

4.1.5. Ermittlung der optimalen Zykluszahl für die kompetitive RT-PCR

Die Auswahl der optimalen PCR-Zykluszahl erfolgte nach zwei Kriterien. Zum einen sollte sich die PCR möglichst im exponentiellen Bereich befinden, da in diesem Bereich die kompetitiven Mechanismen zwischen nativer und Standard-cDNA-Matrize bzw. nativem und Standard-PCR-Amplifikat störungsfreier zum Tragen kommen und eine genauere Quantifizierung gestatten. Zum anderen müssen ausreichend PCR-Amplifikate vorliegen, um auswertbare Peaks (am günstigsten 1000 bis 10000 Einheiten) in der Fragmentanalyse zu erreichen.

Die Überprüfung des exponentiellen Bereiches erfolgte durch die Doppelbestimmung der Amplifikatmenge für rCAR1, rCAR2 und GAPDH mittels Fragmentanalyse nach 22, 26, 28, 30 und 32 PCR-Zyklen, wobei überprüft wurde, bis zu welchem Bereich sich die Menge an PCR-Amplifikaten (entspricht der Peakfläche) annähernd exponentiell vermehrt. Dieser Bereich lag für GAPDH bei maximal 26 Zyklen, für rCAR1 bei 28 Zyklen und für rCAR2 bei 32 Zyklen (Abb. 4.6.).

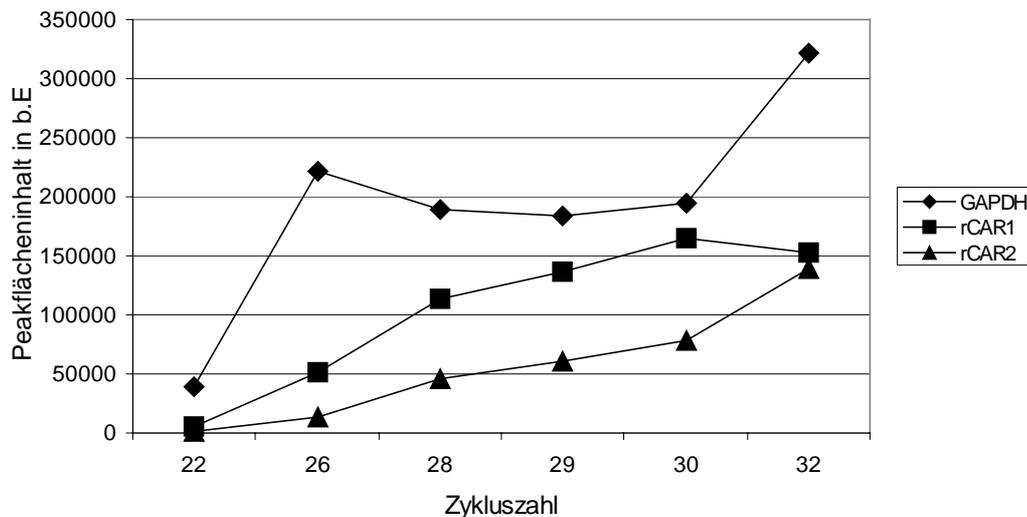


Abb. 4.6.

Zyklusabhängige Änderung der absoluten PCR-Amplifikatmenge (Peakfläche) nach kompetitiver RT-PCR. Der Peakflächeninhalt ergibt sich aus der Summe der Peakflächeninhalte, die für die Standard-PCR-Amplifikate und die jeweiligen nativen PCR-Amplifikate ermittelt wurden. Für die Untersuchungen wurde die aus der RNA vom Herz Tag 17 p.c. unter Verwendung der entsprechenden Längenstandardkonzentration revers transkribierte cDNA eingesetzt.

Für die kompetitive GAPDH-PCR wurden bereits mit 22 bis 23 Zyklen gut quantifizierbare Peakflächeninhalte ermittelt, so dass in diesem Zyklusbereich gearbeitet wurde. Für die kompetitive rCAR1-PCR wurde in Abhängigkeit vom Peakflächeninhalt ein Bereich von 26 bis 28 Zyklen, für die kompetitive rCAR2-PCR ein Bereich von 28 bis 30 Zyklen ausgewählt.

4.1.6. Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

4.1.6.1. Wiederholung von PCR und Fragmentanalyse

Um die systembedingten Schwankungen der Ergebnisse zu überprüfen, erfolgte eine Doppelbestimmung der rCAR2-mRNA-Expression in einigen Organen (Herz, Leber, Niere, Gehirn). Dazu wurde die kompetitive PCR für rCAR2 und GAPDH im Anschluss an die reverse Transkription wiederholt (unabhängiger PCR-Ansatz) und mittels Fragmentanalyse die relative rCAR2-mRNA-Expression bestimmt.

Die Abb. 4.7. und 4.8. zeigen am Beispiel von Gehirn und Leber neben den Werten der Doppelbestimmung die entsprechenden Trendlinien der beiden Einzelbestimmungen als gleitenden Durchschnitt, ermittelt auf der Grundlage der Mittelwerte der Ergebnisse zweier aufeinanderfolgender Entwicklungstage. Der Mittelwert der Abweichung zwischen den beiden Trendlinien betrug in der Leber das 1,053-fache (entspricht 5,3%) des ersten Wertes bei einer Streuung von 0,035, im Herzen das 1,097-fache (9,7%) des ersten Wertes bei einer Streuung von 0,047, in der Niere das 1,189-fache (18,9%) des ersten Wertes bei einer Streuung von 0,16 und im Gehirn das 1,35-fache (35%) des ersten Wertes bei einer Streuung von 0,21. Diese Ergebnisse belegen eine hohe Reproduzierbarkeit von PCR und Fragmentanalyse.

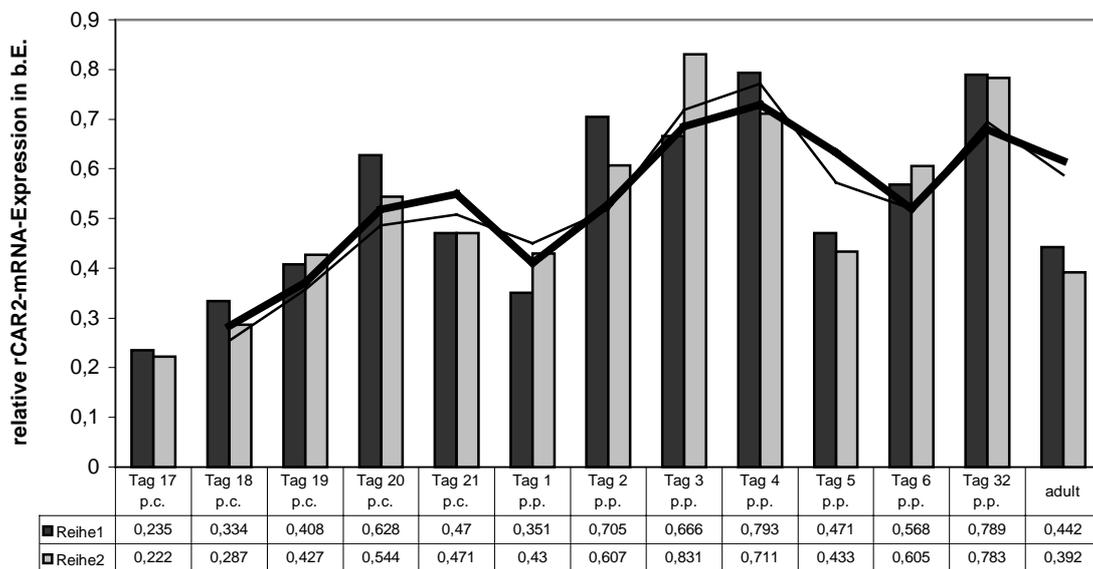


Abb. 4.7.

Doppelbestimmung der relativen rCAR2-mRNA-Expression in der Leber.

Reihe 1: erste Bestimmung, Trendlinie als dicker schwarzer Strich,

Reihe 2: zweite Bestimmung, Trendlinie als dünner schwarzer Strich

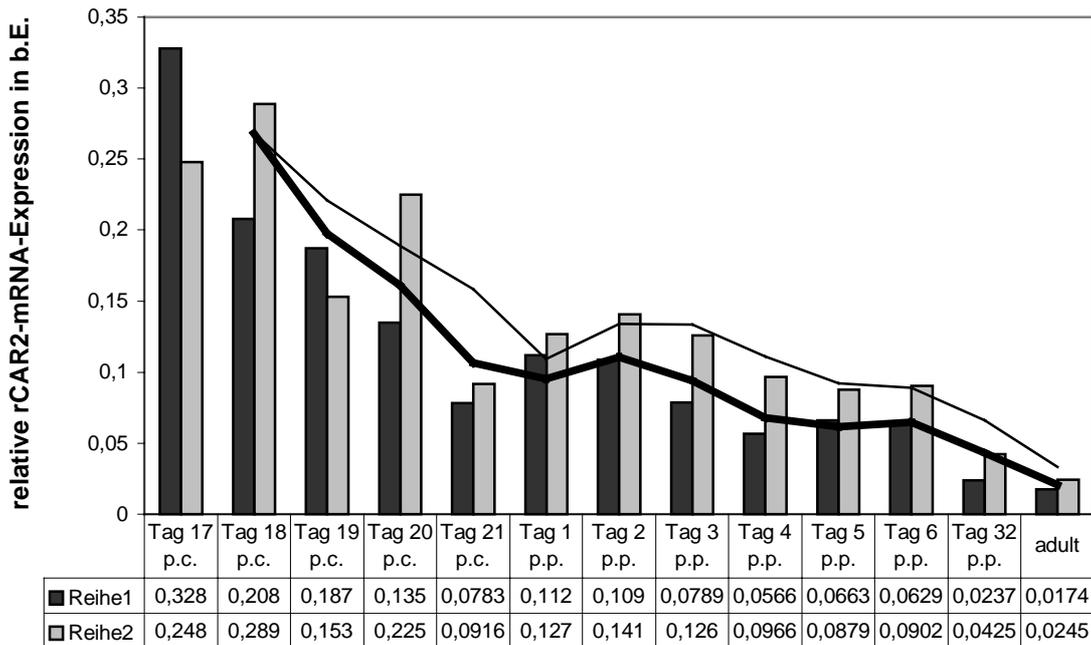


Abb. 4.8.

Doppelbestimmung der relativen rCAR2-mRNA-Expression im Gehirn.

Reihe 1: erste Bestimmung, Trendlinie als dicker schwarzer Strich,

Reihe 2: zweite Bestimmung, Trendlinie als dünner schwarzer Strich.

4.1.6.2. Wiederholung der reversen Transkription mit anschließender PCR und Fragmentanalyse

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der reversen Transkription erfolgte eine Doppelbestimmung der rCAR1-mRNA-Expression in der Lunge in Form einer Transkriptionswiederholung (unabhängige Ansätze) mit anschließender gemeinsamer kompetitiver PCR und Fragmentanalyse.

Die Abb. 4.9. zeigt neben den Werten der Doppelbestimmung die entsprechenden Trendlinien der beiden Einzelbestimmungen als gleitenden Durchschnitt, ermittelt auf der Grundlage der Mittelwerte der Ergebnisse zweier aufeinanderfolgender Entwicklungstage. Die Werte der zweiten Bestimmung fielen allgemein niedriger aus (im Durchschnitt 72,4% der ersten Werte, Streuung 12,0%). Die Trendlinie der zweiten rCAR1-mRNA-Expressionsbestimmung lag dabei im Durchschnitt 28,8% (Streuung 8,7%) unterhalb der ersten Trendlinie. Der Mittelwert der Abweichung zwischen den beiden Trendlinien betrug das 1,288-fache (28,8%) des ersten Wertes bei einer Streuung von 0,087.

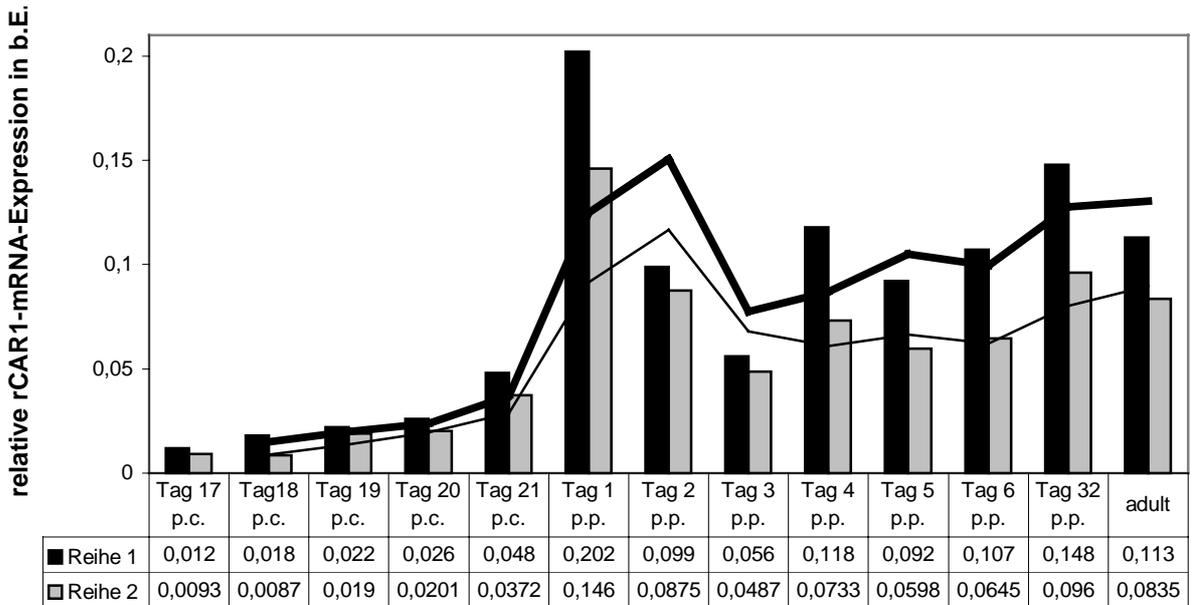


Abb. 4.9.

