

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Die untersuchten Gewebeproben stammen von Hunden, bei denen in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin eine Umfangsvermehrung im Bereich der Milchdrüse (Mamma) diagnostiziert wurde. Die Entnahme der betroffenen Mammaleisten erfolgte chirurgisch in toto oder partiell. Aus den entnommenen Mammaleisten wurden intra operationem sowohl makroskopisch neoplastisch veränderte als auch makroskopisch neoplastisch unveränderte Teilproben gewonnen. Jeweils eine Hälfte der Teilproben wurde anschließend in RNA-Later konserviert, die andere Hälfte formalinfixiert (4%ig). Anschließend erfolgten die weitere histologische Untersuchung und die Klassifizierung der Tumoren nach WHO-Richtlinien (siehe 3.2.2.1 und Abbildung 17). Bei den erkrankten Tieren handelte es sich ausschließlich um Hündinnen mit unterschiedlicher klinischer Historie, die tabellarisch im Anhang (siehe 8.1.1) dargestellt ist. Es wurden 25 Mammakarzinome und korrespondierendes neoplastisch unverändertes Mammagewebe von 23 Hündinnen entnommen. Bei zwei Hündinnen mit multiplen Tumoren wurden Teilproben von jeweils zwei Einzeltumoren mit unterschiedlicher Histologie sowie korrespondierendes neoplastisch unverändertes Mammagewebe in die weiteren Untersuchungen einbezogen (siehe 8.1.1, z.B. 17A und 17B).

3.2 Histologische Untersuchung

3.2.1 Probenaufbereitung

Nach der Entnahme (siehe 3.1) werden die Gewebeproben in 4%igem Formalin fixiert, um die unmittelbar einsetzende Auto- bzw. Heterolyse zu stoppen. Für die Paraffinhistologie müssen die fixierten Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie in Xylol entwässert und entfettet werden (siehe Tabelle 9), erst dann lässt sich das Gewebe in Paraffin einbetten. Mit einem Schlittenmikrotom (Jung,

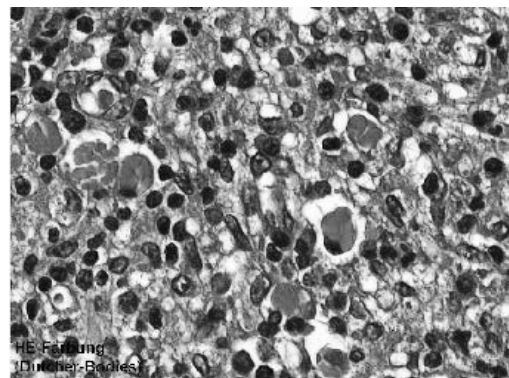


Abbildung 16 Beispiel einer HE-Färbung

Heidelberg) werden 5–7 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese werden auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und über Nacht im Brutschrank bei 60°C nachgetrocknet. Die getrockneten Präparate werden in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert (siehe Tabelle 8) und in Aqua bidest. überführt. Zur routinemäßigen lichtmikroskopischen Untersuchung färbt man die Proben mit Hämatoxilin-Eosin (HE) nach Hansen (siehe Tabelle 10) (Romeis, 1989). Bei dieser Färbung lagert sich der Kernfarbstoff (Aluminium- oder Eisenhämatoxylin) an negativ geladene Phosphatgruppen von Nukleinsäuren an, das negativ geladene Eosin an positive Gruppen von Proteinen. So lassen sich die Zellkerne blau, das Zytoplasma, Kollagen und proteinhaltige Lösungen rot darstellen.

3.2.2 Histologische Beurteilung

Anhand der so hergestellten Präparate (siehe 3.2.1) erfolgen die histologische Beurteilung der Tumorproben sowie der putativ neoplastisch unveränderten Mammagewebeproben und die Klassifikation der Tumoren in Anlehnung an die Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation (WHO)) (siehe 3.2.2.1).

