

### 3. Methoden

#### 3.1. RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mittels Trizol-Protokoll nach Anleitung des Herstellers Invitrogen mit einigen Modifikationen: Zunächst wurde ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß für die Extraktion vorbereitet: Es wurde unter dem Abzug auf Eis gekühlt und mit 750 µl Trizol-Reagenz gefüllt. Das geforene Biopsat wurde auf eine sterile, RNase-freie Alufolie transferiert und von Eis befreit. Anschließend wurde es sofort in das mit Trizol vorbereitete Gefäß überführt. Das Biopsat wurde nun mit einem Ultraschallhomogenisator dreimal für je 12 Sekunden mit jeweils 30 Sekunden Pause bei 70 % der maximalen Leistung im Eisbad behandelt. Nach diesem Gewebaufschluss wurde das Volumen mit RNase-freiem Wasser auf 1000 µl aufgefüllt, um ein Volumenverhältnis von Trizol-Reagenz zu Probensuspension von 3:1 zu gewährleisten. Die geschallten Proben wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine komplette Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu erreichen. Nach Zugabe von 200 µl reinem Chloroform wurde das verschlossene Gefäß 15 Sekunden von Hand geschüttelt und danach für drei Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde der Ansatz 15 Minuten mit 12.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Dadurch ergaben sich zwei scharf voneinander abgetrennte Phasen: Die obere wässrige Phase enthielt die RNA, die untere, organische Phenol-Chloroformphase enthielt DNA und Proteine.

Die obere farblose, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues steriles 1,5 ml Gefäß überführt. Hierbei durfte die Interphase keinesfalls mit überführt werden, da sie große Mengen an Proteinen enthält. Von nun an war das Arbeiten unter dem Abzug nicht mehr nötig. Nun folgte die RNA-Präzipitation durch Zugabe von 500 µl Propanol-2 und 10 µl Glycogenlösung (20 µg / µl). Es wurde sanft von Hand umgeschwenkt. Zur RNA-Fällung wurde das Gefäß bei Raumtemperatur 10 Minuten stehen gelassen. Dann wurde bei 4 °C für 10 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Das oft vor der Zentrifugation noch unsichtbare RNA-Präzipitat formte sich zu einem gelähnlichen Pellet am seitlichen Boden des Eppendorfgefäßes. Der Überstand wurde möglichst vollständig dekantiert.

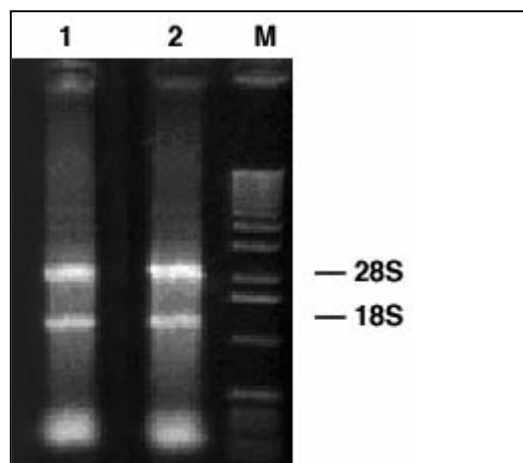
Um die restliche Salze und Propanol-2 Rückstände auszuwaschen wurde das Pellet mit 1000 µl Ethanol (75 %) versetzt und kurz mild gevortext. Dieser Ansatz wurde dann sofort bei 7.500 g für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert, im Anschluß wurde der Überstand verworfen. Nun blieb das Gefäß mit geöffnetem Deckel liegen um den restlichen Alkohol möglichst vollständig verdunsten zu lassen. Das RNA-Pellet durfte dabei keinesfalls austrocknen, da dies die Löslichkeit der RNA herabgesetzt hätte.

Das Pellet wurde mit 50  $\mu$ l RNase freiem Wasser durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipettenspitze gelöst und anschließend für zehn Minuten bei 55 °C inkubiert, um den Lösevorgang zu vervollständigen. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 3.2. Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA

Auf ein Wiegen der Biopsie zur Bestimmung der Gewebemenge wurde verzichtet, da der Bezug der Zytokin-mRNA-Menge auf die GAPDH-mRNA-Menge die Kenntnis des Biopsiegewichts erübrigte. Eine Überprüfung der Qualität und Effektivität der RNA-Aufreinigung jeder einzelnen Biopsie war für die in der Studie zu analysierenden Proben nicht möglich, da für die photometrische Messung zu wenig Material zur Verfügung stand. Um die Qualität und Effektivität der RNA-Extraktion zu validieren, wurde in Voruntersuchungen von 10 Biopsien RNA-Reinheit und RNA-Ausbeute bestimmt.

Dazu wurden 6  $\mu$ l der RNA-Lösung zusammen mit 8  $\mu$ l Gelladepuffer auf ein ethidiumbromidgefärbtes 2,0 %-iges Agarosegel aufgetragen und die Intaktheit der RNA anhand der ribosomalen RNA-Banden beurteilt. Bei gut präparierter Gesamt RNA (Abbildung 01) wurde die tRNA im Bereich zwischen 0,1-0,3 kb sichtbar, und die ribosomale RNA zeigte zwei diskrete Banden bei 2 kb und 5 kb, die der 18S- und 28S-Untereinheit entsprachen. Die mRNA wurde im Bereich von 7 kb bis 15 kb aufgetrennt.



**Abb. 01:** Auftrennung von Gesamt-RNA durch Gelelektrophorese neben einem Basenpaarmarker (10-10.000 bp) mit einem 1 %-igen Agarosegel

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit der RNA wurde 1 µl der RNA-Probe in 99 µl DEPC-Wasser verdünnt und mit dem Photometer die Extinktion gemessen. Dabei dienten 100 µl DEPC-Wasser als Leerwert zur Eichung des Photometers. Bei 260 nm Wellenlänge wurde die Extinktion für Nukleinsäuren und bei 280 nm die Extinktion für Proteine bestimmt und aus diesen die Konzentration der RNA berechnet. Eine optische Dichte von 1 entsprach 40 µg RNA pro ml, so dass folgende Formel zur Berechnung der RNA-Konzentration verwendet wurde:

$$\frac{\text{OD}_{260} \times 40 (\mu\text{g} / \text{ml})}{\text{Verdünnung}} = \text{RNA-Konzentration} (\mu\text{g} / \text{ml})$$

Als Maß für die Reinheit der RNA-Präparation wurde der Quotient aus Nukleinsäuren- und Proteinextinktion (OD-Ratio) gebildet. Ratios von 2,0 bis 1,8 wiesen auf hochreine DNA-beziehungsweise RNA-Präparationen hin. Da das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280 nm liegt, verringerten Proteinverunreinigungen die Ratio.

### 3.3. DNase-Verdauung

Die enzymatische Spaltung von DNA war notwendig, da zur quantitativen Untersuchung der mRNA-Expression mit RT-PCR potenziell vorhandene DNA in den RNA-Proben zu Interferenzen hätte führen können. Die maximale Menge an RNA, die bei der reversen Transkription (RT) zu DNA umgeschrieben werden konnte, war 5 µg. Aus den Vorbestimmungen war bekannt, dass der RNA-Gehalt der Aufreinigung maximal 0,7 µg / µl und im Durchschnitt 0,43 µg / µl betrug. Daher wurde entschieden, die höchstmögliche Menge von 8 µl RNA-Lösung einzusetzen. Die tiefgefrorenen RNA-Isolate wurden auf Eis aufgetaut, 8 µl entnommen und entsprechend folgendem Ansatz weiterverarbeitet:

8 µl RNA-Probe  
 1 µl 10 x DNase I Reaktionspuffer  
 1 µl DNase I (1 Unit / µl)

Bei der DNase-Verdauung wurde DNase I verwendet, welche Einzel- und Doppel-strang-DNA zu Oligo-dNTPs zerlegt.

