

3 Material und Methoden

3.1 Inkubation der Hühnerembryonen

3.1.1 Herkunft und Bebrütung der Hühnerembryonen

SPF-Valo Hühnereier der Rasse „White Leghorn“ werden über die Firma *Lohmann Tierzucht GmbH* bezogen (Siehe 8.1.1). Die Muttertiere sind 20-45 Wochen alt und unterliegen einem Standard-Aufzuchtprogramm. Die Nahrung der Legehennen besteht aus einem vierphasigem Hühnerfutter, welches zur Keimreduzierung dampfbehandelt wurde. Die Futterration wird dem Körpergewicht und dem Alter entsprechend und in Abhängigkeit vom Beleuchtungsprogramm gewählt. Die Beleuchtung erfolgt künstlich in Dunkelhäusern. Das Beleuchtungsprogramm wird dem Alter und weiteren Bedingungen (Temperatur) angepasst. Bei den Kücken wechseln sich kurze Hell- und Dunkelphasen ab, welche mit zunehmendem Alter länger werden.

Die Bebrütung der SPF-Valo Eier im Versuchslabor erfolgt in Brutschränken mit Ventilationssystem und automatischer Wendevorrichtung (Siehe 8.1.1). Die Temperatur beträgt durchgehend 37,5°C (+/- 0,25%), die Luftfeuchtigkeit 60% (+/- 2%). Die einzige Ausnahme in Bezug auf die Bebrütungstemperatur stellt die Gruppe V0 dar, die über 24 h bei 40,0°C bebrütet wurde.

Um normoxische Inkubationsbedingungen zu schaffen, werden die Eier in Raumluft (21% Sauerstoff) bebrütet. Um einen verminderten Sauerstoffgehalt in der Inkubationsluft zu erreichen, wird ein Gasgemisch aus 15% Sauerstoff und 85% Stickstoff bzw. 100% Stickstoff (Anoxie) in den Brutschrank eingeleitet. Das exakte Mischungsverhältnis der beiden Gase wird durch Anwendung eines Regelsystems, bestehend aus zwei Massendurchflussreglern und einem Flow-Bus, gewährleistet. Das Regelsystem ist von der Firma *MÄTTIG Meß- und Regeltechnik GmbH* speziell für unsere Anforderungen gefertigt worden (Siehe 8.1.1). Zusätzlich wird die Gaskonzentration innerhalb des Inkubators in regelmäßigen Abständen mittels einer Sauerstoffelektrode überprüft.

3.1.2 Messung des Sauerstoffgehaltes im Brutschrank

Das O₂-Meter wird regelmäßig zur Überprüfung der Gasverhältnisse in der Inkubationsluft eingesetzt (Siehe 8.1.2). Es gibt Auskunft über die Sauerstoffionenkonzentration in Flüssigkeiten und Gasen. Hierbei verändert die Ionenkonzentration im Messmedium über die Messmembran die Konzentration des Innenelektrolytes der Elektrode und damit auch die

Spannung zwischen der inneren Elektrode und dem Innenelektrolyt. Die Änderung der Spannung ist der Sauerstoffionenkonzentration proportional. Zur Eichung des O₂-Meters wird die Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft mit derjenigen in einer sauerstofffreien Lösung verglichen. Als sauerstofffreie Lösung wird eine 3%ige Natriumdithionitlösung (Siehe 8.1.2) verwendet.

3.1.3 Versuchsablauf

Folgendes Inkubationsschema wird zur Untersuchung der Auswirkung eines chronischen Sauerstoffmangels auf einen Hühnerembryo verwendet.

