

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 USSING-KAMMER-METHODE**

#### **2.1.1 Versuchstiere und Fütterungsregime**

Eine Gruppe von 12 Schafen gleicher Rasse und Herkunft, im Alter von 6 bis 9 Monaten und einem Gewicht zwischen 30 und 40 kg wurde in 6 Gruppen zu 2 Tieren eingeteilt. Um zu Versuchsbeginn eine Adaptation der Versuchstiere an eine energiearme Diät garantieren zu können, wurde allen Tiere bereits 8 Wochen vor Versuchsbeginn eine energiearme und rohfaserreiche Diät gefüttert. Im Anschluss wurden die einzelnen Versuchstiergruppen unterschiedlich lange mit Kraftfutter (Zusammensetzung siehe Tabelle 9) und Heu gefüttert. Heu stand den Tieren ad libitum zur Verfügung, während das Kraftfutter rationiert in 400 g-Portionen, zweimal täglich (7 Uhr morgens und 15 Uhr nachmittags), gefüttert wurde. Für die Dauer des Experiments wurde der Gesundheitsstatus sowie die tägliche Futteraufnahme dokumentiert.

#### **2.1.2 Entnahme und Präparation der Schleimhäute**

Die Schafe wurden am Ende der jeweiligen Konzentratfütterungsperiode (KFP) geschlachtet. Bei der Schlachtung werden etwa 2 bis 3 Minuten nach Eintritt des Todes die Vormägen aus der Bauchhöhle entnommen, der Pansen durch einen Schnitt entlang des Randes des cranioventralen Pansensacks eröffnet, entleert und mehrere etwa 10 cm x 30 cm große Stücke des ventralen Pansensacks herausgeschnitten, wobei auf gleichmäßigen Zottenbesatz geachtet wird. Die so entnommenen Gewebeproben werden wiederholt in 38°C warmer Pufferlösung gespült. Anschließend wird die *tunica mucosa* manuell von den darunter befindlichen Schichten (*tunica muscularis* und *tunica serosa*) abgelöst. Zum Transport der Proben werden diese in ein Dewargefäß, das mit einer 38°C warmen Pufferlösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 10) gefüllt ist, überführt. Der Puffer wird kontinuierlich mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) begast.

#### **2.1.3 Allgemeiner Versuchsaufbau**

Die Versuchstechnik geht auf eine von USSING und ZEHRAN (1951) entwickelte Methode zurück und dient der Erfassung von elektrophysiologischen Parametern unter *in vitro* Bedingungen (Ussing et al., 1951).

Die Schleimhaut wird in circa 3 cm x 3 cm große Stücke zerschnitten und so zwischen die beiden Hälften einer Ussingkammer eingespannt, daß serosal (= basolateral) wie mukosal

(= apikal) das Gewebe mit einer Fläche von 3,14 cm<sup>2</sup> in Kontakt mit dem Aussenmedium steht. Auf beiden Seiten schützt ein Silikonring das Gewebe vor Beschädigungen im Randbereich (edge damage). Über kurze Schläuche werden beide Kammerhälften mit einem doppelwandigen Gasliftsystem verbunden, das im Inneren - die durch Begasung (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Gasliftsystem der Firma Landgraf) stetig umgewälzte - Pufferlösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 11) enthält, während im äußeren Mantel ein 38°C warmes Wasserbad (mittels Pumpthermostat: Haake D1) die Temperatur des Puffers konstant hält (Stevens, 1964).

#### 2.1.4 Elektrische Messungen

Vor dem Einspannen der Epithelien in die Kammern wird der Flüssigkeitswiderstand der Pufferlösungen und das Elektrodeneigenpotential gemessen und für den Versuch gespeichert, um die späteren Messungen um diese Werte automatisch korrigieren zu können. Zur Messung der elektrischen Parameter dienen 2 gewebe-nahe Kalium-Chlorid-Brücken, verbunden mit Ag-AgCl-Elektroden, welche die transepitheliale Potentialdifferenz erfassen, sowie 2 gewebe-ferne Agar-Brücken, verbunden über Ag-AgCl-Elektroden zur externen Stromspeisung. Potentialdifferenz (PD<sub>t</sub>, mV) und Stromstärke (I, µA · cm<sup>-2</sup>) werden über eine computergesteuerte „voltage-clamp-Anlage“ (Windows, Clamp Version 2.02, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen) koordiniert und erfasst (Scheffler, 1984).

Etwa 45 Minuten nach dem Schlachtvorgang wird das Pansenepithel für 15 Minuten unter „open circuit-Bedingungen“ äquilibriert. Hierbei wird die transmurale Potentialdifferenz gemessen. Durch das Aussenden von Strompulsen (= ΔI, mit einer Amplitude von 50 µA, für die Dauer von 200 ms, im Abstand von 2,5 Minuten) kann die hierdurch kurzfristig veränderte Potentialdifferenz (= ΔPD) gemessen werden. Nach dem Ohm'schen Gesetz kann jetzt der transmurale Widerstand (= R<sub>t</sub>) berechnet werden.

**Gleichung 1** 
$$R_t = \frac{\Delta P}{\Delta I_t}$$

Die Gewebeleitfähigkeit (= G<sub>t</sub>) entspricht dem reziproken Wert des Gewebewiderstandes.

**Gleichung 2** 
$$G_t = \frac{1}{R_t}$$

Das Pansenepithel wird weitere 30 Minuten unter „short-circuit-Bedingungen“ äquilibriert bis sich ein „steady-state“ eingestellt hat. Hierbei wird das transepitheliale Potential durch unidirektional gerichteten, externen Strom auf 0 mV reduziert. Der sogenannte Kurzschlussstrom entspricht genau der Summe aller elektrogenen Ionenbewegungen des

Epithels, so daß unter diesen Bedingungen ein elektrischer Gradient ausgeschlossen werden kann.

Da gleichzeitig auf beiden Seiten identische Pufferlösungen mit identischer Osmolarität eingesetzt werden, fehlt auch der chemische Gradient. Findet also unter Kurzschlussbedingungen ein Nettotransport statt, kann davon ausgegangen werden, daß es sich hierbei um einen aktiven Transport handelt.

### 2.1.5 Ionenflussmessungen für Natrium

Durch Zugabe radioaktiv markierten Natriums kann der unidirektionale Natriumflux gemessen werden. Pro Epithelstück kann nur eine Transportrichtung bestimmt werden. Für die Ermittlung der Nettotransportraten müssen jedoch beide Transportrichtungen an elektrophysiologisch ähnlichen Epithelien bestimmt werden. Die Paarbildung erfolgt anhand ähnlicher Gewebeleitfähigkeiten ( $G_T$ -Werte).

**Gleichung 3** 
$$J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$$

Hierzu werden zunächst die Isotope (80 kBq) auf einer Seite des Epithels zugegeben und 30 Minuten später, nach Äquilibration der Isotope, sowohl der gleichen Seite („heiße Seite“) als auch der anderen Seite („kalte Seite“) entnommen. Die Probe der heißen Seite dient der Bestimmung der spezifischen Aktivität, die der kalten Seite der Feststellung des Nullwertes. Im weiteren Verlauf werden der kalten Seite dreimal in definierten Zeitintervallen (alle 30 Minuten) Proben (mit einem Probenvolumen von 2 ml) entnommen, um den Ionentransport zu quantifizieren. Das hierdurch entstandene Volumendefizit wird durch Zugabe von Pufferlösung ausgeglichen.

### 2.1.6 Berechnungen

Zur Berechnung der Natriumfluxe wird die Radioaktivität der Proben, die auf der kalten Seite entnommen wurden, im Gammacounter ermittelt.

