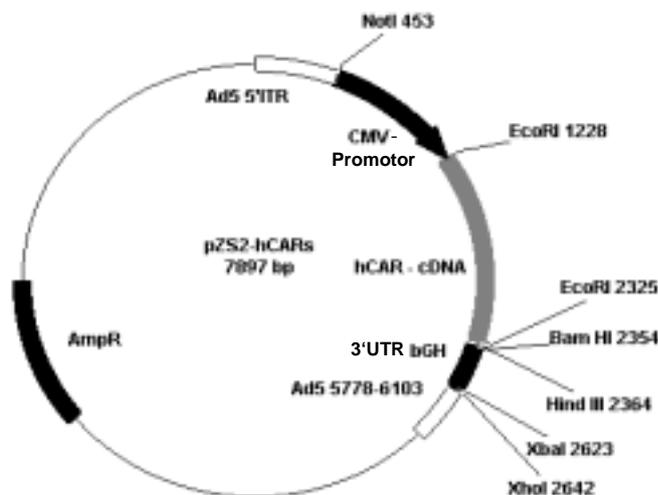


Abb. 3.3.
Shuttle Plasmid pZS2-hCARs

3.7.2. Transduktion

Die auf 24-Well-Zellkulturplatten ausgesäten Zellen wurden mit 1 ml 1 X PBS (Gibco BRL) gewaschen, die Zellen eines Wells gewonnen und gezählt (siehe 3.1.2.). Anschließend erfolgte die Zugabe der AdV in 1 ml OptiMEM (Gibco BRL). Die Vektordosierung erfolgte in AdV-Partikeln pro Zelle. Die Platten wurden danach 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend erneut mit 1 ml 1 X PBS (Gibco BRL) gewaschen und mit frischem Medium überschichtet. Grundsätzlich wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.7.3. Transgenexpressionsnachweis

3.7.3.1. Nachweis der CAR-Expression mittels FACS-Analyse

Nach der Gewinnung der Zellen (siehe 3.1.2.) wurden 2×10^5 Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, durch 5-minütige Zentrifugation bei 1500 min^{-1} und 4°C pelletiert, in 1 ml 1 X PBS (Gibco BRL) resuspendiert und erneut 5 min bei 1500 min^{-1} und 4°C pelletiert. Zum Nachweis der CAR-Oberflächenexpression wurde das Zellpellet in 1 ml 1 X PBS mit 2% Endobolin (Sigma) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 1500 min^{-1} und 4°C pelletiert und anschließend für 30 min mit 50 µl des monoklonalen anti-hCAR-Antikörpers (Ak) *RmcB** (Gebrauchsverdünnung 1:1000) bzw. mit 50 µl des 1:5 verdünnten Isotypen-Kontroll-Ak *CLB 600 mouse IgG1* (Dianova) inkubiert. Danach wurde 1 ml 1 X PBS zugegeben, bei 1500 min^{-1} und 4°C 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurden dann mit 50 µl des sekundären Fluorescein (FITC)-konjugierten-Ak *AffiniPure F(ab')₂ Fragment Ziege-anti-Maus-IgG (H+L)* (Gebrauchsverdünnung 1:200; Dianova) resuspendiert und 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 1 ml 1 X PBS gewaschen und in 500 µl 1 X PBS aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität von 10^4 bis 2×10^4 Zellen wurde anschließend mittels FACS (fluorescenc activated cell scanning) –Analyse (Einzelzellmessung) im FACS Calibur bestimmt. Generell wurden alle Zellsuspensionen vor der Analyse mit 1µl Propidiumjodid (Merck) behandelt, um Hintergrundwerte durch eine Färbung toter Zellen zu ermitteln.

*RmcB von J. M. Bergelson (Childrens Hospital Philadelphia, Philadelphia, USA)
freundlicherweise zur Verfügung gestellt

3.7.3.2. Nachweis der GFP-Expression

Für den Nachweis der GFP (green fluorescent protein) -Expression wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit dem Ad5CMVGFP (10^3 Partikel/Zelle) für 20 min transduziert und 24 h später die Fluoreszenz mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie bzw. mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 25 nachgewiesen.

3.7.3.3. Nachweis der Luciferase-Expression

Das Enzym Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Abgabe eines Photons. Der Nachweis der Luciferase-Expression erfolgte mit dem *Luciferase detection Kit* (Boeringer Mannheim). Nach Abnehmen des Mediums und Waschen der Zellen mit 1 X PBS wurden die Zellen direkt mit 250 μ l Lysispuffer (im Kit enthalten) lysiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur und anschließend eine 15-sekündige Zentrifugation bei 14000 min^{-1} . 20 μ l des Überstandes wurden mit 100 μ l Luciferase-Substrat gemischt und die Luciferase-Aktivität innerhalb von 10 s im Luminometer bestimmt.