Die Proben wurden für 15 Minuten bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl 25 mM EDTA (pH 8,0) zugegeben, um das im Puffer enthaltene  $Mg^{2+}$  zu komplexieren und so die DNase zu inaktivieren. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei 65 °C inkubiert und gleich danach wieder in das Eisbad überführt. Die Reverse Transkription wurde direkt im Anschluss durchgeführt.

### 3.4. Reverse Transkription

Vor der PCR musste zunächst in einer Erststrangsynthese die mRNA in cDNA (copy-DNA) umgeschrieben werden. Dies war erforderlich, weil die DNA-Polymerase in der späteren PCR nur DNA erkennt und die RNA für die PCR nicht ausreichend thermostabil ist.

Als Primer zur Reversen Transkription dienten Oligo(dT), in diesem Fall aus 12 bis 18 Thymidinresten bestehend, die am Poly-A-Strang der mRNA ansetzen. An diesen Initiationsstellen bindet die Omniscript™ Reverse Transkriptase und führt drei verschiedene hintereinander geschaltete enzymatische Schritte durch: Zunächst synthetisiert sie mit ihrer RNA-abhängigen DNA-Polymerase ein RNA/DNA-Hybridmolekül. Dann wird die RNA von diesem Doppelstrang durch die Exoribonukleasefunktion des Enzyms hydrolysiert und die nun einzelsträngige DNA durch die DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität zum DNA-Doppelstrang komplettiert.

Der RT-Mastermix pro Probe wurde zunächst erstellt aus:

- 2 µl Oligo-(dT)16 Primer (0,5 µM)
- 2 µl 10x RT-Puffer
- 2 µl dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP; jedes 0,5 mM)
- 1 µl Omniscript™ Reverse Transkriptase (4 U / µl)
- 1 µl RNase Inhibitor (10 U / µl)
- 1 µl steriles Wasser

Alle Arbeitsschritte bis auf die Inkubationen wurden auf Eis durchgeführt. Dem RT-Mastermix wurden die gesamten 11 µl der RNA-Probe nach der DNase-Verdauung zugefügt. Die Reaktionslösung wurde gemischt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Deaktivierung der Omniscript™ Reversen Transkriptase erfolgte für fünf Minuten bei 93 °C. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Anhand der späteren Amplifizierung von GAPDH-cDNA konnte die Umschreibung der RNA in cDNA überprüft werden.

### 3.5. Primerdesign

Zum Primerdesign mussten einige grundlegende Richtlinien beachtet werden:

Die gewählte Sequenz der Primer sollte nur einmal im gesamten Genom vorkommen. Bei näherungsweise 3 Milliarden ( $10^9$ ) Basenpaaren des Humangenoms errechnete sich daher bei vier verschiedenen Basen eine notwendige Mindestlänge der Primer von 16 Basen. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine bestimmte Base an einer bestimmten Position vorkommt, beträgt  $1/4$  bei zufälliger Anordnung einer der vier Basen. Bei 16 Positionen errechnet sich daher:  $(1/4)^{16} = 1/(4 \times 10^9)$ . Empirisch wurde herausgefunden, dass die Wahrscheinlichkeit nicht  $1/4$ , sondern  $0,283$  beträgt (Linz und Degenhardt, 1990). Bei der Primerentwicklung wurde eine Mindestlänge von mindestens 18 Basen gewählt. Alle vier Basen sollten jeweils bei beiden Primern in gleichen Anteilen vertreten sein. Innerhalb jedes Primers sollte der CG-Gehalt höher sein als der AT-Gehalt, weil ersterer Dreifachwasserstoffbrückenbindungen bildet, letzterer nur Zweifachwasserstoffbrückenbindungen wodurch ein Primer mit höherem CG-Gehalt fester bindet. Das Primerpaar sollte an dem jeweiligen 3'-terminalen Ende nicht komplementäre Basensequenzen zueinander aufweisen, um die Amplifikation von Primerdimeren zu vermeiden. Auch sollten die Primer möglichst weder inter- noch intramolekulare Komplementarität aufweisen, damit die Primer nicht mit sich selbst oder untereinander, sondern ausschließlich an die genomische DNA der Probe binden. Bereiche, die eine ausgeprägte Sekundärstruktur (Loops) zulassen, sollten vermieden werden. Als ungünstig für eine möglichst spezifische Primerbindung haben sich ebenfalls Primerabschnitte mit Polypurin- oder Polypyrimidin-Basenfolge herausgestellt. Von entscheidender Bedeutung war auch die korrekte Hybridisierung des Primers mit seinem 3'-terminalen Ende an der DNA für die Amplifikation durch die Polymerase. Bei der Sequenzwahl war diesem Teil des Primers besondere Aufmerksamkeit zu schenken. Die Schmelztemperaturen beider Primer eines Paares sollten möglichst ähnlich sein, damit beide Primer in der PCR bei derselben Temperatur gleich gut mit der Ziel-DNA hybridisieren.

Die Schmelztemperatur ist abhängig von der Anzahl der Basenpaare, dem Verhältnis von Purin- zu Pyrimidinbasen und der Verteilung der Basen. Vereinfachend gilt, dass Thymin und Adenin etwa  $2\text{ °C}$  und Guanin und Cytosin  $3\text{ °C}$  zur Schmelztemperatur beitragen. Die verwendeten Primerpaare sollten in ihrer Schmelztemperatur ( $T_m$ ) möglichst in einem Bereich von  $55 - 60\text{ °C}$  liegen. Die Primerpaare wurden zudem so ausgewählt, dass die von ihnen eingerahmten Sequenzen (Amplikons) nur zwischen 180 und 380 Basenpaaren variierten, um für alle untersuchten Zytokine ähnliche PCR-Bedingungen zu schaffen.

Die für die Suche der Primer und Sonden zugrunde liegenden Sequenzen wurden aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, 1998) bezogen. Um das Risiko von möglichen Nebenamplifikaten zu minimieren, wurden die verwendeten Primer und Sonden auf Sequenzhomologien ebenfalls in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information überprüft.

Die Daten zur Ziel-Sequenz und Lage der Primer sind der Tabelle 02 auf den Seiten 15-16 zu entnehmen.

### **3.6. Amplifikation von cDNA mittels konventioneller PCR**

Ziel dieses Arbeitsschrittes war die Herstellung einer ausreichend großen Menge spezifischer DNA-Abschnitte für die spätere Klonierung. Hierzu wurde eine konventionelle PCR durchgeführt.

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine gängige Methode zur Genanalyse. Das Grundprinzip dieser Technik ist es, millionenfache Kopien eines definierten Bereichs des Genoms zu erstellen, so dass das entstehende Amplifikat sicht- und analysierbar wird. Der prinzipielle Ablauf der PCR beruht auf drei Schritten:

Die zu analysierende DNA wird durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf etwa 90 – 95 °C von der Doppelstrangform in DNA-Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung).

Im zweiten Schritt wird durch Absenken der Temperatur auf zirka 50 – 60 °C die Anlagerung (Annealing) des für jeden zu untersuchenden Genabschnitt individuellen Primerpaares eingeleitet. Die verwendete Annealing-Temperatur richtet sich dabei nach der errechneten Schmelztemperatur der verwendeten Primer (annealing temperature). Das gegenläufig orientierte Primerpaar definiert die zu amplifizierenden Ziel-Sequenz.

In einem dritten Schritt wird die Temperatur auf das Optimum der Taq-DNA-Polymerase von 72 °C eingestellt, um die komplementäre Kopie des definierten DNA-Bereichs zu synthetisieren. Dabei verlängert die Taq-Polymerase die auf der DNA hybridisierten Primer in 5'-3'-Richtung (Elongation oder Extension) durch Verknüpfung von Desoxyribonukleotiden komplementär zur Matrize zu einem Gegenstrang.

Durch die Wiederholung dieser drei Schritte wird bei jedem Zyklus die Menge des zu untersuchenden Genabschnitts verdoppelt, wodurch die PCR den gewünschten Genabschnitt exponentiell amplifiziert.