Nach der Berechnung der spezifischen Aktivität:

**Gleichung 4** 
$$Ak_{spez} = \frac{cpm_h}{V_h \cdot c} [cpm \cdot \mu mol^{-1}]$$

cpm = Radioaktivität der „heißen“ Probe (Mittelwert aus den 2 „heißen“ Proben)  
[counts per minute]

$V_h$  = Volumen der „heißen“ Probe [ml]

c = Konzentration des zu untersuchenden nicht radioaktiv markierten Isotops in der Pufferlösung [ $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]

können anschließend die Ionenfluxe nach folgender Formel direkt berechnet werden:

**Gleichung 5**

$$J = \frac{cpm_2 \cdot \frac{V_s}{V_p} - cpm_1 \cdot \frac{V_s - V_p}{V_p}}{Ak_{spez} \cdot A \cdot t} [\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}]$$

J = Ionenflux [ $\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ]

$cpm_1$  = 'Counts per minute' (Radioaktivität) der zu Beginn eines Fluxes entnommenen Probe

$cpm_2$  = 'Counts per minute' (Radioaktivität) der am Ende des entsprechenden Fluxes entnommenen Probe

$V_s$  = Puffervolumen im Gasliftsystem [ml]

$V_p$  = Probenvolumen der „kalten“ Seite [ml]

$Ak_{spez}$  = Spezifische Aktivität [ $\text{cpm} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ ]

A = Gewebefläche [ $\text{cm}^2$ ]

t = Dauer eines Fluxintervalls (Zeit zwischen 2 „kalten Proben“) [h]

## 2.2 ZELLKULTURVERFAHREN

Der qualitative und quantitative Nachweis bestimmter mRNA-Sequenzen erfolgte im Rahmen von *in vivo* (Pansengewebe frisch geschlachteter Schafe) und *in vitro*- Versuchen an kultivierten Pansenepithelzellen (REC).

### 2.2.1 Kultivierung von REC

Die eingesetzten Zellen (Beschreibung siehe 8.2.1.1) wurden aus der Pansenschleimhaut eines adulten Schafes isoliert und durch wiederholtes Passagieren immortalisiert.

Die in Stickstoff konservierten Zellen werden zur weiteren Kultivierung aufgetaut und in „Dulbecco`s minimal essential Medium“ (DMEM, siehe Tabelle 12) resuspendiert. Um das im Gefriermedium enthaltene DMSO (Dimethylsulfoxid) zu extrahieren, wird die Zellsuspension 10 Minuten bei 1.000 rcf zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das so „gereinigte“ Zellpellet wird in 15 ml DMEM resuspendiert, die Zellen auf einer Zellkulturschale ausgesät und anschließend im Brutschrank bei 100% Wasserdampfsättigung in einem Luft-CO<sub>2</sub>(5%)-Gemisch bei 38°C inkubiert. 24 Stunden nach dem Aussäen wird das

Zellkulturmedium erneuert. Etwa 72 Stunden später wird entsprechend dem Dichtegrad des Monolayers im Verhältnis 1:4 subkultiviert. Für die Experimente werden Kulturen ab dem 8. Kulturtag verwendet.

## 2.3 STIMULATIONSVERSUCHE

Nach Stimulation durch Faktoren, die im Zusammenhang mit der Adaptation des Pansenepithels diskutiert werden, wurde die Expression von 5 Transportproteinen *in vitro* an REC quantitativ untersucht.

Bei den ausgewählten Stimulationsfaktoren handelt es sich um:

Fettsäuren:

- **Butyrat**: 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM und 1 mM, über 24 h
- **Laktat**: 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM und 1 mM, über 24 h

CO<sub>2</sub>:

- **CO<sub>2</sub>**: 7,5% über 6 h, 12 h und 24 h

Wachstumsfaktoren, die möglicherweise an der Adaptation des Pansenepithels beteiligt sind:

- **IGF1** (Insulin like growth factor 1): 2 ng / ml, über 6 h, 12 h und 24 h
- **EGF** (Epidermal growth factor): 2 ng / ml, über 6 h, 12 h und 24 h

Komponenten, die möglicherweise am Mechanismus der Signaltransduktion im adaptierenden Pansenepithel beteiligt sind:

- **di-Butyl-cAMP** (cyclische Adenosinmonophosphat): 25 µM, 50 µM, 75 µM und 100 µM, über 24 h
- **PGE2** (Prostaglandin E2): 100 nM, über 6 h, 12 h und 24 h

Zur Durchführung der Versuche wird dem Kulturmedium 24 Stunden vor Beginn der Stimulationsversuche das fötale Kälberserum entzogen, um die Proliferation der Zellen zu minimieren. Zu diesem Zeitpunkt wird jeweils eine Probe entnommen (1. Aliquot). Anschließend werden die Stimulationsfaktoren dem Medium als Additivum zugefügt und die Zellen gemäß der definierten Parameter (Konzentration, Inkubationsdauer) des entsprechenden Stimulans inkubiert. Nach Abschluss dieser Inkubationsphase werden Proben der „stimulierten“ Zellen entnommen (2.-4. Aliquot). Abschliessend werden die Zellen jedes Versuchs wiederholt unter Basisbedingungen (24 h, 38°C, Medium ohne FKS-Zusatz) inkubiert. Pro Versuch wird am Ende dieser Phase jeweils eine Probe entnommen (5. bzw. 6. Aliquot). Eine Übersicht der Versuchsabläufe und Probennahmen ist in Tabelle 3 dargestellt.

## Material und Methoden

Alle Proben werden mit einem Zellschaber geerntet und bei -20°C zur weiteren Verarbeitung konserviert.

**Tabelle 3** Tabellarische Darstellung der Probennahme im Verlauf der Stimulationsversuche mit REC

Stimulans	Konzentration	6 h-Probe	12 h-Probe	24 h-Probe
Butyrat	0,1 mM			(2.Aliquot)
	0,3 mM			(3.Aliquot)
	0,5 mM			(4.Aliquot)
	1,0 mM			(5.Aliquot)
Laktat	0,1 mM			(2.Aliquot)
	0,3 mM			(3.Aliquot)
	0,5 mM			(4.Aliquot)
	1,0 mM			(5.Aliquot)
Kohlendioxid	7,50%	(2.Aliquot)	(3.Aliquot)	(4.Aliquot)
IGF1	2 ng / ml	(2.Aliquot)	(3.Aliquot)	(4.Aliquot)
EGF	2 ng / ml	(2.Aliquot)	(3.Aliquot)	(4.Aliquot)
di-Butyl-cAMP	25 µM			(2.Aliquot)
	50 µM			(3.Aliquot)
	75 µM			(4.Aliquot)
	100 µM			(5.Aliquot)
PGE2	100 nmol	(2.Aliquot)	(3.Aliquot)	(4.Aliquot)

## **2.4 ISOLIERUNG DER GESAMT-RNA AUS TIERISCHEN ZELLEN**

### **2.4.1 Stabilisierung der Proben-RNA**

Zur Vermeidung von spezifischem und nicht spezifischem RNA-Abbau wurden Zell- und Gewebeproben sofort nach der Entnahme stabilisiert. Dazu wird jede Probe (ca. 50 mg) in mindestens dem zehnfachen Volumen RNA-Stabilisationsmedium (RNA-Later, siehe 8.4.1) aufbewahrt. Die RNA der so behandelten Proben ist bei Raumtemperatur 7 Tage, bei 2-8°C 4 Wochen und bei -80°C unbegrenzt haltbar.