Doppelbestimmung der relativen rCAR1-mRNA-Expression in der Lunge

Reihe 1: erste Bestimmung, Trendlinie als dicker schwarzer Strich

Reihe 2: zweite Bestimmung, Trendlinie als dünner schwarzer Strich

4.1.7. Ermittlung des GAPDH-Korrekturfaktors

Um eine mögliche Regulation der mRNA-Expression des internen Standards GAPDH während der Organogenese berücksichtigen zu können, wurden Korrekturfaktoren für GAPDH nach folgender Methode ermittelt. Aus sämtlichen mit der kompetitiven RT-PCR ermittelten GAPDH-Expressionswerten je Entwicklungstag und Organ (im allgemeinen 5 Werte je Entwicklungstag, für Tag 19 p.c., Tag 2 p.p. und Tag 32 p.p. 6 Werte), basierend auf zwei unabhängigen RNA-Messungen und –Verdünnungen wurde ein Mittelwert für jeden Entwicklungstag gebildet. Die so erhaltenen Mittelwerte wurden gegen den Mittelwert für den Tag 19 p.c. relativiert und dienten als GAPDH-Korrekturfaktoren (Tab. 4.10.).

Organ	Entwicklungstag													
	17	18	19	20	21	1	2	3	4	5	6	32		
	p.c.	p.c.	p.c.	p.c.	p.c.	p.p.	adult							
Gehirn	1,03	1,15	1	1,26	1,34	1,71	0,98	1,15	1,47	1,38	1,07	1,05	2,83	
Niere	1,64	0,83	1	1,24	0,89	1,06	0,89	0,62	0,87	0,64	0,9	0,73	1,77	
Leber	0,68	1,03	1	0,65	0,79	0,65	0,5	0,4	0,54	0,6	0,64	0,76	1,01	
Herz	0,95	1,03	1	1,69	1,44	1,4	1,08	1,08	1,4	1,07	1,77	1,41	1,31	
Lunge	1,83	1,58	1	1,38	0,7	0,46	0,47	0,7	0,43	0,5	0,47	0,39	0,56	
Skelett- muskulatur	0,97	1,04	1	0,88	1,61	2,93	1,54	2,05	1,96	1,62	1,63	5,12	11,52	

Tabelle 4.10.
GAPDH-Korrekturfaktoren ermittelt nach kompetitiver RT-PCR

Zur Überprüfung dieser Faktoren wurde parallel dazu die GAPDH-mRNA-Expression im Verhältnis zur 18S-mRNA-Expression für einen Teil der Entwicklungstage (Tag 18 p.c., Tag 20 bzw. 21 p.c., Tag 6 p.p., Tag 32 p.p.) mittels Northern blot-Hybridisierung ermittelt, durch Phosphoimaging ausgewertet und gegen den Wert für den Tag 18 p.c. relativiert. Die Northern blot-Hybridisierungen lieferten Korrekturfaktoren, die den mittels kompetitiver RT-PCR ermittelten Korrekturfaktoren ähnelten, wobei ein Vergleich der Trendlinien zwischen beiden Korrekturwerten eine tendenzielle Übereinstimmung zeigte (Abb. 4.11. bis 4.15.). Für die Leber konnten mittels Northern blot-Hybridisierung keine Korrekturfaktoren ermittelt werden, so dass kein Vergleich mit den Korrekturfaktoren aus der kompetitiven RT-PCR möglich war. Die auf der Basis der kompetitiven RT-PCR ermittelten GAPDH-Korrekturfaktoren (Tab. 4.10.) wurden für die Berechnung der rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression während der Organogenese herangezogen, indem die nach der Formel in Punkt 3.5.3. ermittelte relative CAR-Expression mit dem entsprechenden Korrekturfaktor multipliziert wurde.

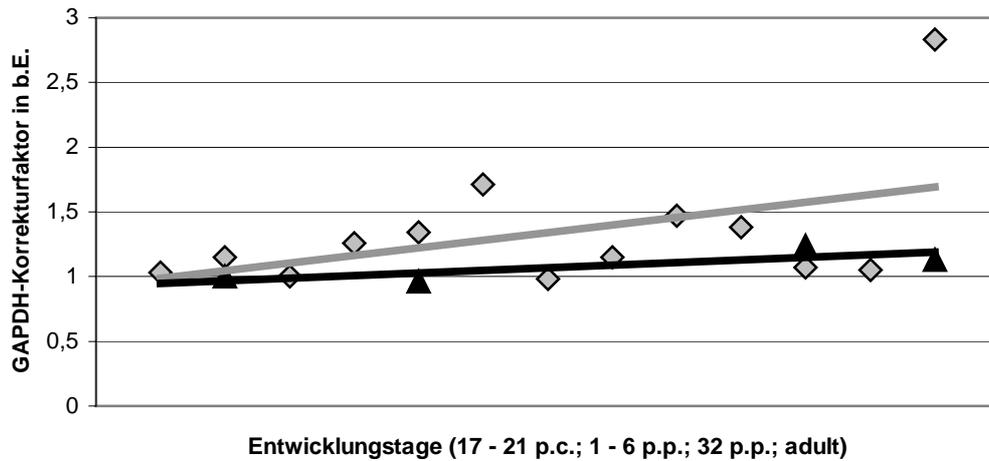


Abb. 4.11.

Vergleich der GAPDH-Korrekturfaktoren im Gehirn

- ▲ Faktor nach Northern-Blot-Hybridisierung mit entsprechender schwarzer Trendlinie;
- ◇ Faktor nach kompetitiver RT-PCR mit entsprechender grauer Trendlinie

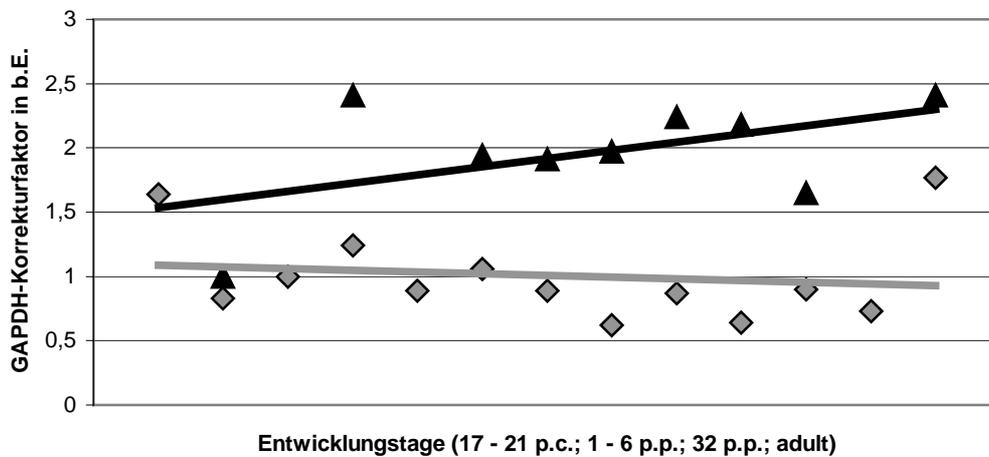


Abb. 4.12.

Vergleich der GAPDH-Korrekturfaktoren in der Niere

- ▲ Faktor nach Northern-Blot-Hybridisierung mit entsprechender schwarzer Trendlinie
- ◇ Faktor nach kompetitiver RT-PCR mit entsprechender grauer Trendlinie

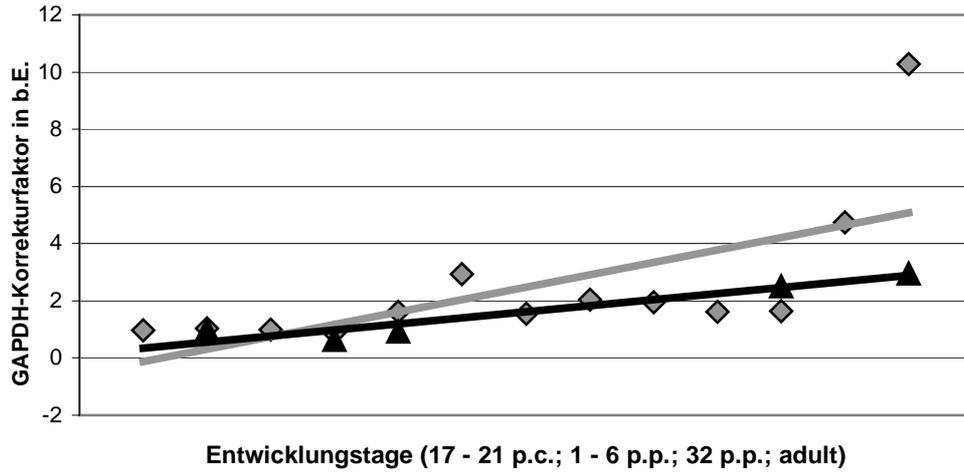


Abb. 4.13.

Vergleich der GAPDH-Korrekturfaktoren in der Muskulatur

- ▲ Faktor nach Northern-Blot-Hybridisierung mit entsprechender schwarzer Trendlinie
- ◇ Faktor nach kompetitiver RT-PCR mit entsprechender grauer Trendlinie

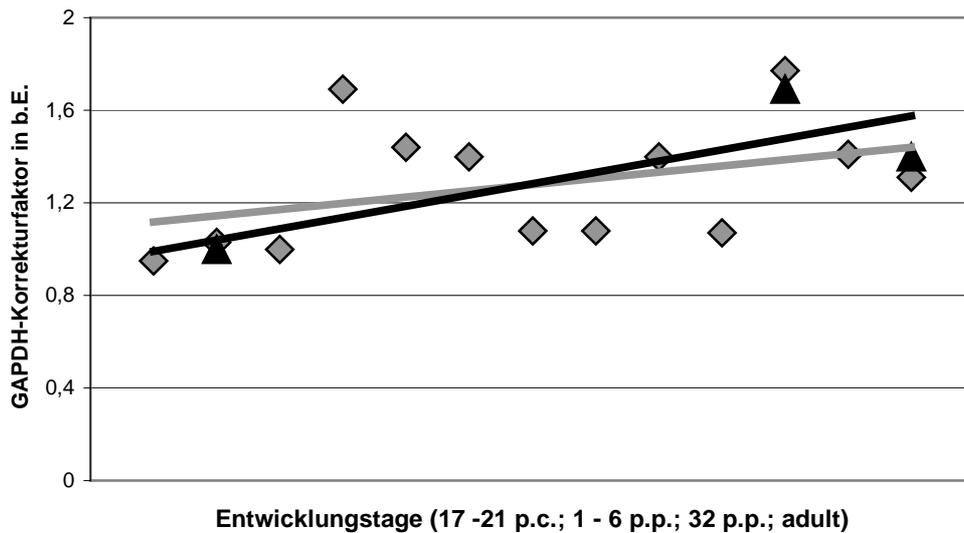


Abb. 4.14.

Vergleich der GAPDH-Korrekturfaktoren im Herzen

- ▲ Faktor nach Northern-Blot-Hybridisierung mit entsprechender schwarzer Trendlinie
- ◇ Faktor nach kompetitiver RT-PCR mit entsprechender grauer Trendlinie

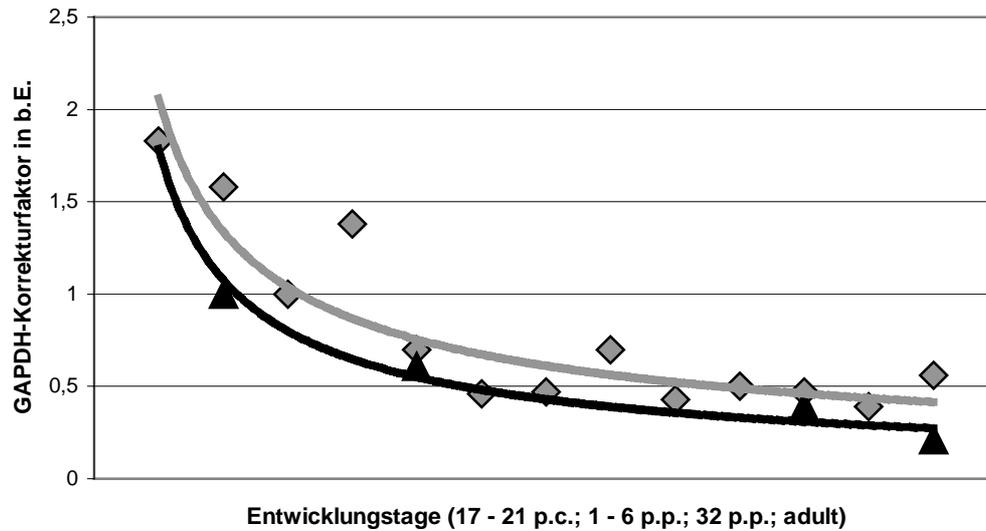


Abb. 4.15.

