

4 ERGEBNISSE

4.1 ERGEBNISSE DER GELELEKTROPHORETISCHEN AUFTRENNUNG DER PLASMID-RESTRIKTIONSFRAGMENTE

Zur Überprüfung der Spezifität der Plasmid-DNA-Fragmente aus dem Restriktionsverdau (siehe Tabelle 3) wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung durchgeführt (siehe 3.2.1.5). Auf einem UV-Illuminator (siehe 3.1.9) wurden die Gele mit einer Wellenlänge von 405 nm belichtet und die mit Ethidiumbromid angefärbten Banden der DNA-Fragmente zur Beurteilung der Größe mit denen des eingesetzten DNA-Größenmarkers verglichen.

Die für die jeweils eingesetzte Plasmid-DNA spezifischen Größen der Restriktionsfragmente sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3 Übersicht der für die Plasmide im Restriktionsverdau verwendeten Endonukleasen mit Angabe der entstehenden Fragmentgrößen

Plasmid	Verwendetes Restriktionsenzym	Puffer	Fragmentgrößen (Anzahl bp)
pcDNA6/V5-His B	HincII	Tango®	234, 759, 1967, 2188
pCMVsL4V5blas	HinDIII EcoRI	Tango®	4677, 5114
pCMVZFP67neo	HincII	Tango®	2422, 4653
pGFPdhE1A1	EcoRI	Tango®	1443, 3933
pAD5U6shRNA1-LTBP4	HinDIII EcoRI	Tango®	398, 3284

Der Nachweis der erfolgreichen Amplifizierung der jeweiligen Plasmide mit Hilfe des spezifischen Restriktionsverdau (siehe Tabelle 3) ist in den folgenden Abbildungen der gelelektrophoretischen Fragmentauftrennungen dargestellt.

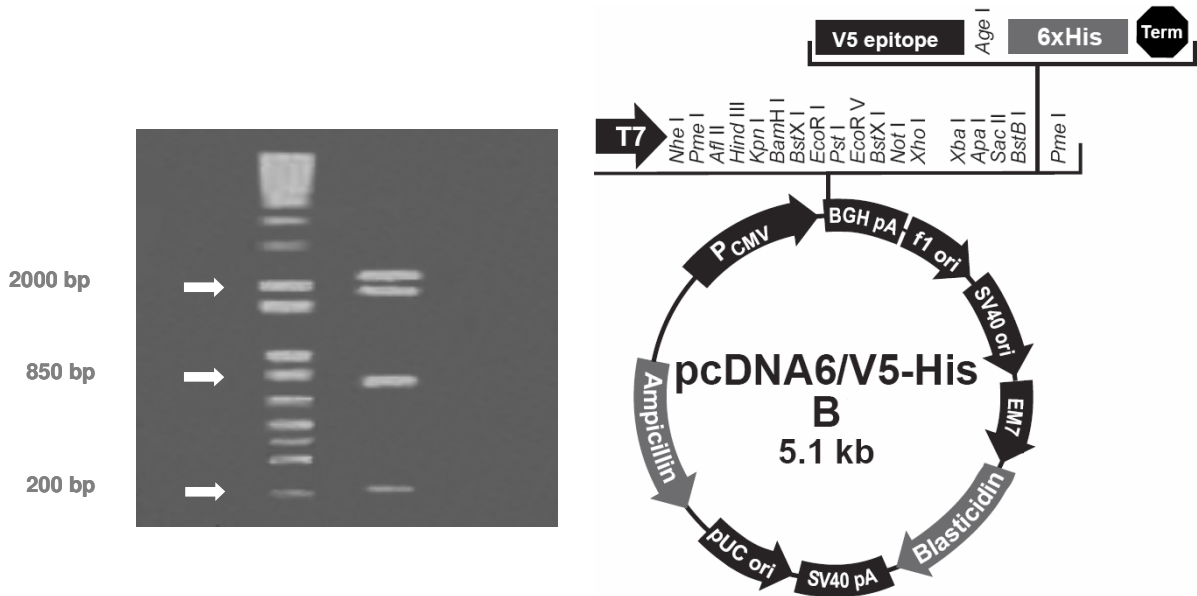


Abbildung 7 Darstellung links: Restriktionsverdau von pcDNA6/V5-His B (rechte Auftrennung) mit DNA-Größenmarker (linke Auftrennung, 1 Kb Plus DNA Ladder, siehe 3.1.7), 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid, 60 Minuten, 110 Volt. Fragmentgrößen (Anzahl bp): 234, 759, 1967, 2188
Darstellung rechts: Vektorkarte pcDNA6/V5-His B (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

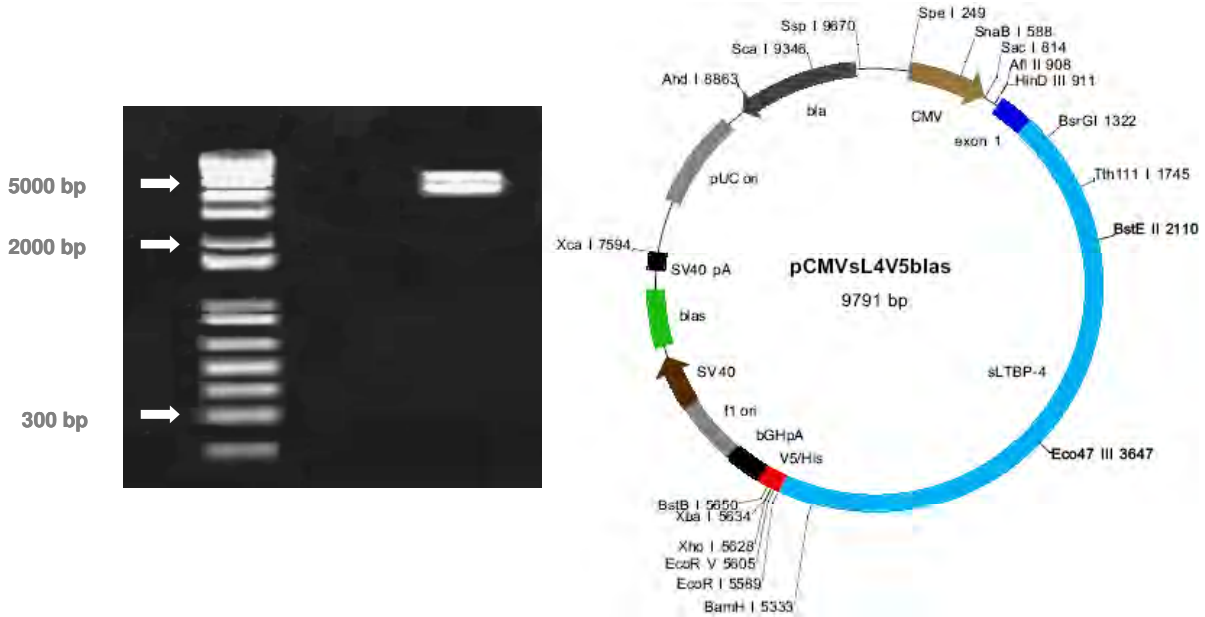


Abbildung 8 Darstellung links: Restriktionsverdau von pCMVsL4V5blas (rechte Auftrennung) mit DNA-Größenmarker (linke Auftrennung, 1 Kb Plus DNA Ladder, siehe 3.1.7), 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid, 60 Minuten, 110 Volt. Fragmentgrößen (Anzahl bp): 4677, 5114
Darstellung rechts: Vektorkarte pCMVsL4V5blas (Dr. J. Altschmied, Frankfurt am Main)

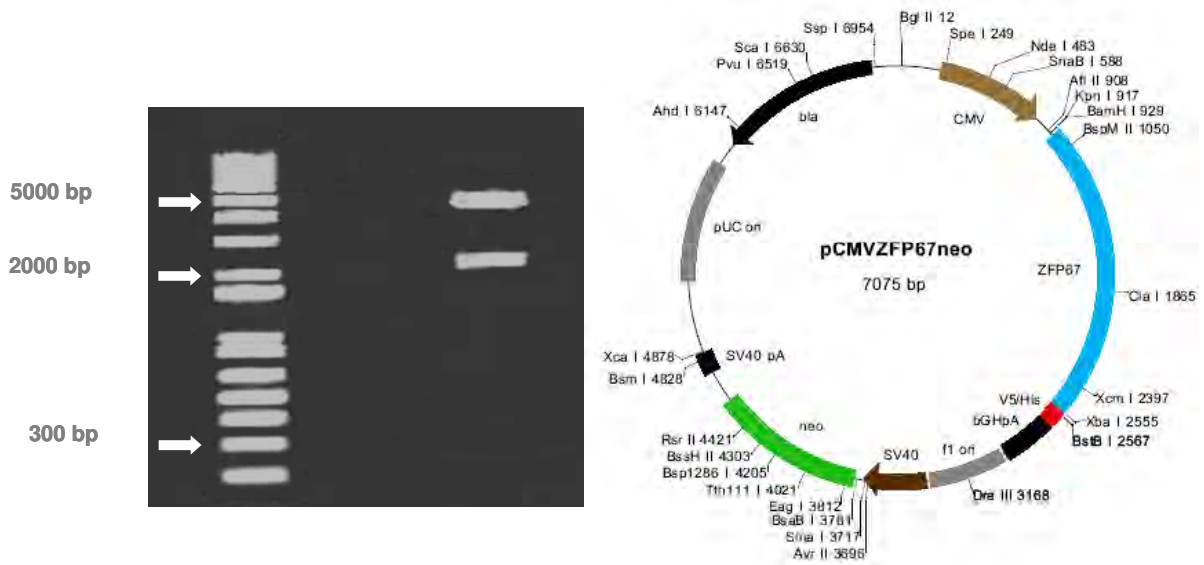


Abbildung 9 Darstellung links: Restriktionsverdau von pCMVZFP67neo (rechte Auftrennung) mit DNA-Größenmarker (linke Auftrennung, 1 Kb Plus DNA Ladder, siehe 3.1.7), 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid, 60 Minuten, 110 Volt. Fragmentgrößen (Anzahl bp): 2422, 4653
Darstellung rechts: Vektorkarte pCMVZFP67neo (Dr. J. Altschmied, Frankfurt am Main)