### **2.4.2 Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben**

Aus den stabilisierten Gewebeproben wurde die gesamte RNA präpariert. Hierzu werden 50 mg Gewebe in RNA-Later mit einem rotierenden Dispergierwerkzeug so lange zerkleinert, bis es völlig homogen in der Flüssigkeit vorliegt. Um bei der Probenzerkleinerung keine Kreuzkontaminationen zu ermöglichen, wird das Dispergierwerkzeug nach jeder Probe gereinigt. Dazu wird der Zerkleinerungsaufsatz demontiert und mit demineralisiertem Wasser gesäubert. Hiernach werden mögliche lipophile Rückstände durch eine zweiminütige Reinigung in 70% Ethanol entfernt. Nach Remontage wird der Aufsatz 3 mal für 2 Minuten in 50 ml demineralisiertem Wasser bei maximaler Frequenz gespült. Die zerkleinerte Probe wird bei 16.100 rcf 1 Minute lang zentrifugiert. Die Stabilisationsflüssigkeit wird abpipettiert und die zerkleinerte Gewebeprobe in Lysispuffer resuspendiert. Der Lysispuffer lysiert die homogenisierte Probe und inaktiviert durch seinen Guanidin-Isothiozyanat-Anteil RNasen, wodurch der RNA-Abbau verhindert wird. Zum weiteren Homogenisieren der zellulären Probenanteile wird das Lysat direkt in eine „QIAshredder-Säule“ pipettiert und 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das durchgeflossene Lysat wird mit 600 µl Ethanol vermischt und im Folgenden zur Bindung an eine Silica-Gel-Membran pipettiert und 15 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Zur Beseitigung von Kontaminationen führt man in der Folge Waschschriffe und eine DNase-Behandlung durch. Für den ersten Waschschriff werden 350 µl RW1 Puffer in die Silica-Gel-Membran pipettiert und anschließend 15 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Für die DNase-Behandlung werden 10 µl DNase1 Stammlösung mit 70 µl Puffer gemischt, direkt auf die Membran aufgetragen und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für den zweiten Waschschriff werden weitere 350 µl Puffer auf die Membran pipettiert und anschließend 5 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Anschliessend werden 500 µl Waschpuffer auf die Silica-Gel-Membran pipettiert, 15 Sekunden bei



maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Durchfluss dekantiert. Abschließend werden wiederholt 500 µl Waschpuffer auf die Säule pipettiert und 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Zum Eluieren der RNA wird die mit 50 µl Wasser beladene Säule 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss enthält die gelöste RNA der Gewebeprobe, die im Folgenden weiterbearbeitet oder bei – 70°C gelagert wird.

### **2.4.3 Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes**

Die aufgearbeiteten Proben werden nach der Präparation auf ihren tatsächlichen Gehalt (Menge und Reinheit) an RNA überprüft. Hierzu werden 50 µl einer Probe mit einem Photometer untersucht. Anhand der Extinktionswerte bei definierten Wellenlängen (230 nm, 260 nm, 280 nm, 320 nm) kann die Konzentration und Reinheit der RNA-Probe näherungsweise kontrolliert werden. Die Konzentration wird aus der Extinktion bei 260 nm berechnet. Ein Reinheitsoptimum der RNA-Präparation liegt vor, wenn maximale Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen werden können. Nach der Konzentrationbestimmung werden die Proben auf 100 ng / µl verdünnt. So steht in jeder Probe die gleiche Konzentration an Gesamt-RNA für die Synthese der cDNA (siehe 2.7.2) zur Verfügung. Die RNA Proben werden bei einer Temperatur von -70°C gelagert, um die RNA vor Abbauprozessen zu schützen.

## **2.5 KONVENTIONELLE PCR**

### **2.5.1 PCR und RT-PCR allgemein**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer) binden am 5'-und 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz, bevor eine DNA-abhängige DNA-Polymerase die Ausgangssequenz (Template) repliziert. Wiederholte Zyklen von Einzelstrangbildung (Denaturation), Primeranbindung (Annealing) und Neustrangsynthese (Elongation) führen zu einer exponentiellen Vermehrung des von den Primern flankierten Bereichs der Proben-DNA (Template-DNA). Als Endprodukt wird in vielfacher Kopie doppelsträngige lineare DNA spezifischer Sequenz gebildet.

Für die RT-PCR muss die Zielsequenz in der isolierten RNA vor der eigentlichen PCR revers transkribiert werden. Hierzu wird die Proben-RNA durch eine reverse Transkriptase (Polymerase) in cDNA umgeschrieben (Erststrangsynthese = first-strand-synthesis), welche ihrerseits für die anschließende PCR als Template-DNA fungiert.

Als Endprodukt der RT-PCR liegt doppelsträngige lineare DNA in vielfacher Kopie vor, deren Sequenz durch das eingesetzte RNA-Template und die verwendeten Primer determiniert wird.

### **2.5.2 Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide für die konventionelle PCR**

Polymerasen benötigen zu Beginn der Transkription eine doppelsträngige Matrize. Primer sind Startermoleküle, die spezifisch an eine einzelsträngige RNA- oder DNA-Matrize hybridisieren. Bei einer RNA-Matrize (Einzelstrang) bindet zum ersten Zyklus nur ein Primer (antisense Primer), wohingegen bei einer DNA-Matrize (Doppelstrang) gleich beide Primer binden können. Sie flankieren die Sequenz des zukünftigen PCR-Produktes. Von deren Ende aus synthetisiert die Polymerase (reverse Transkriptase bei RNA, DNA abhängige DNA Polymerase bei DNA) den komplementären DNA-Strang in 5'-3'-Richtung.

Da das Primerpaar (sense und antisense Primer) einen spezifischen RNA- bzw. DNA-Bereich hybridisieren soll, muss dieser Sequenzbereich bekannt sein. RNA- und DNA-Sequenzen sowie deren komplementären Aminosäuresequenzen können über Internetseiten, wie NCBI oder Ensembl (siehe 8.7.3.1) recherchiert werden. Der für die Aminosäuresequenz des Proteins codierende Bereich wird EDV-gestützt identifiziert, wobei der codierende Bereich der mRNA dadurch erkannt wird, daß er von Startcodon (ATG) und Stopcodon (TAA oder TGA) begrenzt wird. Die Primer werden computergestützt so gewählt,

dass sie einen Sequenzbereich von 500–1000 Basenpaaren (bp) flankieren. PCR-Produkte dieser Größe lassen sich gut darstellen und bei Bedarf präparieren (siehe 2.5.7), wobei der zeitliche Aufwand und die Fehlerquote der PCR gering bleiben. In der codierenden Sequenz identifizierte Primer sollten eine Länge von etwa 20 bp, einen für die PCR geeigneten Schmelzpunkt ( $T_m = 58^\circ\text{C}$ ), eine geringe Neigung zur Aneinanderlagerung untereinander (Complementarity) sowie nur kurze zusammenhängende Abschnitte eines Nucleotides (Runs) besitzen. Sind adäquate Primer gefunden, werden diese kommerziell synthetisiert (Fa. MWG). Gelieferte Primer werden nach Anweisung der Hersteller in Aqua purificata gelöst (100 pmol /  $\mu\text{l}$  = Stammlösung). Die Arbeitslösung wird durch Verdünnung auf 20 pmol /  $\mu\text{l}$  hergestellt und so in der PCR eingesetzt.

### **2.5.3 Protokoll der RT-PCR**

Die eingesetzte Methode zur RT-PCR ist ein One-Step Verfahren, dessen Ansatz entsprechend Tabelle 13 zusammengefügt wird und gemäß Tabelle 14 im Thermocycler inkubiert wird. Im Anschluss wird eine DNA-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.5.4).

### **2.5.4 DNA-Gelelektrophorese**

Diese Methodik dient der Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen. Als Vergleich dient ein DNA-Größenstandard (Gemisch aus Oligonukleotiden bekannter Länge).

Als Laufmedium wird ein 2%-iges Agarosegel in TAE-Puffer verwendet. Dieses wird als etwa 0,5 cm starkes Gel in die Gießapparatur gegossen und nach Aushärtung mit TAE-Puffer überschichtet. Anschließend werden je 10  $\mu\text{l}$  der DNA in wässriger Lösung (mit Probenpuffer vermengt) in eine Geltasche pipettiert. Als Größenstandard dienen 5  $\mu\text{l}$  DNA-Ladder. Das Gel wird 40 Minuten bei 110 V (Spannung) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Ablauf der Elektrophorese wird das Gel für 30 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (10  $\mu\text{g}$  / ml) entwickelt. Auf einem UV-Illuminator (Wellenlänge = 405 nm) wird das Gel belichtet und die Bande(n) der Proben-DNA mit der DNA-Ladder verglichen. Die Komponenten sind in 8.5.3 dargestellt.