Vergleich der GAPDH-Korrekturfaktoren in der Lunge

- ▲ Faktor nach Northern-Blot-Hybridisierung mit entsprechender schwarzer Trendlinie
- ◆ Faktor nach kompetitiver RT-PCR mit entsprechender grauer Trendlinie

Um die unterschiedlich hohe GAPDH-Expression in den verschiedenen Organen zu berücksichtigen, wurde zum Vergleich der rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression zwischen den untersuchten Organen an ausgewählten Entwicklungsstagen (Tag 19 p.c., Tag 2 p.p., Tag 32 p.p.) ein alternativer GAPDH-Korrekturfaktor ermittelt (Tab. 4.16.).

Organ	Tag 19 p.c.	Tag 2 p.p.	Tag 32 p.p.
Herz	1,0	1,0	1,0
Lunge	0,35	0,19	0,11
Leber	0,38	0,27	0,38
Niere	0,52	0,54	0,30
Gehirn	0,43	0,65	0,36
Muskulatur	0,45	1,05	2,53

Tab. 4.16.

Alternative GAPDH-Korrekturfaktoren

Dazu wurde aus den mittels kompetitiver RT-PCR ermittelten GAPDH-Werten für jedes Organ an den ausgewählten Entwicklungsstagen (Tag 19 p.c.: 5 Werte, Tag 2 p.p.: 3 Werte, Tag 32 p.p.: 2 Werte) ein Mittelwert gebildet und gegen den für das Herz erhaltenen Mittelwert relativiert. Dabei wurden nur GAPDH-Werte berücksichtigt, die aus Versuchen stammten, bei denen alle Organe eines Entwicklungsstages gemeinsam untersucht wurden.

Die Überprüfung der Korrekturfaktoren für den Tag 32 p.p. erfolgte durch den Vergleich mit GAPDH-Korrekturfaktoren, die mittels Northern-Blot-Hybridisierung ermittelt wurden (Fechner *et al.* 1999), wobei eine Relativierung der Werte gegen den für die Lunge ermittelten Wert erfolgte (Abb. 4.17.)

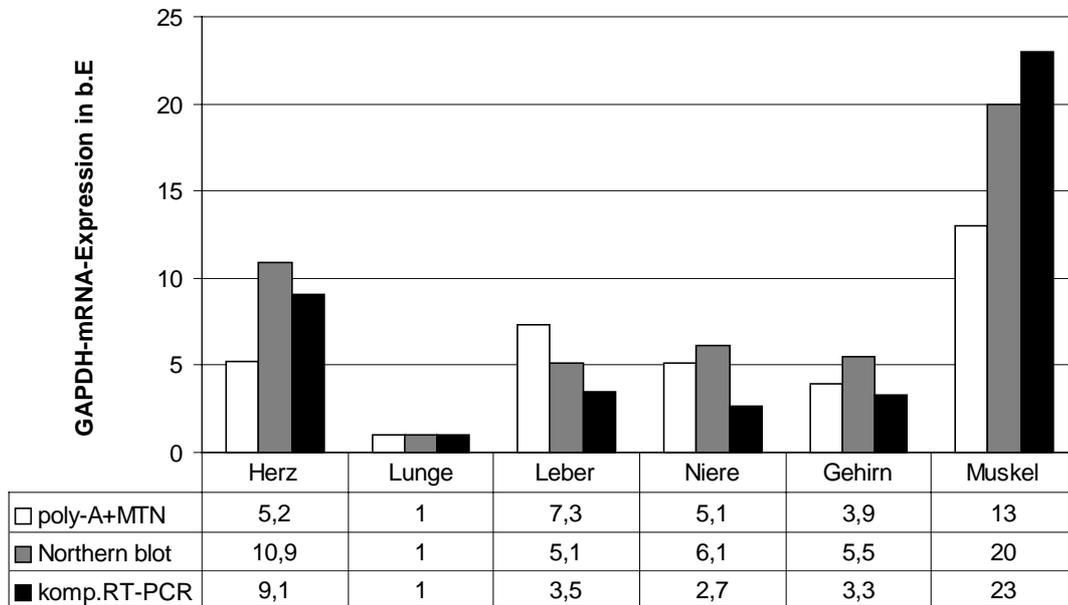


Abb. 4.17.

Vergleich der GAPDH-Korrekturfaktoren

Werte für poly-A⁺-MTN (multi tissue northern blot) und Northern-Blot nach (Fechner *et al.* 1999), Werte für die kompetitive RT-PCR nach Relativierung der Werte für Tag 32 p.p. aus Tab. 4.16. gegen den für die Lunge ermittelten Wert

4.2. Ermittlung der relativen rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression während der Organogenese

4.2.1. rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression im Herzen

Die höchste rCAR1-mRNA-Expression wurde im geburtsnahen Zeitraum (Tag 20 p.c. bis Tag 3 p.p.) ermittelt, sie stieg gegenüber den Tagen 17 bis 19 p.c. um den Faktor 1,6 und fiel zum Tag 84 p.p. (adult) um den Faktor 6,2. Der Expressionswert am Tag 6 p.p. wurde nicht berücksichtigt. (Abb. 4.18.)

Die höchste rCAR2-mRNA-Expression wurde am Tag 18 p.c. ermittelt. Danach kam es zu einem intermittierenden Abfall, wobei die Expression zwischen dem höchsten Wert am Tag 18 p.c. und dem niedrigsten Wert am Tag 32 p.p. um den Faktor 3,4 und gegenüber dem Wert am Tag 84 p.p. (adult) um den Faktor 2,3 abnahm. Der Expressionswert am Tag 6 p.p. wurde nicht berücksichtigt. (Abb. 4.19.)

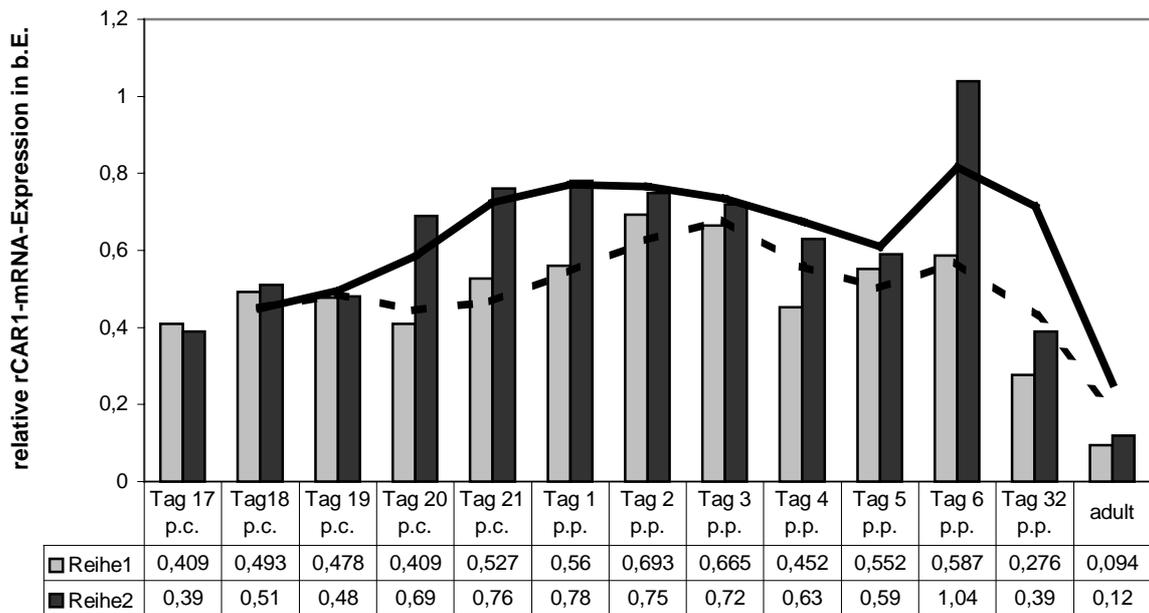


Abb. 4.18.

relative rCAR1-mRNA-Expression im Herzen

Reihe 1: relative rCAR1-mRNA-Expression ohne Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren; gestrichelte Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 1

Reihe 2: relative rCAR1-mRNA-Expression unter Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren nach Tab. 4.10.; durchgehende Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 2

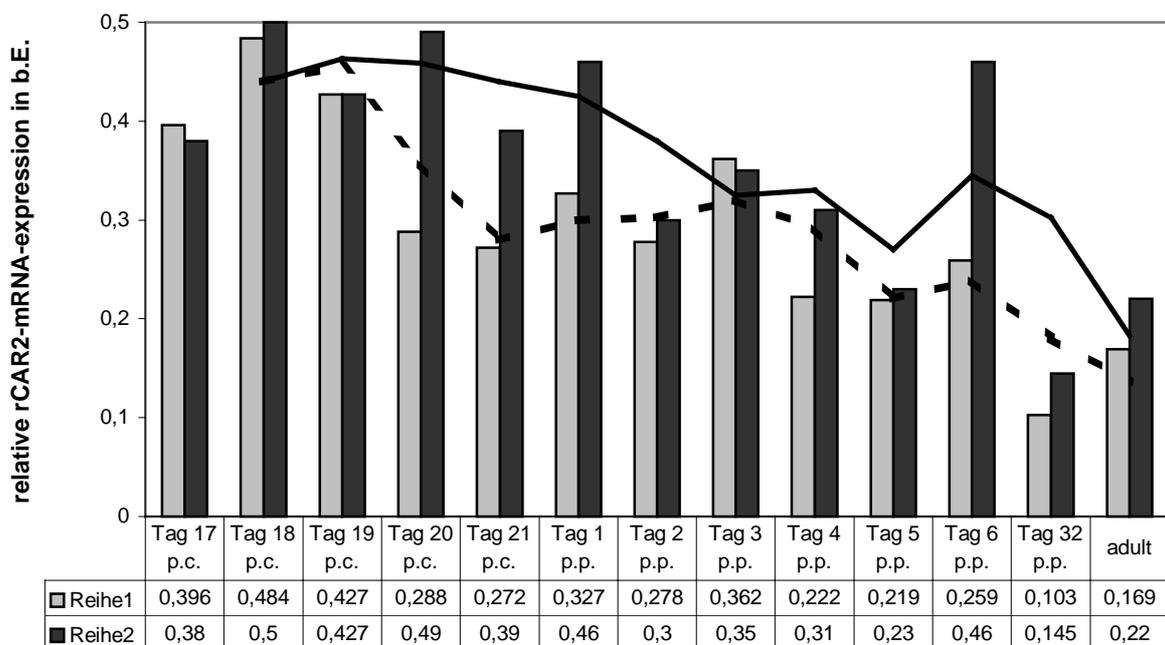


Abb. 4.19.

relative rCAR2-mRNA-Expression im Herzen

Reihe 1: relative rCAR2-mRNA-Expression ohne Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren; gestrichelte Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 1

Reihe 2: relative rCAR2-mRNA-Expression unter Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren nach Tab. 4.10.; durchgehende Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 2

4.2.2. rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression im Gehirn

Die rCAR1-mRNA-Expression stieg zum Tag 19 p.c. gegenüber den Tagen 17 und 18 p.c. um den Faktor 1,9. Die höchste Expression wurde zwischen den Tagen 19 p.c. und 6 p.p. gemessen und lag im Durchschnitt um das 1,9-fache über dem Wert der Tage 17 und 18 p.c.. Gegenüber dem Mittelwert der Tage 5 und 6 p.p. kam es bis zum Tag 32 p.p. zu einem starken Rückgang der Expression um den Faktor 49,5, gegenüber dem Tag 84 p.p. (adult) um den Faktor 4,2 (Abb. 4.20.).

Die rCAR2-mRNA-Expression zeigte gegenüber rCAR1 einen abweichenden Verlauf. Der höchste Expressionswert wurde am Tag 17 p.c. ermittelt. Anschließend kam es bis zum Tag 32 p.p. zu einer allmählich abfallenden Expression um den Faktor 8,6 zwischen dem höchsten und dem niedrigsten Wert. Der Expressionswert am Tag 84 p.p. (adult) war 4 mal höher als am Tag 32 p.p.(Abb. 4.21.).