3.2.2.1 Ausschnitt aus den WHO-Richtlinien zur Klassifizierung von Mammatumoren



Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat



CANINE

1 Malignant Tumors

- 1.1 Noninfiltrating (in situ) carcinoma
- 1.2 Complex carcinoma
- 1.3 Simple carcinoma
 - 1.3.1 Tubulopapillary carcinoma
 - 1.3.2 Solid carcinoma
 - 1.3.3 Anaplastic carcinoma
- 1.4 Special types of carcinomas
 - 1.4.1 Spindle cell carcinoma
 - 1.4.2 Squamous cell carcinoma
 - 1.4.3 Mucinous carcinoma
 - 1.4.4 Lipid-rich carcinoma
- 1.5 Sarcoma
 - 1.5.1 Fibrosarcoma
 - 1.5.2 Osteosarcoma
 - 1.5.3 Other sarcomas
- 1.6 Carcinosarcoma
- 1.7 Carcinoma or sarcoma in benign tumor

Abbildung 17 Auszug aus den Richtlinien zur histologischen Klassifizierung von Mammatumoren des Hundes

Aus dem gesamten Probenpool wurden anhand der histologischen Beurteilung und Klassifizierung der Einzelproben ausschließlich maligne Tumoren vom nicht infiltrierenden Typ (in situ Karzinome), vom komplexen und vom einfachen Typ ausgewählt (siehe Abbildung 17). Diese wurden anschließend mit dem jeweils korrespondierenden neoplastisch unveränderten Gewebe durch molekularbiologische Verfahren auf Proteinebene (siehe 3.3) und auf Transkriptionsebene (siehe 3.5 und 3.9) untersucht.

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Prinzip

Die Immunhistochemie stellt eine Methode dar, mit der Proteine mithilfe von Antikörpern in histologischen Schnittpräparaten sichtbar gemacht werden können. Auf diese Weise lässt sich darstellen, in welchem Kompartiment der Zelle das Protein lokalisiert ist. Für Antikörperfärbungen werden die paraffineingebetteten Proben in 5–10 µm dicken Schnitten verwendet. Zur Antikörperfärbung wird ein spezifisch gegen das zu untersuchende Protein (Antigen) gerichteter Primärantikörper benötigt. Dieser wird mit einer Pufferlösung auf das Gewebe gegeben und inkubiert, so dass eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattfinden kann. Anschließend wird durch Waschschriffe in Pufferlösungen nicht gebundener Antikörper entfernt, um unspezifische Signale (Hintergrundsignale) zu vermeiden. Nun wird das Gewebe mit einem zweiten Antikörper (Sekundärantikörper), der gegen den konstanten Teil (Fc-Teil) des ersten Antikörpers gerichtet ist, inkubiert. Dadurch wird eine Verstärkung des Signals erreicht, da mehrere Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden können. Gleichzeitig ist der Sekundärantikörper mit einem Signalmolekül gekoppelt. Dieses kann, je nach Färbungsmethode, aus verschiedenen Stoffen bestehen (alkalische Phosphatase, Biotin etc.).

Beim Streptavidin-Biotin-System werden Sekundärantikörper verwendet, die mit Biotin gekoppelt sind, das dann von Streptavidin erkannt wird. Dieses wiederum ist mit einer alkalischen Phosphatase oder Peroxidase verbunden. Hier setzt die alkalische Phosphatase oder die Peroxidase anschließend einen Farbstoff um, welcher das eigentliche Signal darstellt. Dieses System besitzt eine zusätzliche signalverstärkende Wirkung.