### **2.5.5 PCR zur Vermehrung eines PCR-Produktes (Massen-PCR)**

Eine höhere Konzentration des PCR-Produktes kann die Klonierungseffizienz (siehe 2.6) steigern. Um dieses zu erreichen wird bei Bedarf die Menge an PCR-Produkt gesteigert. Bei einer Massen-PCR wird das RT-PCR-Produkt als Template in einer PCR eingesetzt, deren Ansatz (siehe Tabelle 15) mehrfach hergestellt und nach dem in Tabelle 16 beschriebenen

Protokoll inkubiert wird. Im Folgenden wird die bei der Massen-PCR gewonnene DNA gereinigt (siehe 2.5.6.)

### **2.5.6      Aufreinigung eines PCR-Produktes**

Ein PCR-Produkt liegt nach seiner Synthese in einer Lösung aus DNA-Polymerasen, Puffern, Primern und Nukleotiden vor. Um nur das PCR-Produkt in die nächsten Arbeitsschritte zu überführen, wird es gereinigt (Utensilien siehe 8.5.5).

Der PCR-Ansatz wird mit 5 Volumen Bindungspuffer vermischt. Bei der anschließenden Zentrifugation (1 Minute bei 15.700 rcf) wird das PCR-Produkt an eine Silica-Gel-Membran gebunden und der Durchfluss verworfen. Zur Reinigung werden 750 µl Waschpuffer zugegeben, zentrifugiert (1 Minute bei 15.700 rcf) und der Durchfluss wiederum verworfen. Im Folgenden wird durch wiederholte Zentrifugation die Membran getrocknet (1 Minute bei 15.700 rcf). Abschliessend wird die DNA mit 50 µl Wasser durch Zentrifugation aus der Membran gelöst (1 Minute bei 15.700 rcf). Die gereinigte DNA kann gekühlt gelagert oder direkt zur weiteren Bearbeitung eingesetzt werden.

### **2.5.7      Extraktion einer DNA-Bande aus einem Elektrophoresegel**

Dieser Arbeitsschritt wird durchgeführt, um DNA einer bestimmten Größe mit dem aus einem Agarosegel zu isolieren und zu reinigen (Utensilien siehe 8.5.6).

Die erwünschte Bande wird mit einem Skalpell aus dem Gel entfernt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Überschichtung mit 3 Volumen Bindungspuffer wird das Gelfragment bei etwa 50°C vollständig gelöst. Anschließend wird ein Gelvolumen Isopropanol zugegeben und mit diesem vermengt. Um die DNA zu binden, überführt man die Probe auf eine Silica-Gel-Membran und zentrifugiert diese für 1 Minute bei 15.700 rcf. Der Durchfluss wird verworfen. Zum Waschen werden 750 µl Waschpuffer zugegeben und 1 Minute 15.700 rcf zentrifugiert. Der Durchfluss wird wiederum verworfen. Hiernach wird nochmals 1 Minute bei 15.700 rcf zentrifugiert um die Membran zu trocknen. Zum Eluieren der DNA werden 30-50 µl Aqua purificata direkt auf die Membran pipettiert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 15.700 rcf wird der Durchfluss aufgefangen und kann anschließend bei -20°C konserviert oder in einer PCR eingesetzt werden.

## **2.6 KOLONIERUNG VON PLASMIDEN**

### **2.6.1 Klonierung von DNA in Plasmiden allgemein**

Als Klon bezeichnet man eine große Anzahl identischer Zellen oder Moleküle, die alle auf einen Ursprung - eine Zelle oder ein Molekül – zurückzuführen sind.

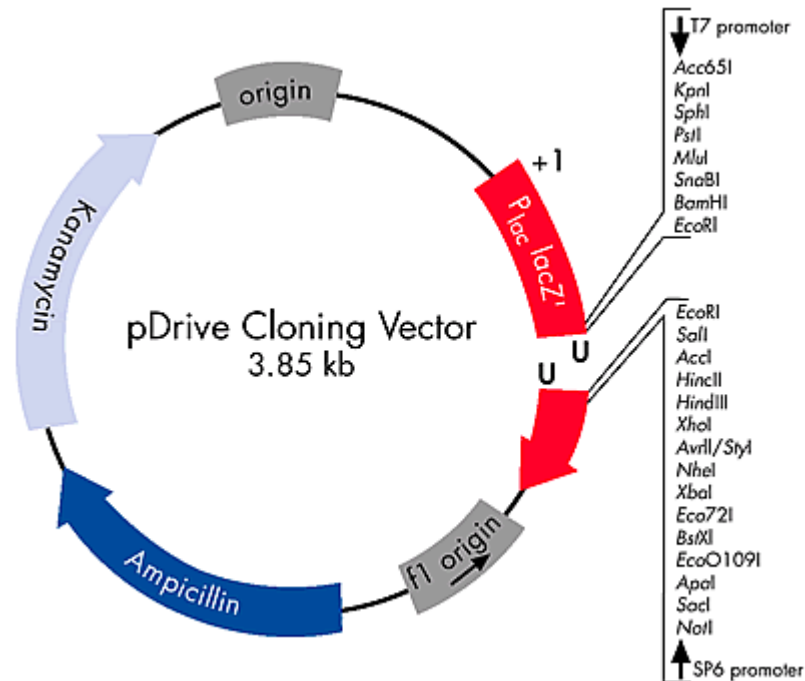
Ein PCR-Produkt wird in ein bakterielles Plasmid (Vektor) ligiert (siehe 2.6.3), in kompetente Bakterien transformiert (siehe 2.6.4) und nach Selektion plasmidtragender Bakterien (siehe 2.6.5) werden Kopien des ursprünglichen Fragments auf diese Weise reproduziert.

### **2.6.2 Anfügen von Adenosin-Überhängen**

PCR-Produkte können für eine effektive Verwendung in TA- oder UA-Klonierungssystemen (siehe 2.6.1) mit Adenosin-Resten gekoppelt werden. Hierzu wird durch eine terminale Adenosyl-Transferase an das 3'-Ende des PCR-Produkts ein A-Überhang angehängt, der eine effiziente Ligation in Vektoren ermöglicht, die 5'-terminale Uracyl- oder Thymin-Reste tragen. 8 µl PCR-Produkt und 2 µl A-Addition-Mix werden in ein Mini-Tube pipettiert und vorsichtig vermischt (siehe 8.6.1). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C kann das Produkt zur Ligation eingesetzt werden (siehe 2.6.3)

### **2.6.3 Ligationsprotokoll**

Bei der Ligation wird ein PCR-Produkt enzymatisch in einen Vektor integriert. Als Plasmid wurde in dieser Arbeit der „pDrive Cloning Vector“ (siehe 8.6.2) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Vektor, der in linearer Form vorliegt und einen U-Überhang besitzt. Hierdurch ist es möglich PCR-Produkte mit einem einzelsträngigen A-Überhang (siehe 2.6.2) effizient zu hybridisieren. Der Vektor besitzt einen Replikationsstartpunkt (ori = origin of replication), ein Ampicillinresistenzgen, ein Kanamycinresistenzgen und eine Region mit einer Reihe von Restriktionsschnittstellen zum Einklonieren und Herausschneiden von Fremd-DNA (MCS = Multiple cloning site). Ferner enthält der „pDrive Cloning Vector“ eine Region, namens „P<sub>lac</sub>lacZ“. Hierbei handelt es sich um den Bereich des Vektors, der das „blue-white-screening“ ermöglicht. Mittels „blue-white-screening“ ist es möglich, anhand der Farbe der Kolonien eine Selektion hinsichtlich des Klonierungserfolges durchzuführen. Die Region „P<sub>lac</sub>lacZ“, welche die MCS überspannt, kodiert das Protein β-Galactosidase. Transformierte Zellen (siehe 2.6.4), die kein PCR-Produkt enthalten, exprimieren die β-Galactosidase und bilden in Gegenwart von X-gal blaue Kolonien aus. Im Gegensatz dazu exprimieren transformierte Zellen, die das gewünschte PCR-Produkt enthalten, keine β-Galactosidase und bilden weiße Kolonien (Etschmann, 2002).