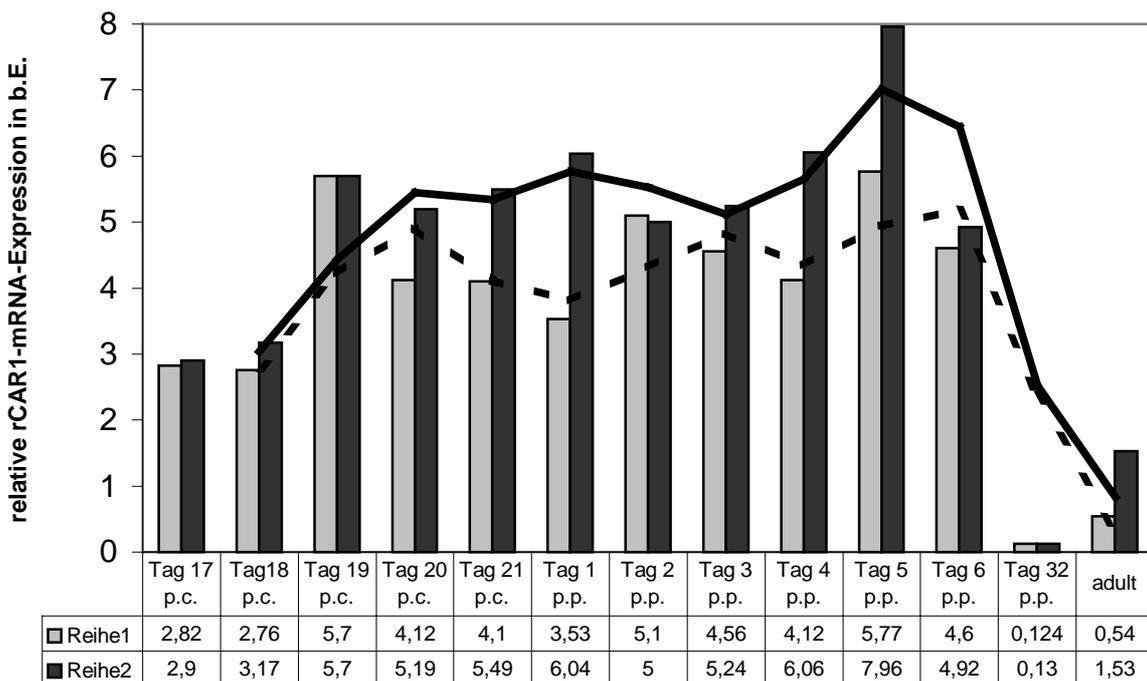


Abb. 4.20.

relative rCAR1-mRNA-Expression im Gehirn

Reihe 1: relative rCAR1-mRNA-Expression ohne Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren; gestrichelte Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 1

Reihe 2: relative rCAR1-mRNA-Expression unter Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren nach Tab. 4.10.; durchgehende Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 2

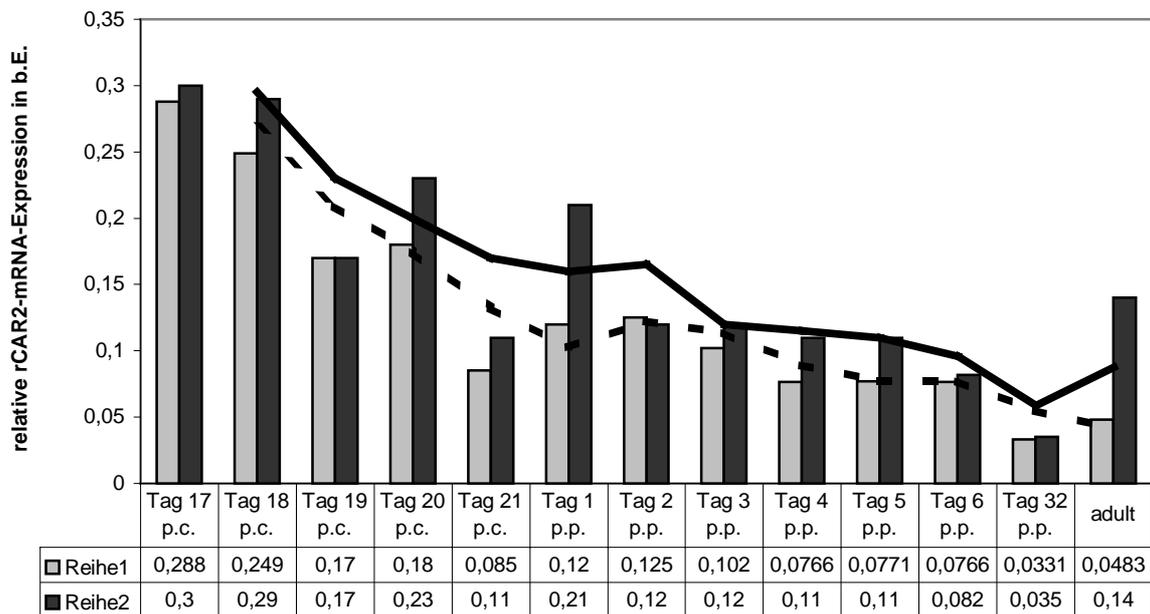


Abb. 4.21.

relative rCAR2-mRNA-Expression im Gehirn

Reihe 1: relative rCAR2-mRNA-Expression ohne Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren; gestrichelte Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 1

Reihe 2: relative rCAR2-mRNA-Expression unter Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren nach Tab. 4.10.; durchgehende Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 2

4.2.3. rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in der Lunge

In der Lunge konnte im Untersuchungszeitraum keine wesentliche Änderung der rCAR1-mRNA-Expression ermittelt werden. Der Faktor zwischen dem höchsten Wert am Tag 18 p.c. und dem niedrigsten Wert am Tag 84 p.p. (adult) betrug 1,9 (Abb. 4.22).

Die höchste rCAR2-mRNA-Expression wurde für den Tag 1 p.p. ermittelt. Sie stieg gegenüber dem Tag 17 p.c. um den Faktor 3,8, wobei es alleine zwischen den Tagen 21 p.c. und 1 p.p. zu einem Anstieg um den Faktor 2,7 kam. Zwischen dem Tag 1 p.p. und dem Tag 3 p.p. fiel die Expression um den Faktor 2,4, um dann bis zum Tag 84 p.p. (adult) um das 1,7-fache anzusteigen (Abb. 4.23.).

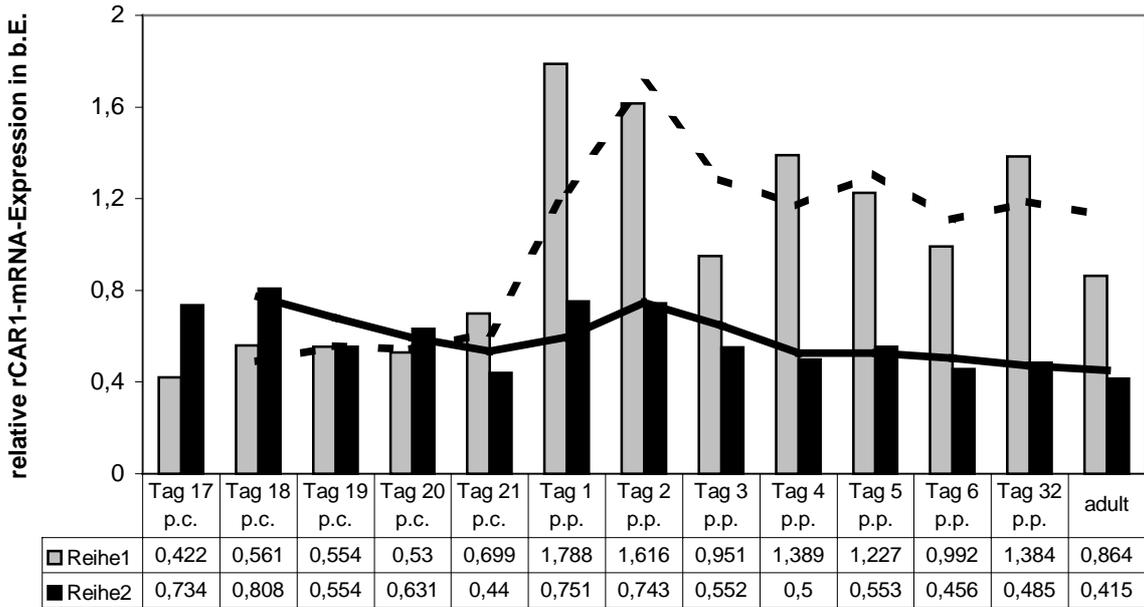


Abb. 4.22.

relative rCAR1-mRNA-Expression in der Lunge

Reihe 1: relative rCAR1-mRNA-Expression ohne Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren; gestrichelte Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 1

Reihe 2: relative rCAR1-mRNA-Expression unter Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren nach Tab. 4.10.; durchgehende Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 2

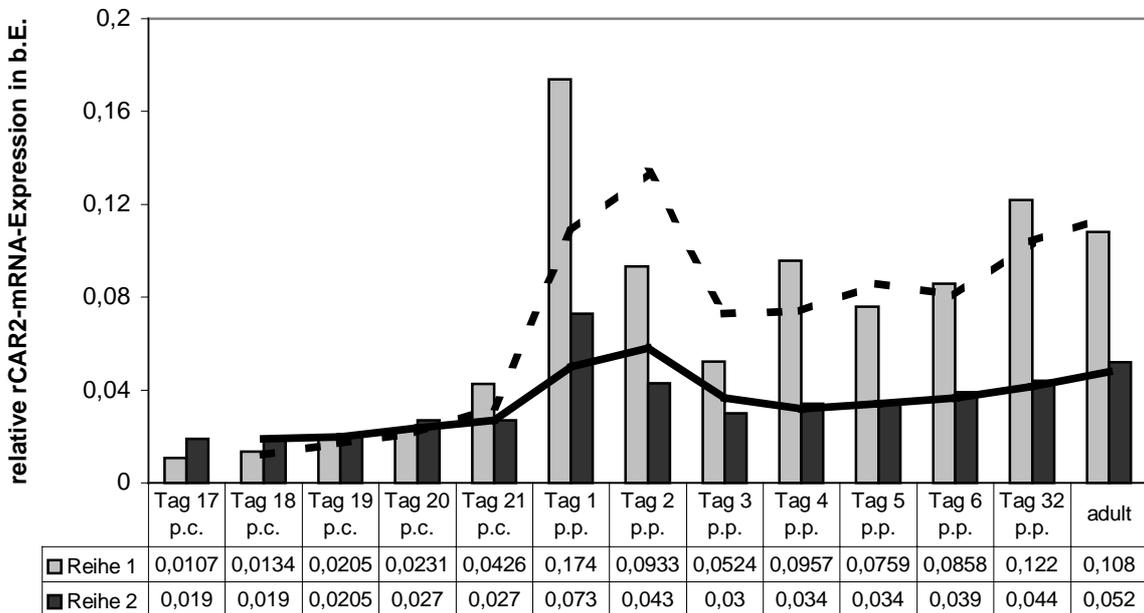


Abb. 4.23.

relative rCAR2-mRNA-Expression in der Lunge

Reihe 1: relative rCAR2-mRNA-Expression ohne Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren; gestrichelte Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 1

Reihe 2: relative rCAR2-mRNA-Expression unter Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren nach Tab. 4.10.; durchgehende Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 2

4.2.4. rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in der Niere

Die rCAR1-mRNA-Expression stieg zwischen dem Tag 17 p.c. und dem Tag 19 p.c. um den Faktor 1,8. Zwischen dem Tag 19 p.c. und dem Tag 6 p.p. kam es zu schwankenden Expressionswerten, wobei die höchste Expression an den Tagen 1 und 2 p.p. erzielt wurde (1,9-fach höhere Expression als am Tag 17 p.c.). Gegenüber dem Tag 6 p.p. kam es am Tag 32 p.p. zu einer um den Faktor 8,3, am Tag 84 p.p. (adult) zu einer um den Faktor 1,3 verringerten Expression (Abb. 4.24.).

Nach einer hohen rCAR2-mRNA-Expression am Tag 17 p.c. kam es am Tag 18 p.c. zu einem Abfall der Expression um den Faktor 4,1. Bis zum Tag 1 p.p. stieg die Expression um den Faktor 4,8, fiel am Tag 2 p.p. um den Faktor 2,1 und blieb zwischen den Tagen 2 bis 6 p.p. annähernd konstant. Gegenüber dem Tag 32 p.p. kam es dann zu einem Expressionsabfall um den Faktor 2,5 und gegenüber dem Tag 84 p.p. (adult) um den Faktor 1,3 (Abb. 4.25.).

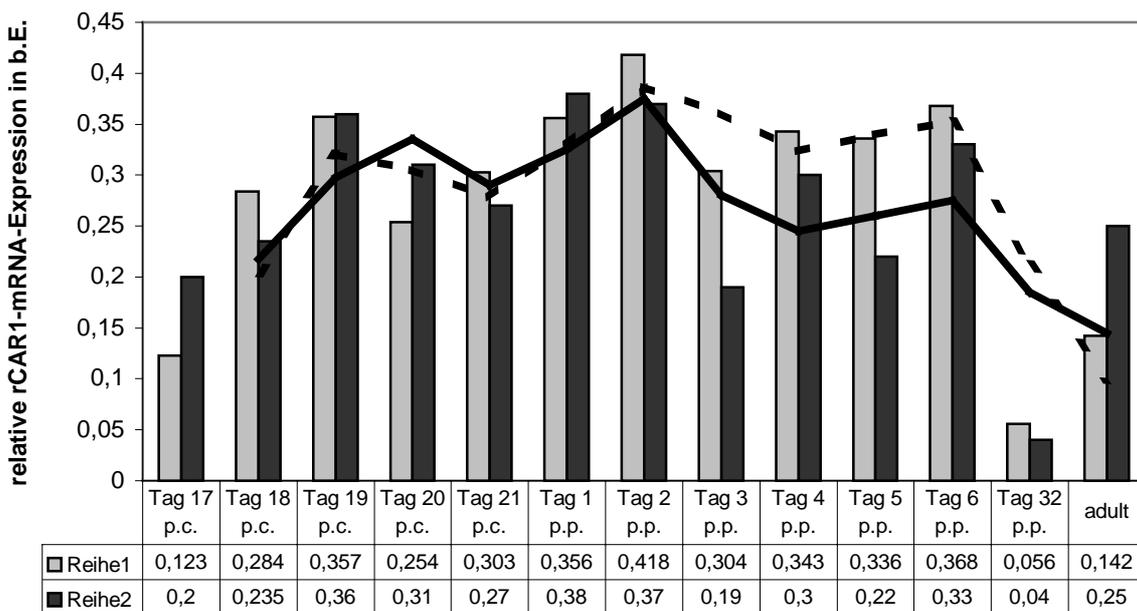


Abb. 4.24.

relative rCAR1-mRNA-Expression in der Niere

Reihe 1: relative rCAR1-mRNA-Expression ohne Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren; gestrichelte Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 1

Reihe 2: relative rCAR1-mRNA-Expression unter Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren nach Tab. 4.10.; durchgehende Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 2