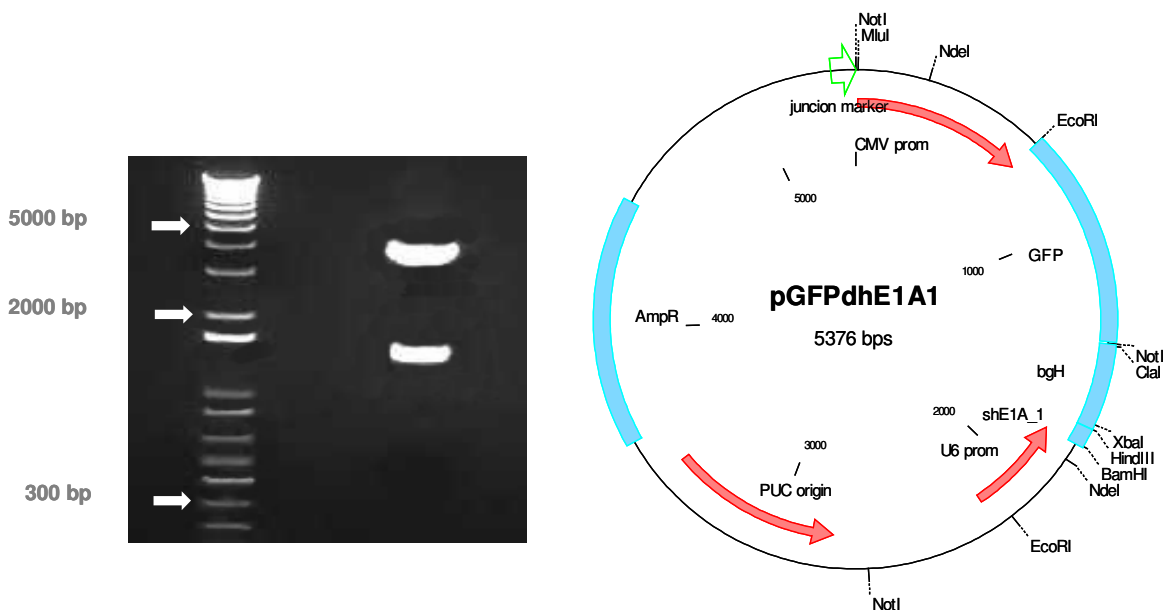


Abbildung 10 Darstellung links: Restriktionsverdau von pGFPdhE1A1 (rechte Auftrennung) mit DNA-Größenmarker (links, 1 Kb Plus DNA Ladder, siehe 3.1.7), 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid, 60 Minuten, 110 Volt. Frangmentgrößen (Anzahl bp): 1443, 3933
Darstellung rechts: Vektorkarte pGFPdhE1A1 (Dr. H. Fechner, Berlin)

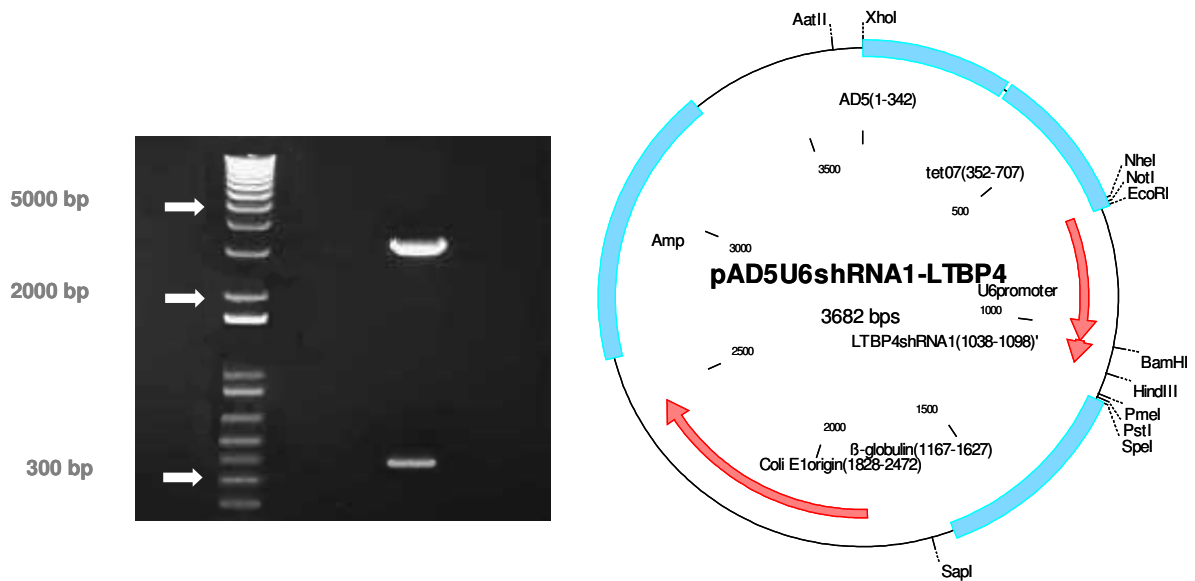


Abbildung 11 Darstellung links: Restriktionsverdau von pAD5U6shRNA1-LTBP4 (rechte Auftrennung) mit DNA-Größenmarker (links, 1 Kb Plus DNA Ladder, siehe 3.1.7), 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid, 60 Minuten, 110 Volt. Fragmentgrößen (Anzahl bp): 398, 3284
Darstellung rechts: Vektorkarte pADU6shRNA1-LTBP4 (Dr. H. Fechner, Berlin)

4.2 ERGEBNISSE AUS ZELLKULTUR UND TRANSFEKTION DER ZELLINIE HEK293T

4.2.1 Wachstumsverhalten der Zelllinie HEK293T

Die Verifikation des Wachstumsverhaltens der HEK293T Zellen diente der Optimierung der Transfektionsansätze.

Hierzu wurden die Zellen bei Inkubation in Vollmedium (siehe 3.2.2.1) regelmäßig lichtmikroskopisch beurteilt.

Das Wachstum dieser Zellen war stets kontinuierlich, das Zellbild einheitlich und die Vitalitätsmerkmale (siehe 3.2.2.2) gleichmäßig ausgeprägt.

Die Zellen benötigten bei Erstkultivierung nach Kryokonservierung etwa 9 Tage bis zum Übergang in die proliferative Phase. Ein konfluenten Zellrasen entwickelte sich bei Erstkultivierung nach zwölf Tagen und bereits nach einer Passage in sechs Tagen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4 Prozentuale Angabe der Zellrasendichte von HEK293T Zellen in einer 75cm² Zellkulturflasche mit Vollmedium (siehe 3.2.2.1)

Tage in Kultur	Zellrasendichte		
	Erstkultivierung	Passage 1	Passage 2
3	10%	50%	50%
6	30%	100%	100%
9	50%	X	X
12	100%	X	X

Tage in Kultur = Zellkultivierung (siehe 3.2.2.1)

Erstkultivierung = Anzüchtung der Zellen nach Kryokonservierung

X = Keine Angabe, da Zellen bei 100% Konfluenz passagiert oder geerntet werden.

4.2.2 Ergebnisse der mikroskopischen Fluoreszenzanalyse

Neben der mikroskopischen Zellbeurteilung auf Vitalität und Differenzierung wurde die Transfektionseffizienz während eines Transfektionsansatzes in 24-Stunden-Intervallen anhand der pGFPdhE1A1 - transfizierten Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (siehe 3.1.9) semiquantitativ dokumentiert. Hierzu wurde die fluoreszierende Eigenschaft des Proteins »GFP« (Grün Fluoreszierendes Protein) genutzt (siehe 3.2.2.7). 72 Stunden nach Zugabe des Transfektionsreagenzes zeigten 70%-90% der Zellen grüne Fluoreszenz (siehe Abbildung 12).

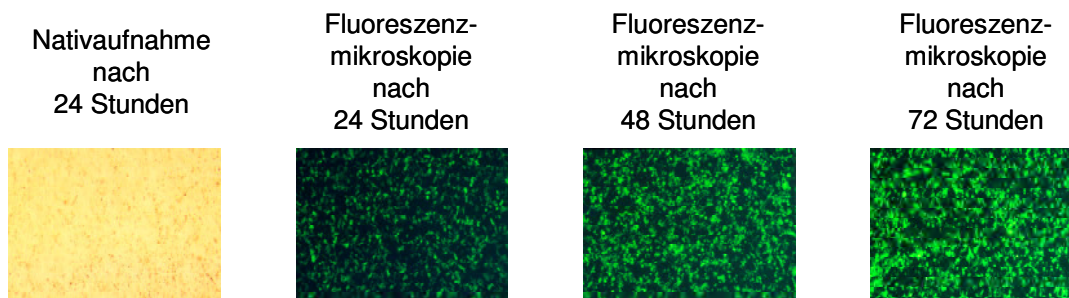


Abbildung 12 Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Transfektionseffizienz anhand der mit dem Plasmid pGFPdhE1A1 transfizierten Zellen im zeitlichen Verlauf. Der prozentuale Anteil fluoreszierender Zellen ist proportional zur Transfektionseffizienz.

4.3 ERGEBNISSE DER MOLEKULARBIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN

4.3.1 Ergebnisse der RNA-Isolierung und RNA-Qualitätskontrolle

4.3.1.1 RNA-Konzentrationen

Die isolierten RNA-Proben wiesen in der spektralphotometrischen Analyse (siehe 3.2.3.2.2) eine durchschnittliche Konzentration von 821 ng / μ l auf. Keine der Proben zeigte maximale photometrische Extinktionswerte bei 230, 280 oder 320 nm. Da bei allen Proben eine maximale Extinktion bei 260 nm vorlag, wurden die Proben als reine RNA-Lösungen bewertet.

4.3.1.2 RNA-Integrität

In der Kapillarelektrophorese wiesen die isolierten RNA-Proben eine durchschnittliche RNA-Integrität (RIN) von 9,1 auf. Ein Ausschluss von Proben für weitere Untersuchungen erfolgte bei einer berechneten RIN < 5 (siehe 3.2.3.2.3).

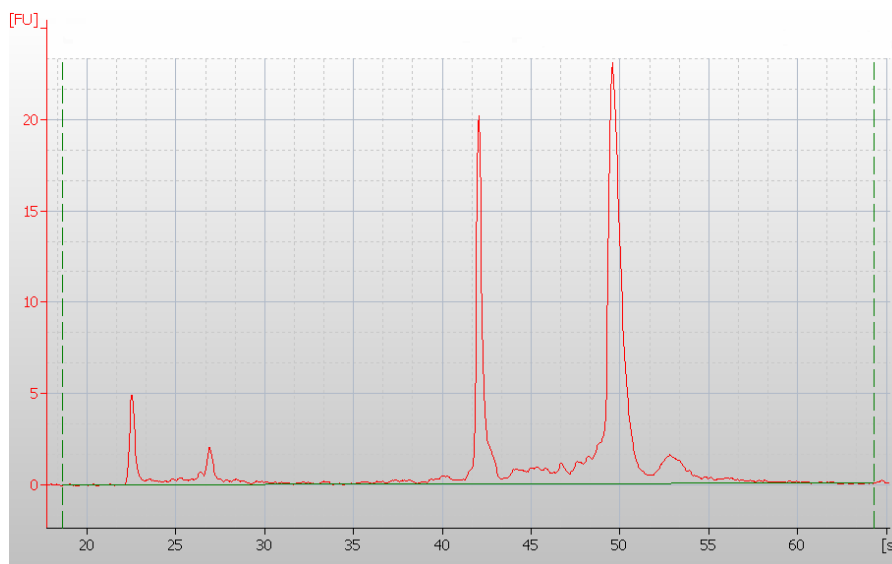


Abbildung 13 Elektropherogramm der Probe 2009 (RIN = 10,0), Agilent 2100 Bioanalyzer (siehe 3.1.9)

Abszisse: Zeit in Sekunden [s]

Ordinate: Intensität der Fluoreszenz (Fluorescence Units [FU])

Der erste Peak bei 23 Sekunden stellt den Marker-Peak dar. Die zweite Amplitude ist die »5S-Region« und repräsentiert kleinere rRNA und tRNA-Fragmente. Die zwei Peaks mit der hohen Amplitude sind ribosomale Peaks und stehen für die 18S-Untereinheit (links) und die 28S-Untereinheit (rechts) der mRNA-Probe (Schroeder, Mueller et al. 2006).