<u>Gruppe/Versuch (V) 0:</u>	D10	<u>Probennahme</u>
	D1 – D9	Bebrütung bei 21% O ₂ (Raumluft)
	D9 – D10	Bebrütung bei 15% O ₂ und 40°C RT
<u>V1</u>	D12	<u>Probenentnahme</u>
	D1 - D6	Bebrütung bei 21% O ₂ (Raumluft)
	D6 - D12	Bebrütung bei 15% (Testgruppe) bzw. 21% O ₂ (Basisgruppe)
<u>V2</u>	D18	<u>Probenentnahme</u>
	D1 – D6	Bebrütung bei 21% O ₂ (Raumluft)
	D6 – D12	Bebrütung bei 15% (Testgruppe) bzw. 21% O ₂ (Basisgruppe)
	D12 - D18	Bebrütung bei 21% O ₂ (Raumluft)
<u>V3</u>	D18	<u>Probenentnahme nach 30 Minuten bei 0% O₂</u>
	D1 - D6	Bebrütung bei 21% O ₂ (Raumluft)
	D6 - D12	Bebrütung bei 15% (Testgruppe) bzw. 21% O ₂ (Basisgruppe)
	D12 – D18	Bebrütung bei 21% O ₂ (Raumluft)
<u>V4</u>	D18	<u>Probenentnahme nach 45 Minuten bei 0% O₂</u>
	D1 - D6	Bebrütung bei 21% O ₂ (Raumluft)
	D6 - D12	Bebrütung bei 15% (Testgruppe) bzw. 21% O ₂ (Basisgruppe)
	D12 – D18	Bebrütung bei 21% O ₂ (Raumluft)

Alle zu den Versuchen (Testgruppen) parallel durchgeführten Kontrollen (Basisgruppen) werden bei 37,5°C (+/- 0,25%) inkubiert. Die Sauerstoffkonzentration der Basisgruppe V0 beträgt ununterbrochen 21%. Zu beachten ist, dass die Basisgruppen zu V3 und V4 zusammen mit den Testgruppen einer akuten Anoxie von 30 bzw. 45 Minuten ausgesetzt werden.

Die Wahl der Tage 6-12 für Verabreichung des chronischen Sauerstoffmangels beruht auf einer sensiblen Phase für den Energiestoffwechsel des Herzen in diesem Zeitraum (Decker, 2002; Dzialowski *et al.*, 2002).

Mit Hilfe von V1 sollen direkte und durch V2 langanhaltende Folgen eines chronischen Sauerstoffmangels untersucht werden. V3 und V4 ermöglichen die Beobachtung akuter Anpassungsmechanismen unter verschiedenen lang andauernder Anoxie. Dies führt unter Umständen zu unterschiedlichen Reaktionsmustern zwischen den Test- und Basisgruppen. In der Gruppe V0 werden die Hühnerembryonen zwei Stressoren ausgesetzt. Einerseits einem Sauerstoffmangel (15% O₂ über 24h), der eine kardiale Hypoxie erzeugt und zu einer signifikanten Induktion von VEGF und HIF1a führen soll (Catron *et al.*, 2001; Ivnitski-Steele *et al.*, 2004) und andererseits einer Hyperthermie (40,0°C Umgebungstemperatur), die den Energieumsatz in ektothermen Lebewesen steigert. Mit dieser Kombination von Stressoren soll die Anpassungsfähigkeit des Hühnerembryo maximal gefordert werden.

3.2 Gewinnung und Aufbereitung der Proben

3.2.1 Präparation der Hühnerembryonen und der Herzen

Die gesäuberte und mit Ethanol (70%) desinfizierte Eischale wird über der Luftkammer eröffnet. Der Embryo wird aus dem Ei entnommen, mittels Scherenschlag dekapitiert, der Dottersack aus dem Embryo vorgelagert und entfernt. Die Leibeshöhle wird eröffnet und das noch schlagende Herz freigelegt, an der Basis abgesetzt und aus dem Körper entnommen. Das Herz wird von Gefäß- und Bindegewebsresten befreit, ein 50 mg großes Stück abgetrennt, mittels RNA-Stabilisierungsmedium vollkommen überschichtet und auf Eis gestellt (Siehe 8.2.1).