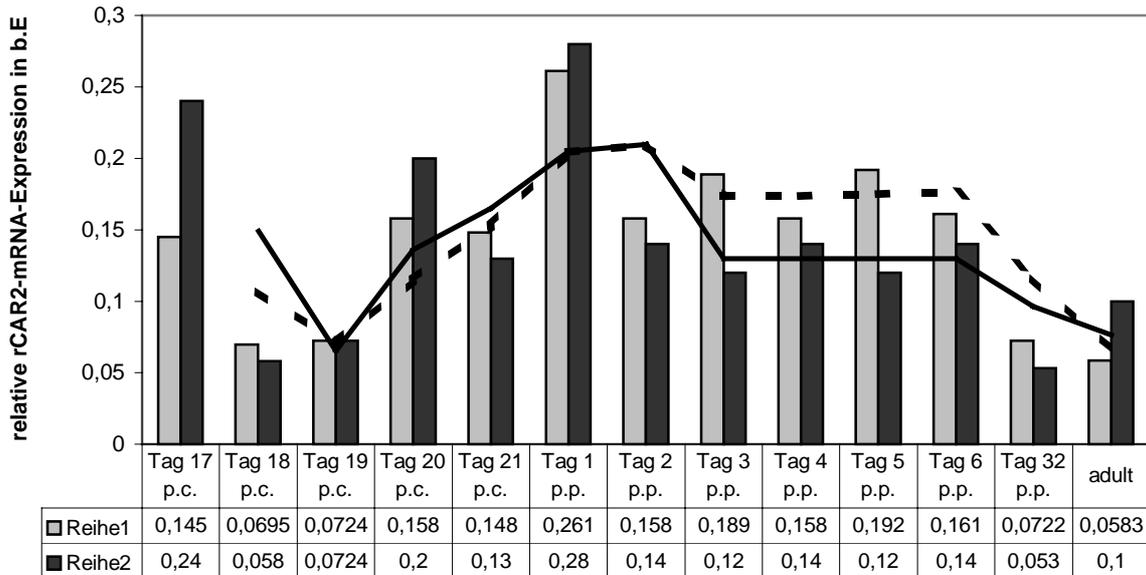


Abb. 4.25.

relative rCAR2-mRNA-Expression in der Niere

Reihe 1: relative rCAR2-mRNA-Expression ohne Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren;
gestrichelte Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 1

Reihe 2: relative rCAR2-mRNA-Expression unter Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren
nach Tab. 4.10.; durchgehende Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 2

4.2.5. rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in der Skelettmuskulatur

Die höchste rCAR1-mRNA-Expression wurde am Tag 20 p.c. erreicht. Während es an den Tagen 17 bis 19 p.c. keine wesentliche Expressionsänderung gab, stieg die Expression zwischen Tag 19 p.c. und Tag 20 p.c. um den Faktor 1,5. Nach dem Tag 20 p.c. kam es am Tag 21 p.c. zu einem abrupten Abfall der Expression um den Faktor 5,0. Zwischen Tag 21 p.c. und Tag 6 p.p. fiel die Expression um den Faktor 3,2. Zwischen den Tagen 6 p.p. und 32 p.p. nahm die Expression um den Faktor 9,0, zwischen den Tagen 6 p.p. und 84 p.p. (adult) um den Faktor 11,8 ab. Der Faktor zwischen der höchsten Expression am Tag 20 p.c. und der niedrigsten Expression am Tag 84 p.p. betrug 190,9 (Abb. 4.26.).

Der Verlauf der rCAR2-mRNA-Expression im Untersuchungszeitraum wies starke Ähnlichkeit mit dem Verlauf der rCAR1-mRNA-Expression auf. Die höchsten Expressionswerte wurden ebenfalls am Tag 20 p.c. erreicht, wobei es gegenüber den Tagen 17 bis 19 p.c. zu einem Anstieg um den Faktor 2,2 kam. Nach dem Tag 20 p.c. kam es am Tag 21 p.c. zu einem Rückgang der Expression um den Faktor 6,3 und zwischen Tag 21 p.c. und Tag 6 p.p. zu einem Rückgang um den Faktor 2,3. Gegenüber dem Tag 6 p.p. nahm die Expression am Tag 32 p.p. um den Faktor 2,7 ab. Der Faktor zwischen der höchsten

Expression am Tag 20 p.c. und der niedrigsten Expression am Tag 32 p.p. betrug 45,9. Für den Tag 84 p.p. konnte kein Wert ermittelt werden (Abb. 4.27.).

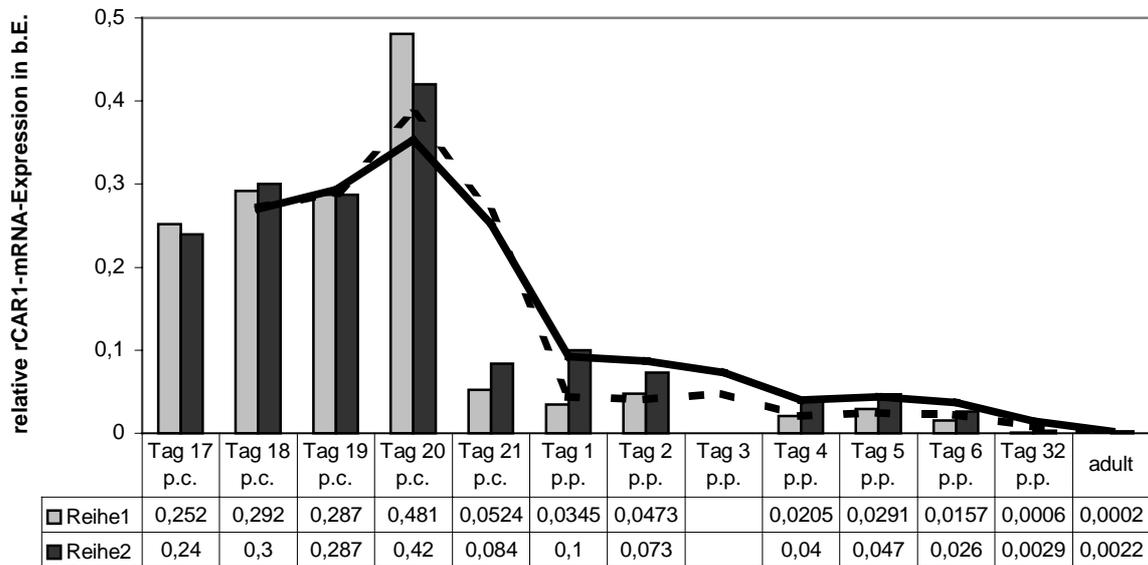


Abb. 4.26.

relative rCAR1-mRNA-Expression in der Skelettmuskulatur

Reihe 1: relative rCAR1-mRNA-Expression ohne Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren; gestrichelte Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 1

Reihe 2: relative rCAR1-mRNA-Expression unter Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren nach Tab. 4.10.; durchgehende Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 2

(für den Tag 3 p.p. wurde keine relative rCAR1-mRNA-Expression ermittelt)

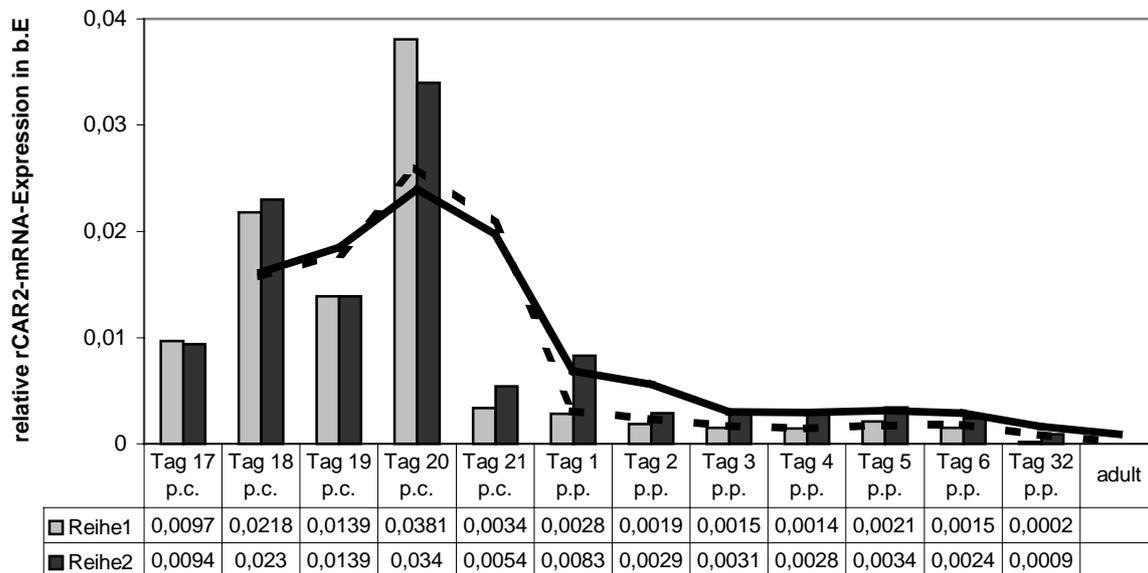


Abb. 4.27.

relative rCAR2-mRNA-Expression in der Skelettmuskulatur

Reihe 1: relative rCAR2-mRNA-Expression ohne Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren; gestrichelte Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 1

Reihe 2: relative rCAR2-mRNA-Expression unter Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren nach Tab. 4.10.; durchgehende Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 2

(für das adulte Tier wurde keine relative rCAR2-mRNA-Expression ermittelt)

4.2.6. rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in der Leber

In der Leber konnte im Untersuchungszeitraum keine wesentliche Änderung der rCAR1-mRNA-Expression ermittelt werden. Der Faktor zwischen dem höchsten Wert an den Tagen 3 und 6 p.p. und dem niedrigsten Wert am Tag 32 p.p. betrug 3,5 (Abb. 4.28.).

Der Verlauf der rCAR2-mRNA-Expression zeigte zwischen dem Tag 17 p.c. und dem Tag 19 p.c. einen Anstieg um das 2,6-fache. Zwischen dem Tag 19 p.c. und dem Tag 6 p.p. blieb die Expression annähernd konstant und nahm zum Tag 32 p.p. hin um das 1,6-fache, zum Tag 84 p.p. hin um das 1,1-fache zu. Der Faktor zwischen dem niedrigsten Wert am Tag 17 p.c. und dem höchsten Wert am Tag 32 p.p. betrug 3,8 (Abb. 4.29.).

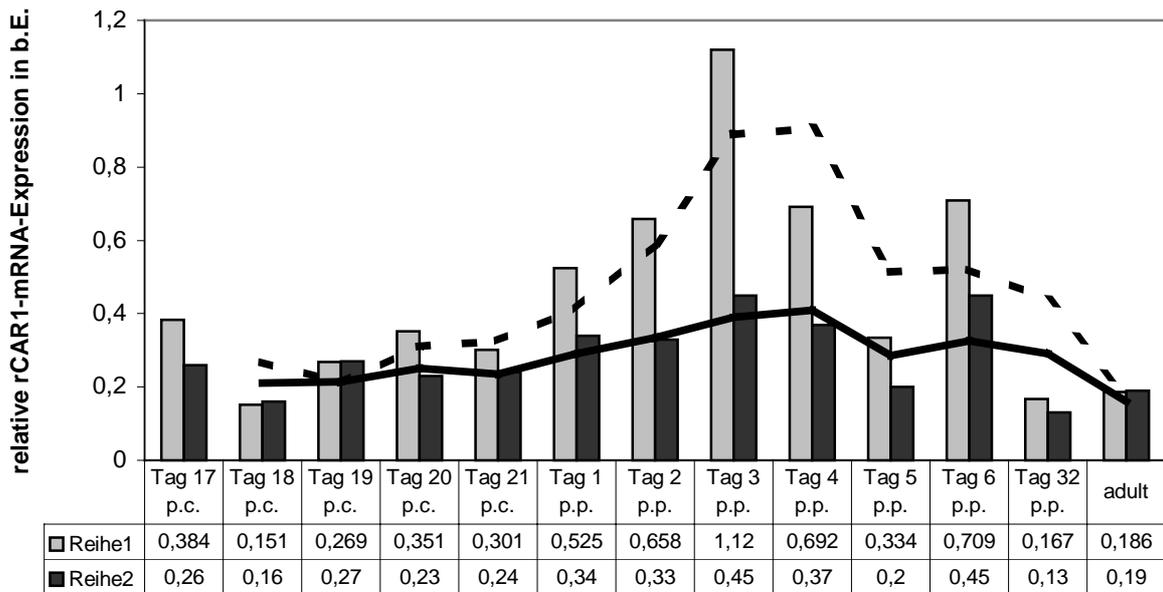


Abb. 4.28.

relative rCAR1-mRNA-Expression in der Leber

Reihe 1: relative rCAR1-mRNA-Expression ohne Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren; gestrichelte Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 1

Reihe 2: relative rCAR1-mRNA-Expression unter Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren nach Tab. 4.10.; durchgehende Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 2