Bei keiner Probe wurde eine RIN < 5 festgestellt. Eine Auflistung der Einzelergebnisse der Integritätsuntersuchungen ist im Anhang Absatz 9.1 in Tabelle 6 zu finden. Abbildung 13 zeigt exemplarisch das für die Probe 2009 ermittelte Elektropherogramm. Für diese Probe errechnete der Agilent 2100 Bioanalyzer (siehe 3.1.9) eine RNA-Integrität von 10,0 (keine RNA-Degradation).

4.3.2 Ergebnisse der relativen Quantifizierung der Zielgene LTBP-4, TGF- β 1, p21 und c-myc sowie der Referenzgene

4.3.2.1 qPCR Kontrollen auf Kontamination mit genomischer DNA

Zur Untersuchung der RNA-Proben auf Kontamination mit genomischer DNA wurde die relative Menge an β -Aktin-Sequenzen in den RNA-Proben untersucht (siehe 3.2.3.4.6). Sie betrug durchschnittlich 0,18 %.

Keine der RNA-Proben wiesen im Vergleich zu den korrespondierenden cDNA-Proben > 4 % β -Aktin-Kopien auf (siehe Anhang, Absatz 9.1, Tabelle 7).

Berechnet wurde die relative Menge an β -Aktin-Sequenzen in den RNA-Proben nach folgendem Beispiel:

Eine C_T -Wert-Differenz von 1 impliziert einen Faktor zwei. Ergibt eine qPCR beispielsweise von β -Aktin im RNA-Lauf für Probe A einen C_T -Wert von 22 und der entsprechende cDNA-Lauf einen C_T -Wert von 21 (Differenz = 1), dann enthält die RNA halb so viele β -Aktin-Kopien wie die cDNA. Damit liegt die Kontaminationsrate an genomischer DNA bei 50%. Wäre der C_T -Wert des RNA-Laufes bei 23, würde dies eine Kontaminationsrate von 25% bedeuten.

4.3.2.2 qPCR Assay Etablierung

Die qPCR-Untersuchungsmethoden zur relativen Quantifizierung der Kopienzahl für LTBP-4 und β -Aktin wurden in vorangegangenen Arbeiten etabliert (Kruse 2005). Für TGF- β 1, p21 und c-myc mussten neue qPCR Assays etabliert werden.

Die Bestimmung der qPCR-Effizienz erfolgte softwaregestützt durch eine Regressionsanalyse (siehe 3.2.3.4.3). Hierbei wird die Ausgangsmenge an Target-DNA in einer logarithmischen Funktion gegen die Zykluszahl dargestellt. Die qPCR-Effizienz wird entweder in Prozent (100 % entsprechen einer Verdoppelung der Menge an PCR-Produkt pro Zyklus) oder als Steigung der Regressionsgeraden (slope) ausgedrückt. In der vorliegenden Arbeit wurden nur qPCR Assays mit einer Effizienz von > 90 % für die Untersuchungen verwendet.

4.3.2.2.1 qPCR Assay Etablierung für TGF-β1

Die Versuche zur Etablierung der qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von TGF-β1 zeigten eine Sensitivität von 0,5 fg (femtogramm) und eine Effizienz von 100 %. Für das qPCR-Produkt wurde ein Schmelzpunkt von 92 °C festgestellt.

Das Temperaturoptimum für Hybridisierung und Neustrangsynthese lag bei 58 °C. Der qPCR-Assay zeigte sich nach den definierten Kriterien Sensitivität, Spezifität und Effizienz (siehe 3.2.3.4.3) als spezifisch (siehe Abbildung 14).

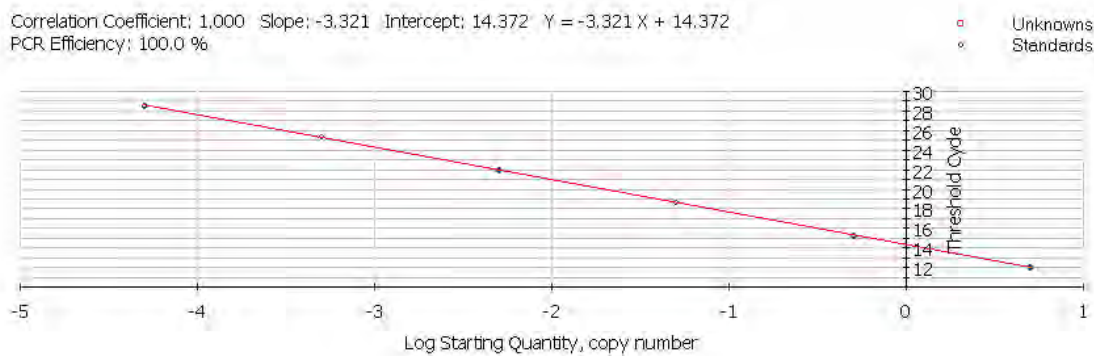


Abbildung 14 Regressionsgerade für das GOI (Zielgen) TGF-β1

Zur Bestätigung der Übereinstimmung der amplifizierten cDNA-Sequenz mit humanem TGF-β1 (GenBank Accession No. NM_000660) wurde diese in aufgereinigter Form an ein Sequenzierungslabor (Fa. SeqLab) versandt und dort sequenziert. Die ermittelte Sequenz wurde softwaregestützt in einem Sequenzvergleich (Alignment) untersucht (GeneDoc, Version 2.6.002). Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt.

```

          *          980          *          1000          *          1020          *          1040
TGFβ1human : ttctgcctcgggcccctgccctacatttgagcctggacacgcagtacagcaaggtcctggccctgtacaaccagcataa : 1040
seq.TGFβ1  : -----tggacacgcagtacagcaaggtcctggccctgtacaaccagcataa : 46
                                     TGGACACGCAGTACAGCAAGGTCTGGCCCTGTACAACCAGCATAA

          *          1060          *          1080          *          1100          *          1120
TGFβ1human : ccggggcgctcggcggcgccgtgctgctgcccagggcctggagccgctgcccacgtgactacgtgggcccgaagc : 1120
seq.TGFβ1  : ccggggcgctcggcggcgccgtgctgctgcccagggcctggagccgctgcccacgtgactacgtgggcccgaagc : 126
                                     CCCGGGCGCCTCGGCGGCGCCGTGCTGCTGCCCAGGCGCTGGAGCCGCTGCCCATCGTGTACTACGTGGGCGCAAGC

          *          1140          *          1160          *
TGFβ1human : ccaagtgagcagctgtccaacatgatcgtgctcctgcaagtgacagctga : 1173
seq.TGFβ1  : ccaagtgagcagctgt----- : 144
                                     CCAAGGTGGAGCAGCTGT
    
```

Abbildung 15 Alignment der sequenzierten cDNA mit der Sequenz des humanen TGF-β1 (GenBank Accession Nr. NM_000660) mit der Software GeneDoc Version 2.6.002 (Übereinstimmung >90%, siehe 3.2.3.4.3)

4.3.2.2.2 qPCR Assay Etablierung für p21

Die Versuche zur Etablierung der qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von p21 zeigten eine Sensitivität von 0,5 fg und eine Effizienz von 98,3 %. Für das qPCR-Produkt wurde ein Schmelzpunkt von 82 °C festgestellt.

Das Temperaturoptimum für Hybridisierung und Neustrangsynthese lag bei 58 °C. Der qPCR-Assay zeigte sich nach den definierten Kriterien Sensitivität, Spezifität und Effizienz (siehe 3.2.3.4.3) als spezifisch (siehe Abbildung 16).

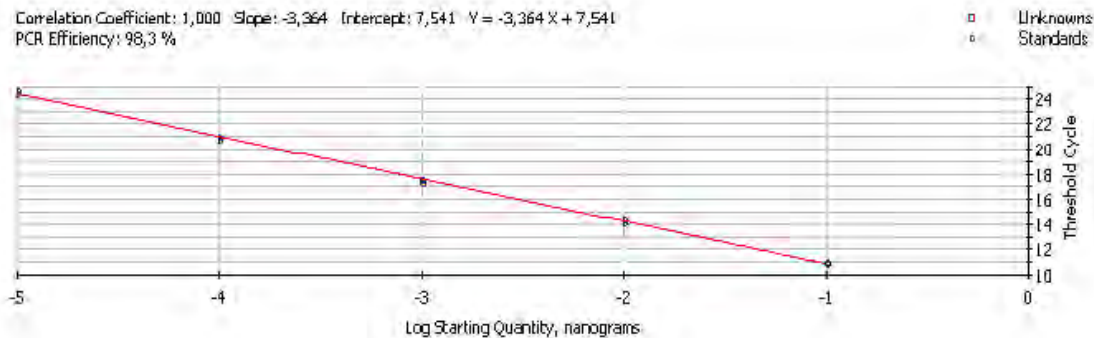


Abbildung 16 Regressionsgerade für das GOI (Zielgen) p21

Zur Bestätigung der Übereinstimmung der amplifizierten cDNA-Sequenz mit humanem p21 (GenBank Accession No. NM_000389) wurde diese in aufgereinigter Form an ein Sequenzierungslabor (Fa. SeqLab) versandt und dort sequenziert. Die ermittelte Sequenz wurde softwaregestützt in einem Sequenzvergleich (Alignment) untersucht (GeneDoc, Version 2.6.002). Das Ergebnis ist in Abbildung 17 dargestellt.

```

          *      260      *      280      *      300      *      320
CDKIp21hum : gaacttcgactttgtcaccgagacaccactggagggtagcttcgcctgggagcgtgtgctggggccttgccc 320
seq.CDKIp2 : -----tgcccaagc : 9
                                     TGCCCAAGC

          *      340      *      360      *      380      *      400
CDKIp21hum : tctaccttcccacggggcccccggcgaggccgggatgagttgggaggagggcagggcctggcacctcacctgctctgctg : 400
seq.CDKIp2 : tctaccttcccacggggcccccggcgaggccgggatgagttgggaggagggcagggcctggcacctcacctgctctgctg : 89
TCTACCTTCCCACGGGGCCCCGGCGAGGCCGGGATGAGTTGGGAGGAGGCCAGGCGCCTGGCACCTCACCTGCTCTGCTG
    
```

Abbildung 17 Alignment der sequenzierten cDNA mit der Sequenz des humanen p21 (GenBank Accession Nr. NM_000389) mit der Software GeneDoc Version 2.6.002 (Übereinstimmung >90%, siehe 3.2.3.4.3)

4.3.2.2.3 qPCR Assay Etablierung für c-myc

Die Versuche zur Etablierung der qPCR-Untersuchungsmethode zur Quantifizierung von c-myc zeigten eine Sensitivität von 0,5 fg und eine Effizienz von 99,7 %. Für das qPCR-Produkt wurde ein Schmelzpunkt von 81 °C festgestellt. Das Temperaturoptimum für Hybridisierung und Neustrangsynthese lag bei 58 °C. Der qPCR-Assay zeigte sich nach den definierten Kriterien Sensitivität, Spezifität und Effizienz (siehe 3.2.3.4.3) als spezifisch (siehe Abbildung 18).