3.3 Messung morphologischer Parameter

3.3.1 Bestimmung der Körpermasse

Ermittelt werden die Körperfeuchtgewichte der Embryonen. Dazu werden diese aus der Eischale entnommen und unverzüglich durch einen Scherenschlag dekapitiert. Der Dottersack wird entfernt, der Embryo mit einem Tupfer abgetrocknet und anschließend das Körpergewicht auf einer digitalen Feinwaage bestimmt (Siehe 8.3).

3.3.2 Bestimmung des Herzgewichtes

Nach der Bestimmung des Körpergewichtes (siehe oben) wird das Herz des Embryos isoliert und vor dessen weiterer Präparation sein Gewicht auf einer digitalen Feinwaage bestimmt.

3.3.3 Auswertung der Gewichtsentwicklung

Zur Auswertung der Entwicklung vom Körper- und Herzmassen wird von den Werten der Gruppen jeweils das arithmetische Mittel gebildet und die dazu gehörige Standardabweichung tabellarisch dargestellt.

3.4 Isolierung der Gesamt-RNA aus tierischen Zellen

3.4.1 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 8.4.1.1) aufbewahrt. Die RNA der so behandelten Proben ist bei Raumtemperatur 7 Tage, bei 2-8°C 4 Wochen und bei -80°C unbegrenzt haltbar.

3.4.2 Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben

Aus den stabilisierten Gewebeproben wird die gesamte RNA präpariert (Siehe 8.4.2). Hierzu werden 50 mg Gewebe in RNA-Later mit einem rotierenden Dispergierwerkzeug (Fa. Ika Labortechnik) so lange zerkleinert, bis es völlig homogen in der Flüssigkeit vorliegt. Um bei der Probenzerkleinerung eine Kreuzkontaminationen zu verhindern, 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 einer Mischung aus Lysispuffer (RLT-Puffer) resuspendiert. Der RLT-Puffer lysiert die homogenisierte Probe und inaktiviert durch seinen Guanidin-Isotiozyanat-Anteil RNasen, wodurch der spezifische 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. Anschließend wird die in der Probe enthaltene DNA enzymatisch verdaut. Zu diesem Zweck 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.

3.4.3 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 mittels Photometer geprüft. Anhand der Extinktionswerte bei definierten Wellenlängen (230 nm, 260 nm, 280 nm, 320 nm) können die Konzentration und Reinheit der RNA-Probe näherungsweise kontrolliert werden (siehe 8.4.3). 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. Proben, deren Extinktionsmaximum nicht bei 260 nm gemessen wird, werden aus der Analyse ausgeschlossen. 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 3.7.2) zur Verfügung. Die RNA Proben werden bei einer Temperatur von -70°C im Kühlschrank gelagert, um die RNA vor Abbauprozessen zu schützen.

3.5 Konventionelle PCR

3.5.1 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.

3.5.2 Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide für die konventionelle PCR

Polymerasen benötigen zu Beginn der Transkription eine doppelsträngige Matritze. Primer sind Startermoleküle, die spezifisch an eine einzelsträngige RNA- oder DNA-Matritze hybridisieren. Bei einer RNA-Matritze (Einzelstrang) bindet zum ersten Zyklus nur ein Primer (antisense Primer), wohingegen bei einer DNA-Matritze (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 komplementäre 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 3.5.7), 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 (100pmol/ μl = Stammlösung). Die Arbeitslösung wird durch Verdünnung auf 20pmol/ μl hergestellt und so in der PCR eingesetzt.

3.5.3 Protokoll der RT-PCR

Die eingesetzte Methode zur RT-PCR ist ein One-Step Verfahren, dessen Ansatz entsprechend Tabelle 2 (im Anhang) zusammengefügt wird und gemäß Tabelle 3 (im Anhang) im Thermocycler inkubiert wird. Im Anschluss wird eine DNA-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 3.5.4).