3.3.2 Prinzip des Streptavidin-Biotin-Systems

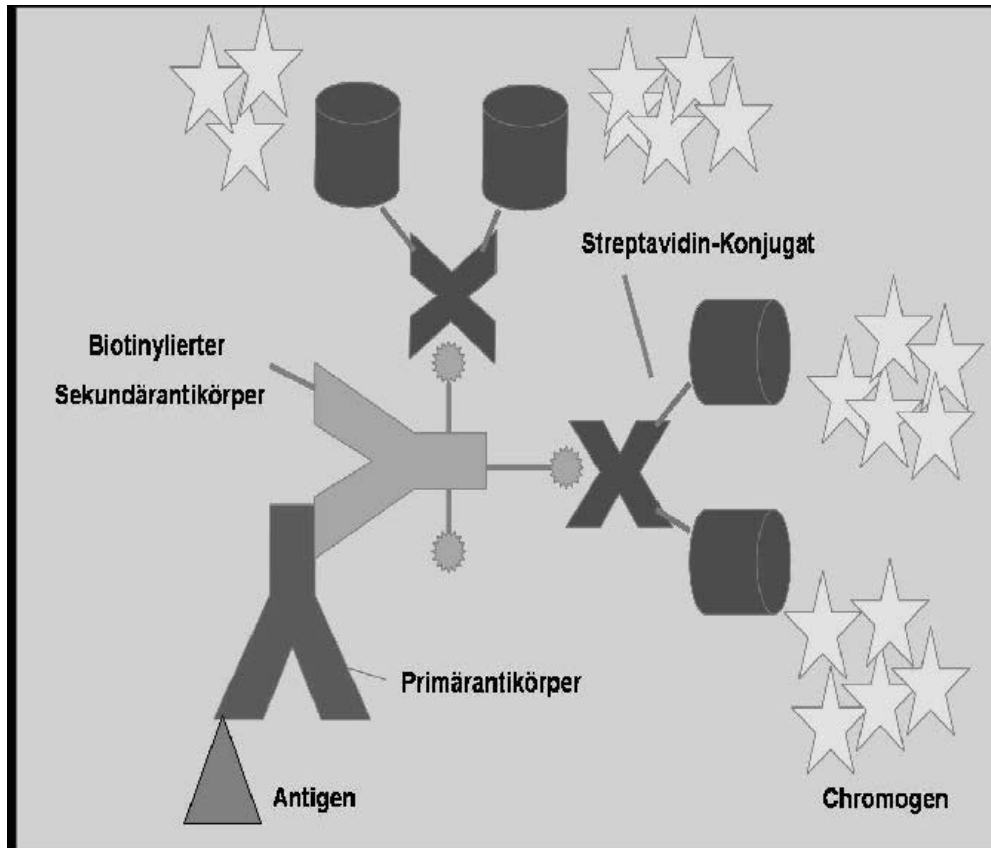


Abbildung 18 Prinzip des Streptavidin-Biotin-Systems. Nach Bindung des Primärantikörpers an sein Antigen und des biotinylierten Sekundärantikörpers erfolgt die Anlagerung des Streptavidin-Konjugats (Streptavidin + alkalische Phosphatase) an das Biotin. Letztlich erfolgt die Umsetzung eines zugegebenen Chromogens durch die alkalische Phosphatase, woraus die Farbreaktion resultiert.

3.3.3 Durchführung der Immunhistochemie

Zur Bestimmung der Lokalisation und der Menge von caninem p21 und p27 in den Tumorproben im Vergleich zu neoplastisch unverändertem Mammarydrüsenparenchym wurden die gewonnenen Proben immunhistochemisch untersucht. Zur Analyse wurde in dieser Arbeit die Methode der indirekten Immunhistochemie mittels des Detektionssystems „Super sensitive immunodetection system“ (Biogenex) (siehe 8.3.2) gewählt. Hierbei wird nach der Zugabe und Bindung des unkonjugierten spezifischen Primärantikörpers (siehe 8.3.1) an sein Antigen ein biotinmarkierter (biotinylierter) Sekundärantikörper (Link-Antikörper) zugegeben. Anschließend wird ein alkalisches Phosphatase-konjugiertes Streptavidin als Markierungsenzym (Label)

zugefügt. Die farbliche Darstellung erfolgt durch die Zugabe der jeweiligen Substrat-Chromogenlösung (Chromogen für p21 3,3'-Diaminobenzidin bzw. Neufuchsin für p27). Diese Farbreaktion lässt sich lichtmikroskopisch darstellen und qualitativ auswerten. Zunächst wurden Mikrotomschnitte der Mammagewebeproben angefertigt, diese auf silanisierte Objektträger aufgebracht und entparaffiniert (siehe Tabelle 11). Für p21 wurden pro Probe zunächst 100 µl 2%iges Bovines Serumalbumin (pH-Wert 7,4) auf die Schnitte aufgetragen und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diesen Schritt wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Für p27 erfolgte eine Antigendemaskierung durch Hitze, wozu die Schnitte in Citratpuffer (siehe Tabelle 11) gegeben und 3 x 5 Minuten in der Mikrowelle (600 Watt) gekocht wurden. Nach 15-minütiger Abkühlung wurden die Schnitte für 5 Minuten in PBS(Phosphate buffered saline)-Puffer (siehe Tabelle 12) gespült, auf Cover-Plates® montiert und in die Färbestation Sequenza™ eingesetzt. Anschließend erfolgte ein weiterer Spülschritt für 3 x 5 Minuten mit PBS-Puffer. Die Schnitte wurden im Kühlschrank über Nacht mit dem jeweiligen primären Antikörper inkubiert. Für p21 wurde der Antikörper in einer 1:50-Verdünnung eingesetzt, bei dem p27-Antikörper handelte es sich um eine Ready-to-use-Lösung (siehe 8.3.1). Für die Negativkontrolle wurden statt des primären Antikörpers 100 µl PBS-Puffer eingesetzt. Die Schnitte wurden 3 x 5 Minuten mit PBS-Puffer gespült, und es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Link) für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Nach einem weiteren PBS-Puffer-Spülschritt über 3 x 5 Minuten wurden die Proben mit dem Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex (Label) versetzt, 20 Minuten (RT) inkubiert und erneut in PBS-Puffer 3 x 5 Minuten gespült. Die Schnitte wurden dem Sequenza™ entnommen, von den Cover-Plates® demontiert und für 20 Minuten mit der Substrat-Lösung (für p21 siehe Tabelle 14, für p27 siehe Tabelle 15) inkubiert. Es folgte ein weiterer Spülschritt (1 x 5 Minuten) in PBS-Puffer. Anschließend wurden die Schnitte in einem Hämalaun-Bad für 3–6 Minuten gegengefärbt, in Leitungswasser gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 95 %, 100 %) und Xylol für jeweils 2–3 Minuten entwässert. Abschließend wurden die Schnitte in Glyceringelatine eingedeckt. Im Fall von p27 wurde als Spülpuffer TBS (Tris Buffered Saline) (siehe Tabelle 13) anstelle von PBS verwendet. Die immunhistologischen Präparate wurden anschließend mikroskopisch untersucht und beurteilt.