Ergebnisse

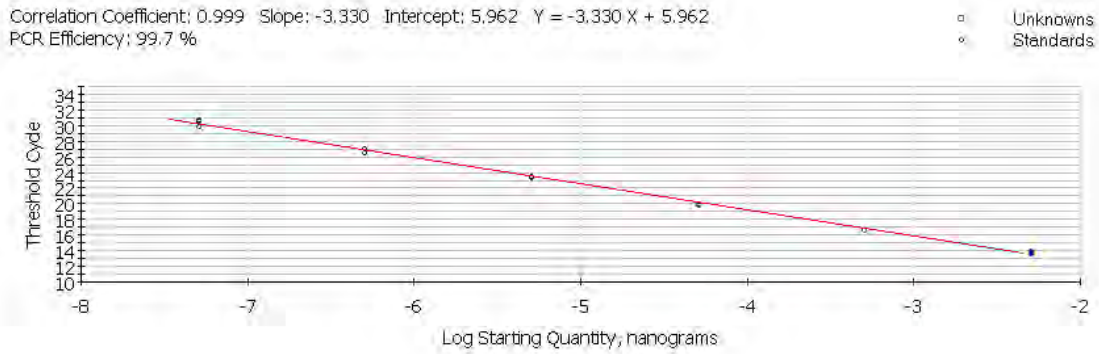


Abbildung 18 Regressionsgerade für das GOI (Zielgen) c-myc

Zur Bestätigung der Übereinstimmung der amplifizierten cDNA-Sequenz mit humanem c-myc (GenBank Accession No. V00568) wurde diese in aufgereinigter Form an ein Sequenzierungslabor (Fa. SeqLab) versandt und dort sequenziert. Die ermittelte Sequenz wurde softwaregestützt in einem Sequenzvergleich (Alignment) untersucht (GeneDoc, Version 2.6.002). Das Ergebnis ist in Abbildung 19 dargestellt.

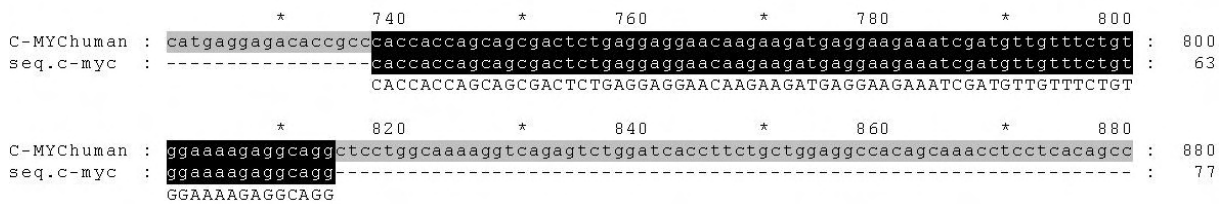


Abbildung 19 Alignment der sequenzierten cDNA mit der Sequenz des humanen c-myc (GenBank Accession Nr. V00568) mit der Software GeneDoc Version 2.6.002 (Übereinstimmung >90%, siehe 3.2.3.4.3)

4.3.2.3 Geeignete Referenzgene

In den Untersuchungen zur Ermittlung geeigneter Referenzgene (siehe 3.2.3.4.5) wurde festgestellt, dass HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase), ATP5B (ATP Synthase, H⁺ transportierend, mitochondrialer F1 Komplex, beta-Polypeptid) und RPL32 (Ribosomales Protein L32) aus der Liste der 11 überprüften Referenzgene (18s rRNA, 28s rRNA, GAPDH, β-Aktin, Ubiquitin, β-2-Mikroglobulin, YWHAZ, TATA-Box bindendes Protein, HPRT, ATP-Synthase Untereinheit 5B und Cyclophyllin) in der vorliegenden Arbeit die stabilste kombinierte Expressionsrate aufwiesen. Diese Kombination wurde während der relativen Quantifizierung zur Normalisierung der Expressionsrate aller zu untersuchenden Gene in allen Proben eingesetzt. Die Etablierung der entsprechenden qPCR Assays erfolgte in Vorarbeiten (Etschmann, Wilcken et al. 2006).

4.3.2.4 Bestimmung der C_T-Werte

Für die Bestimmung der relativen Menge der Ziel- bzw. Referenzgene in den untersuchten cDNA-Proben wurden mit Hilfe der qPCR die C_T-Werte für jedes GOI (Gene Of Interest, Zielgen) und jedes Referenzgen ermittelt (siehe 3.2.3.4.8).

Die Einzelergebnisse (C_T-Werte) für jedes Ziel- und Referenzgen sind im Anhang geordnet nach transfiziertem Plasmid und cDNA-Probennummer aufgelistet und können den Tabellen 8 bis 12 im Absatz 9.1 entnommen werden.

4.3.2.5 Relative Quantifizierung der Referenz- und Zielgene in HEK293T Zellen

4.3.2.5.1 sLTBP-4 knock-down durch RNA-Interferenz (gene silencing)

Mit Hilfe der relativen Quantifizierung wurde zunächst überprüft, ob ein knock-down der sLTBP-4-Expression durch Transfektion der Zellen mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pAD5U6shRNA1-LTBP4 (für eine Darstellung der Vektorkarte siehe Material und Methoden, Absatz 3.1.2.2) erreicht werden konnte.

Die mit diesem Plasmid transfizierten Zellen exprimieren eine kurze doppelsträngige short-hairpin-RNA (shRNA), die in der Zelle zu einer siRNA (small interference RNA) umgesetzt wird und als solche die mRNA des Zielgens sLTBP-4 zerstört.

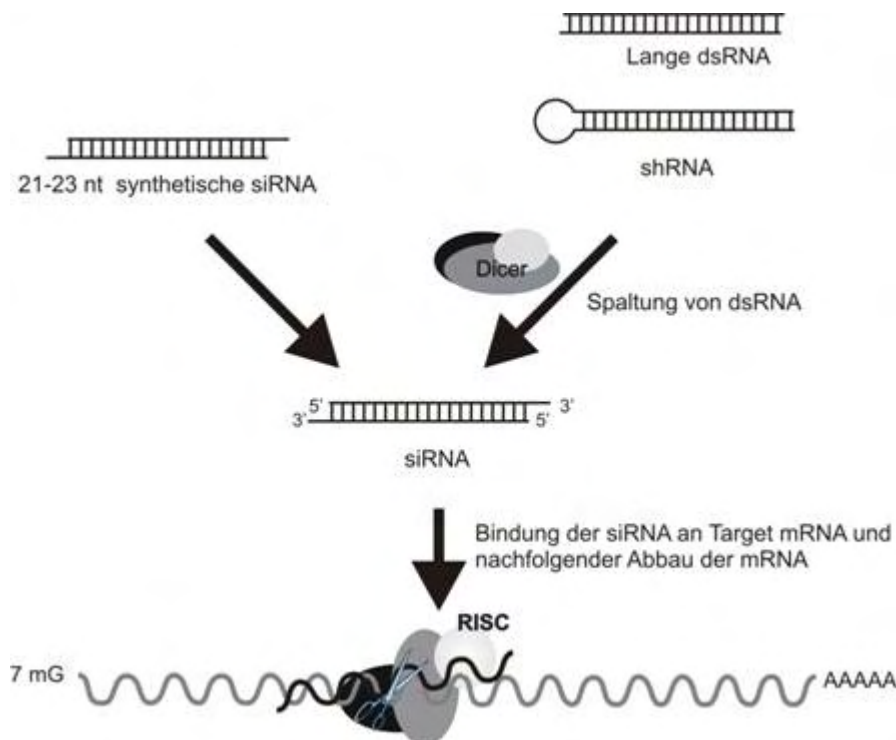


Abbildung 20 Schematische Darstellung der RNA-Interferenz

Dicer: ubiquitäres Enzym (RNase III)

RISC: RNA induced silencing complex (Endoribonuklease)

4.3.2.5.2 sLTBP-4 Überexpression

Die erfolgreiche Überexpression von sLTBP-4 in HEK293T Zellen transfiziert mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pCMVsL4V5blas (für eine Darstellung der Vektorkarte siehe Material und Methoden, Absatz 3.1.2.2) wurde ebenfalls durch relative Quantifizierung verifiziert.

Das cDNA-Plasmid-Konstrukt pCMVsL4V5blas enthält neben der funktionellen sLTBP-4 cDNA (im kodierenden Bereich) den viralen Promotor SV40 (Simian Virus 40). Dies ermöglicht eine hohe sLTBP-4-Expressionsrate in epithelialen Zellen. Plasmide, die eine SV40-kodierende Sequenz enthalten, werden in einer HEK293T Zelle 400- bis 1000-fach repliziert und weisen somit eine stark erhöhte Expressionsrate auf (Pear, Nolan et al. 1993).

4.3.2.5.3 Testgruppen

Die relative Expression der GOI (Zielgene, Targetgene) sLTBP-4, TGF- β 1, p21 und c-myc in HEK293T Zellen wurde in zwei Gruppen untersucht (siehe Tabelle 5).

Testgruppe 1 umfasste cDNA-Proben der Zellen aus dem Transfektionsansatz für sLTBP-4-knock-down (Transfektion mit pAD5U6shRNA1-LTBP4).

Testgruppe 2 ergab sich aus cDNA-Proben der Zellen aus dem Transfektionsansatz für sLTBP-4-Überexpression (Transfektion mit pCMVsL4V5blas).

Tabelle 5 Tabellarischer Überblick über die untersuchten Testgruppen

Testgruppe	cDNA	Testplasmid	Kontrollplasmid	Alternative Kontrolle
1	cDNA aus HEK293T Zellen mit sLTBP-4 knock-down	pAD5U6shRNA1-LTBP4	pGFPdhE1A1	Nur Transfektionsreagenz
2	cDNA aus HEK293T Zellen mit sLTBP-4 Überexpression	pCMVsL4V5blas	pcDNA6/V5-His B	Nur Transfektionsreagenz

4.3.2.5.4 Kontrollgruppen

Als Kontrolle wurden für beide Testgruppen (1 und 2, siehe Tabelle 5) cDNA-Proben aus HEK293T Zellen eingesetzt, die mit dem jeweiligen »Leervektor« (Plasmid ohne im kodierenden Bereich integrierte cDNA) transfiziert wurden.

Beide Testgruppen (1 und 2) wurden zusätzlich mit einer alternativen Kontrolle untersucht. Dies diente der Feststellung, ob die Transfektion mit dem jeweiligen Kontrollplasmid (siehe Tabelle 5) die Genexpression der Zellen von TGF- β 1, p21 und c-myc beeinflusst.