3.5.4 DNA-Gelelektrophorese

Diese Methodik wird zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen eingesetzt. 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 μl der DNA in wässriger Lösung (mit Probenpuffer vermengt) in eine Geltasche pipettiert. Als Größenstandard dienen 5 μl DNA-Ladder. Die DNA wird im Gel für 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 im Kapitel 8.5.3 (siehe Anhang) dargestellt.

3.5.5 PCR zur Vermehrung eines PCR-Produktes (Massen-PCR)

Eine höhere Konzentration des PCR-Produktes kann die Klonierungseffizienz (siehe 3.6) steigern. Um dies 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 Tabelle 4 (siehe Anhang) mehrfach hergestellt und nach dem in Tabelle 5 (siehe

Anhang) beschriebenen Protokoll inkubiert wird. Im Folgenden wird die bei der Massen-PCR gewonnene DNA gereinigt (siehe 3.5.6.).

3.5.6 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.

3.5.7 Extraktion einer DNA-Bande aus einem Elektrophoresegel

Dieser Arbeitsschritt wird durchgeführt, um DNA einer bestimmten Größe 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 die Menge eines Gelvolumen Isopropanol zugegeben und mit diesem vermennt. 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 mit 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.

3.6 Klonierung von Plasmiden

3.6.1 Klonierung von DNA in Plasmiden allgemein

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

Ein PCR-Produkt wird in ein bakterielles Plasmid (Vektor) ligiert (siehe 3.6.3), in kompetente Bakterien transformiert (siehe 3.6.4) und nach Selektion plasmidtragender Bakterien (siehe 3.6.5) werden auf diese Weise Kopien des ursprünglichen Fragments reproduziert.

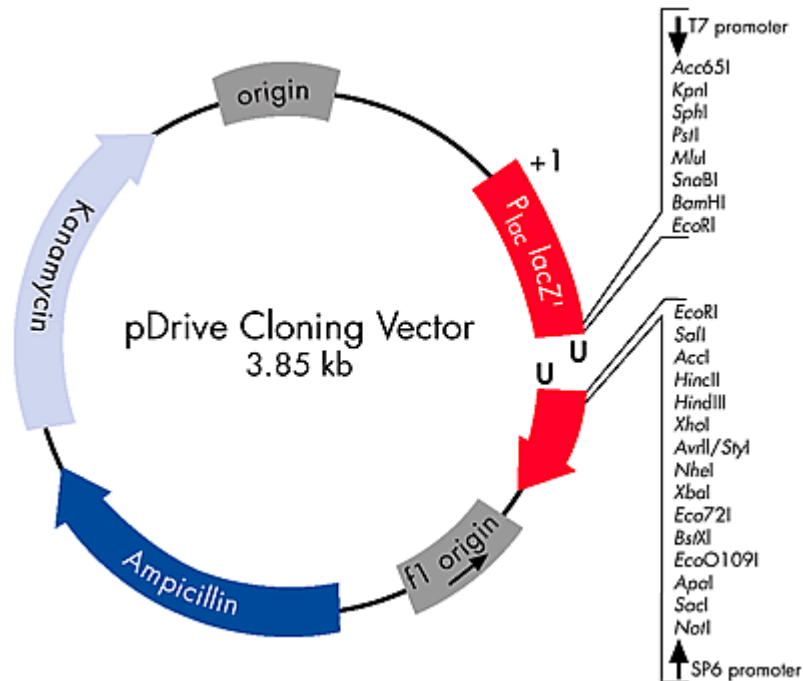
3.6.2 Anfügen von Adenosin-Überhängen (A)

PCR-Produkte können für eine effektive Verwendung im TA- oder UA-Klonierungssystemen (siehe 3.6.1) 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 Uracil- 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 3.6.3).

3.6.3 Ligationsprotokoll

Bei der Ligation wird ein PCR-Produkt enzymatisch in einen Vektor integriert. Als Plasmid diente in dieser Arbeit der „pDrive Cloning Vector“ (siehe 8.6.2 und grafische Darstellung umseitig). 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 3.6.2) 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_{lac}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_{lac}lacZ“, welche die MCS überspannt, kodiert das Protein β-Galactosidase. Transformierte Zellen (siehe 3.6.4), 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).