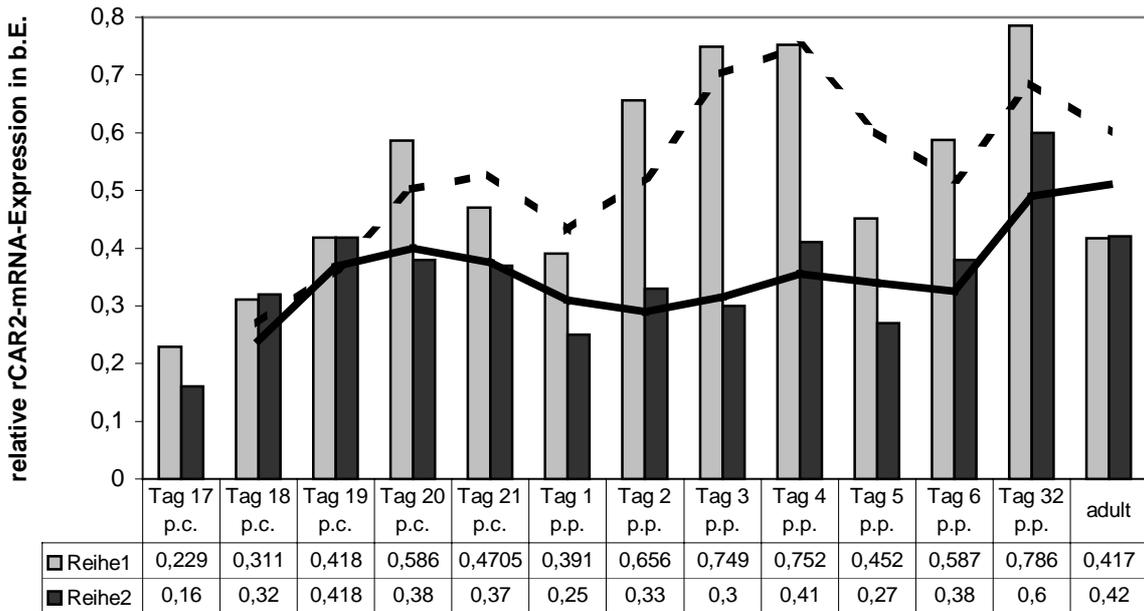


Abb. 4.29.

relative rCAR2-mRNA-Expression in der Leber

Reihe 1: relative rCAR2-mRNA-Expression ohne Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren; gestrichelte Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 1

Reihe 2: relative rCAR2-mRNA-Expression unter Berücksichtigung der GAPDH-Korrekturfaktoren nach Tab. 4.10.; durchgehende Linie: gleitender Durchschnitt für Werte der Reihe 2

4.2.7. Vergleichende Untersuchungen zur rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression

Zum Vergleich der rCAR1-bzw. der rCAR2-mRNA-Expression zwischen den einzelnen Organen, wurden für jedes Organ die Expression an drei Entwicklungstagen (Tag 19 p.c., Tag 2 p.p., Tag 32 p.p.) in einem gemeinsamen Versuch bestimmt, wobei die ausgetesteten und in den Einzelversuchen eingesetzten RNA-Standard-Konzentrationen verwendet wurden. Diese Untersuchungen wurden für rCAR1 und rCAR2 durchgeführt.

4.2.7.1. Verhältnis zwischen rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression

Zur Berechnung des Verhältnisses zwischen rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression wurden die für jedes Organ an den drei gemeinsam untersuchten Entwicklungstagen ermittelten rCAR1- und rCAR2-Expressionswerte addiert und der jeweilige prozentuale Anteil ermittelt. Der Anteil der rCAR2-Expression an der Summe aus rCAR1- und rCAR2-Expression lag fast ausschließlich unter 10%. Dabei war der Anteil der rCAR2-mRNA-Expression in der Leber mit durchschnittlich 7,68% (10,86 % am Tag 19 p.c., 5,64% am Tag 2 p.p., 6,54% am Tag 32 p.p.) am höchsten. In der Niere lag der Anteil der rCAR2-mRNA-Expression bei

durchschnittlich 4,90% (1,68% am Tag 19 p.c., 3,58% am Tag 2 p.p., 9,44% am Tag 32 p.p.), in der Skelettmuskulatur bei durchschnittlich 4,04% (2,92% am Tag 19 p.c., 3,56% am Tag 2 p.p., 5,64% am Tag 32 p.p.), in der Lunge bei durchschnittlich 2,98% (1,85% am Tag 19 p.c., 3,60% am Tag 2 p.p., 3,49% am Tag 32 p.p.), im Herzen bei durchschnittlich 2,42% (2,07% am Tag 19 p.c., 2,48% am Tag 2 p.p., 2,70% am Tag 32 p.p.) und im Gehirn bei durchschnittlich 0,65% (0,34% am Tag 19 p.c., 0,31% am Tag 2 p.p., 1,29% am Tag 32 p.p.) (Abb. 4.30.).

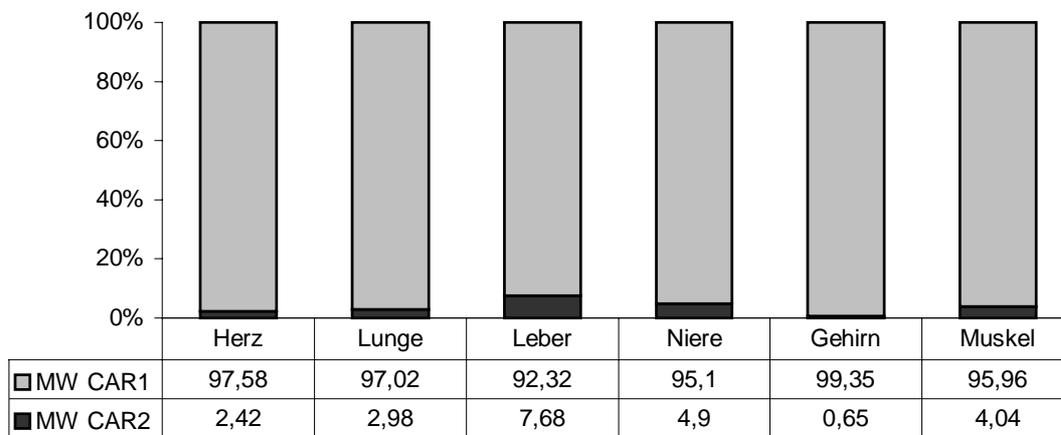


Abb. 4.30.

Mittelwerte (MW) des prozentualen Anteils der rCAR1- bzw. rCAR2-mRNA-Expression an der Summe aus rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression

4.2.7.2. Organverteilung der rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression

Die Organverteilung der rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression wurde durch die gemeinsame Untersuchung der Organe dreier Entwicklungsstadien ermittelt. Dabei erfolgte eine Korrektur der ermittelten Expressionswerte durch die alternativen GAPDH-Korrekturfaktoren nach Tab. 4.16., um die unterschiedliche GAPDH-mRNA-Expression in den einzelnen Organen zu berücksichtigen.

Am Tag 19 p.c. wurde die höchste rCAR1-mRNA-Expression im Gehirn ermittelt (gleich 100%). In den übrigen Organen wurde eine deutlich geringere Expression festgestellt. Sie betrug im Herzen 34,9%, in der Lunge 15,3%, in der Leber 7,1%, in der Niere 19,7% und in der Skelettmuskulatur 6,0% der Expression im Gehirn.

Am Tag 2 p.p. konnte eine ähnliche Organverteilung der rCAR1-mRNA-Expression festgestellt werden. Das Gehirn zeigte erneut die höchste Expression (100%). Dagegen betrug die Expression im Herzen 38,4%, in der Lunge 20,6%, in der Leber 12,0%, in der Niere 14,7% und in der Skelettmuskulatur 2,6% der Expression im Gehirn.

Am Tag 32 p.p. konnte eine Veränderung der rCAR1-mRNA-Expression in den einzelnen Organen festgestellt werden. So wies nun die Leber die höchste Expression auf (100%), wobei jedoch auch im Herzen mit 92,1% und in der Lunge mit 90,5% der Expression in der Leber eine vergleichsweise hohe Expression festgestellt wurde. In den anderen Organen war mit 10,7% in der Niere, 9,4% im Gehirn und 1,0% in der Skelettmuskulatur bezogen auf die Expression in der Leber nur eine geringe rCAR1-Expression nachweisbar. (Abb. 4.31.)

Die höchste rCAR2-mRNA-Expression am Tag 19 p.c. wurde in der Leber ermittelt (100%). Für die anderen Organe wurden folgende Werte festgestellt: im Herzen 85%, in der Lunge 33,5%, in der Niere 39,2%, im Gehirn 39,9% und in der Skelettmuskulatur 21,1% der Expression in der Leber.

Am Tag 2 p.p. zeigte das Herz die höchste rCAR2-Expression (100%), wobei auch in der Lunge mit 78,6% und in der Leber mit 73,0% der im Herzen ermittelten Expression eine vergleichsweise hohe Expression festgestellt wurde. Die Niere wies eine Expression von 55,8%, das Gehirn von 31,6% und die Skelettmuskulatur von 9,8% der Expression im Herzen auf.

Am Tag 32 p.p. konnte in Übereinstimmung mit der rCAR1-Expression die höchste rCAR2-Expression in der Leber festgestellt werden. Mit 36,3% und 46,7% der Expression in der Leber wiesen das Herz und die Lunge die nächsthöheren Expressionen auf. Dagegen zeigte die Niere mit 15,9%, das Gehirn mit 1,8% und die Skelettmuskulatur mit 0,9% der Expression in der Leber eine vergleichsweise niedrige rCAR2-Expression (Abb. 4.32.).

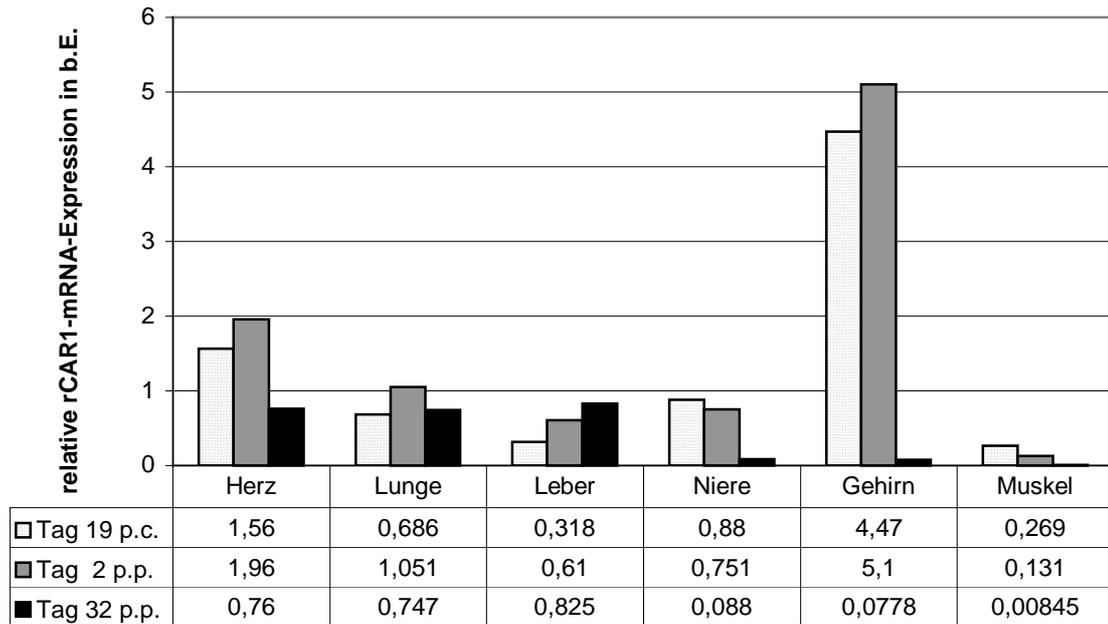


Abb. 4.31.
Vergleich der relativen rCAR1-mRNA-Expression in verschiedenen Organen

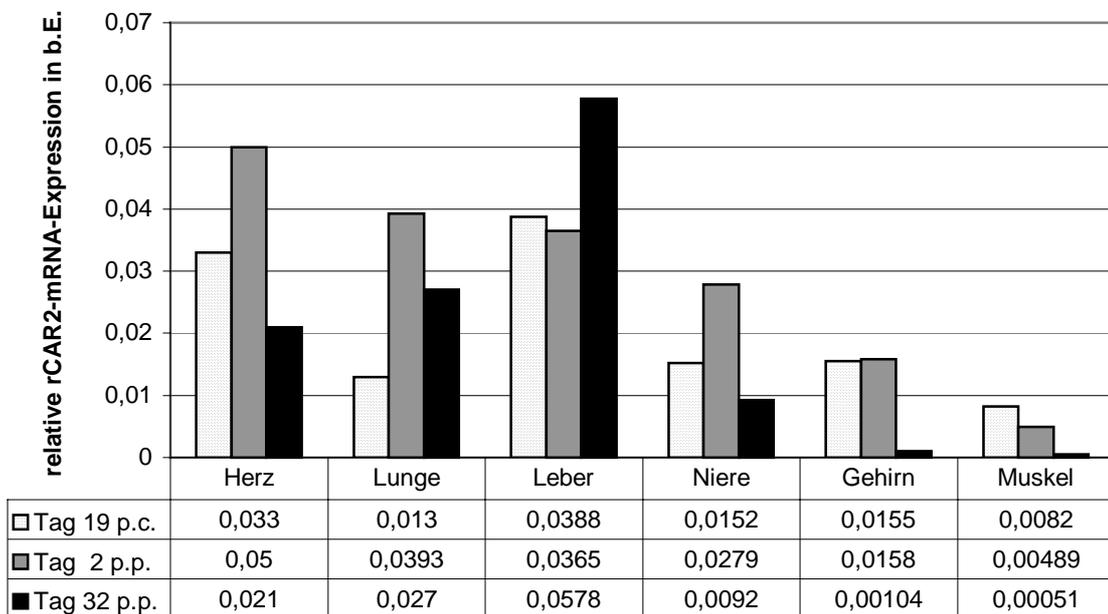


Abb. 4.32.
Vergleich der relativen rCAR2-mRNA-Expression in verschiedenen Organen

4.3. Untersuchung der rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in Rattenkardiomyozytenkulturen

4.3.1. rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Zelldichte

Neonatale Rattenkardiomyozyten (nRKMZ) wurden in unterschiedlicher Dichte ausgesät (Abb. 4.33.), 48 h später wurde die Gesamt-RNA präpariert und mittels kompetitiver RT-PCR, unter Verwendung der RNA-Längenstandards und Versuchsbedingungen, die in der kompetitiven RT-PCR zur Untersuchung der rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression während der Organogenese eingesetzt wurden (jedoch ohne Berücksichtigung eines GAPDH-Korrekturfaktors), auf die Expression von rCAR1- und rCAR2-mRNA untersucht.