Der Mastermix einer konventionellen 20  $\mu\text{l}$  PCR enthielt:

- 12  $\mu\text{l}$  Aqua destillata
- 2  $\mu\text{l}$  10xPCR-Puffer incl  $\text{MgCl}_2$
- 2  $\mu\text{l}$  dNTP's (jedes 1 mM)
- 1  $\mu\text{l}$  Sense-Primer (5  $\mu\text{M}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  Antisense-Primer (5  $\mu\text{M}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  Taq-DNA-Polymerase (1 U /  $\mu\text{l}$ )

Dieser Mastermix wurde in 200  $\mu\text{l}$  PCR-Gefäßen zu je 19  $\mu\text{l}$  aliquotiert. Um die Amplifikation von Primerdimeren zu minimieren, sollte bis zum Start der PCR auf Eis gearbeitet werden. Jedem PCR-Gefäß wurden dann 1  $\mu\text{l}$  cDNA als zu untersuchende Probe hinzu pipettiert.

Bedingungen für die konventionelle PCR:

Alle konventionellen PCRs wurden am Perkin Elmer 4000 folgendermaßen durchgeführt:

- 10 min 94 °C (initiale Denaturierung)
- 35 Zyklen: 1 min 94 °C (Denaturierung)
  - 1 min X °C (Hybridisierung) (X °C siehe Tab. 03)
  - 1 min 72 °C (Elongation)
- 5 min 72 °C (finale Extension)

**Tab. 03: Hybridisierungstemperaturen**

	Hybridisierungstemperatur (°C)
GAPDH	63
IL-2	63
IL-4	58
IL-6	62
IL-10	69
IL-16	66
IFN- $\gamma$	60
TNF- $\alpha$	54
CCL3	60
CCL5	56

### 3.7. Detektion der Amplifikate mittels Gelelektrophorese

Um die Spezifität der PCR-Produkte zu beurteilen, wurden diese mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. In einem elektrischen Feld wandern die bei neutralem pH negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Die DNA wandert entsprechend ihrer Größe. Kleine Moleküle legen bei gleicher Zeit und Feldstärke eine längere Trennstrecke zurück als größere DNA-Fragmente, wobei die zurückgelegte Wegstrecke im umgekehrten Verhältnis zum Logarithmus der Produktgröße steht.

Das Gel wurde durch Kochen von 1,5 g Agarose in 100 ml 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle hergestellt. Nachdem es auf 20 °C abgekühlt war, wurden 5  $\mu$ l einer einprozentigen Ethidiumbromidlösung hinzupipettiert und das Gel gegossen. Ethidiumbromid ist ein mit doppelsträngiger DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der durch Anregung mit UV-Licht zum Fluoreszieren gebracht werden kann. Nach dem Erkalten des Gels wurde es mit 1x TAE-Puffer überschichtet und der Kamm für die Probenaschen entfernt. Um eine gute Sedimentation der Proben in den Probenaschen zu erreichen, wurden die Amplifikate mit 5  $\mu$ l Bromphenol-Blau Ladepuffer versetzt, der zusätzlich zur Markierung der Lauffront im Gel diente. Es wurden 15  $\mu$ l DNA-Ladepuffergemisch in die Taschen pipettiert und eine Spannung von 80-100 V (6,7 V / cm Elektrodenabstand) angelegt bis die Bromphenol-Blau-Bande die Mitte des Gels erreicht hatte. Für die Größenbestimmung wurde eine sogenannte 100 bp DNA-Leiter bzw. der Molecular Weight Marker III als Größenstandard eingesetzt. Nach Abschluß der Laufzeit wurde



die DNA auf einem Transluminator mit kurzwelligem UV-Licht (280 nm) sichtbar gemacht und als Bilddatei gespeichert.

### **3.8. Herstellung quantitativer Standardreihen für die Echtzeit-PCR**

Zur Quantifizierung der Zytokin-mRNA-Expression war es notwendig Standards anzufertigen. Hierzu wurden durch serielle Verdünnung Standardreihen mit definierten Mengen an DNA hergestellt, die bei den quantitativen PCRs immer parallel mit den Proben amplifiziert wurden. Um ausreichend Produkt für die Standarderstellung zu gewinnen hätte eine PCR durchgeführt werden können. Allerdings arbeitet die für die PCR notwendige thermostabile Taq-DNA-Polymerase fehlerhaft. Um fehlerfreie Standards zu erhalten, wurde die DNA-Sequenz der zu untersuchenden Zytokine und des Housekeeping-Gens GAPDH in *E. coli* vervielfältigt. Die für die Klonierung eingesetzten GAPDH- und Zytokin-DNA-Sequenzen wurden aus geeigneten Patientenproben durch konventionelle PCR hergestellt.

#### **3.8.1. PCR-Produktreinigung**

Vor der molekularen Klonierung bestimmter DNA-Fragmente wurde eine konventionelle PCR durchgeführt und das PCR-Produkt anschließend per Gelelektrophorese dargestellt. Unter dem Transluminator wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem 1,5 %-igen Agarosegel geschnitten und gewogen. Anschließend wurde das DNA-Produkt aus dem Gel unter Verwendung des QIAquick Gel-Extraktions-Kit eluiert: Der Gelausschnitt wurde in ein 2,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit dem dreifachen seines eignen Volumens mit QG-Puffer versetzt (1 µg ≈ 1 µl). Dieser Mix wurde dann bei 50 °C für 10 Minuten inkubiert und alle drei Minuten gevortext, bis das Gel völlig aufgelöst war. Der pH-Wert des verwendeten QG-Puffers wurde mit Hilfe eines Farbindikators überwacht, da die Adsorption der DNA an die Säule nur bei einem pH ≤ 7,5 effizient war. Es wurden maximal 800 µl dieses Reaktionsansatzes in eine QIAquick-Zentrifugations-Säule überführt, die zur Aufnahme des Filtrats in ein Sammelgefäß gestellt worden war. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 10.000 g für fünf Minuten. Bei einem Probenvolumen größer 800 µl konnte die Säule mehrmals beladen werden. Eine solche Säule war in der Lage 10 µg DNA zu binden. Die Bindung der DNA an die Silica-Gel-Matrix erfolgte unter hoher Salzkonzentration des QG-Puffers. Nach dem Zentrifugieren wurde das Filtrat verworfen und die Säule mit 500 µl QG-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Dieses Filtrat