3.4 Isolierung der Gesamt-RNA aus tierischen Zellen

3.4.1 Stabilisierung der Proben-RNA

Zur Vermeidung von spezifischem und nichtspezifischem RNA-Abbau wurden Zell- und Gewebeproben sofort nach der Entnahme stabilisiert. Dazu wird jede Probe (ca. 50 mg) in mindestens dem zehnfachen Volumen RNA-Stabilisationsmedium (RNA-Later, siehe 8.4.1) aufbewahrt. Die RNA der so behandelten Proben ist bei Raumtemperatur einen Tag, bei 2–8°C eine Woche und bei -20°C unbegrenzt haltbar.

3.4.2 Aufarbeitung der stabilisierten Gewebeproben

Aus den stabilisierten Gewebeproben wurde die gesamte RNA nach dem modifizierten Protokoll der RNA-Mini-Präparation der Fa. Macherey-Nagel (siehe Abbildung 19 und 8.4.2.1) präpariert. Hierzu wurde die Gewebeprobe mit einem Skalpell zerkleinert. Die Stabilisationsflüssigkeit wird abpipettiert, und 100 mg der zerkleinerten Gewebeprobe werden in 700 µl Lysispuffer gegeben. Der Lysispuffer lysiert die homogenisierte Probe und inaktiviert durch seinen Guanidin-Isothiozyanat-Anteil RNasen, wodurch der

Protocol at a glance (Rev. 04)
Total RNA Isolation

Mini
NucleoSpin® RNA II










1 Homogenization of sample		30 mg
2 Cell Lysis		350 µl RA1 3.5 µl β-mercaptoethanol Mix
3 Filtration of lysate		1 min 11,000 x g
4 Adjust RNA binding conditions		350 µl 70 % ethanol
5 Bind RNA		30 sec 8,000 x g
6 Desalt silica membrane		350 µl MDB 1 min 11,000 x g
7 Digest DNA		95 µl DNase reaction mixture RT 15 min
8 Wash and Dry silica membrane	  	1 st wash 200 µl RA2 2 nd wash 600 µl RA3 3 rd wash 250 µl RA3 1 st and 2 nd 30 sec 8,000 x g 3 rd 2 min 11,000 x g
9 Elute highly pure RNA		60 µl H ₂ O (RNase free)

