

4. ERGEBNISSE

4.1. Evaluierung der kompetitiven RT-PCR

4.1.1. Nachweis von rCAR1- und rCAR2-mRNA in verschiedenen Organen

Der Nachweis der rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression erfolgte mittels RT-PCR. In allen untersuchten Organen konnte am Tag 2 p.p. sowohl rCAR1- als auch rCAR2-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 4.1.).

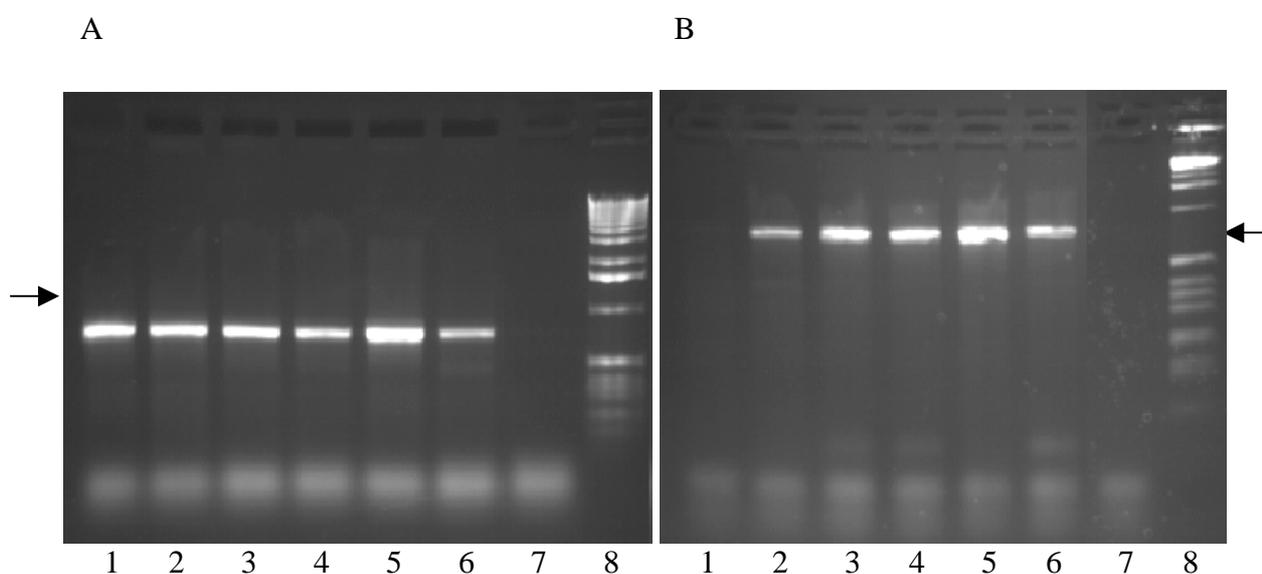


Abb. 4.1.

RT-PCR (40 PCR-Zyklen) zum Nachweis von rCAR1- und rCAR2-mRNA unter Verwendung von 100 ng DNase I-verdauter Gesamt-RNA und dem Primerpaar mCAR.334s/rCAR1.1097a (rCAR1) und mCAR.334s/rCAR2.1096a (rCAR2). A: rCAR1-mRNA-Nachweis; B: rCAR2-mRNA-Nachweis; 1 = Herz; 2 = Lunge; 3 = Leber; 4 = Niere; 5 = Gehirn; 6 = Muskel; 7 = Negativkontrolle; 8 = Marker X (Roche); B: Linie 1 zeigte nur eine sehr schwache Bande

4.1.2. Sequenzierung der RNA-Längenstandards

Die RNA-Längenstandards für rCAR1 und rCAR2 wurden mittels Sequenzierung auf das Vorhandensein der 10 bp-Deletion überprüft. Der Sequenzhomologievergleich zeigte, dass bei beiden Längenstandards eine 10 bp Deletion vorhanden war (Abb. 4.2.).