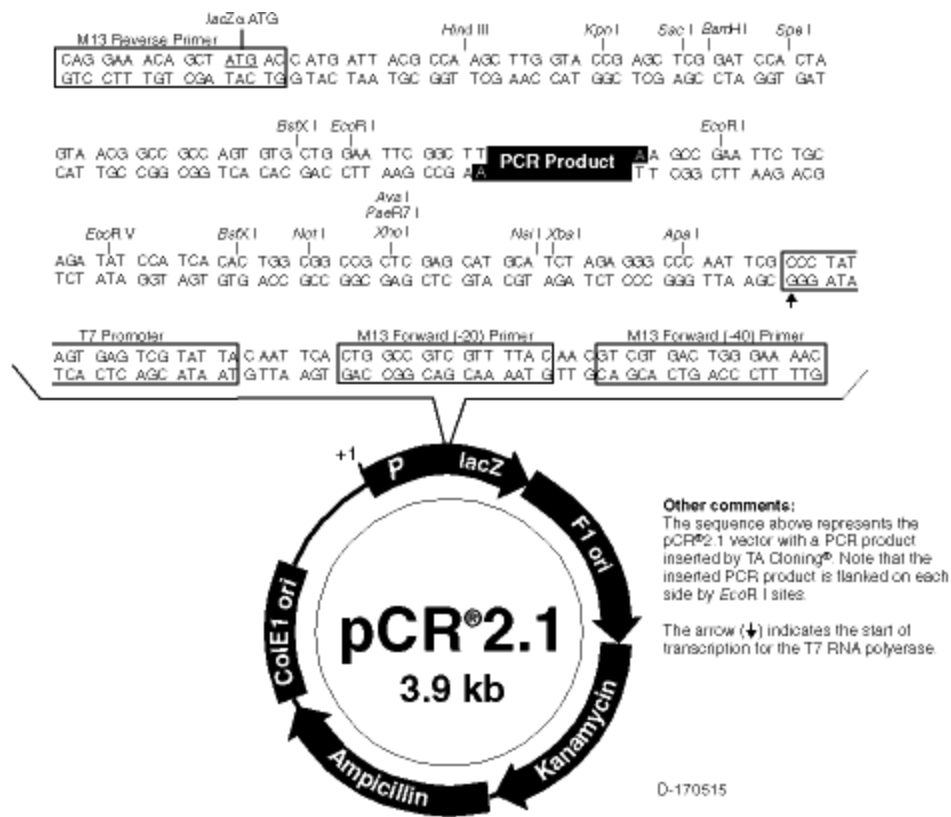
wurde ebenfalls verworfen und nun mit 750  $\mu$ l PE-Puffer gewaschen, wobei nach Zugabe des Puffers die Säule für zwei bis fünf Minuten stehengelassen und dann eine Minute zentrifugiert wurde. Das Filtrat war zu verwerfen und nochmals war die Säule für eine Minute zu zentrifugieren, um Reste von Pufferlösungen zu entfernen. Die Elution der DNA aus der Silica-Gel-Membran erfolgte mit 50  $\mu$ l sterilem Wasser. Aufgrund der niedrigen Salzkonzentration des Wassers löste sich die DNA vom Säulenmaterial. Um die Effektivität der Elution zu steigern, wurde die Säule vor der Zentrifugation für eine Minute inkubiert. Im letzten Zentrifugationsschritt enthielt das Filtrat die gereinigte DNA, die in einem neuen 2,5 ml Gefäß aufgefangen wurde. Zur Kontrolle wurden 2  $\mu$ l des Filtrats auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch überprüft.

### **3.8.2. Klonierung, Transformation und Kultivierung**

Die Klonierung wurde zur Erzeugung identischer Kopien (Klone) eines parentalen DNA-Abschnittes durchgeführt. Für die Klonierung mit dem TA Cloning Kit wird am 3'-Ende der doppelsträngigen cDNA ein Adenosin-Überhang benötigt, der nicht komplementär gepaart ist, also einzelsträngig übersteht, und die Anlagerung an die Thymidinreste des Plasmids ermöglicht. Um die geextrahierte cDNA in diese Form zu modifizieren, wurde eine konventionelle PCR durchgeführt, bei der die letzte Extension bei 72 °C auf 10 Minuten verlängert wurde, da die Taq-DNA-Polymerase aufgrund ihrer templateunabhängigen terminalen Transferaseaktivität an den 3'-Enden Adenosin-Reste anhängt. Für den ersten Schritt der Klonierung, der Ligation des Plasmids mit dem PCR-Produkt, wurde folgender 10  $\mu$ l-Ansatz pipettiert:

- 1  $\mu$ l steriles Wasser
- 1  $\mu$ l 10x Ligationspuffer
- 2  $\mu$ l pCR2.1-Vektor (25 ng /  $\mu$ l)
- 5  $\mu$ l frisches PCR-Produkt
- 1  $\mu$ l T4 DNA-Ligase

Nach vorsichtigem Rühren mit der Pipettenspitze, ist bei 14 °C eine Inkubationszeit von mindestens vier Stunden einzuhalten. Die Ligation der PCR-Produkte erfolgte mit ihren 3'-Desoxyadenosin-Resten an den 5'-Desoxythymidin-Überhängen (TA-Cloning) des linearisierten pCR2.1-Vektors.



Quelle: Durchführungshandbuch von Invitrogen

**Abb. 02: Sequenz des pCR 2.1 Vektors mit dem eingefügten PCR-Produkt**

Die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten kompetenten *E. coli*-Zellen (One Shot™ Zellen) wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit  $2,0\ \mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol ( $0,5\ \text{M}$ ) versetzt, um den Eintritt der Plasmide in die Zellen zu erleichtern. Es wurden  $2\ \mu\text{l}$  der Ligationsreaktionslösung zu den kompetenten Zellen pipettiert. Das Mischen erfolgte nur durch vorsichtiges Rühren, da durch Aufziehen mit der Pipette die fragilen Zellen durch Scherkräfte zerstört worden wären. Während der Ansatz für 30 Minuten auf Eis gekühlt wurde, erfolgte die Transformation der ligierten Plasmide mit dem PCR-Produkt in die kompetenten *E. coli*-Zellen. Eine Hitzeschockbehandlung von 30 Sekunden bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  beendete die Transformation. Sofort im Anschluss wurden die Ansätze für mindestens zwei Minuten auf Eis gekühlt.  $250\ \mu\text{l}$   $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmes SOC-Medium wurden dem Ansatz zugegeben und es erfolgte eine weitere Inkubation unter leichter Bewegung bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für eine Stunde. Die Inkubation im SOC-Medium diente den plasmidtragenden Zellen dazu, ihre plasmidkodierte und somit erworbene Ampicillin-Resistenz zu exprimieren. Je  $100\ \mu\text{l}$  beziehungsweise  $200\ \mu\text{l}$  Flüssigkultur wurden auf Selektivplatten ausgestrichen, die Ampicillin und x-Gal enthielten, so dass ein Überwachsen der Platten (zu großes Volumen)

beziehungsweise nicht genügend heranwachsende Kolonien (zu geringes Volumen) verhindert wurde. Die Inkubation der Platten erfolgte für mindestens 18 Stunden bei 37 °C. Nach der Inkubation zeigte sich meist ein Bild mit heterogenen Kolonien, welche in der Größe zwischen 1 bis 5 mm differierten und weiß, hellblau oder tiefblau gefärbt waren. Durch das Ampicillin war es lediglich plasmidhaltigen Zellen möglich zu wachsen. X-Gal ermöglichte die Differenzierung zwischen weißen Zellen, welche das Plasmid inklusive Insert trugen und plasmidtragenden blauen Zellen, welche kein Insert aufwiesen. Der Einbau des Inserts führte zu einer Verschiebung im Leseraster, so dass es nicht mehr zur Spaltung von x-Gal kam und kein blauer Farbstoff mehr entstehen konnte. Mit einer Impföse wurde nacheinander von etwa vier weißen Kolonien Material abgehoben und in Erlenmeyerkolben überführt, die zuvor mit etwa 100 ml LB-Medium mit Ampicillinzusatz (50 µg / ml) aufgefüllt worden waren. Diese Flüssigkulturen wurden mit der Möglichkeit des Gasaustauschs für 16 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze in Röhren umgefüllt und die Bakterien durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 6.000 g (4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, und aus dem Bakteriensediment konnte nun die Plasmidextraktion erfolgen.