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

Für die Ligation werden 1 μ l „pDrive Cloning Vector“, 4 μ l PCR-Produkt und 5 μ l „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 3.6.4) eingesetzt werden.

3.6.4 Transformationsprotokoll

Bei der Transformation werden Plasmide in kompetente Bakterien eingeschleust. Hierzu werden zunächst 2 Agarplatten (siehe 3.6.10) auf 37°C leicht vorgewärmt, „SOC-Medium“ (siehe 8.6.2.1) wird auf Raumtemperatur erwärmt und die kompetenten Bakterien (Qiagen, Genotyp: (F⁺::Tn10(Tc^r proA⁺B⁺ lacI^qZM15)recA1 and A 1 hsdR17(r_{k12}⁻m_{k12}⁺)lac glnV44 thi- 1 gyrA96 relA1)) auf Eis vorsichtig aufgetaut. Anschließend gibt man 2 μ l Ligations-Reaktions-Mix (siehe 3.6.3) 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 μ l „SOC-Medium“ auf den Transformationsansatz und vermischt beides durch vorsichtiges Pipettieren miteinander. Auf eine der beiden vorgewärmten Agarplatten werden 50 μ l, auf die andere 250 μ l des fertigen Transformationsansatzes pipettiert und gleichmäßig ausgestrichen. Nach einer Inkubation der Bakterien bei 37°C über Nacht können weiße Bakterienkolonien in Flüssigmedium

überführt (siehe 3.6.5) und so mit der Selektion von Bakterien begonnen werden, die rekombinante Plasmide tragen (siehe 3.6.5).

3.6.5 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 3.6.7) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsfragmente (siehe 3.5.4) kann abschließend die Spezifität des fremden DNA-Fragments überprüft werden.

3.6.6 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 3.6.4) in 2 ml LB Medium (siehe 3.6.11) mit Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator (siehe Anhang) 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 Bakterentrümmer durch Zentrifugation und die alkoholische Fällung der im Überstand verbliebenen Plasmid-DNA. Endprodukt des Verfahrens sind 20 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 3.6.7) Die 24 entnommenen Proben werden in je 500 µl STET-Puffer (siehe Tabelle 6) resuspendiert und anschließend werden 25 µl Lysozymlösung (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 Raumtemperatur (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 (Aqua purificata) 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.

3.6.7 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 24mal 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 3.5.4). Zwei der das gewünschte Insert tragenden Bakterienkulturen (siehe 3.6.6) werden in einem Verhältnis von 1:1 mit Glycerin versetzt und bei -80°C zur weiteren Verarbeitung konserviert.

3.6.8 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 3.6.10) werden in einem Erlenmeyerkolben vorgelegt, mit Ampicillin versetzt und je 5 µl der anhand des Restriktionsverdaus ausgewählten Bakteriensuspension (siehe 3.6.7) werden in den Erlenmeyerkolben zugegeben. Der Reaktionsansatz wird bei 37°C und einer Frequenz von 250/min über Nacht auf einem Schüttelinkubator (siehe Anhang) 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 werden zu der Bakteriensuspension 4 ml Lysispuffer gegeben, beides vorsichtig gemischt 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 eine Silica-Membran äquilibriert, indem man auf die Säule 4 ml Äquilibrierungspuffer 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 2mal 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 gelöst. 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 für 15 Minuten bei 15.700 rcf zentrifugiert. Der Überstand wird abermals dekantiert. Nach einer 10minütigen Trocknungsphase des Pellet (durch Inkubation bei 37°C) wird das DNA-Pellet in 500 µl Aqua purificata gelöst. Durch die

Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA im Photometer (siehe 3.4.3) wird eine Dokumentation des DNA-Gehalts der einzelnen Proben ermöglicht.