A

gi|6013134|gb|AF109644.1|AF109644 Rattus norvegicus coxsackie-adenovirus-receptor homolog (CAR1) mRNA, partial cds, Length = 1076

```

Query: 1      tccatgtccccttccaacatggaagggtattccaagaccagctataaccaagtccccagt 60
            |||
Sbjct: 910    tccatgtccccttccaacatggaagggtattccaagaccagctataaccaagtccccagt 969

Query: 61      gaagac-----ctcctcagagtcgactctggcaccgctaaggtagctgccct 110
            |||
Sbjct: 970    gaagactttgaacgtgctcctcagagtcgactctggcaccgctaaggtagctgccct 1029

Query: 111     aatctaa 117
            |||
Sbjct: 1030   aatctaa 1036

```

B

>gi|6013132|gb|AF109643.1|AF109643 Rattus norvegicus coxsackie-adenovirus-receptor homolog (CAR2) mRNA, partial cds Length = 1033

```

Query: 1      tccatgtccccttccaacatggaagggtattccaagaccagctataaccaagtccccagt 60
            |||
Sbjct: 910    tccatgtccccttccaacatggaagggtattccaagaccagctataaccaagtccccagt 969

Query: 61      gaagac-----ctcctcagagtcgactctggcaccgctaagttcaagtacgct 110
            |||
Sbjct: 970    gaagactttgaacgtgctcctcagagtcgactctggcaccgctaagttcaagtacgct 1029

Query: 111     tacc 114
            |||
Sbjct: 1030   tacc 1033

```

C

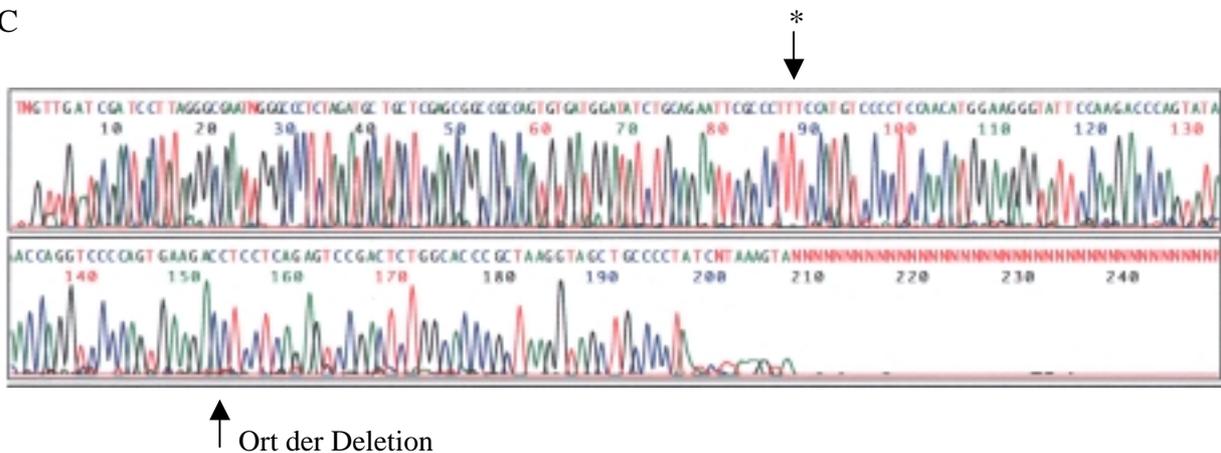


Abb. 4.2.

A und B) Sequenzhomologievergleich der sequenzierten rCAR1-bzw. rCAR2-Längenstandards mittels *Blast search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die zu sequenzierenden Fragmente des rCAR1-Längenstandards wurden mit dem Primerpaar M13fo/rCAR1.1097a, die des rCAR2-Längenstandards mit dem Primerpaar M13fo/rCAR2.1096a amplifiziert.

C) Elektrpherogramm der rCAR1-Längenstandardsequenz (Auswertung mittels *ABI DNA Sequencing Analysis Software*), * entspricht Nukleotidposition 1 im Sequenzhomologievergleich

4.1.3. Vergleich der Konzentrationen des rCAR1- und rCAR2-Längenstandards

Das Ergebnis der Dot-blot-Hybridisierung (Abb. 4.3.) zeigte, dass die rCAR1- und rCAR2-Längenstandard-Transkripte annähernd gleich konzentriert waren. Der nach Phosphoimaging und mittels *Tina Software 2.09 g* (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) ermittelte Unterschied wurde durch den Einsatz des 1,45-fachen Volumens an rCAR2-Längenstandard in der reversen Transkription ausgeglichen.