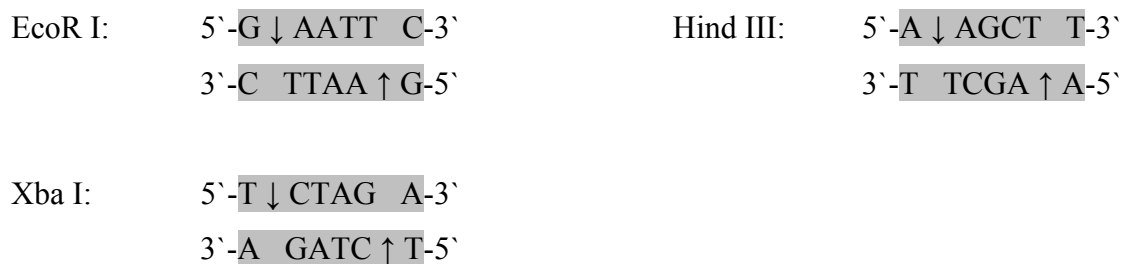
### **3.8.3. Plasmidextraktion**

Für die Plasmidextraktion wurde das Zellsediment in 4 ml P1-Puffer, dem zuvor RNase A zugefügt worden war, resuspendiert. Es wurden 4 ml P2-Puffer (200 nMol NaOH, 1 % SDS) hinzugefügt, vermischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der alkalische Puffer bewirkte die Lyse der Zellen und denaturierte die zellulären Proteine, chromosomale DNA und die Plasmid-DNA. Nach Zugabe von 4 ml P3-Puffer wurde das Röhren sechsmal vorsichtig gedreht, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 30 Minuten bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Dieser kaliumacetathaltige P3-Puffer neutralisierte die Lösung und die Plasmid-DNA renaturierte, wohingegen die chromosomale DNA nach der Renaturierung zellwandgekoppelt blieb. Hierdurch war eine Präzipitation der chromosomalen DNA, der Proteine und der Zelltrümmer möglich, welche durch die Zentrifugation abgetrennt wurden. Der sich ausbildende klare Überstand wurde in eine mit QBT equilibrierte QIAGEN-Säule überführt. Die Plasmid-DNA wurde an die Silika-Gel-Membran der Säule gebunden. Die restliche Lösung wurde abzentrifugiert, und das Eluat verworfen. Die Säulen wurden daraufhin zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen und jeweils eine Minute bei 13.000 g zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift und Verwerfen des Eluats wurde erneut zentrifugiert, um sämtliche Reste der Waschlösung zu entfernen. Die Plasmid-DNA wurde mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Die eluierte

DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 12.000 g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 g und 4 °C und Verwerfen des Überstands wurde das Sediment 10 Minuten luftgetrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst.

### 3.8.4. Restriktionsverdauung

Verwendet wurden die Restriktionsendonukleasen EcoR1, Hind III und Xba I.



Diese Restriktionsendonukleasen der Klasse II benötigen lediglich  $Mg^{2+}$  Ionen zur DNA-Hydrolyse und kein NAD oder ATP wie die der Klassen I und III. Die jeweilige Erkennungssequenz besteht aus sechs Basen, welche palindromisch (kreuzgespiegelt) angeordnet sind. Mit jeweils 1 µl der gelösten Plasmid-DNA wurde mit EcoR1 eine Restriktionsverdauung durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 20 µl setzte sich wie folgt zusammen:

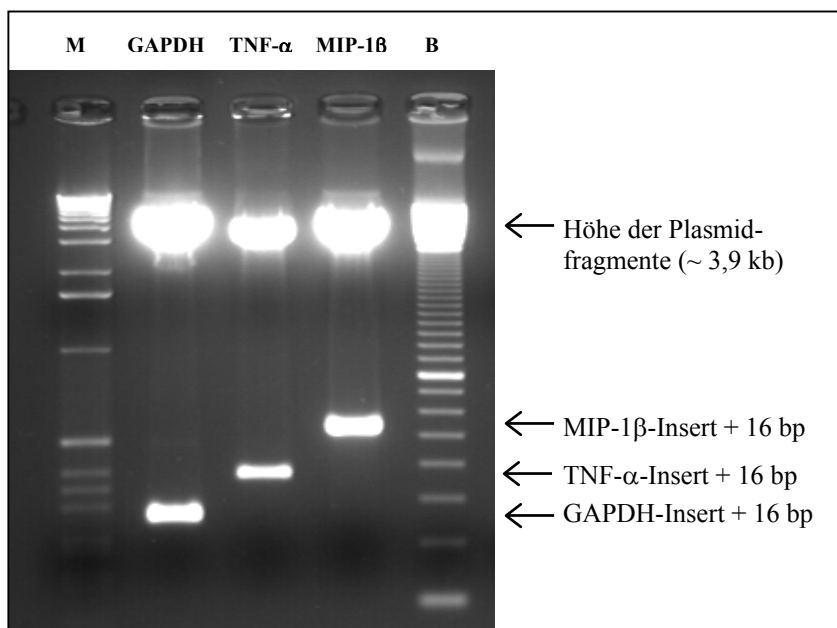
2,0 µl 10x Puffer 3  
 0,2 µl EcoR1 (10 U /µl)  
 16,8 µl Aqua destillata  
 1,0 µl Plasmidlösung

Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei 37 °C.

EcoR1 findet laut Herstellerangaben im Plasmid zwei Schnittstellen vor, die das Insert umrahmen. Daher waren nach der Restriktionsverdauung und anschließender Gelelektrophorese zwei Banden zu erwarten. Das Gelfoto (Abbildung 03) zeigt entsprechend eine Bande für das größere Fragment (~3,9 kb), das dem Vektor entspricht. Die zweite Bande enthält ein Fragment der Größe „Insert“ bp + 16 bp. Die 16 bp ergeben sich durch die Wahl der Schnittstellen zum

Herausschneiden des Inserts, die Teil der MCS (multiple cloning site) des Plasmids sind. Da bei IL-4 das Insert ebenfalls eine Schnittstelle für EcoR1 aufwies, waren hier drei Banden zu erwarten.

Um durch eine externe Kontrolle die Ergebnisse der Klonierung validieren zu lassen, wurden Aliquots der Plasmidaufreinigungen aller Zytokin- und der GAPDH-DNA-Fragmente zur Sequenzierung an Invitek, Berlin, Deutschland, geschickt. Die Ziel- und Konsensussequenzen der Inserts der Plasmide erwiesen sich bei allen Zytokinen und GAPDH als identisch.



**Abb. 03:** Auftrennung der Produkte der Restriktionsverdauung der Klonierungsansätze von GAPDH, TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  durch Gelelektrophorese zwischen einem Molekulargewichtsmarker (M) und einem Basenpaarmarker (B) mit einem 1,5 %-igen Agarosegel

Nach übereinstimmenden Ergebnissen wurden die Plasmidlösungen 1:10 mit Aqua destillata verdünnt und nach photometrischer Konzentrationsbestimmung mit Hind III (mit Ausnahme von CCL3) linearisiert, da nach meiner Erfahrung die PCR-Ergebnisse besser mit linearisierter DNA ausfielen, als mit der Plasmid-Ringstruktur. Die Basenabfolge von CCL3 hatte eine zusätzliche Schnittstelle für Hind III, so dass in diesem Fall mit Xba linearisiert wurde.

Der Reaktionsansatz bestand aus:

- 11  $\mu\text{l}$  10x Puffer 2
- 5  $\mu\text{l}$  Hind III (10 U /  $\mu\text{l}$ )
- 4  $\mu\text{l}$  Aqua destillata
- 90  $\mu\text{l}$  Plasmidlösung (1:10)

Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei 37 °C.

### **3.8.5. Bestimmung der Konzentration des Plasmids im Eluat**

Auf der Basis der in diesem Arbeitsschritt ermittelten Konzentration der Plasmidlösung wurden die Konzentrationen der quantitativen Standards eingestellt.

Von den Plasmidlösungen wurde eine Verdünnung von 1:10 mit Aqua destillata durchgeführt. Im BioPhotometer<sup>®</sup> der Firma Eppendorf erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte. Zur Verwendung kam eine 10 mm x 10 mm sterile Einmalküvette (Üvette<sup>®</sup>, Eppendorf), die sich auf 10 mm x 2 mm verjüngt mit einem Messvolumen von 50 - 100  $\mu\text{l}$ . Es wurden sechs Wiederholungsmessungen mit derselben Küvette und immer neuem Inhalt durchgeführt und gemittelt. Der Nullabgleich erfolgte mit dem Aqua destillata, womit auch die Verdünnung in diesem Schritt vorgenommen wurde. Doppelsträngige DNA zeigt bei 260 nm ihr Absorptionsmaximum und besitzt einen definierten Absorptionsfaktor von 50. Die Ermittlung der Konzentration der eingesetzten Lösung erfolgte automatisch durch das Photometer nach folgender Formel:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{Abs}_{260 \text{ nm}} \times 50 \text{ (Faktor für ds DNA)} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 3.8.6. Berechnung der Kopienzahl pro Mikroliter

Aus der Konzentration wurde die Anzahl von DNA-Molekülen pro ml nach folgender Formel errechnet (Sambrook, 1987):

$50 \mu\text{g} / \text{ml} = 4,74 \times 10^{13}$  Moleküle / ml, wenn die DNA ein kb lang ist.