3.6.9 Sequenzierung

Die abschließende Erfolgskontrolle erfolgt durch eine Sequenzierung des Inserts im Kontext des Vektors (Sequenz Laboratories Göttingen GmbH / <http://www.SEQLAB.de>). Die Proben (ca. 500 µl) werden bei –20°C konserviert.

3.6.10 Herstellung von Luria Bartrani (LB) 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 ersten Platte sollte kein Kolonienwachstum stattgefunden haben, auf der zweiten Platte hingegen sollten weiße Kolonien sichtbar geworden sein (Ampicillinresistenz).

3.6.11 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.

3.7 Quantitative PCR

3.7.1 Allgemeines

Für die Erstellung von Genexpressionsprofilen muss die Kopienzahl der gesuchten mRNA-Spezies 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, W. M. *et al.*, 1999; Wilhelm und Pingoud, 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 und wird als Interkalator unspezifisch in die Windungen der dsDNA eingebaut (Morrison *et al.*, 1998). 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.

3.7.2 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) werden 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 8 und Tabelle 9 (siehe Anhang) zu entnehmen. An der stabilen cDNA werden nun die Gehalte der verschiedenen Ziel- und Kontrollsequenzen mittels quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bestimmt (siehe 3.7.3).

3.7.3 Protokoll der qPCR

Die in der reversen Transkription (siehe 3.7.2) hergestellte cDNA wird zur Erstellung des Expressionsprofils des gesuchten Gens durch qPCR untersucht. Ein Reaktionsansatz (siehe Tabelle 10) 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 3.7.1). 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 11 (siehe Anhang) 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.

3.7.4 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 3.5, 3.6). Bei der Primersuche für die qPCR müssen Kriterien berücksichtigt werden, welche bei jeder Form der PCR von Bedeutung sind (siehe 3.5.2) und solche, die für die qPCR spezifisch sind (Amplikonlänge 70-120bp, Exon-Exon-Grenze im PCR-Produkt).

Für die vorliegende Arbeit wurden die Oligonucleotide mittels 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).

3.7.5 Etablierungsverfahren

3.7.5.1 Bestimmung des Temperaturoptimums

Das verwendete qPCR Protokoll (siehe 3.7.3) beinhaltet einen kombinierten Annealing-Elongationsschritt (siehe Tabelle 11). 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 wird eine Negativkontrolle mitgeführt.

3.7.5.2 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 annähernd gleich sein (Pfaffl, 2001). Zur Effizienzbestimmung werden Plasmide als target-cDNA eingesetzt, welche die Sequenz des qPCR-Produkts enthalten (siehe 3.5, 3.6). So wird gewährleistet, dass die im Folgenden ermittelten Daten eines qPCR-assays spezifisch für das GOI sind. Ausgehend von einer Konzentration von 1ng/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 Regressionsgeraden 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 0). 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 für die PCR-Effizienz:
$$\text{Effizienz} = 10^{\left(-\frac{1}{\text{Slope}}\right)}$$

Im Anschluss an die qPCR zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz wurde eine Schmelzkurvenanalyse (siehe 3.7.1) 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.

3.7.6 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 3.7.9). „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 β -Aktin (mRNA) als Referenzgen eingesetzt. Die Expressionsraten (C_T -Werte) von β -Aktin werden in der relativen Quantifizierung der qPCR zur Normalisierung auf die Expressionsraten (C_T -Werte) der jeweiligen Zielgene bezogen.

3.7.7 Kontrollen

Als Negativkontrolle fungiert ein Ansatz ohne Template („No Template Control“, NTC; siehe 3.7.3). Zur Prüfung der RNA-Präparationen auf DNA-Verunreinigungen wird für jede RNA-Probe eine β -Aktin-PCR ohne vorherige reverse Transkription durchgeführt (RNA-Kontrolllauf). Dabei wird jeweils 1 μ l RNA (100 ng/ μ 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 β -Aktin Amplifikation in diesem Ansatz fehlt.