**Abbildung 8** Grafische Darstellung des verwendeten Vektors (pDrive Cloning Vector; Fa. Qiagen)

Für die Ligation werden 1 µl „pDrive Cloning Vector“, 4µl PCR-Produkt und 5µl „Ligation Master Mix 2x“ in ein Mini-Tube pipettiert und vorsichtig miteinander vermischt. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 4°C kann das Produkt zur Transformation (siehe 2.6.4) eingesetzt werden.

## 2.6.4 Transformationsprotokoll

Bei der Transformation werden Plasmide in kompetente Bakterien eingeschleust. Hierzu werden zunächst 2 Agarplatten (siehe 2.6.9) auf 37°C leicht vorgewärmt, „SOC-Medium“ (siehe 8.6.2.1) wird auf Raumtemperatur erwärmt und die kompetenten Bakterien (Qiagen, Genotyp: (F<sup>+</sup>::Tn10(Tc<sup>r</sup> proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>ZM15)recA1 and A 1 hsdR17(r<sub>k12</sub><sup>-</sup>m<sub>k12</sub><sup>+</sup>)lac glnV44 thi- 1 gyrA96 relA1)) auf Eis vorsichtig aufgetaut. Anschließend gibt man 2 µl Ligations-Reaktions-Mix (siehe 2.6.3) auf die kompetenten Bakterien und inkubiert den Ansatz 5 Minuten auf Eis. Nachfolgend wird der Ansatz in einen 42°C warmen Heizblock überführt und dort 30 Sekunden lang inkubiert, um nachfolgend erneut 2 Minuten auf Eis inkubiert zu werden. Abschließend pipettiert man 250 µl „SOC-Medium“ auf den Transformationsansatz und vermischt beides durch vorsichtiges Pipettieren miteinander. Auf eine der beiden vorgewärmten Agarplatten werden 50 µl, auf die andere 250 µl des fertigen Transformationsansatzes pipettiert und gleichmäßig ausgestrichen. Nach einer Inkubation der Bakterien bei 37°C über Nacht können weiße Bakterienkolonien in Flüssigmedium

überführt und so mit der Selektion von Bakterien begonnen werden, die rekombinante Plasmide tragen (siehe 2.6.5).

### **2.6.5 Selektion plasmidtragender Bakterien**

Nach der eigentlichen Transformation erfolgt die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien gegen nicht transformierte Bakterien anhand des Wachstums von Bakterien auf ampicillinhaltigen Agarplatten. Für die Selektion rekombinanter Bakterien nutzt man das „blue-white-screening“, wobei Plasmide mit PCR-Produkt das Wachstum weißer Kolonien auslösen. Anhand des Restriktionsverdau (siehe 2.6.7) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsfragmente (siehe 2.5.4) kann abschließend die Spezifität des fremden DNA-Fragments überprüft werden.

### **2.6.6 Präparation von Plasmid-DNA aus kleinen Bakterienkulturen**

Zur Erfolgskontrolle von DNA-Klonierungen in bakteriellen Plasmiden ist es nötig, serienweise kleine monoklonale Bakterienpräparationen qualitativ auf ihre Plasmide zu untersuchen. Zuerst werden zu diesem Zweck monoklonale Kolonien plasmidtragender Bakterien (siehe 2.6.4) in 2 ml LB Medium (siehe 2.6.10) mit Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator gehalten. Danach wird mit Hilfe der „STET-Methode“, bei der Bakterien in STET-Puffer aufgenommen werden, die Plasmid-DNA aus den Bakterien gereinigt. Nach Aufnahme in STET-Puffer werden die Bakterien in weiteren Arbeitsschritten durch Zugabe von Lysozym und anschließendes Aufkochen lysiert. Es folgt die Entfernung der Bakterientrümmen durch Zentrifugation und die alkoholische Fällung der im Überstand verbliebenen Plasmid-DNA. Endprodukt des Verfahrens sind 30 µl einer homogenen wässrigen Lösung von Plasmid-DNA (Etschmann, 2002).

In insgesamt 24 15ml-Reaktionsgefäßen werden je 2 ml ampicillinhaltiges LB-Medium (siehe 8.6.7) gefüllt. In jedes dieser Röhrchen überträgt man eine Kolonie monoklonaler, plasmidtragender Bakterien. Es folgt anschließend eine Inkubation über Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator (bei einer Frequenz von 250 / min). Je 1 ml der Bakteriensuspension wird in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (2 min. bei 15.700 rcf) und der Überstand dekantiert. Der Rest der Bakterienkultur wird verwahrt, um eine Langzeitlagerung plasmidtragender Bakterien zu ermöglichen (siehe 2.6.7) Die 24 entnommenen Proben werden in je 500 µl STET-Puffer (siehe Tabelle 17) resuspendiert und anschließend werden 25 µl Lysozylösung (10 mg / ml) je Probe hinzugefügt. Die Proben werden gemischt, bis eine homogene Suspension entstanden ist und anschließend 5 Minuten bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Danach inkubiert man die Proben für 40 Sekunden in einem 100°C warmen Heizblock und zentrifugiert die Proben 5 Minuten bei 15.700 rcf. Der hierbei

entstandene Niederschlag (Bakterienlysat) wird entfernt und verworfen. Um die Plasmid-DNA auszufällen, werden je 500 µl Isopropanol zugegeben, die Proben gründlich gemischt und bei RT 5 Minuten inkubiert. Anschließend zentrifugiert man die Proben 5 Minuten bei 15.700 rcf und dekantiert den Überstand. Abschließend wird der Niederschlag in je 30 µl Wasser resuspendiert, indem man die Proben für 30 Minuten bei 37°C und 1.400 rpm im Thermomixer schüttelt. Als Endprodukt erhält man 24 Proben gereinigter Plasmid-DNA.

### **2.6.7 Prüfen auf das Vorhandensein des Inserts im Plasmid durch Restriktionsverdau**

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen (Restriktionskartierung) dient der sequenzspezifischen Zerschneidung von DNA-Molekülen. Eine wässrige Nucleinsäurelösung wird mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen unter standardisierten Bedingungen inkubiert. Dabei werden die Nucleinsäuren sequenzspezifisch geschnitten, wobei die Sequenz der Schnittstelle vom verwendeten Enzym abhängt. Als Endprodukt des Verfahrens steht sequenzspezifisch geschnittene Nucleinsäure in unreiner wässriger Lösung zur Verfügung (Etschmann, 2002).

Hierzu werden 0,5 µl des entsprechenden Restriktionsenzym (in dieser Arbeit stets EcoR1), 2 µl des dazugehörigen Puffers (10-fach, Menge entspricht 10% des Gesamtvolumens) und 3 µl der aufgereinigten DNA (entspricht etwa einem Verhältnis von 1-5 IE Restriktionsenzym zu 1 µg DNA) in ein Mini-Tube pipettiert und anschließend mit Aqua purificata auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Bei der Auswahl des Restriktionsenzym ist grundsätzlich darauf zu achten, daß sich keine Schnittstelle für das verwendete Enzym im Insert befindet. Dieser Reaktionsansatz muss entsprechend der Anzahl an Reaktionsansätzen des Mini-Prep-Verfahrens 24-mal pipettiert werden. Anschließend werden die Proben eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Zur abschließenden Überprüfung der Spezifität des DNA-Fragments werden die enzymatisch verdauten Proben elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.5.4).

Zwei der das gewünschte Insert tragenden Bakterienkulturen (siehe 2.6.6) werden in einem Verhältnis von 1:1 mit Glycerin versetzt und bei -80°C zur weiteren Verarbeitung konserviert.

### **2.6.8 Vermehrung von Plasmiden im mittleren Maßstab (Midi-Prep-Verfahren)**

Für die anschließende Sequenzierung werden Plasmide in Mengenbereichen bis etwa ein Milligramm benötigt. Hierfür eignet sich ein bakterielles Vermehrungsverfahren, das von einer Suspensionskultur plasmidtragender Bakterien ausgeht. Nach Vermehrung der



Bakterien in etwa 500 ml LB-Medium mit antibiotischem Zusatz wird mit Hilfe des Midiprep Kit (siehe 8.6.6) eine alkalische Lyse der Bakterien und anschließend eine DNA-Aufreinigung durch Anionenaustauscherharze durchgeführt. Endprodukt ist eine gereinigte, konzentrierte, wässrige Plasmidlösung (Etschmann, 2002).