Daraus folgt:

$$\frac{50 \mu\text{g} / \text{ml}}{4,74 \times 10^{13} \text{ Moleküle}} = \frac{\text{photometrisch gemessener Wert } [\mu\text{g} / \text{ml}]}{\text{in der Lösung vorhandene Anzahl Moleküle}}$$

Wir ermittelten Konzentrationen von  $10^{11} - 10^{13}$  Molekülen / ml.

**Tab. 04: Ermittelte Plasmidkonzentrationen**

Plasmid	dsDNA ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )	Moleküle / ml
GAPDH	102,6	$2,34 \times 10^{13}$
IL-2	54,3	$6,51 \times 10^{12}$
IL-4	21,5	$4,98 \times 10^{12}$
IL-6	3,9	$8,99 \times 10^{11}$
IL-10	4,1	$3,14 \times 10^{13}$
IL-16	4,1	$2,68 \times 10^{13}$
IFN- $\gamma$	4,1	$1,34 \times 10^{13}$
TNF- $\alpha$	102,6	$2,34 \times 10^{13}$
CCL3	44,7	$8,46 \times 10^{12}$
CCL5	4,1	$6,81 \times 10^{11}$

### 3.8.7. Erstellung der Verdünnungsreihen mit definierter Kopienzahl

Zur Herstellung der Standard-Verdünnungsreihen wurde die Anzahl der DNA-Moleküle pro ml kalkuliert (Tabelle 04). Anhand dieser Daten wurden Verdünnungsreihen von  $1 \times 10^{10}$  (V1) bis  $1 \times 10^4$  (V7) Kopien pro ml hergestellt, so dass theoretisch in der V7-Verdünnung in einem in der PCR eingesetzten Mikroliter eine Kopie vorhanden war. Den Standards wurde synthetisches



Poly-A zugesetzt, um ihnen eine definierte Konzentration an begleitender DNA beizumischen. Dadurch wurde die Effizienz der PCR der Standards der Effizienz der PCR der Proben angepasst, die ebenfalls unspezifischen Hintergrund neben der Zielsequenz enthielten. 10 µl Poly-A (100 ng / µl) wurden mit 30 µl Tris-Puffer (pH 7,3; 10 mM) gemischt und die Verdünnungsreihe in 5:50 Schritten pipettiert. Die Lagerung der Verdünnungsreihen erfolgte bei -20 °C.

### **3.9. Echtzeit-PCR mit dem LightCycler**

Die Echtzeit-PCR bietet gegenüber der herkömmlichen PCR drei große Vorteile: Erstens eine erhebliche Zeitersparnis durch schnelle Temperatureinstellung. Zweitens ist die spezifische Amplifikation einer Zielsequenz am Monitor verfolgbar (Echtzeit), wodurch die spätere Gelelektrophorese überflüssig wird. Drittens minimiert dieser Verzicht auf den Gelelektrophoreseschritt die Kontaminationsgefahr mit Ziel-DNA an den Arbeitsplätzen.

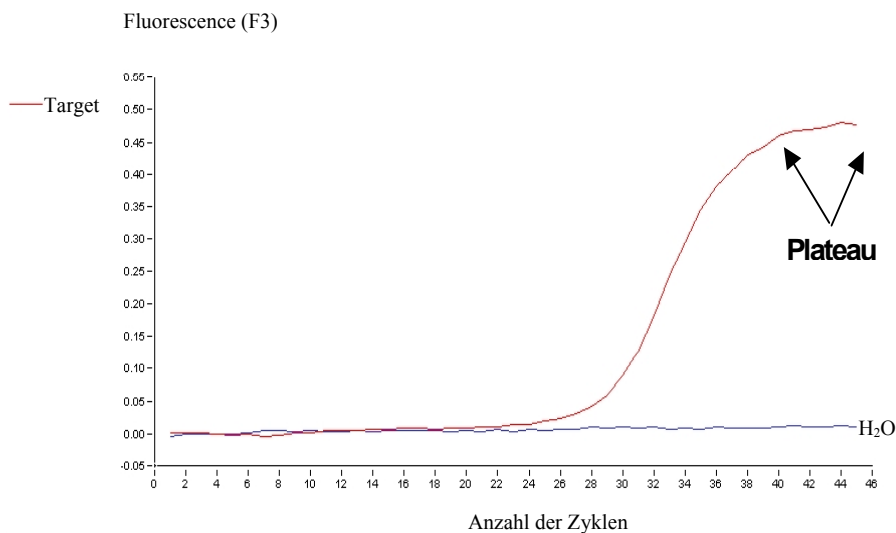
Geräte wie der LightCycler mit der entsprechenden Software bieten darüber hinaus den wesentlichen Vorteil, dass die amplifizierten Produkte auch schnell quantifiziert werden können und zwar exakter als mit der herkömmlichen kompetitiven PCR. Damit ist die Etablierung einer arbeitsintensiven kompetitiven PCR zur Quantifizierung nicht mehr notwendig.

Versuche dieser Arbeit wurden mit einem LightCycler der Firma Roche durchgeführt.

#### **3.9.1. Der LightCycler**

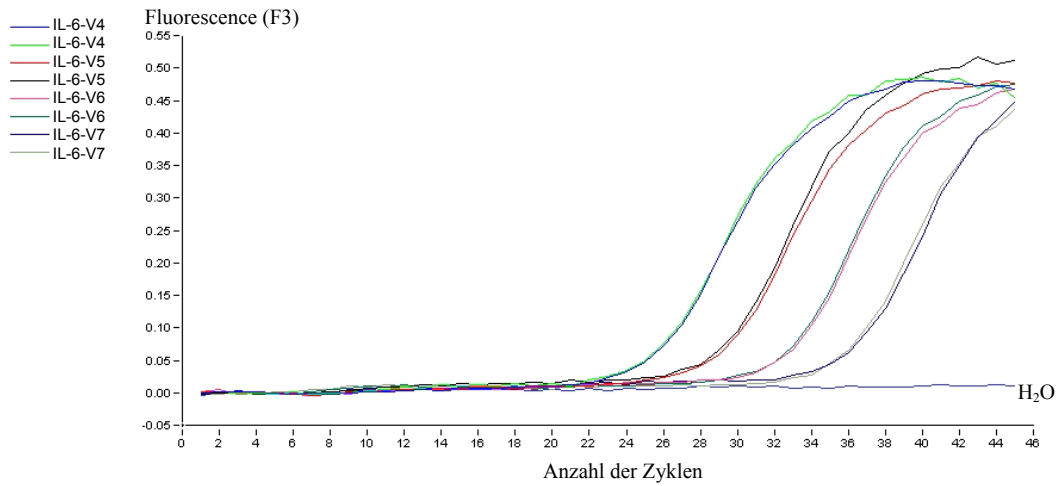
Der LightCycler besteht aus einem schnellen Thermocycler und einem Fluorimeter, das die Fluoreszenz in den maximal 32 Glaskapillaren während der Amplifizierung misst (Wittwer et al., 1997b). Die Temperaturregulierung des LightCycler ist durch einen besonderen Heiz- und Kühlmechanismus sehr rasch. Durch die Zirkulation heißer Luft bzw. kalter Luft werden maximale Heiz- bzw. Kühlgeschwindigkeiten von 20 °C pro Sekunde erreicht. Als Reaktionsgefäße werden Glaskapillaren mit einem Reaktionsvolumen von 5 - 30 µl verwendet. Die längliche Form der Kapillaren bedingt ein günstiges Volumen-/Oberflächenverhältnis, und die Verwendung von Glas gewährleistet einen schnellen Temperaturübergang. Die Kapillaren werden in einem herausnehmbaren Rotor mit 32 Aufnahmebohrungen (Probenkarussell) positioniert. Wie bei einem Karussell werden die Proben dann zu der Anregungs- bzw. Detektionsvorrichtung gefahren. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgt durch eine Blaulicht emittierende Diode. Die Detektion erfolgt durch eine Silikonphotodiode. Die beschriebene

rasche Temperaturregulierung ermöglicht eine Zeitersparnis, so dass eine PCR, die bei konventioneller Temperaturregulierung etwa drei Stunden benötigt, in circa 40 Minuten durchzuführen ist. Weiterhin reduziert die schnelle Temperatureinstellung im PCR-Ansatz die Entstehung von unspezifischen Amplifikaten. Nach etwa 40 PCR-Zyklen sind Primer und die dNTP in der Lösung verbraucht, so dass keine nennenswerte Neusynthese mehr stattfindet und die PCR in eine Plateauphase übergeht (Abbildung 04). Das Eintreten der PCR in das Plateau ist abhängig von der Verfügbarkeit von dNTPs, Primern, der Anzahl der Anfangskopien, der Hemmung durch Nebenprodukte und der Produktkonzentration (Erich, 1989).