Unabhängig von der Zelldichte war in allen Zellkulturplatten eine rhythmische Kontraktion der nRKMZ nachweisbar. Eine gleiche Kontraktionsrhythmik innerhalb eines Wells wurde bei einer Zellzahl von $1,6 \times 10^6$ und $3,2 \times 10^6$ Zellen pro Well beobachtet, während bei einer geringeren Zelldichte Zellen, die nicht in direktem Kontakt zueinander standen zum Teil einen unterschiedlichen Rhythmus zeigten. Zellen, die keinen Kontakt zu anderen Zellen hatten, zeigten in der Regel keine rhythmischen Kontraktionen.

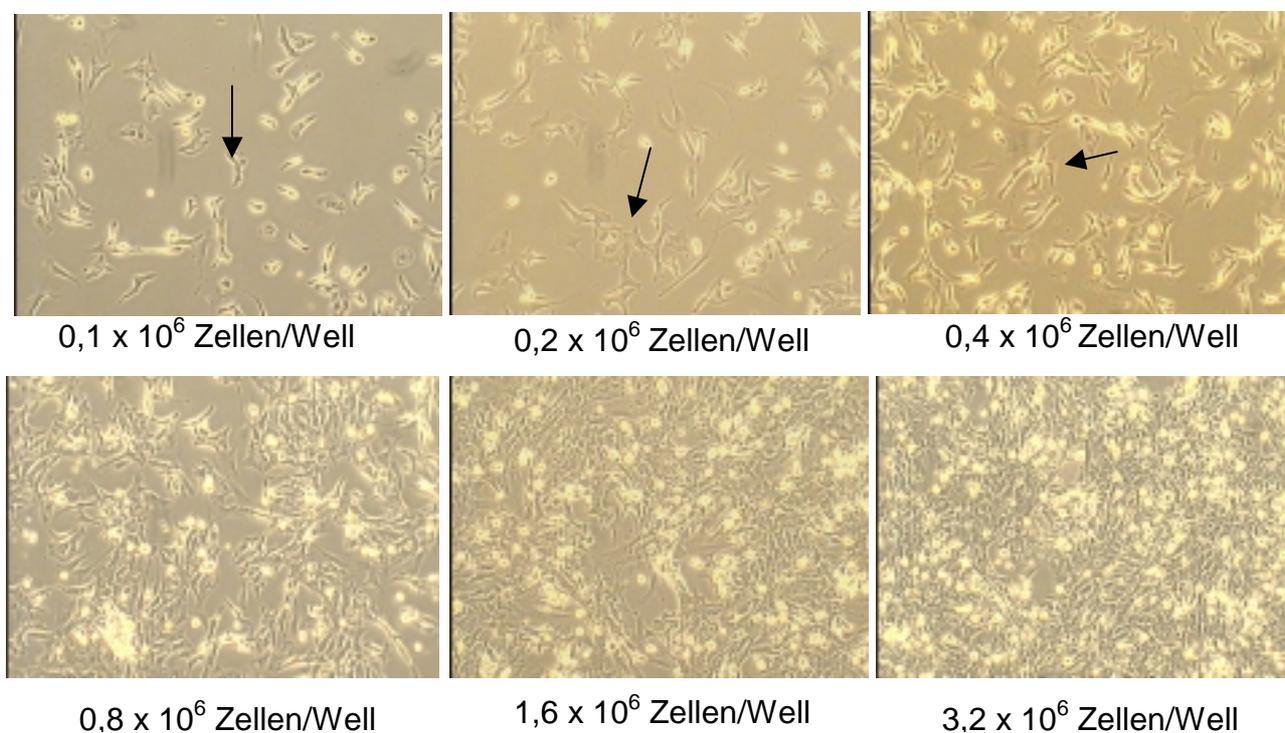


Abb. 4.33.
nRKMZ, ausgesät auf 6-Well-Zellkulturplatten, 40 h nach der Präparation aus Herzen 4 Tage alter Ratten; die Pfeile zeigen einzelne Zellen und Zellverbände

Mit zunehmender Zelldichte konnte eine nahezu lineare Abnahme der relativen rCAR1-mRNA-Expression festgestellt werden. So war die rCAR1-mRNA-Expression bei einer Zelldichte von $0,2 \times 10^6$ Zellen pro Well 9,1 mal höher als bei einer Zelldichte von $3,2 \times 10^6$ Zellen pro Well (Abb. 4.34.). Daneben erreichte die relative rCAR1-mRNA-Expression in nRKMZ *in vitro* in Abhängigkeit von der Zellzahl nur 55% ($0,2 \times 10^6$ Zellen pro Well) bis 6% ($3,2 \times 10^6$ Zellen pro Well) der relativen *in vivo*-rCAR1-mRNA-Expression im Herzen 4 Tage alter Ratten (Abb. 4.34.).

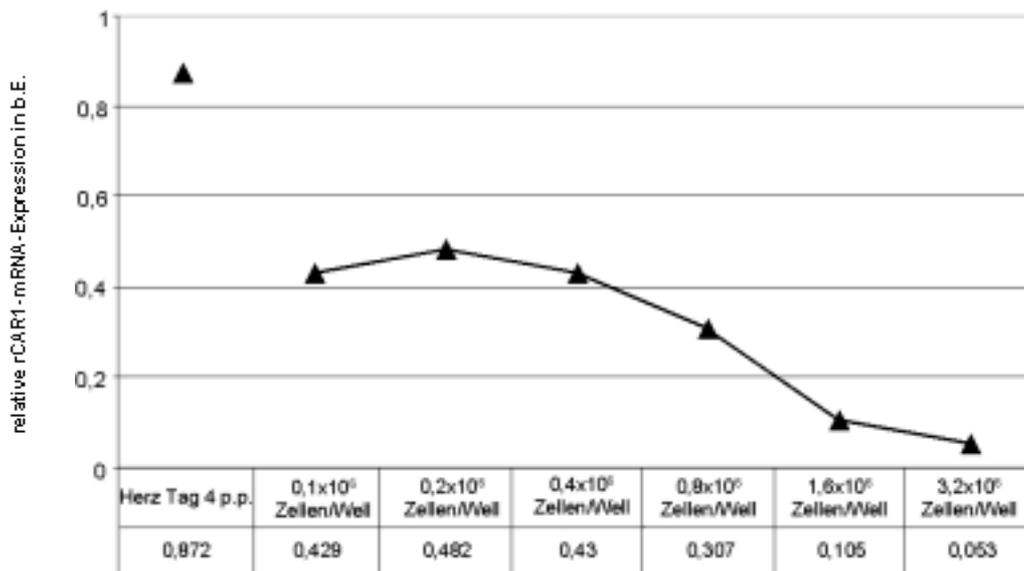


Abb. 4.34.
relative rCAR1-mRNA-Expression in nRKMZ in Abhängigkeit von der Zelldichte 48 h nach der Isolierung

Mit zunehmender Zelldichte konnte auch für rCAR2, ähnlich der Expressionsänderung bei rCAR1, eine Reduktion der mRNA-Expression beobachtet werden, wobei die relative rCAR2-mRNA-Expression bei einer hohen Zelldichte ($3,2 \times 10^6$ Zellen pro Well) um den Faktor 2,1 gegenüber dem Mittelwert der Expression bei geringer Zelldichte ($0,1 - 0,8 \times 10^6$ Zellen pro Well) abnahm (Abb. 4.35.). Für die relative rCAR2-mRNA-Expression wurde bei einer hohen Zelldichte eine Reduktion auf 70% ($1,6 \times 10^6$ Zellen pro Well) bzw. 55% ($3,2 \times 10^6$ Zellen pro Well) der *in vivo*-mRNA-Expression am Tag 4 p.p. nachgewiesen. Bei geringen Zelldichten ($0,1$ bis $0,8 \times 10^6$ Zellen pro Well) war hingegen keine Veränderung bzw. eine geringfügige Erhöhung der rCAR2-mRNA-Expression festzustellen (Abb. 4.35.).

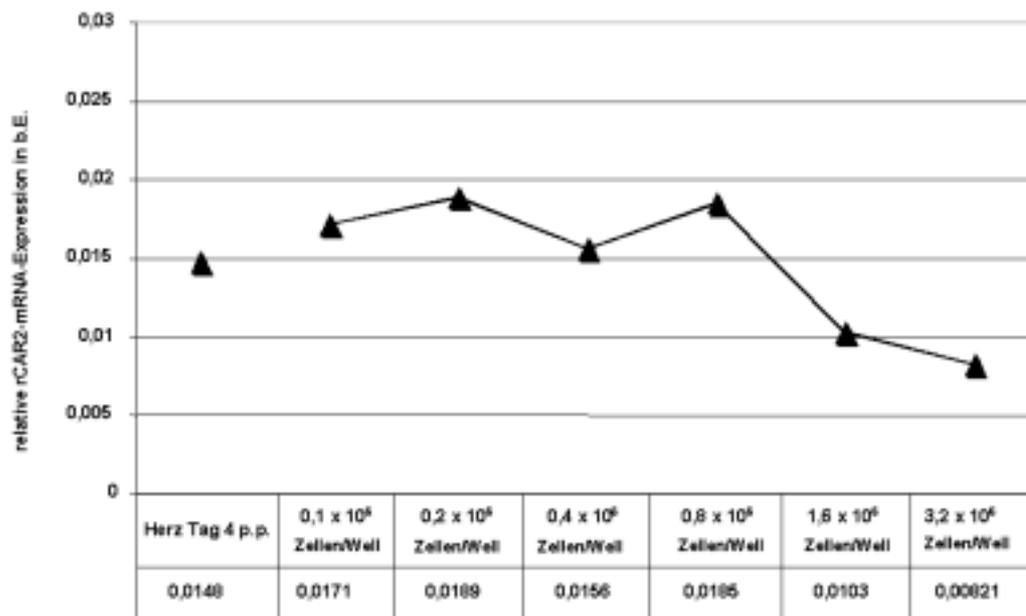


Abb. 4.35.
relative rCAR2-mRNA-Expression in nRKMZ in Abhängigkeit von der Zelldichte 48 h nach der Isolierung

4.3.2. rCAR1-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Kulturdauer und Zelldichte

Untersuchungen zum Einfluss der Kulturdauer auf die rCAR1-mRNA-Expression in nRKMZ durch Bestimmung der relativen rCAR1-mRNA-Expression mittels kompetitiver RT-PCR 24, 48 und 72 h nach der Isolierung zeigten, dass die Kulturdauer nur einen geringen oder keinen Einfluss auf rCAR1-mRNA-Expression besitzt. So konnte bei dicht ausgesäten nRKMZ ($2,4 \times 10^6$ Zellen pro Well) 72 h nach dem Aussäen eine geringe Erhöhung der rCAR1-mRNA-Expression um das 1,26-fache gegenüber der Expression 24 h nach dem Aussäen beobachtet werden, während es bei nRKMZ, die mit $0,2 \times 10^6$ Zellen pro Well ausgesät wurden, abgesehen von einer geringen Erhöhung nach 48h zu keiner Expressionsänderung kam. Dagegen betrug die rCAR1-mRNA-Expression in nRKMZ 24 bis 72 h nach der Isolierung in dünn gesäten Zellen durchschnittlich 44,5%, in dicht gesäten Zellen 20,7% der Expression im Herzen 4 Tage alter Ratten und 58,4 (dünn gesät) bzw. 27,2% (dicht gesät) der Expression frisch isolierter nRKMZ.

Unabhängig von der Kulturdauer konnte festgestellt werden, dass in nRKMZ mit niedriger Zelldichte ($0,2 \times 10^6$ Zellen pro Well) durchschnittlich 2,1-mal mehr rCAR1-mRNA exprimiert wurde als in nRKMZ, die 12 mal dichter ausgesät wurden. (Abb. 4.36.)