2 x 250 ml LB-Medium (siehe 2.6.9) werden in einem Erlenmeyerkolben vorgelegt, mit Ampicillin versetzt und je 5 µl der anhand des Restriktionsverdaus ausgewählten Bakteriensuspension (siehe 2.6.7) wird in den Erlenmeyerkolben zugegeben. Der Reaktionsansatz wird bei 37°C und einer Frequenz von 250 / min über Nacht auf einem Schüttelinkubator gehalten. Die 500 ml Bakteriensuspension werden auf insgesamt 10 50-ml-Reaktionsgefäße verteilt. Diese werden 5 Minuten bei 15.700 rcf zentrifugiert und der Überstand wird dekantiert. Sämtliche Bakterienpellets eines Klons werden in insgesamt 4 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Anschließend wird zu der Bakteriensuspension 4 ml Lysispuffer gegeben, dieser vorsichtig eingemischt und anschließend 5 Minuten bei RT inkubiert. 4 ml Neutralisationspuffer werden zugegeben, die Suspension wird erneut vorsichtig gemischt und anschließend 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im Folgenden wird die Bakteriensuspension 10 Minuten bei 15.557 rcf und 4°C zentrifugiert. Es wird mit dem entstandenen plasmidhaltigen Überstand weitergearbeitet, das Bakterienlysat wird verworfen. Anschließend wird ein Silica-Membran äquilibriert, indem man 4 ml Äquilibrationpuffer auf die Säule pipettiert, der durch die Membran abtropft. Im Folgenden wird der zuvor gewonnene Überstand auf die Säule gegeben. Die Flüssigkeit folgt ebenfalls der Schwerkraft, wobei die DNA-Moleküle in der Membran gebunden werden. Anschließend wird die Membran 2-mal durch die Zugabe von je 10 ml Waschpuffer gereinigt. Hierbei werden die verbliebenen Bestandteile der zuvor verwendeten Lösungen sowie bakterielle Kohlenhydrate entfernt. Durch die abschließende Zugabe von 5 ml Elutionspuffer wird die DNA aus der Säule eluiert. Das Eluat wird in einem 15 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen und anschließend durch die Zugabe von 3,5 ml Isopropanol präzipitiert. Hierzu wird die Lösung 5 Minuten bei RT leicht geschwenkt und im Anschluss 30 Minuten bei 15.700 rcf zentrifugiert und der Überstand wird dekantiert. Nachfolgend wird das DNA-Pellet durch Zugabe von 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und 15 Minuten bei 15.700 rcf zentrifugiert und der Überstand wird abermals dekantiert. Nach einer 10-minütigen Trocknungsphase des Pellets (durch Inkubation bei 37°C) wird das DNA-Pellet in 500 µl Aqua purificata gelöst. Durch die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA im Photometer (siehe 2.4.3) wird eine Dokumentation des DNA-Gehalts der einzelnen Proben ermöglicht. Die abschließende Erfolgskontrolle erfolgt durch eine Sequenzierung des Inserts im Kontext des Vektors (Sequence Laboratories Göttingen GmbH / <http://www.SEQLAB.de>). Die Proben (ca. 500 µl) werden bei -20°C konserviert.

### **2.6.9 Herstellung von LB (Luria / Miller) Agarplatten**

Zur Herstellung von 1000 ml LB-Agar (Utensilien siehe 8.6.7) werden 40 Gramm LB-Agar (Fa. Roth) in 1000 ml voll entsalztes (VE) Wasser überführt, gemischt und das Gemisch anschließend aufgekocht. Nachdem sich der LB-Agar auf 50°C abgekühlt hat, werden Ampicillin, X-gal und IPTG hinzugefügt. Der LB-Agar wird etwa 0,5 cm hoch unter sterilen Bedingungen in Platten gegossen, die anschließend bei 4°C gelagert werden können.

Um die Funktionsfähigkeit der hergestellten Platten zu überprüfen, wird eine Platte mit kompetenten Bakterien, eine zweite Platte mit transformierten kompetenten Bakterien beimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Auf der einen Platte sollte kein Kolonienwachstum stattgefunden haben, auf der anderen Platte hingegen sollten weiße Kolonien sichtbar geworden sein (Ampicillinresistenz).

### **2.6.10 Herstellung von LB-Medium**

Zur Herstellung von LB-Medium (Utensilien siehe 8.6.7) werden 25 Gramm LB-Broth in 1000 ml VE-Wasser überführt und das Gemisch anschließend aufgekocht. Das Flüssigmedium wird abschließend autoklaviert.

## 2.7 QUANTITATIVE PCR

### 2.7.1 Allgemeines

Für die Erstellung von Genexpressionsprofilen muss die Kopienzahl der gesuchten mRNA-Spezies relativ quantifiziert werden. Dieses erfolgt durch reverse Transkription und anschließende quantitative PCR. Die quantitative oder „real-time“ PCR (qPCR) repräsentiert eine spezifische und sensitive Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren (Freeman et al., 1999; Wilhelm, 2003). Im Vergleich zur Endprodukt-PCR (konventionelle PCR), bei der DNA-Produkte nach Beendigung aller Amplifikationszyklen durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden, ermöglicht es die qPCR, bei welcher nach jedem Amplifikationszyklus der Gehalt an doppelsträngiger DNA gemessen wird, Aussagen über die Ausgangsmenge an DNA zu treffen (Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993). Mit beiden Methoden werden *in vitro* geringste Mengen spezifischer DNA-Abschnitte amplifiziert und detektiert.

Bei der qPCR wird ein Thermocycler (siehe 8.7.2) eingesetzt, der ein optisches Detektionsmodul zur Messung der Fluoreszenz eines Farbstoffs (SYBR-Green) enthält (Bustin, 2002). Dieser Cyanin-Farbstoff bindet ausschließlich an doppelsträngige (ds) DNA (Morrison et al., 1998) und wird als Interkalator unspezifisch in die Windungen der dsDNA eingebaut. SYBR Green fluoresziert im gebundenen Zustand nach Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge (497 nm), wobei die Emissionswellenlänge 520 nm beträgt (Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993). Durch Messung der Fluoreszenz nach jedem PCR-Zyklus wird die Bestimmung der Menge an PCR-Produkten erreicht. Nach Beendigung des gesamten qPCR-Laufs ergibt die Aneinanderreihung der einzelnen photometrischen Fluoreszenzwerte eine Amplifikationskurve. Während der ersten Amplifikationszyklen ist der Gehalt an PCR-Produkt noch so gering, daß die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz nicht überschritten wird. Die Amplifikationskurve hat in diesem Abschnitt eine Steigung von null und entspricht der Basislinie. Anschließend folgt eine annähernd exponentielle Vermehrung des PCR-Produkts, die durch einen steilen Anstieg der Amplifikationskurve gekennzeichnet ist. Im Folgenden flacht die Steigung der Amplifikationskurve, bedingt durch Substratverbrauch und Enzymschöpfung wieder ab und eine Reaktionssättigung stellt sich ein. So ergibt sich insgesamt ein sigmoider Verlauf der Amplifikationskurve. Zur Verrechnung der ermittelten Amplifikationskurven, wird deren Verlauf auf einen Zahlenwert reduziert, der als „Cycle-Threshold Value“ ( $C_T$ -Wert) bezeichnet wird. Der  $C_T$ -Wert entspricht der Zykluszahl, bei welcher eine Amplifikationskurve beim Übergang in die exponentielle Amplifikation einen Schwellenwert überschreitet, der als „Cycle Threshold“ bezeichnet wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde der „Cycle Threshold“ auf einen Wert von 100 RFU (relative fluorescence units) festgelegt.