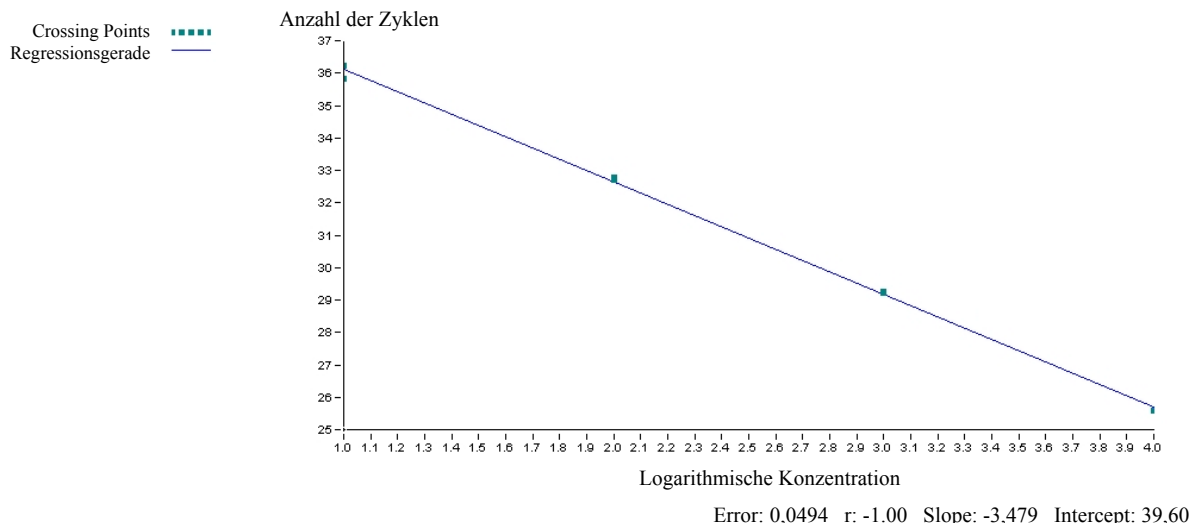
**Abb. 04:** Idealverlauf einer PCR-Amplifikationskurve und einer Negativ-Kontrolle

Das Maximum der zweiten Ableitung der Amplifikationskurve wird in der LightCycler-Software als Crossingpoint bezeichnet und entspricht dem Wendepunkt der ersten Ableitung. Zur Quantifizierung wurden zusammen mit den zu analysierenden Proben sequenziell verdünnte Standards mit definierten Mengen an DNA der Zielsequenz in der PCR amplifiziert. Werden Standard- und Ziel-DNA mit der gleichen Effizienz amplifiziert, kann mit Hilfe der Crossing Points der Standards eine Eichgerade generiert werden, anhand welcher die unbekanntes DNA-Konzentrationen berechnet werden können (Abbildung 05).

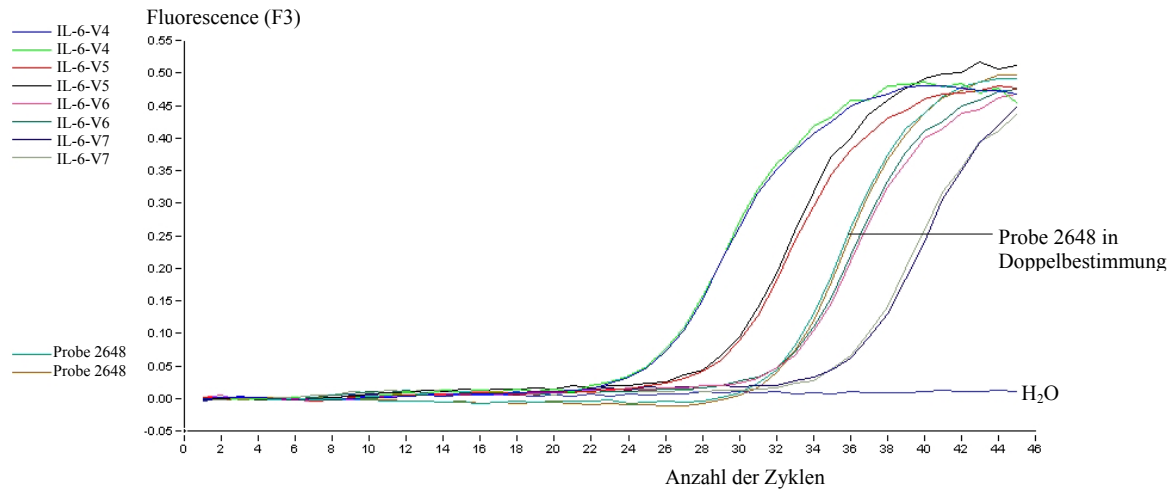


**Abb. 05:** PCR-Amplifikationskurve von vier Standardverdünnungen in Doppelbestimmung und einer Negativ-Kontrolle (H<sub>2</sub>O)

Durch die Auftragung der Crossing Points (Ordinate) der verschiedenen Verdünungsstufen des Standards gegen den dekadischen Logarithmus der bekannten Kopienzahl (Abszisse) wurde durch die Software der LightCycler Version 3.6 eine Standardkurve generiert (Abbildung 06).



**Abb.06:** Durch den LightCycler generierte Standardkurve



**Abb. 07:** LightCycler-Lauf mit Standards und einer Probe in Doppelbestimmung

Die Konzentrationen der Proben wurden, wie in Abbildung 07 beispielhaft für die Probe 2648 gezeigt wird, während des PCR-Laufs automatisch von der Light Cycler-Software durch die Werte der mitlaufenden Standards berechnet, entsprechend der Formel (Bustin et al., 1999):

$$C = Ct - k / m$$

wobei  $Ct$  der Crossing Point der jeweiligen Probe,  $k$  der Ordinatenschnittpunkt und  $m$  die Steigung der Standardkurve ist.

Alle Bestimmungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Für die Berechnungen der Kopienzahl in den Proben wurde immer der Mittelwert der Doppelbestimmung verwendet. Tabellarisch wurden die Ergebnisse der Crossing Points und anfänglichen Kopienanzahl jeder einzelnen Probe vom Gerät angezeigt. Die Standardabweichung der Ausgangsfluoreszenz wurde automatisch berechnet.

### 3.9.2. SYBR Green

SYBR Green fluoresziert, wenn es an doppelsträngige Nukleinsäuren bindet (Morrison et al., 1998; Ririe et al., 1997). Es wurde von uns zur Überwachung des Amplifizierungsprozesses der Nukleinsäuren in der Echtzeit-PCR im LightCycler eingesetzt. Die Fluoreszenz wurde zum Abschluss des Extensionsschrittes gemessen (Wittwer et al., 1997a).