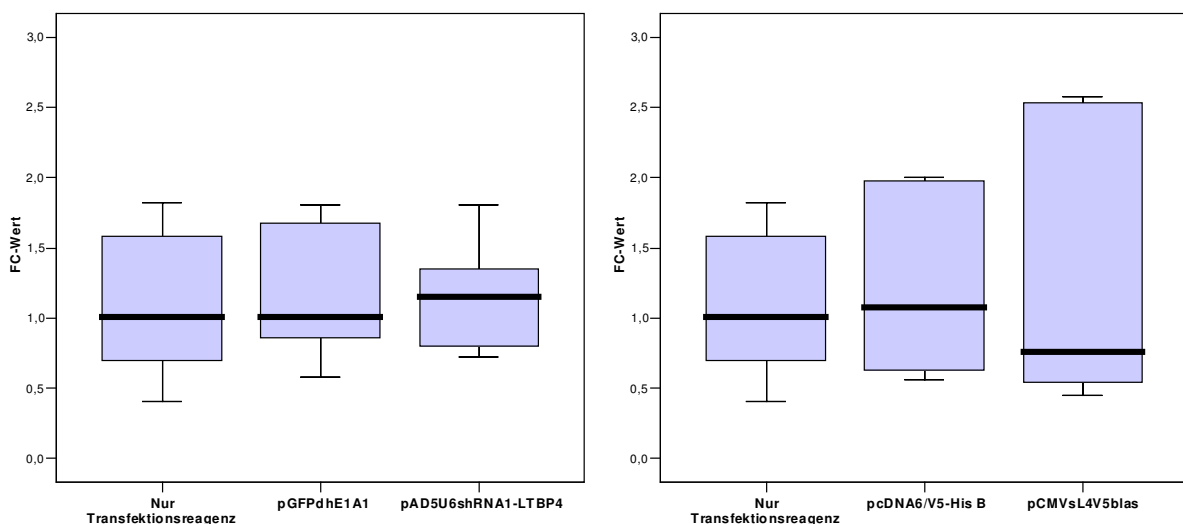
Die alternative Kontrolle bestand aus Transfektionsreagenz, dem keine Plasmid-DNA zugefügt wurde.

4.3.2.5.5 Relative Expressionsraten der Referenzgene

Die Expressionsstabilität der Kombination aus Referenzgenen ist Voraussetzung für die Zuverlässigkeit der mit Hilfe der Referenzgene normalisierten Daten der Zielgene (Dheda, Huggett et al. 2005). Die Expressionsraten der Referenzgene in den Gruppen der jeweiligen Kontroll- und Testproben wurden bezogen auf ihren Median relativ quantifiziert (siehe Gleichung 6) und die ermittelten Ergebnisse graphisch als Boxplot dargestellt (Etschmann, Wilcken et al. 2006).

Boxplots präsentieren die ermittelten FC-Werte in einer Fünf-Punkte-Zusammenfassung; es werden der Median, die zwei Quartile sowie die beiden Extremwerte abgebildet (siehe 3.2.3.4.12).

Abbildung 21 zeigt die Expressionsstabilität der Referenzgene in den untersuchten Proben.



Nur Transfektionsreagenz: HEK293T Zellen, denen als Kontrolle nur Transfektionsreagenz (siehe 3.1.8) zugefügt wurde

pGFPdhE1A1: FC-Werte der Referenzgene in HEK293T Zellen transfiziert mit dem Plasmid pGFPdhE1A1

pAD5U6shRNA1-LTBP4: FC-Werte der Referenzgene in HEK293T-Zellen transfiziert mit dem Plasmid pAD5U6shRNA1-LTBP4

pcDNA6/V5-His B: FC-Werte der Referenzgene in HEK293T Zellen transfiziert mit dem Plasmid pcDNA6/V5-His B

pCMVsL4V5blas: FC-Werte der Referenzgene in HEK293T Zellen transfiziert mit dem Plasmid pCMVsL4V5blas

Abbildung 21 Graphische Darstellung der Expressionsstabilität der Referenzwerte in den Kontroll- und Testprobengruppen aus dem HEK293T-Transfektionsansatz für das sLTBP-4-knock-down (Diagramm links) und die sLTBP-4-Überexpression (Diagramm rechts)

Das linke Diagramm zeigt die FC-Werte der Kontrollproben (pGFPdhE1A1) und Testproben (pAD5U6shRNA1-LTBP4) der Gruppe des Transfektionsansatzes für das sLTBP-4-knock-down (verminderte sLTBP-4-Expression). Das rechte Diagramm zeigt die FC-Werte der Kontrollproben (pcDNA6/V5-His B) und Testproben (pCMVsL4V5blas) der Gruppe des Transfektionsansatzes für die sLTBP-4-Überexpression (vermehrte sLTBP-4-Expression). Für beide Gruppen ist der Boxplot der FC-Werte der HEK293T Zellen, denen als Kontrolle

nur Transfektionsreagenz (siehe 3.1.8) zugefügt wurde, dargestellt. In allen Kontroll- und Testprobengruppen lag der Median der FC-Werte im Bereich von 1. Die maximale FC-Wert-Differenz lag unter 2,5. Eine Auflistung der entsprechenden FC-Werte befindet sich im Anhang, Absatz 9.1 in Tabelle 13.

4.3.2.5.6 Relative Expressionsraten der GOI in HEK293T Zellen mit sLTBP-4-knock-down

4.3.2.5.6.1 sLTBP-4

Mittels relativer Quantifizierung wurde zunächst überprüft, ob eine verminderte sLTBP-4-Expression (knock-down) durch Transfektion der Zellen mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pAD5U6shRNA1-LTBP4 erreicht werden konnte.

Die relative Expression von LTBP-4 in HEK293T Zellen mit potentiell verminderter sLTBP-4-Expression wurde durch den Vergleich der Expression in Kontrollproben (cDNA aus mit dem Plasmid pGFPdhE1A1 transfizierten Zellen) mit der Expression in Testproben (cDNA aus mit dem Plasmid pAD5U6shRNA1-LTBP4 transfizierten Zellen) ermittelt (siehe auch 3.2.3.4.10). Als alternative Kontrolle wurden cDNA-Proben aus Zellen eingesetzt, denen im Transfektionsansatz nur Transfektionsreagenz (ohne Plamid-DNA) zugefügt wurde (siehe 4.3.2.5.4). Die erfolgreich verminderte relative sLTBP-4-Expression (knock-down) ist in Abbildung 22 dargestellt.

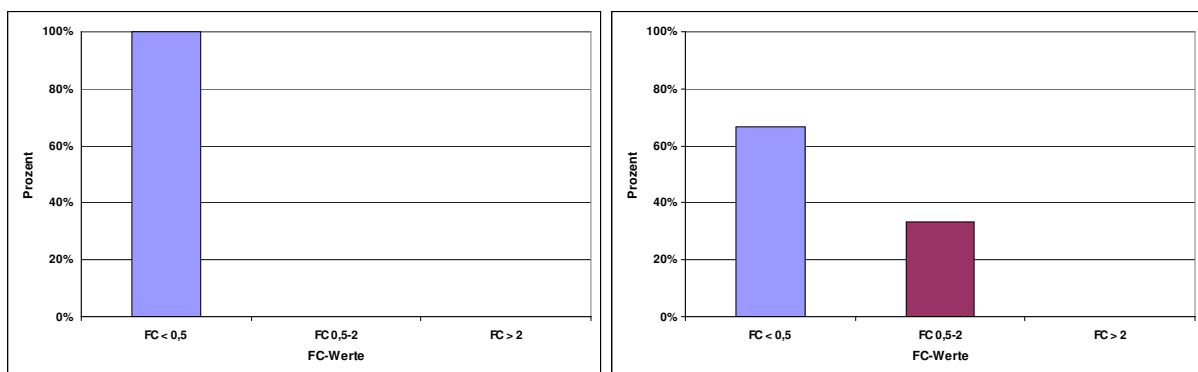


Abbildung 22 Relative sLTBP-4-Expression in HEK293T Zellen, die mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pAD5U6shRNA1-LTBP4 (verminderte LTBP-4-Expression) transfiziert wurden (Diagramm links: Kontrollproben = cDNA aus mit dem Plasmid pGFPdhE1A1 transfizierten Zellen, Diagramm rechts: Kontrollproben = cDNA aus HEK293T Zellen, denen nur Transfektionsreagenz zugefügt wurde)

In der Auswertung mit dem Kontrollplasmid (Diagramm rechts) lagen alle $FC_{sLTBP-4}$ -Werte (100%) unter 0,5. Das ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass in allen Testproben weniger als halb so viele Kopien an sLTBP-4-mRNA zu finden waren wie in den korrespondierenden Kontrollproben.

In der Auswertung mit dem Transfektionsreagenz als Kontrolle (Diagramm links) lagen 67% der $FC_{sLTBP-4}$ -Werte (100%) unter 0,5; in 33% der Proben blieb sLTBP-4 unreguliert (FC-Werte zwischen 0,5 und 2). Eine tabellarische Auflistung der entsprechenden FC-Werte befindet sich im Anhang, Absatz 9.1 in Tabelle 14 und Tabelle 15.

4.3.2.5.6.2 TGF- β 1

Um die funktionelle Konsequenz der Ablation endogener sLTBP-4-Expression, induziert durch sLTBP-4-shRNA (exprimiert durch den adenoviralen Vektor pAD5U6shRNA1-LTBP4), zu untersuchen, wurde in mit diesem Vektor transfizierten HEK293T Zellen die relative Expression von TGF- β 1-mRNA ermittelt. Dabei repräsentierten cDNA-Proben aus mit dem Plasmid pGFPdhE1A1 transfizierten Zellen die Kontrollproben. Als alternative Kontrolle wurden cDNA-Proben aus Zellen eingesetzt, denen im Transfektionsansatz nur Transfektionsreagenz (ohne Plamid-DNA) zugefügt wurde (siehe 4.3.2.5.4).

Die relative TGF- β 1-Expression in HEK293T Zellen mit effizientem und spezifischem knock-down der sLTBP-4-Expression ist in Abbildung 23 dargestellt.

In der Auswertung mit dem Kontrollplasmid (Diagramm rechts) lagen alle $FC_{TGF-\beta 1}$ -Werte (100%) zwischen 0,5 und 2. Das ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass in allen Testproben weniger als halb so viele bis doppelt so viele Kopien an TGF- β 1-mRNA zu finden waren wie in den korrespondierenden Kontrollproben und somit die Genexpression in den untersuchten Proben nicht reguliert wurde. In der Auswertung mit dem Transfektionsreagenz als Kontrolle (Diagramm links) lagen 67% der $FC_{TGF-\beta 1}$ -Werte zwischen 0,5 und 2. Das ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass die Genexpression in den 67% der untersuchten Proben nicht reguliert wurde. In 33% der Proben konnte eine vermehrte TGF- β 1-Expression beobachtet werden (FC-Wert > 2). Eine tabellarische Auflistung der entsprechenden FC-Werte befindet sich im Anhang, Absatz 9.1 in Tabelle 16.