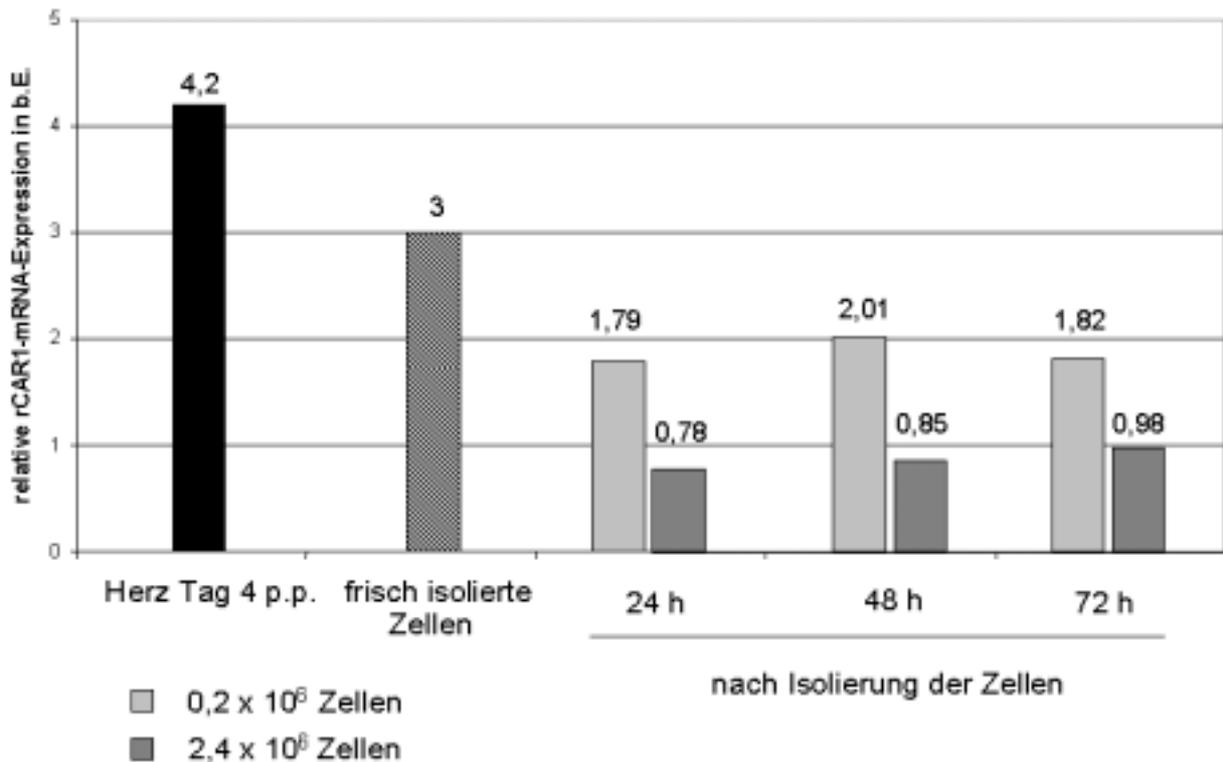


Abb. 4.36.
relative rCAR1-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Zelldichte und der Kulturdauer

4.4. Untersuchungen zur Bedeutung des CAR für den adenoviralen Gentransfer in Rattenkardiomyozytenkulturen

4.4.1. Überprüfung der eingesetzten Adenovektoren

4.4.1.1. Nachweis der korrekten Insertion der Transgene und Überprüfung der Adenovektoren auf RCA-Freiheit

Der für die Versuche verwendete Ad5CMVhCARs wies eine korrekte Insertion der hCAR-cDNA in die AdV-DNA auf, was mittels folgender Methoden überprüft wurde. Nach einer PCR unter Verwendung des im CMV-Promotor bindenden Primers CMV480s und des in der 3'UTR des bovinen Wachstumshormons bindenden Primers pZS2-3'UTRa konnte die erwartete Fragmentgröße (ca. 1250 bp) nach Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden (Abb. 4.37.). Das in der PCR erhaltene Fragment wurden anschließend sequenziert, wobei sowohl die korrekte Insertion der hCAR-cDNA als auch eine 100%ige Sequenzhomologie zu der ursprünglich in das Plasmid pZS2 klonierten cDNA festgestellt werden konnte. Weiterhin wurden 1 µg AdV-DNA mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaut. Entsprechend der

Lokalisation des Transgens im AdV wurde ein charakteristisches Bandenmuster nach Agarosegelelektrophorese erhalten, welches dem der theoretisch ermittelten Restriktionskarte für den AdV entsprach (Abb. 4.38.).

Der Ad5CMVhCARs wurde zudem mittels PCR unter Verwendung eines für das adenovirale E1B-Gen spezifischen *sense*-Primers (Ad5-3315s) und einem im E2A-Gen liegenden *antisense*-Primer (Ad5-4999a) auf das Vorhandensein von replikationskompetenten Ad (RCA) überprüft. Er wies keine Kontaminationen mit RCA's auf (Abb. 4.37.). Die weiterhin verwendeten Indikatorvektoren Ad5CMVGFP und Ad5CMVluc und der Kontrollvektor Ad5CMVrTTP waren im Labor vorhanden und ebenfalls als RCA-frei getestet worden.

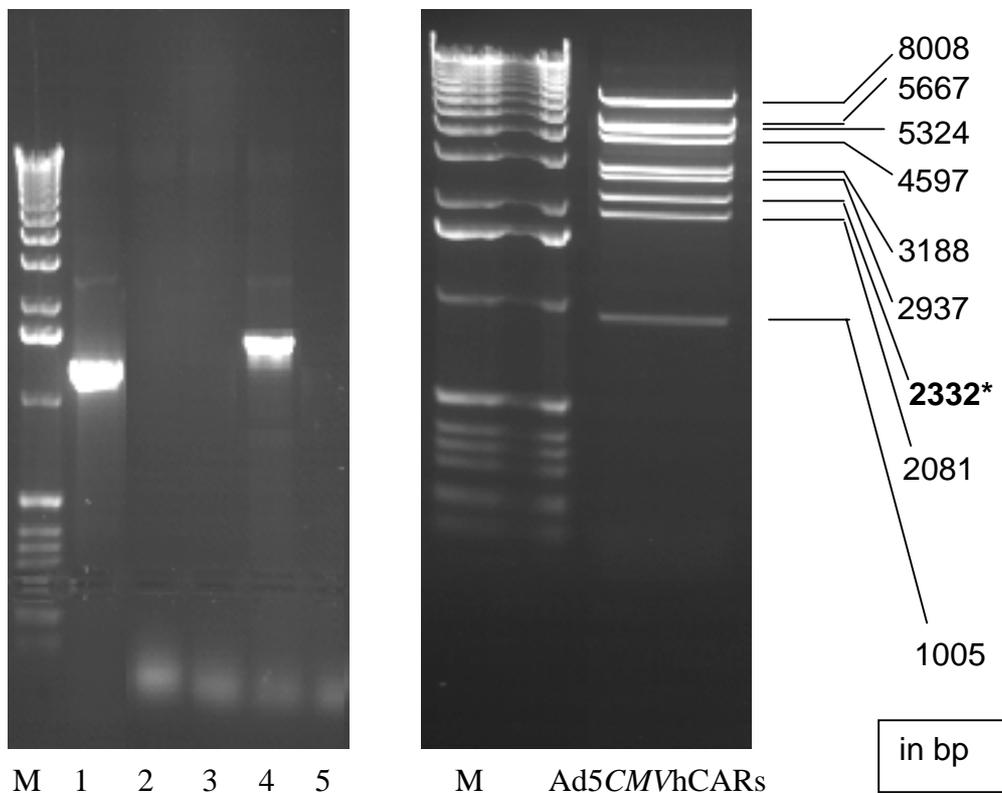


Abb. 4.37.

Abb. 4.38.

Abb. 4.37.

Nachweis der hCARs-cDNA in der AdV-DNA und der RCA-Freiheit der AdV-Präparation.

70 ng AdV-DNA wurden unter Verwendung des Primerpaares CMV480s/pZS2-3'UTRa (Bahn 1; Bahn 2 PCR-Negativkontrolle) bzw. mit dem Primerpaar Ad5-3315s/Ad5-4999a (Bahn 3; Bahn 4 RCA-kontaminierter AdV als Positivkontrolle; Bahn 5 PCR-Negativkontrolle) in einer PCR über 40 Zyklen amplifiziert und agarosegelelektrophoretisch aufgetrennt. M= Marker X (Roche)

Abb.4.38.

Agarosegelelektrophorese nach *HindIII*-Verdau von Ad5CMVhCARs

* charakteristische, die hCAR-cDNA enthaltende Bande; M= Marker X (Roche)

4.4.1.2. Adenovektorvermittelte hCAR-Expression in verschiedenen Zelllinien

Zum Nachweis der Expression des rekombinanten hCAR wurden EA.hy926-, HT-29- und CHO-K1-Zellen mit 5×10^5 Partikeln Ad5CMVhCARs/Zelle transduziert und 24 h später mittels Flow Cytometry unter Verwendung des anti-hCAR-Ak RmcB auf die Expression von endogenem und rekombinalem CAR untersucht.

Der Vergleich der endogenen CAR-Expression zwischen den beiden humanen Zelllinien HT-29 und EA.hy926 vor der Transduktion zeigte, dass HT-29-Zellen weniger endogenen CAR exprimierten. In den nicht humanen CHO-K1-Zellen war mit dem anti-hCAR-Ak RmcB endogener CAR nicht nachweisbar. (Abb. 4.38.)

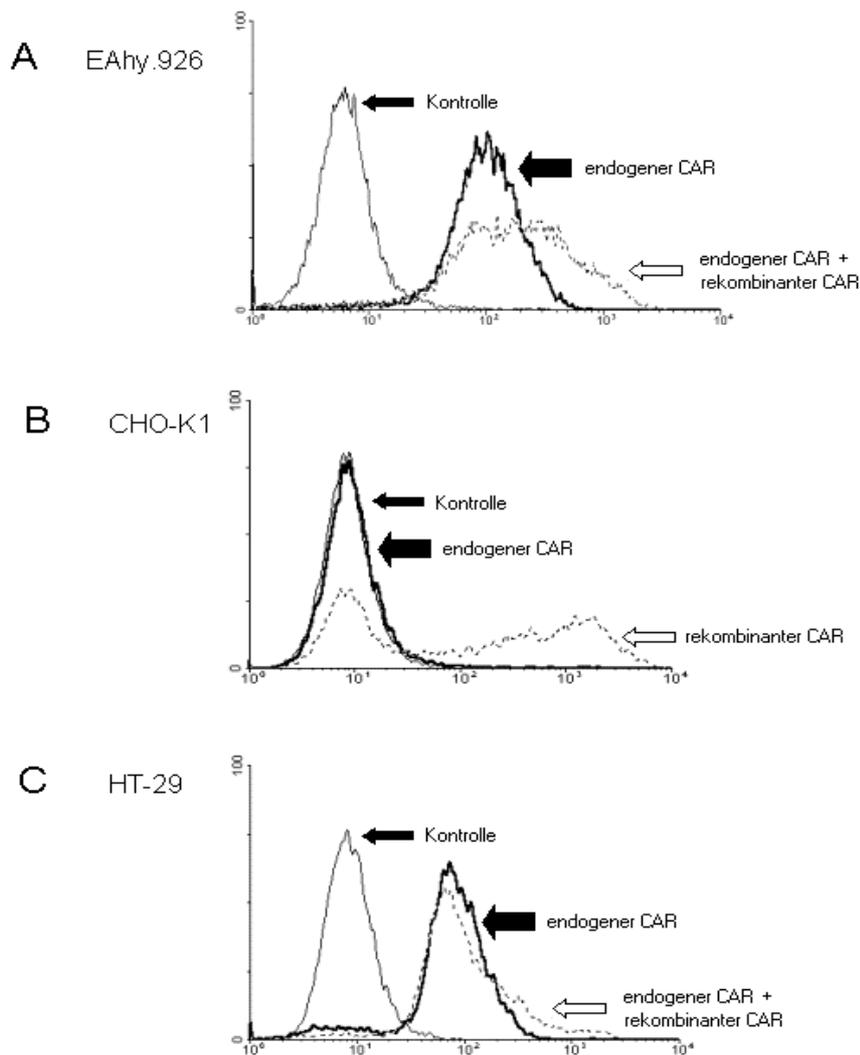


Abb. 4.38.

Nachweis von hCAR mittels FACS-Analyse vor und nach AdCMVhCARs-Transduktion.

Kontrolle = nicht transduzierte Zellen und Verwendung eines Isotypen-Ak

endogener CAR = nicht transduzierte Zellen und Verwendung des anti-hCAR-Ak RmcB

endogener + rekombinanter CAR = mit Ad5CMVhCARs transduzierte Zellen und Verwendung des anti-hCAR-Ak RmcB

Nach der Transduktion mit Ad5CMVhCARs blieb die Fraktion der CAR-exprimierenden Zellen in EA.hy926-Zellen und HT-29 Zellen unverändert ($9,2 \pm 0,0$ gegenüber $94,25 \pm 0,8$ und $89,4 \pm 0,6$ gegenüber $91,9 \pm 0,8$), während in CHO-K1-Zellen ohne nachweisbaren endogenen CAR $62,5 \% \pm 2,8 \%$ der Zellen rekombinanten hCAR auf der Zelloberfläche exprimierten. Gleichzeitig zeigte sich bei allen Zelllinien eine Verschiebung des für CAR ermittelten Histogramms nach rechts, was Ausdruck einer Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) und damit einer erhöhten CAR-Expression (endogen + rekombinant) pro Zelle ist. In EA.hy926-Zellen war diese Zunahme wesentlich stärker als in HT-29 Zellen, während in CHO-K1-Zellen nur rekombinantes hCAR erfasst wurde (Abb. 4.38.). Die Infektion der Zellen unter gleichen Bedingungen mit dem Kontroll-AdV Ad5CMVrTTP, führte weder zur Veränderung der Fraktion der hCAR-exprimierenden Zellen noch zu einer Erhöhung der CAR-Expression (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit dem neu entwickelten hCAR-exprimierenden AdV eine Expression des rekombinanten hCAR in verschiedenen Zelllinien möglich war.

4.4.2. Überprüfung der Adenovektor-Transduktionseffizienz in Rattenkardiomyozytenkulturen

In einem weiteren Versuch wurde die Transduktionseffizienz neonataler Rattenkardiomyozyten (nRKMZ) beim Einsatz von AdV geprüft. Dazu wurden nRKMZ zwei Tage nach der Isolierung mit Ad5CMVGFP infiziert. Wie aus Abb. 4.39. ersichtlich wird, exprimierten 24 h nach der Infektion mehr als 90% der Zellen GFP. Die GFP-exprimierenden Zellen zeigten im Vergleich zu nicht infizierten nRKMZ keinen Unterschied hinsichtlich der Kontraktilität und Vitalität.