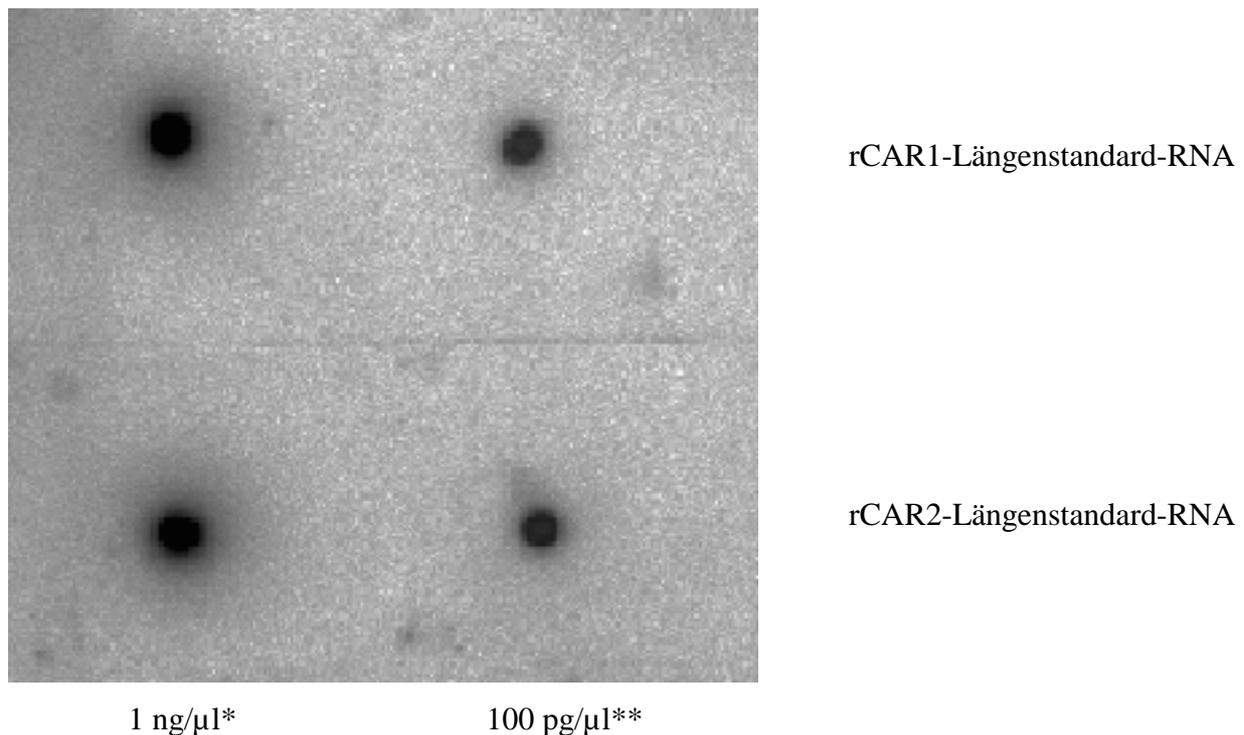


Abb. 4.3.

Dot-Blot-Hybridisierung der rCAR1- und rCAR2-Längenstandard-Transkripte mit einer rCAR-spezifischen *antisense*-Einzelstrang-DNA-Sonde (siehe 3.6.1.)

* 1 ng rCAR1-Längenstandard-RNA/μl entsprechen 0,69 ng rCAR2-Längenstandard-RNA/μl

** 100 pg rCAR1-Längenstandard-RNA/μl entsprechen 69 pg rCAR2-Längenstandard-RNA/μl

4.1.4. Austestung der in der reversen Transkription einzusetzenden Menge an rCAR1-, rCAR2- und GAPDH-Längenstandard für jedes Organ

Die Austestung erfolgte für zwei Entwicklungstage je Organ durch die gemeinsame reverse Transkription von 100 ng nativer Gesamt-RNA und unterschiedlicher Volumina (in der Regel 0,5 μl und 1,0 μl) jeder Verdünnungsstufe (C1 bis C4) des GAPDH- und des rCAR1- oder des GAPDH- und des rCAR2-Längenstandards.

verwendete Verdünnungsstufen: C1 = 100 pg/μl
 C2 = 10 pg/μl
 C3 = 1 pg/μl
 C4 = 0,1 pg (100 fg)/μl

Nach PCR und Fragmentanalyse wurde diejenige Verdünnungsstufe ausgewählt und für die Untersuchung aller Entwicklungsstadien eines Organs eingesetzt, bei der die Peakflächen von nativem und Standard-PCR-Produkt annähernd gleich groß waren, d.h. der Quotient aus nativem und Standard-PCR-Produkt im Idealfall 1 ergab (Abb. 4.4.A/B). Gegebenenfalls musste das einzusetzende Volumen der ausgewählten Verdünnungsstufe in einem zweiten Versuch genauer bestimmt werden, um dem optimalen Quotienten möglichst nahe zu kommen.