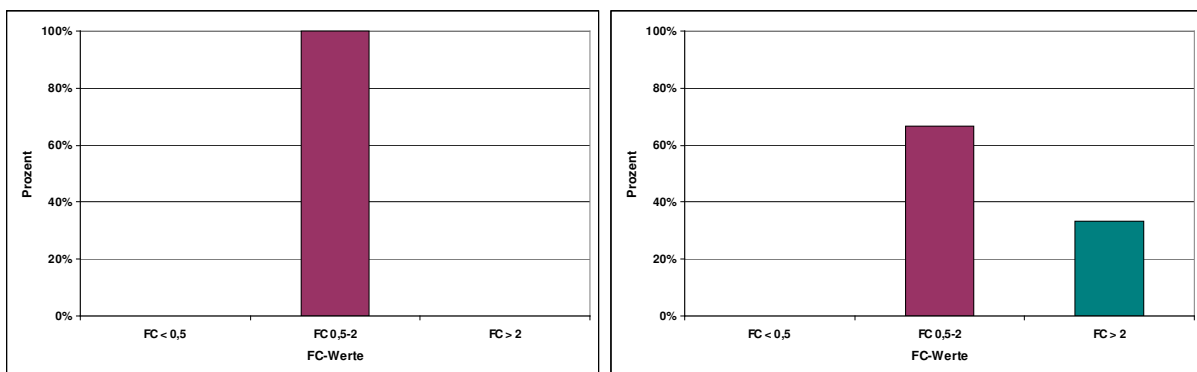


Abbildung 23 Relative TGF- β 1-Expression in HEK293T Zellen, die mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pAD5U6shRNA1-LTBP4 (verminderte sLTBP-4-Expression) transfiziert wurden (Diagramm links: Kontrollproben = cDNA aus mit dem Plasmid pGFPdhE1A1 transfizierten Zellen, Diagramm rechts: Kontrollproben = cDNA aus HEK293T-Zellen, denen nur Transfektionsreagenz zugefügt wurde)

4.3.2.5.6.3 p21

Die relative Expression von p21-mRNA in HEK293T Zellen mit verminderter LTBP-4-Expression wurde durch den Vergleich der Expression in Kontrollproben (cDNA aus mit dem Plasmid pGFPdhE1A1 transfizierten Zellen) mit der Expression in Testproben (cDNA aus mit dem Plasmid pAD5U6shRNA1-LTBP4 transfizierten Zellen) ermittelt (siehe auch 3.2.3.4.10). Als alternative Kontrolle wurden cDNA-Proben aus Zellen eingesetzt, denen im Transfektionsansatz nur Transfektionsreagenz (ohne Plamid-DNA) zugefügt wurde (siehe 4.3.2.5.4).

Die relative p21-Expression in HEK293T Zellen mit effizientem und spezifischem knock-down der sLTBP-4-Expression ist in Abbildung 24 dargestellt. Sowohl in der Auswertung mit dem Kontrollplasmid (Diagramm rechts) als auch in der Auswertung mit dem Transfektionsreagenz als Kontrolle (Diagramm links) lagen 67% der FC_{p21} -Werte zwischen 0,5 und 2. Das ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass die Genexpression in den 67% der untersuchten Proben nicht reguliert wurde. In 33% der Proben konnte eine vermehrte p21-Expression beobachtet werden (FC -Wert > 2). Eine tabellarische Auflistung der entsprechenden FC -Werte befindet sich im Anhang, Absatz 9.1 in Tabelle 17.

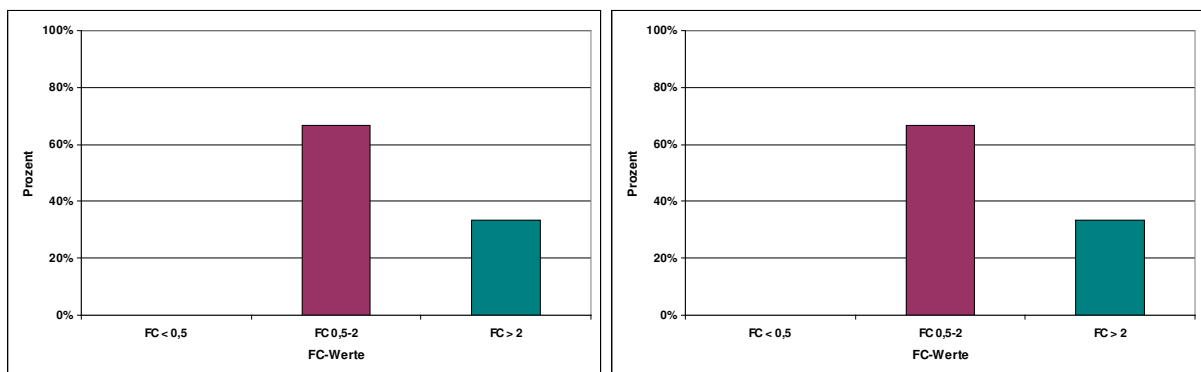


Abbildung 24 Relative p21-Expression in HEK293T Zellen, die mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pAD5U6shRNA1-LTBP4 (verminderte LTBP-4-Expression) transfiziert wurden (Diagramm links: Kontrollproben = cDNA aus mit dem Plasmid pGFPdhE1A1 transfizierten Zellen, Diagramm rechts: Kontrollproben = cDNA aus HEK293T Zellen, denen nur Transfektionsreagenz zugefügt wurde)

4.3.2.5.6.4 c-myc

Die relative Expression von c-myc-mRNA in HEK293T Zellen mit effizientem und spezifischem knock-down der sLTBP-4-Expression wurde durch den Vergleich der Expression in Kontrollproben (cDNA aus mit dem Plasmid pGFPdhE1A1 transfizierten Zellen) mit der Expression in Testproben (cDNA aus mit dem Plasmid pAD5U6shRNA1-LTBP4 transfizierten Zellen) ermittelt (siehe auch 3.2.3.4.10).

Als alternative Kontrolle wurden cDNA-Proben aus Zellen eingesetzt, denen im Transfektionsansatz nur Transfektionsreagenz (ohne Plamid-DNA) zugefügt wurde (siehe 4.3.2.5.4).

Die relative c-myc-Expression in HEK293T Zellen mit effizientem und spezifischem knock-down der sLTBP-4-Expression ist in Abbildung 25 dargestellt. Sowohl in der Auswertung mit dem Kontrollplasmid (Diagramm rechts) als auch in der Auswertung mit dem Transfektionsreagenz als Kontrolle (Diagramm links) lagen 67% der FC_{c-myc} -Werte zwischen 0,5 und 2. Das ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass die Genexpression in den 67% der untersuchten Proben nicht reguliert wurde. In 33% der Proben konnte eine vermehrte c-myc-Expression beobachtet werden ($FC\text{-Wert} > 2$).

Eine tabellarische Auflistung der entsprechenden FC-Werte befindet sich im Anhang, Absatz 9.1 in Tabelle 18.

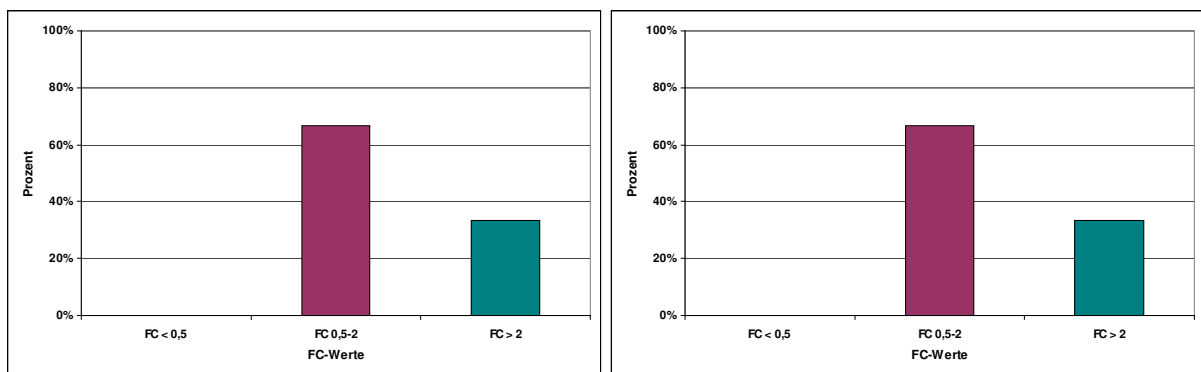


Abbildung 25 Relative c-myc-Expression in HEK293T Zellen, die mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pAD5U6shRNA1-LTBP4 (verminderte LTBP-4-Expression) transfiziert wurden (Diagramm links: Kontrollproben = cDNA aus mit dem Plasmid pGFPdhE1A1 transfizierten Zellen, Diagramm rechts: Kontrollproben = cDNA aus HEK293T Zellen, denen nur Transfektionsreagenz zugefügt wurde)

4.3.2.5.7 Relative Expressionsraten der GOI in HEK293T Zellen mit sLTBP-4-Überexpression

4.3.2.5.7.1 sLTBP-4

Mit Hilfe der relativen Quantifizierung wurde zunächst überprüft, ob eine sLTBP-4-Überexpression durch Transfektion der Zellen mit dem Expressionsvektor pCMVsL4V5blas erreicht werden konnte.

Die mit diesem Plasmid transfizierten Zellen exprimieren sLTBP-4-mRNA in hoher Kopienzahl, was zu einer vermehrten sLTBP-4-Expression führt.

Die relative Expression von sLTBP-4 in HEK293T Zellen mit potentiell vermehrter LTBP-4-Expression wurde durch den Vergleich der Expression in Kontrollproben (cDNA aus mit dem »Leervektor« pcDNA6/V5-His B transfizierten Zellen) mit der Expression in Testproben (cDNA aus mit dem Expressionsvektor pCMVsL4V5blas transfizierten Zellen) ermittelt (siehe auch 3.2.3.4.10). Als alternative Kontrolle wurden cDNA-Proben aus Zellen eingesetzt, denen im Transfektionsansatz nur Transfektionsreagenz (ohne Plamid-DNA) zugefügt wurde (siehe 4.3.2.5.4).

Die erfolgreiche sLTBP-4-Überexpression ist in Abbildung 26 dargestellt.

Sowohl in der Auswertung mit dem Kontrollplasmid (Diagramm rechts) als auch in der Auswertung mit dem Transfektionsreagenz als Kontrolle (Diagramm links) lagen alle $FC_{sLTBP-4}$ -Werte (100%) über 2. Das ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass in allen Testproben mehr als doppelt so viele Kopien an sLTBP-4-mRNA zu finden waren wie in den korrespondierenden Kontrollproben. Eine tabellarische Auflistung der entsprechenden FC-Werte befindet sich im Anhang, Absatz 9.1 in Tabelle 19.