3.7.8 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.

3.7.8.1 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 3.7.1). 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 zu untersuchenden 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 1 dargestellt. Proben mit einem Confidence-Wert von 0 und 1 werden nicht ausgewertet und müssen wiederholt werden.

Differenz des größten und kleinsten C_T -Werts	Confidence-Wert
< 0,1	4
0,1-0,2	3
0,2-0,5	2
0,5-1,0	1
>1,0	0

Tabelle 1 Bewertungsschema verschiedener C_T -Werte innerhalb eines Triplets

3.7.9 Relative Quantifizierung (dCT-Methode)

Die gemittelten C_T -Werte einer Probe werden zur Bestimmung der Expressionsrate des GOI mit Hilfe der d C_T -Methode zur relativen Quantifizierung untersucht (Livak und Schmittgen, 2001). Bei diesem Berechnungsschema wird der gemittelte C_T -Wert (siehe 3.7.8.1) des GOI jeder Probe gegen den gemittelten C_T -Wert des Referenzgens (siehe 3.7.6) normalisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Definition der verwendeten Proben und C_T -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_T -Werte des Target (*TargTest*, *TargCtrl*) und der Referenz (*RefTest*, *RefCtrl*) in der Test- und Kontrollgruppe bekannt sein. Der Expressionsunterschied des GOI in Basis- und Testprobe, normalisiert gegen das Referenzgen, wird in der dd C_T -Methode mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{dd}C_T = FC = 2^{-((\text{Re}f_{Ctrl} - T \text{arg} Ctrl) - (\text{Re}f_{Test} - T \text{arg} Test))}$$

Das Ergebnis wird als „Fold Change“ (FC) ausgedrückt und beschreibt die normalisierte Expressionrate des GOI in der Testprobe (Test) als Vielfaches der normalisierten Expressionsrate des GOI in der Basisprobe (Ctrl).

3.7.10 Auswertung der dC_T - und FC-Werte

Die dC_T -Werte werden zum direkten Vergleich jeder einzelnen Probe innerhalb der Test- bzw. Basisproben in Form von Einzelpunkten grafisch dargestellt. Die arithmetischen Mittel, sowie die Standardabweichungen jeder Test- bzw. Basisprobe werden tabellarisch aufgeführt. Die im Text des Ergebnisteils vermerkten FC-Werte dienen der verbesserten Verständlichkeit und Validierung der Ergebnisse.

Aufgrund der exponentiellen Berechnungsformel 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 Basisgruppe 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). Des Weiteren wurde die Testprobe einer univariaten Varianzanalyse unterzogen und hierzu der Median der Basisprobe gleich 1 gesetzt. Somit muss ein Ergebnis in der univariaten Varianzanalyse einen p-Wert von $< 0,05$ erreichen und der FC außerhalb des Bereiches von 0,5 bis 2,0 liegen, bevor es in dieser Arbeit als signifikant bezeichnet wird.

In dem verwendeten Rechnungsmodell wird keine Korrektur für divergierende PCR-Effizienzen 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 3.7.5.2).

3.8 Auswahl der untersuchten Gene

Stellvertretend für die erwarteten Veränderungen der Expressionsraten verschiedener in den Stoffwechsel involvierter Gene wurden folgende mRNA Konzentrationen untersucht: Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) repräsentativ für die Verbesserung der Sauerstoffversorgung; Enolase und Phosphofruktokinase-M (PFKM) stellvertretend für die glykolytische Energiegewinnung, wobei die Enolase ein geringfügig reguliertes Enzym und die PFKM ein auf verschiedenen Ebenen allosterisch und genregulativ beeinflusstes Enzym darstellen. Die AMP-abhängige-Proteinkinase $\beta 2$ (AMPK $\beta 2$) steht für die Mechanismen der Energieeinsparung (siehe Anhang Tabelle 12).