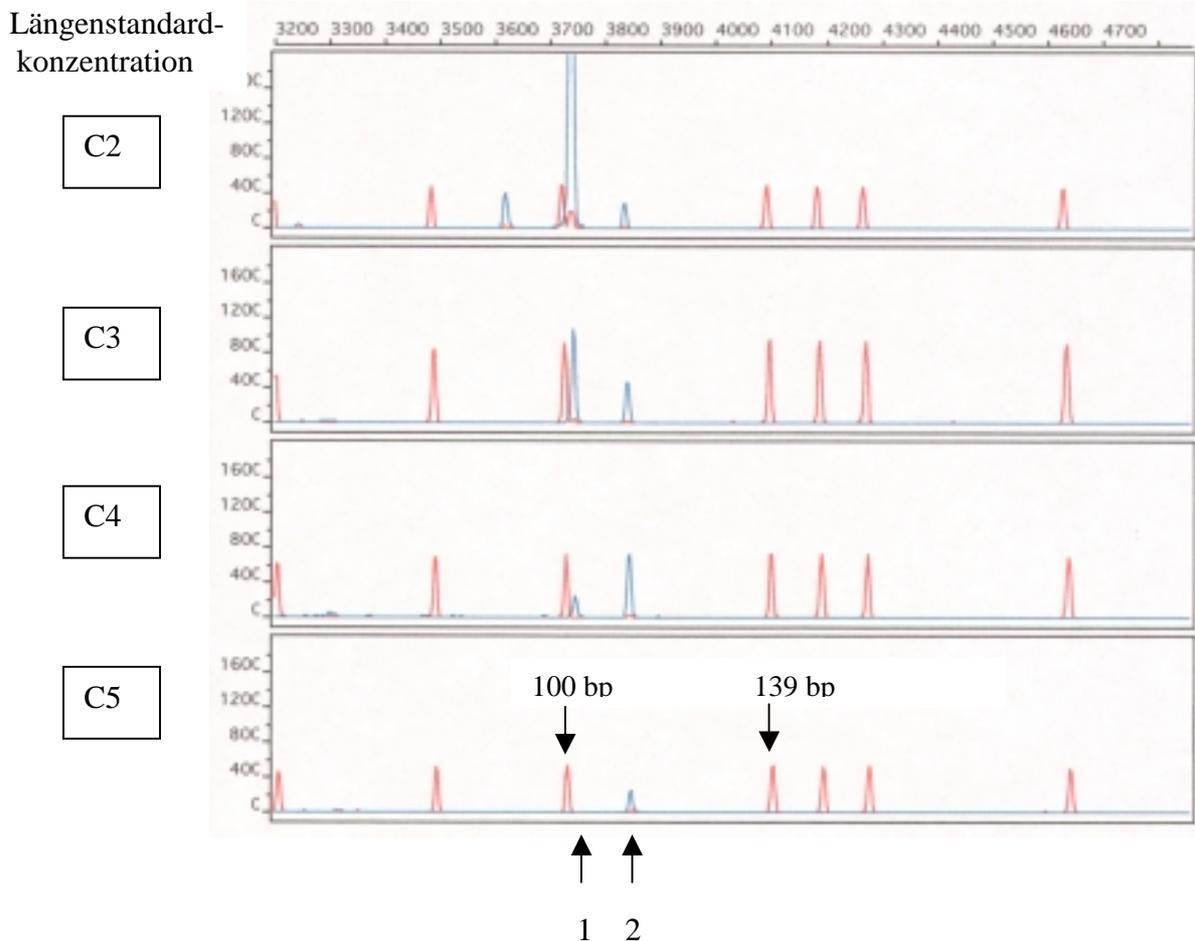


Abb. 4.4. A

Elektropherogramme der GeneScan-Analyse.