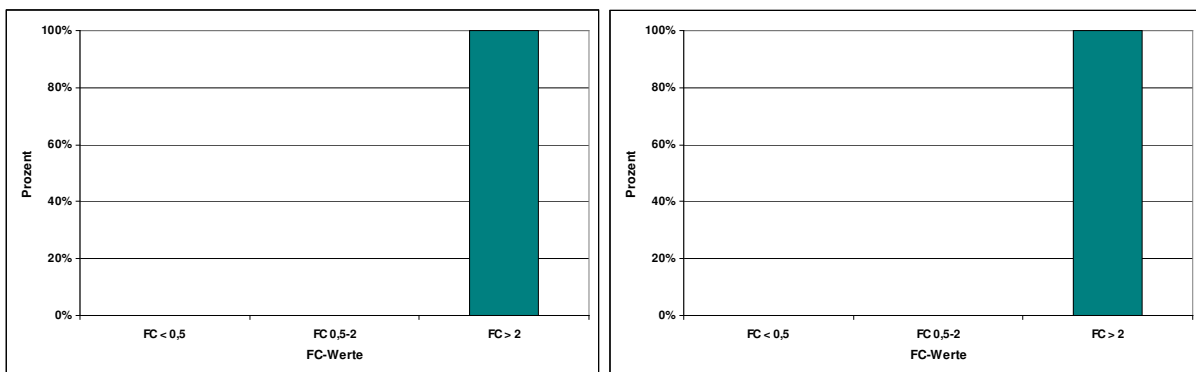


Abbildung 26 Relative sLTBP-4-Expression in HEK293T Zellen, die mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pCMVsL4V5blas (vermehrte sLTBP-4-Expression) transfiziert wurden (Diagramm links: Kontrollproben = cDNA aus mit dem Plasmid pcDNA6/V5-His B transfizierten Zellen, Diagramm rechts: Kontrollproben = cDNA aus HEK293T Zellen, denen nur Transfektionsreagenz zugefügt wurde)

4.3.2.5.7.2 TGF- β 1

Die relative Expression von TGF- β 1 in HEK293T Zellen mit sLTBP-4-Überexpression wurde durch den Vergleich der Expression in Kontrollproben (cDNA aus mit dem Plasmid pcDNA6/V5-His B transfizierten Zellen) mit der Expression in Testproben (cDNA aus mit dem Plasmid pCMVsL4V5blas transfizierten Zellen) ermittelt (siehe auch 3.2.3.4.10). Als alternative Kontrolle wurden cDNA-Proben aus Zellen eingesetzt, denen im Transfektionsansatz nur Transfektionsreagenz (ohne Plamid-DNA) zugefügt wurde (siehe 4.3.2.5.4). Die relative TGF- β 1-Expression in HEK293T Zellen mit sLTBP-4-Überexpression ist in Abbildung 27 dargestellt.

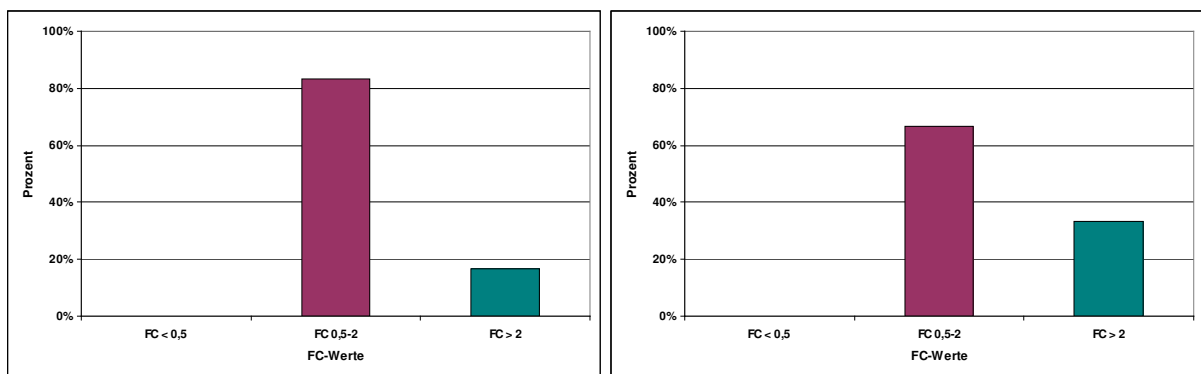


Abbildung 27 Relative TGF- β 1-Expression in HEK293T Zellen, die mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pCMVsL4V5blas (vermehrte LTBP-4-Expression) transfiziert wurden (Diagramm links: Kontrollproben = cDNA aus mit dem Plasmid pcDNA6/V5-His B transfizierten Zellen, Diagramm rechts: Kontrollproben = cDNA aus HEK293T Zellen, denen nur Transfektionsreagenz zugefügt wurde)

In der Auswertung mit dem Kontrollplasmid (Diagramm rechts) lagen 67% der $FC_{TGF-\beta 1}$ -Werte zwischen 0,5 und 2.

Das ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass die TGF- β 1-Genexpression in den 67% der untersuchten Proben nicht reguliert wurde. In 33% der Proben konnte eine vermehrte TGF- β 1-Expression beobachtet werden (FC-Wert > 2). In der Auswertung mit dem Transfektionsreagenz als Kontrolle (Diagramm links) lagen 83% der $FC_{TGF-\beta 1}$ -Werte zwischen 0,5 und 2. Das ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass die TGF- β 1-Genexpression in den 83% der untersuchten Proben nicht reguliert wurde. In 17% der Proben konnte eine vermehrte TGF- β 1-Expression beobachtet werden (FC-Wert > 2). Eine tabellarische Auflistung der entsprechenden FC-Werte befindet sich im Anhang, Absatz 9.1 in Tabelle 20.

4.3.2.5.7.3 p21

Die relative Expression von p21 in HEK293T-Zellen mit sLTBP-4-Überexpression wurde durch den Vergleich der Expression in Kontrollproben (cDNA aus mit dem Plasmid pcDNA6/V5-His B transfizierten Zellen) mit der Expression in Testproben (cDNA aus mit dem Plasmid pCMVsL4V5blas transfizierten Zellen) ermittelt (siehe auch 3.2.3.4.10). Als alternative Kontrolle wurden cDNA-Proben aus Zellen eingesetzt, denen im Transfektionsansatz nur Transfektionsreagenz (ohne Plamid-DNA) zugefügt wurde (siehe 4.3.2.5.4). Die relative p21-Expression in HEK293T Zellen mit sLTBP-4-Überexpression ist in Abbildung 28 dargestellt.

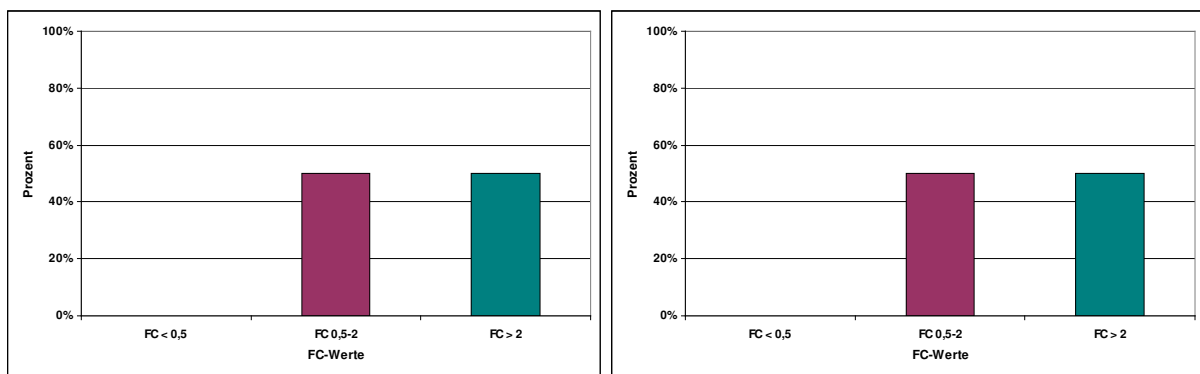


Abbildung 28 Relative p21-Expression in HEK293T-Zellen, die mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pCMVsL4V5blas (vermehrte LTBP-4-Expression) transfiziert wurden (Diagramm links: Kontrollproben = cDNA aus mit dem Plasmid pcDNA6/V5-His B transfizierten Zellen, Diagramm rechts: Kontrollproben = cDNA aus HEK293T-Zellen, denen nur Transfektionsreagenz zugefügt wurde)

Sowohl in der Auswertung mit dem Kontrollplasmid (Diagramm rechts) als auch in der Auswertung mit dem Transfektionsreagenz als Kontrolle (Diagramm links) lagen 50% der FC_{p21} -Werte zwischen 0,5 und 2 und 50% der FC_{p21} -Werte über 2. Das ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass die p21-Genexpression in den 50% der untersuchten Proben nicht reguliert wurde (FC-Wert 0,5-2) und dass in 50% der Proben eine vermehrte p21-Expression (FC-Wert > 2) beobachtet werden konnte. Eine tabellarische Auflistung der entsprechenden FC-Werte befindet sich im Anhang, Absatz 9.1 in Tabelle 21.

4.3.2.5.7.4 c-myc

Die relative Expression von c-myc in HEK293T Zellen mit sLTBP-4-Überexpression wurde durch den Vergleich der Expression in Kontrollproben (cDNA aus mit dem Plasmid pcDNA6/V5-His B transfizierten Zellen) mit der Expression in Testproben (cDNA aus mit dem Plasmid pCMVsL4V5blas transfizierten Zellen) ermittelt (siehe auch 3.2.3.4.10). Als alternative Kontrolle wurden cDNA-Proben aus Zellen eingesetzt, denen im Transfektionsansatz nur Transfektionsreagenz (ohne Plamid-DNA) zugefügt wurde (siehe 4.3.2.5.4). Die relative c-myc-Expression in HEK293T Zellen mit sLTBP-4-Überexpression ist in Abbildung 29 dargestellt.

In der Auswertung mit dem Kontrollplasmid (Diagramm rechts) lagen 67% der $FC_{TGF-\beta 1}$ -Werte zwischen 0,5 und 2. Das ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass die TGF- $\beta 1$ -Genexpression in den 67% der untersuchten Proben nicht reguliert wurde. In 33% der Proben konnte eine vermehrte TGF- $\beta 1$ -Expression beobachtet werden (FC-Wert > 2). In der Auswertung mit dem Transfektionsreagenz als Kontrolle (Diagramm links) lagen 83% der $FC_{TGF-\beta 1}$ -Werte zwischen 0,5 und 2. Das ist gleichbedeutend mit der Aussage, dass die TGF- $\beta 1$ -Genexpression in den 83% der untersuchten Proben nicht reguliert wurde. In 17% der Proben konnte eine vermehrte TGF- $\beta 1$ -Expression beobachtet werden (FC-Wert > 2). Eine tabellarische Auflistung der entsprechenden FC-Werte befindet sich im Anhang, Absatz 9.1 in Tabelle 22.