**Tab. 05: Pipettierschema der Echtzeit-PCR-Ansätze mit SYBR Green**

	GAPDH-PCR	Zytokin-PCR
SYBR Green-Mix*	2,0 µl	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6 µl	1,6 µl
sense/antisense Primer-Mix ( je 5mM)	2,0 µl	2,0 µl
steriles Wasser	13,4 µl	12,4 µl
Aliquot je Kapillare	19,0 µl	18,0 µl

\*entspricht LC-DNA Master SYBR Green I -Mix

Das Endvolumen (EV) der GAPDH-, beziehungsweise Zytokin-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

GAPDH: 19 µl Reaktionsmix +1 µl Probe oder +1 µl Wasserkontrolle → 20 µl EV

Zytokine: 18 µl Reaktionsmix +2 µl Probe oder +2 µl Wasserkontrolle → 20 µl EV

Bedingungen für die Echtzeit-PCR am LightCycler mit dem LC-DNA Master SYBR Green-Kit:

2 min 95 °C (initiale Denaturierung)

45 Zyklen: 10 sec 95 °C (Denaturierung)

1 sec X °C (Hybridisierung) (X siehe Tabelle 06)

1 sec 72 °C (Elongation)

5 min 72 °C (finale Extension)

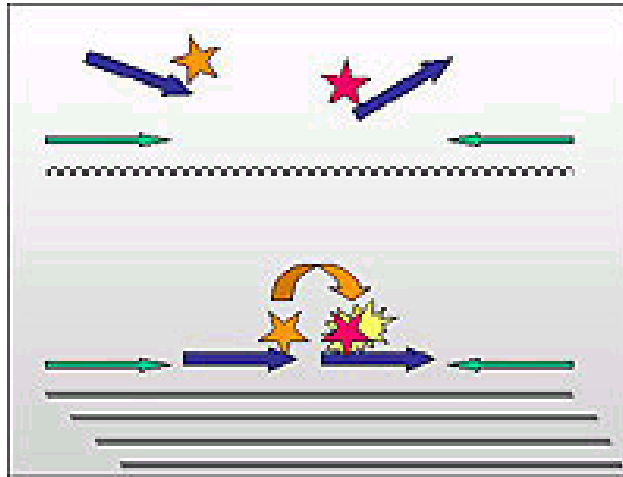
Schmelzkurvenanalyse

**Tab. 06: Hybridisierungstemperaturen der Echtzeit-PCRs**

PCR	Hybridisierungstemperatur [°C]
GAPDH	58
IL-2	58
IL-4	58
IL-6	58
IL-10	60
IL-16	58
IFN-γ	62
TNF-α	62
CCL3	58
CCL5	58

### 3.9.3. Spezifische Hybridisierungssonden

Die 5'-Hybridisierungssonden waren mit Fluorescein an ihrem 3'-Ende, die 3'-Hybridisierungssonden der Zytokin-PCRs mit LC Red640 bzw. für die GAPDH-PCR mit LC Red705 an ihrem 5'-Ende markiert. Fluorescein wird von blauem Licht (470 nm) aus der Diode des LightCyclers angeregt und emittiert daraufhin grünes Licht einer anderen Wellenlänge (Abbildung 08).



**Abb. 08:** DNA-Anlagerung und Energietransfer der Hybridisierungssonden

Wenn sich die beiden Oligonukleotidsonden in enger Nachbarschaft befinden, was nach Kohybridisierung der beiden Proben an die Zielsequenz der Fall ist, regt die vom Fluorescein emittierte Energie das LC Red640 bzw. LC Red705 an, welches daraufhin rotes fluoreszierendes Licht (640 nm bzw. 705 nm) aussendet. Dieses Phänomen des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer kurz FRET genannt (Cardullo et al., 1988), tritt nur auf, wenn sich beide Farbstoffmoleküle in enger Nachbarschaft befinden. Idealerweise liegen nur ein bis fünf Basen zwischen beiden Sonden. Die Fluoreszenz wird während des Primer-Annealing Schrittes gemessen und gegen die Zyklusnummer aufgetragen (Kreuzer et al., 1999). Um eine Extension der Sonden zu verhindern, befinden sich Phosphatgruppen an ihren 3'-Enden. Bei der Elongation werden die Sonden von der Polymerase aus der Bindung mit dem DNA-Einzelstrang verdrängt. Im Gegensatz zu den Primern verbrauchen sich daher die Sonden nicht. Die Auswahl der Sondensequenzen (Tabelle 02, Seite 15-16) und die Herstellung der Sonden erfolgte durch die von Roche hierfür lizenzierte Firma Tibmolbiol. Die anfänglichen Versuche mit spezifischen Hybridisierungssonden wurden mit dem LC-DNA Master Hybridization Probes-Kit

durchgeführt. Aufgrund besserer Ergebnisse mit dem LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes-Kit, wurden alle PCRs auf diesen Kit umgestellt.

**Tab. 07: Pipettierschema der Echtzeit-PCR-Ansätze mit spezifischen Sonden**

	GAPDH	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-16	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	CCL3	CCL5
Kit-Mix	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,8	2,4	0,8	2,4	2,4	0,8	2,4	0,8	0,8	0,8
Primermix (je 5 mM)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Sonde A <sup>#</sup> (10 mM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sonde B <sup>§</sup> (10 mM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
steriles Wasser	12,2	9,6	11,2	9,6	9,6	11,2	9,6	11,2	11,2	11,2
Aliquot je Kapillare	19	18	18	18	18	18	18	18	18	18

Alle Angaben in  $\mu$ l; # die jeweils der PCR entsprechende 3'Sonde mit LC Red705 für GAPDH bzw. LC Red640 für das entsprechende Zytokin; § die jeweils der PCR entsprechende 5'Sonde mit Fluorescein.

Das Endvolumen der GAPDH- beziehungsweise Zytokin-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

GAPDH: 19  $\mu$ l Reaktionsmix +1  $\mu$ l Probe oder  
+1  $\mu$ l Standard oder  
+1  $\mu$ l Wasserkontrolle → 20  $\mu$ l Endvolumen

Zytokine: 18  $\mu$ l Reaktionsmix +2  $\mu$ l Probe oder  
+2  $\mu$ l Standard oder  
+2  $\mu$ l Wasserkontrolle → 20  $\mu$ l Endvolumen.

Bedingungen für die Echtzeit-PCR am LightCycler mit dem Kit LC-DNA Master Hybridization Probes:

2 min 95 °C (initiale Denaturierung)  
 45 Zyklen: 10 sec 95 °C (Denaturierung)  
           15 sec X °C (Hybridisierung) (X siehe Tabelle 06)  
           20 sec 72 °C (Elongation)  
 1 min 72 °C (finale Extension)

Bedingungen für die Echtzeit-PCR am LightCycler mit dem Kit LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes:

10 min 95°C (initiale Denaturierung und Aktivierung der vorher inaktiven Taq-Polymerase)  
 45 Zyklen: 1 sec 95 °C (Denaturierung)  
           12 sec X °C (Hybridisierung) (X siehe Tabelle 06)  
           10 sec 72 °C (Elongation)  
 1 min 72 °C (finale Extension)

Nach Aliquotieren der Reaktionsansätze in die Probentrichter der LightCycler-Kapillaren wurden die Proben-cDNA, die Standard-DNA und die Negativkontrolle (steriles Wasser) hinzupipettiert. Anschließend wurden die Kapillaren mit Stopfen verschlossen und in Zentrifugationsadaptoren stehend etwa 15 Sekunden bei maximal 1.200 g zentrifugiert. Die Metalladaptoren dienen zusätzlich während der Pipettierung als kühlende Halterung, da der Block mit den Adaptoren zuvor im Kühlschrank auf 4 °C gekühlt wurde.

### **3.10. Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung der Daten, von denen eine Normalverteilung nicht vorausgesetzt werden konnte, wurden verteilungsfreie oder nichtparametrische Testverfahren eingesetzt. Bei der vergleichenden Analyse der HIV-Daten mit den Daten der Kontrollpersonen wurde der U-Test nach Mann-Whitney, bei der Auswertung der HIV-Daten im zeitlichen Verlauf unter HAART wurde der Wilcoxon-Test angewendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0,05 angesehen.