Austestung der in der kompetitiven RT-PCR zur Bestimmung der rCAR2-mRNA-Expression im Herzen einzusetzenden rCAR2-Längenstandard-Konzentration unter Verwendung von 1 μl der entsprechenden rCAR2-Längenstandard-Konzentration und 200 ng Gesamt-RNA (Herz Tag 32 p.p.)

rote Peaks: Größenmarker GS-350-Tamra.

blaue Peaks: 1 = rCAR2-Längenstandard (102 bp); 2 = rCAR2-mRNA (112 bp);

Die optimale Konzentration des rCAR2-Längenstandards liegt zwischen C3 und C4.

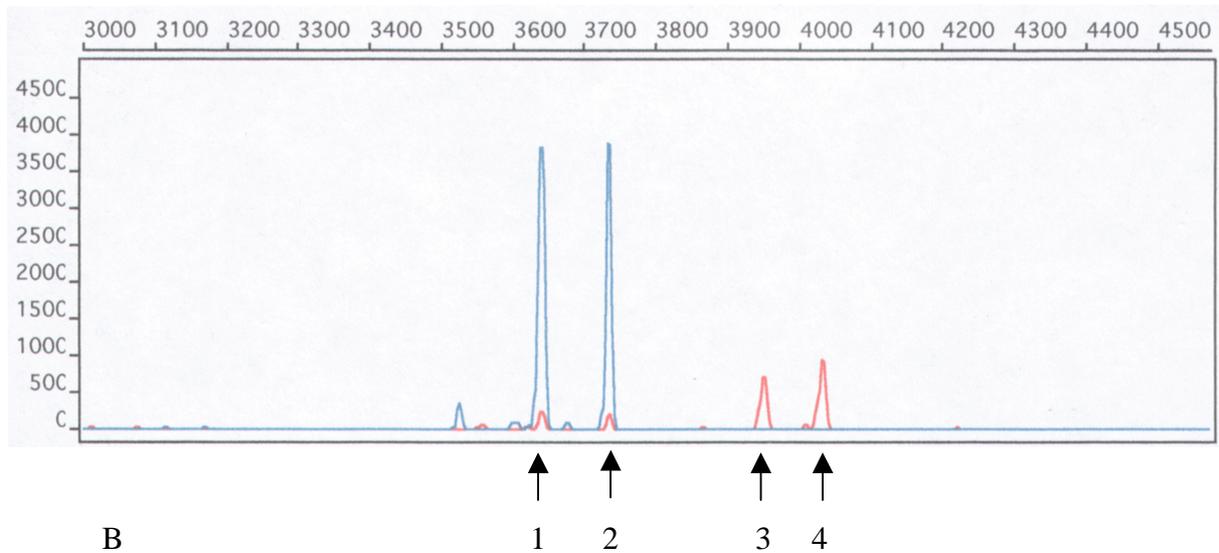


Abb. 4.4.B

Elektropherogramme der GeneScan-Analyse.

Bestimmung der rCAR1-mRNA-Expression im Herzen Tag 21 p.c. (zur Berechnung siehe 3.5.3.).

1 = rCAR1-Längenstandard (0,7 μ l C2), Peakfläche 39515; 2 = rCAR1-mRNA (in 100 ng Gesamt-RNA), Peakfläche 26998; 3 = GAPDH-Längenstandard (1 μ l C2), Peakfläche 7267; 4 = GAPDH-mRNA (in 100 ng Gesamt-RNA), Peakfläche 9422

Tabelle 4.5. zeigt die für die verschiedenen Organe eingesetzten Mengen an rCAR1-, rCAR2- und GAPDH-Längenstandard. Sie lieferten Quotienten, die in der überwiegenden Mehrheit zwischen 0,7 und 2,5 lagen, wobei Ausnahmen durch expressionsbedingte Veränderungen an den einzelnen Entwicklungstagen zustande kamen.

Organ	rCAR1	rCAR2	GAPDH
Herz	0,7 μ l C2	0,3 μ l C3	1,0 μ l C2
Lunge	0,5 μ l C2	0,15 μ l C3	0,3 μ l C2
Leber	1,0 μ l C2	0,3 μ l C3	0,4 μ l C2
Niere	1,0 μ l C2	0,15 μ l C3	0,5 μ l C2
Gehirn	0,3 μ l C1	0,15 μ l C3	0,5 μ l C2
Muskulatur	1,0 μ l C3	0,8 μ l C4	0,5 μ l C2

Tabelle 4..5.

In der kompetitiven RT-PCR eingesetzte Mengen an rCAR1-, rCAR2- und GAPDH-Längenstandard.