Da das Fluorophor SYBR-Green unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, ist eine Unterscheidung zwischen Artefakten oder Primerdimeren, die während der PCR-Reaktion ebenfalls einen Fluoreszenzanstieg verursachen können und dem spezifischen PCR-Produkt nicht möglich. Die Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primerdimeren erfolgt im Anschluss an den PCR-Lauf mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse. Hierbei wird das PCR-Produkt einer allmählichen Temperaturerhöhung von 55°C auf 95°C ausgesetzt, wobei die Fluoreszenz ständig kontrolliert wird. Im Verlauf der Temperaturerhöhung kommt es zu einem steilen Fluoreszenzabfall, wenn der produktspezifische Schmelzpunkt erreicht ist. Dieser hängt von der PCR-Produktlänge und dem Gehalt des PCR-Produkts an Guanin und Cytosin (GC-Gehalt) ab. Durch doppelt reziproke Darstellung des Verlaufs von Temperatur und Fluoreszenz kann der Schmelzpunkt als „Peak“ einer Kurve bestimmt werden.

### **2.7.2 cDNA-Synthese**

Da die relative Quantifizierung von mRNA durch qPCR erfolgt, muss die RNA vor der eigentlichen Untersuchung in cDNA revers transkribiert werden. Bei der reversen Transkription (RT, cDNA-Synthese) wird die Menge (Quantität) und die Information (Qualität) der Gesamt-RNA auf cDNA übertragen. Zu diesem Zweck werden RT-Kits verwendet, welche reverse Transkriptase, Primer und RT-Puffer enthalten. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete RT-Kit (siehe 8.7.1) beinhaltet Oligo-dT-Nukleotide und Random-Hexamer-Nukleotide als Primer. Dadurch werden sowohl mRNA als auch rRNA revers transkribiert. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Reaktionsprotokoll sind Tabelle 19 und Tabelle 20 zu entnehmen. An der stabilen cDNA werden nun die Gehalte der verschiedenen Ziel- und Kontrollsequenzen mittels quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bestimmt (siehe 2.7.3).

### **2.7.3 Protokoll der qPCR**

Die in der reversen Transkription (siehe 2.7.2) hergestellte cDNA wird zur Erstellung des Expressionsprofils des gesuchten Gens durch qPCR untersucht. Ein Reaktionsansatz (siehe Tabelle 21) aus Polymerase, spezifischen Primern und cDNA wird in einem Thermocycler inkubiert und die Bildung spezifischer PCR-Produkte wird in jedem Zyklus kontrolliert. Am Ende der qPCR wird eine Schmelzkurvenanalyse zur Bestimmung der Spezifität des PCR-Produktes durchgeführt (siehe 2.7.1). Für jede zu untersuchende Probe wird ein dreifacher Reaktionsansatz (Triplet) in eine 96-Lochplatte pipettiert und anschliessend durch qPCR analysiert. Alle Proben werden im Thermocycler nach dem in Tabelle 22 beschriebenen

Temperaturprofil behandelt. Dabei wird in jedem Zyklus die Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenzanalyse (Data acquisition) findet in Zyklus 2, Schritt 2 sowie im Zyklus 5 statt.

## **2.7.4 Etablierungsverfahren**

### **2.7.4.1 Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide für die qPCR**

PCR-Primer werden anhand verschiedener Regeln in Homologie zur nachzuweisenden Nukleotidsequenz (target sequence) ausgewählt. Als „target sequence“ fungieren die experimentell ermittelten Nukleotidsequenzen der klonierten PCR-Produkte des entsprechenden GOI (siehe 2.5, 2.6). Bei der Primersuche für die qPCR müssen Kriterien berücksichtigt werden, welche bei jeder Form der PCR von Bedeutung sind (siehe 2.5.2) und solche, die für die qPCR spezifisch sind (Amplikonlänge 70-120bp, Exon-Exon-Grenze im PCR-Produkt).

Für die vorliegende Arbeit wurden die Oligonucleotide mit Hilfe der Software „Primer3“ (siehe 8.7.3.1) ausgewählt. Durch die Integration von Exon-Exon-Grenzen wird der alleinige Nachweis von mRNA garantiert. Genomische DNA (gDNA), welche als Kontaminante in RNA-Präparationen enthalten sein kann, enthält Gensequenzen, die aus Exons und Introns bestehen, wohingegen sich cDNA nur aus Exons zusammensetzt. Durch die Integration von Exon-Exon-Grenzen in das PCR Produkt wird gewährleistet, daß PCR Produkte aus cDNA und aus gDNA anhand ihrer Schmelzkurven eindeutig differenzierbar sind. Informationen über die Lokalisation der Exon-Exon-Grenzen wurden für die vorliegende Arbeit auf der Internetseite „Ensembl“ (siehe 8.7.3.1) im Humangenom recherchiert und sequenzspezifisch übertragen. Die Primersynthese erfolgt durch die Firma MWG Biotech; Ebersberg (siehe 8.7.3.2).

### **2.7.4.2 Bestimmung des Temperaturoptimums**

Das verwendete qPCR Protokoll (siehe 2.7.3) beinhaltet einen kombinierten Annealing-Elongationsschritt (siehe Tabelle 22). Die optimale Annealing-Temperatur, bei welcher ein maximaler Abstand zwischen spezifischer Amplifikation und Negativkontrollamplifikation besteht, kann zwischen PCR-Produkten variieren. Daher wird zur Bestimmung des Temperaturoptimums ein qPCR-Lauf mit einem Temperaturgradienten von 53 bis 67°C während der Annealing-Elongationsphase durchgeführt. Jeder Ansatz wird hierfür dreifach (Triplet) pipettiert. Weiterhin werden jeweils Negativkontrollen mitgeführt.

### **2.7.4.3 Bestimmung der PCR Effizienz**

Die PCR-Effizienz ist für die präzise Quantifizierung von Bedeutung und charakterisiert den Anteil an target-cDNA, welcher während der Annealing-Elongationsphase verdoppelt wird. Bei einer Effizienz von 100% findet pro Zyklus eine Verdoppelung der Menge an PCR-

Produkt statt. Nach 3,333 Zyklen liegt bei einer hundertprozentigen Effizienz eine Verzehnfachung der Ausgangsmenge vor. Die Effizienz wird durch Variablen wie Amplikonlänge, Sekundärstruktur und Primerqualität beeinflusst und sollte für die Primerkombinationen der Ziel- und Referenzsequenzen gleich sein (Pfaffl, 2001).

Zur Effizienzbestimmung werden Plasmide als target-cDNA eingesetzt, welche die Sequenz des qPCR-Produkts enthalten (siehe 2.5, 2.6). So wird gewährleistet, daß die im Folgenden ermittelten Daten eines qPCR-assays spezifisch für das GOI sind. Ausgehend von einer Konzentration von 1 ng / µl Plasmid-DNA wird eine 6-stufige Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfaktor von  $10^{-1}$  erstellt und jeweils als Dreifachansatz (Triplet) mit Negativkontrollen in einem qPCR-Experiment eingesetzt. Nach der Amplifikation werden die Ausgangsmengen an target-cDNA in einer logarithmischen Funktion als Regressionsgerade gegen den  $C_T$ -Wert dargestellt. Bei einer Effizienz von 100% beträgt die Steigung (Slope) der hieraus resultierenden Geraden -3,333. Die Steigung der Regressionsgeraden gilt als ein Indikator für die Amplifikationseffizienz (siehe Gleichung 6). Der Toleranzbereich der Effizienz wurde in der vorliegenden Arbeit auf  $95\% < \text{Effizienz} < 101\%$  festgelegt.

Der Korrelationskoeffizient beschreibt die Kontinuität der Steigung in Bezug auf die verschiedenen Verdünnungsstufen und beträgt im Idealfall 1. In der vorliegenden Arbeit wurde für den Lauf zur Bestimmung der PCR-Effizienz ein Korrelationskoeffizient von  $\geq 0,998$  gefordert.