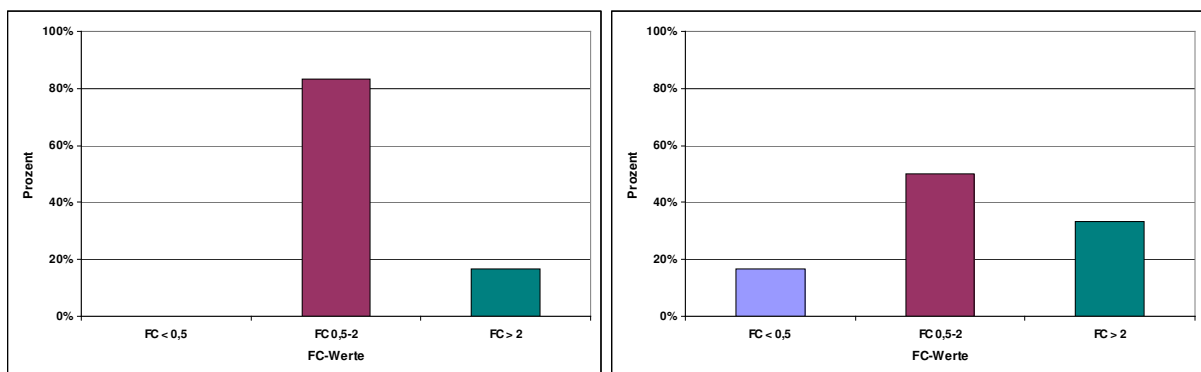


Abbildung 29 Relative c-myc-Expression in HEK293T Zellen, die mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pCMVsL4V5blas (vermehrte LTBP-4-Expression) transfiziert wurden (Diagramm links: Kontrollproben = cDNA aus mit dem Plasmid pcDNA6/V5-His B transfizierten Zellen, Diagramm rechts: Kontrollproben = cDNA aus HEK293T Zellen, denen nur Transfektionsreagenz zugefügt wurde)

4.4 ERGEBNISSE DER PROTEINBIOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNGEN

4.4.1 Detektion des sL4-V5-Fusionsproteins

Das Ziel der proteinbiochemischen Untersuchungen war die Detektion des sL4-V5-Fusionsproteins, das von HEK293T-Zellen nach Transfektion mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pCMVsL4V5blas (transfiziert für eine sLTBP-4-Überexpression) synthetisiert wird (siehe Abbildung 30).

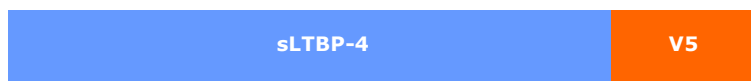


Abbildung 30 Schematische Darstellung des sL4-V5-Fusionsproteins

Das cDNA-Plasmid-Konstrukt pCMVsL4V5blas besitzt, ebenso wie das Plasmid pCMVZFP67neo (transfiziert als Positivkontrolle für den Westernblot), ein sog. »V5-Epitope-Tag« (V5-Epitop-Marker). Der V5-Epitop-Marker entstammt einem kleinem Epitop (Pk) des P- und V-Proteins des Paramyxovirus »Simian Virus 5 (SV5)«. Die Epitop-Markierung dient der Detektion von Proteinen, die von klonierten Genen exprimiert werden. Die das sLTBP-4-kodierende cDNA wurde in die »Multiple Cloning Site« (Abschnitt auf dem Basisplasmid, in den exogene cDNA kloniert wird) der cDNA-Plasmid-Konstrukte unmittelbar vor die V5-Epitop-Marker-kodierende Sequenz kloniert (siehe Abbildung 31), damit die transfizierten Zellen das sLTBP-4 als Fusionsprotein (sL4-V5) synthetisieren. Das sL4-V5-Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von 185 kDa. Nach dem gleichen Prinzip wurde mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pCMVZFP67neo verfahren. Vor den V5-Epitop-Marker wurde hier eine cDNA in das Plasmid kloniert, die für das Protein ZFP67 (»Zink Finger Protein 67«) kodiert. Das ZFP67-V5-Fusionsprotein besitzt ein Molekulargewicht von 70 kDa.

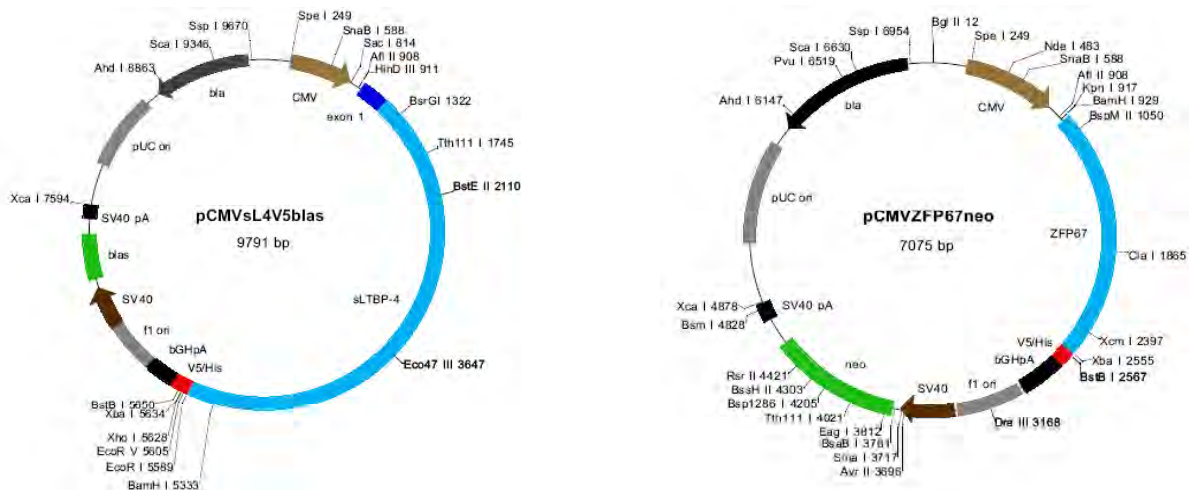


Abbildung 31 Vektorkarten der cDNA-Plasmid-Konstrukte pCMVsL4V5blas und pCMVZFP67neo. Die kodierende cDNA ist blau gefärbt; der V5-Epitop-Marker wird in rot dargestellt.

4.4.2 Proteinkonzentration

Um bei den verschiedenen Proben jeweils die gleiche Proteinmenge in den Western Blot einsetzen zu können, wurde die Konzentration photometrisch bestimmt und der jeweils identische Proteingehalt eingestellt (siehe 3.2.4.3). Bei allen Proben wurde eine Proteinkonzentration von 1000µg / ml eingesetzt.

4.4.3 Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung der korrekt aufgetrennten Proteine wurde nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eines von zwei eingesetzten Fertiggelen (NuPAGE™ 10% Bis-Tris Gel, siehe 3.1.7) nach Coomassie gefärbt. Ziel war hierbei der Nachweis einer sehr guten Auftrennung der Proteinbanden im hochmolekularen Bereich, da das sLTBP-4-Protein mit V5-Tag ein Molekulargewicht von 185 kDa besitzt. Abbildung 32 zeigt die fotografische Darstellung des gefärbten Gels (Ausschnitt).

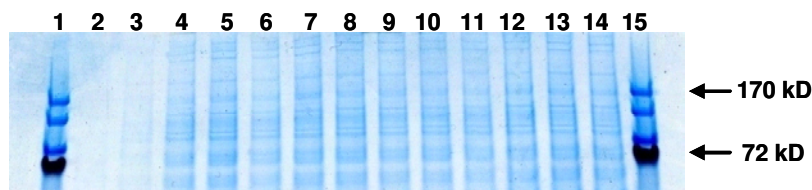


Abbildung 32 NuPAGE™ 10% Bis-Tris Gel nach SDS-PAGE, Coomassie-Färbung

1, 15	: Marker [Page Ruler® Prestained Protein Ladder, Fermentas GmbH]
2, 3, 4, 11, 12, 13, 14	: Kontrollen 1-7 (Protein aus nicht transfizierten HEK293T-Zellen)
5, 6	: Proben 1-2 (Protein aus HEK293T-Zellen kotransfiziert mit pCMVsL4V5blas und pAD5U6shRNA1-LTBP4)
7, 8	: Proben 3-4 (Protein aus HEK293T-Z. transf. mit pCMVZFP67neo)
9, 10	: Proben 5-6 (Protein aus HEK293T-Z. transf. mit pCMVsL4V5blas)

4.4.4 Ponceau S-Färbung

Der erfolgreiche Proteintransfer im Westernblot wurde durch eine Ponceau S-Färbung der Nitrocellulosemembran überprüft. Dabei war von besonderem Interesse, ob Proteine mit einem hohen Molekulargewicht auf die Membran übertragen werden konnten. Abbildung 33 zeigt die fotografische Darstellung der gefärbten Membran (Ausschnitt).

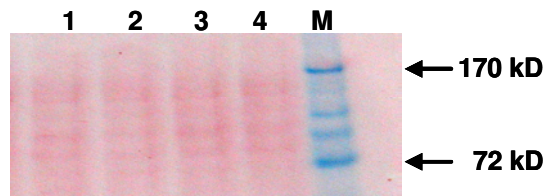


Abbildung 33 Nitrocellulosemembran nach Proteintransfer (Ausschnitt), Ponceau S-Färbung

1	Positivkontrolle 1 (ZFP67-V5-Nachweis, 70 kDa)
2	Positivkontrolle 2 (ZFP67-V5-Nachweis, 70 kDa)
3	Testprobe 1 (sL4-V5-Nachweis, 185 kDa)
4	Testprobe 2 (sL4-V5-Nachweis, 185 kDa)
M	Marker [Page Ruler® Prestained Protein Ladder, Fermentas GmbH]

4.4.5 sL4-V5-Westernblot-Nachweis in HEK293T-Zellen

Die Westernblot-Untersuchungen zeigten eine deutliche sL4-V5-Proteinexpression in HEK293T-Zellen, die mit dem cDNA-Plasmid-Konstrukt pCMVsL4V5blas transfiziert wurden (siehe Abbildung 34). Der Westernblot-Nachweis wurde dreifach reproduziert.

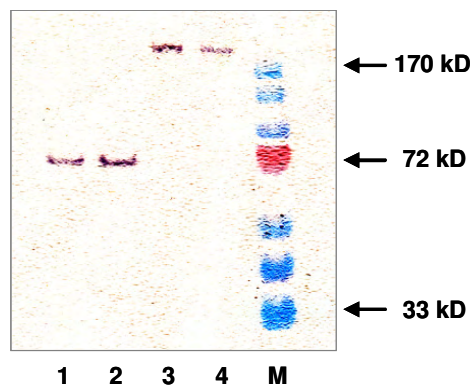


Abbildung 34 Westernblot: sL4-V5-Protein-Nachweis in HEK293T-Zellen

1	Positivkontrolle 1 (ZFP67-V5-Nachweis, 70 kDa)
2	Positivkontrolle 2 (ZFP67-V5-Nachweis, 70 kDa)
3	Testprobe 1 (sL4-V5-Nachweis, 185 kDa)
4	Testprobe 2 (sL4-V5-Nachweis, 185 kDa)
M	Marker [Page Ruler® Prestained Protein Ladder, Fermentas GmbH]