**Gleichung 6** 
$$\text{Effizienz} = 10^{\left(-\frac{1}{\text{Slope}}\right)}$$

Im Anschluss an die qPCR zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz wurde eine Schmelzkurvenanalyse (siehe 2.7.1) durchgeführt, um den produktspezifischen Schmelzpunkt zu bestimmen.

Nach der Etablierung kann ein qPCR-Assay mit optimiertem Protokoll, gesicherter Spezifität und bekannter Effizienz für die Bestimmung der Menge spezifischer mRNA-Moleküle in einer Probe, eingesetzt werden.

### 2.7.5 Referenzgene

Alle Test- und Basiswerte der Proben werden zur relativen Quantifizierung der Expression auf die Expressionsrate von Referenzgenen („Housekeeping Genes“, „Housekeeper“) bezogen, um biologische Variationen bei der Ergebnisinterpretation zu berücksichtigen (siehe 2.7.8). „Housekeeper“ sind Gene, die essentiell für den Erhalt der Zellfunktion sind, ubiquitär exprimiert werden und deren Transkription nicht von experimentellen Bedingungen

beeinflusst werden (Weisser et al., 2004; Zhang et al., 2005). Die  $C_T$ -Werte des Referenzgens dürfen im Proben- und Kontrollgewebe nicht systematisch variieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde  $\beta$ -Aktin (mRNA) als Referenzgen eingesetzt. Die Expressionsraten ( $C_T$ -Werte) von  $\beta$ -Aktin werden in der relativen Quantifizierung der qPCR zur Normalisierung auf die Expressionsraten ( $C_T$ -Werte) der jeweiligen Zielgene bezogen (Rasmussen, 2001).

### **2.7.6 Kontrollen**

Als Positivkontrolle dient ein qPCR-Lauf, in welchem Plasmide bekannter Sequenz als Template eingesetzt werden (siehe 2.7.4). Als Negativkontrolle fungiert ein Ansatz ohne Template („No Template Control“, NTC; siehe 2.7.3). Zur Prüfung der RNA-Präparationen (siehe 2.4.2) auf DNA-Verunreinigungen wird für jede RNA-Probe eine  $\beta$ -Aktin-PCR ohne vorherige reverse Transkription durchgeführt (RNA-Kontrolllauf). Dabei wird jeweils 1  $\mu$ l RNA (100 ng /  $\mu$ l) als Template eingesetzt. Bei kompletter Reinheit der RNA-Proben ergeben sich identische Kurven für Negativ- und RNA-Kontrolle, da ein DNA-Template für eine  $\beta$ -Aktin Amplifikation in diesem Ansatz fehlt.

### **2.7.7 Auswertung der qPCR-Ergebnisse**

Nach Beendigung der qPCR erzeugt das Computerprogramm „MyiQ“ (Fa. Biorad), welches mit dem Thermocycler und der optischen Einheit gekoppelt ist, die um die Hintergrundfluoreszenz korrigierte Amplifikations- und Schmelzkurve.

#### **2.7.7.1 Analyse der Amplifikationskurve**

Zur Darstellung der Amplifikations- bzw. Schmelzkurve wird die Fluoreszenz (Relative Fluorescence Units, RFU) gegen die Zykluszahl bzw. Temperatur aufgetragen. Die Kurven eines Triplets verlaufen im Idealfall identisch. Die verschiedenen Amplifikationskurven vergleicht man anhand ihrer  $C_T$ -Werte (threshold cycle value; siehe 2.7.1). Der  $C_T$ -Wert wird als Zahl ausgedrückt und repräsentiert die Zusammenfassung der Amplifikationskurve in einem numerischen Wert. Der  $C_T$ -Wert verhält sich indirekt proportional zur vorhandenen DNA-Menge der Probe. Je höher der  $C_T$ -Wert (d.h. je höher die Zykluszahl ist, bei der die Fluoreszenzkurve den Schwellenwert überschreitet), desto weniger cDNA bzw. mRNA befindet sich in der untersuchten Probe. Aus den 3 erhaltenen  $C_T$ -Werten (Triplet) wird pro Probe das arithmetische Mittel gebildet. Zur Bewertung der Spannweite dreier  $C_T$ -Werte einer Probe wird der Mittelwert mit einem laborintern definierten „Confidence-Wert“ belegt. Die Bedeutung des Confidence-Wertes ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Proben mit

einem Confidence-Wert von 0 und 1 werden nicht ausgewertet und müssen wiederholt werden.

**Tabelle 4** Bewertungsschema verschiedener C<sub>T</sub>-Werte innerhalb eines Triplets

Differenz des größten und kleinsten C <sub>T</sub> -Werts	Confidence-Wert
< 0,1	4
0,1-0,2	3
0,2-0,5	2
0,5-1,0	1
>1,0	0

### 2.7.8 Relative Quantifizierung (ddC<sub>T</sub>-Methode)

Die gemittelten C<sub>T</sub>-Werte einer Probe werden zur Bestimmung der Expressionsrate des GOI mit Hilfe der ddC<sub>T</sub>-Methode zur relativen Quantifizierung untersucht (Livak et al., 2001). Bei diesem Berechnungsschema wird der gemittelte C<sub>T</sub>-Wert (siehe 2.7.7.1) des GOI jeder Probe zunächst gegen den gemittelten C<sub>T</sub>-Wert des Referenzgens (siehe 2.7.5) normalisiert. Anschliessend werden die normalisierten C<sub>T</sub>-Werte des GOI unterschiedlicher Proben miteinander verglichen, um die Abweichung in der Expressionsrate des GOI zwischen den Proben zu ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Definition der verwendeten Proben und C<sub>T</sub>-Werte folgende Nomenklatur verwendet: Als *Target (Targ)* wird das zu untersuchende Gen (Gene of Interest, GOI) bezeichnet. Die *Referenz (Ref)* stellt das Housekeeping-Gen β-Aktin dar. Die experimentell beeinflusste Probe, bei welcher die Abweichung der Expressionsrate des GOI gemessen werden soll, wird als *Testprobe (Test)* bezeichnet. Die experimentell unbeeinflusste Probe, die als Bezug für die Testprobe dient wird als *Basisprobe (Ctrl)* bezeichnet.

Für eine relative Quantifizierung müssen die C<sub>T</sub>-Werte des Targets (*TargTest*, *TargCtrl*) und der Referenz (*RefTest*, *RefCtrl*) in der Test- und Kontrollprobe bekannt sein. Der Expressionsunterschied des GOI in Basis- und Testprobe, normalisiert gegen das Referenzgen, wird in der ddC<sub>T</sub>-Methode mit Hilfe folgender Formel berechnet:

**Gleichung 7** 
$$FC = 2^{-((RefCtrl - TargCtrl) - (RefTest - TargTest))}$$

Das Ergebnis wird als „Fold Change“ (FC) ausgedrückt und beschreibt die normalisierte Expressionrate des GOI in der Testprobe (Test) als Vielfaches der normalisierten Expressionrate des GOI in der Basisprobe (Ctrl). Aufgrund der exponentiellen Berechnungsformel (siehe Gleichung 7) liegen Werte von 0,5 < FC < 2 in einem Bereich, innerhalb dessen keine zuverlässige Aussage über Genregulation möglich ist und werden



daher als unverändert gegenüber der Kontrolle bewertet. Bei FC-Werten von 0 bis 0,5 ist das GOI in der Testprobe gegenüber der Basisprobe herabreguliert (down-regulated). Bei FC-Werten von über 2 ist das GOI in der Testprobe gegenüber der Basisprobe hochreguliert (up-regulated).

In dem verwendeten Rechenmodell wird keine Korrektur für divergierende PCR-Effizienzen (siehe 2.7.4.3) zwischen den Nachweisreaktionen für Target- und Referenzgen durchgeführt. Daher muss die Effizienz der verwendeten qPCR-Reaktionen annähernd 100% betragen. Bei der Etablierung der qPCR-Assays wurde daher die PCR-Effizienz geprüft und es wurden nur solche PCR-Assays verwendet, die eine Effizienz von mindestens 95% besitzen (siehe 2.7.4.3).