Abbildung 19 Prinzip der RNA-Isolierung nach Macherey-Nagel

RNA-Abbau verhindert wird. Nach der Zugabe zweier Metallkugeln wird die Probe 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Homogenisierung der Probe in der Schwingmühle (Fa. Retsch) für 1,5 Minuten bei 20 Hertz. Die Zerkleinerung in der Schwingmühle erfolgt sowohl durch die Schlagwirkung der Kugeln auf das Mahlgut als auch durch die Schüttelbewegung und den räumlichen Bewegungsablauf der Kugeln. Die Becher führen in horizontaler Lage radiale Schwingungen aus, welche die Kugeln wechselseitig auf das Probenmaterial aufschlagen lassen. Die Frequenz ist zwischen 3 und 30 Hertz (entspricht 180–1800 Schwingungen pro Minute) frei wählbar, ebenso die Mahl- und Mischdauer (zwischen 10 Sekunden und 99 Minuten). Nach dem ersten Mahlschritt in der Schwingmühle folgt ein weiterer 15-minütiger Inkubationsschritt auf Eis, wonach die Probe abermals für 1,5 Minuten bei 20 Hertz in der Schwingmühle homogenisiert wird. Anschließend werden die homogenisierten Proben 1 Minute lang bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der wässrige Überstand abpipettiert. Es folgt eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Hierzu wird der Überstand mit 1 Volumen Phenol-Chloroform versetzt und gründlich gemischt. Die Probe wird 10 Minuten bei 4°C und 15.000 rpm zentrifugiert. Es entsteht eine obere wässrige Phase, in der RNA und kleine DNA-Moleküle gelöst vorliegen, eine Interphase, die aus hydrophilen Proteinen und niedermolekularer DNA besteht, sowie eine untere Phenolphase, die hydrophobe Proteine, hochmolekulare DNA und Fette enthält. Von der oberen wässrigen Phase werden 500 µl abpipettiert und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 200 µl Lysispuffer versetzt. Zum weiteren Homogenisieren der Probe wird das Lysat direkt in ein „Nucleospin Filter column“ (Macherey-Nagel) pipettiert und 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das durchgeflossene Lysat wird mit 700 µl Ethanol vermischt. In zwei 700 µl-Schritten wird das Gemisch auf eine Silica-Gel-Membran pipettiert und jeweils 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. In diesem Schritt erfolgt die Bindung der RNA an die Membran. Der Durchfluss wird verworfen. Zur Beseitigung von Kontaminationen führt man aufeinander folgend verschiedene Waschschriffe und eine DNase-Behandlung durch. Für den ersten Waschschriff werden 700 µl MDB-Puffer in die Silica-Gel-Membran pipettiert und anschließend 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Für die DNase-Behandlung werden 10 µl DNase-Stammlösung mit 90 µl DNase-rxn-Puffer gemischt, 95 µl des Gemischs direkt auf die Membran aufgetragen und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für den

zweiten Waschschrift werden weitere 200 µl RA2-Puffer auf die Membran pipettiert und anschließend 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Anschließend werden 600 µl RA3-Waschpuffer auf die Silica-Gel-Membran pipettiert, 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Durchfluss dekantiert. Wiederholt werden 600 µl RA3 Waschpuffer auf die Silica-Gel-Membran pipettiert, 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Durchfluss dekantiert. Abschließend werden 250 µl Waschpuffer auf die Säule pipettiert und 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Um die Membran zu trocknen, erfolgt ein weiterer 3-minütiger Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit. Zum Eluieren der RNA wird die Säule mit 50 µl Wasser beladen, 1 Minute inkubiert und hiernach 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss enthält die gelöste RNA der Gewebeprobe in wässriger Lösung, 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 mit einem Photometer untersucht (siehe 8.4.3). Anhand der Extinktionswerte bei definierten Wellenlängen (230 nm, 260 nm, 280 nm, 320 nm) können die Konzentration und die Reinheit der RNA-Probe näherungsweise kontrolliert werden. Die Konzentration wird aus der Extinktion bei 260 nm berechnet. Ein Reinheitsoptimum der RNA-Präparation liegt vor, wenn maximale Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen werden können. Nach der Konzentrationsbestimmung werden die Proben auf 100 ng / µl verdünnt. Die RNA-Proben werden bei einer Temperatur von -70°C gelagert, um die RNA vor Abbauprozessen zu schützen (Suplie 2005).



Abbildung 20 RNA LabChip®

3.4.4 RNA-Qualitätskontrolle

Durch die miniaturisierte Kapillarelektrophorese (Agilent 2100 bioanalyser) werden wiederholt die Menge an gewonnener RNA und zusätzlich die Integrität jeder RNA-Probe bestimmt (siehe 8.4.4). Bei der Bestimmung der Integrität handelt es sich um ein Verfahren, das die Möglichkeit bietet zu prüfen, ob die vorliegende RNA intakt vorliegt oder bereits teilweise oder vollständig durch Einwirken von RNasen degradiert wurde. Hierzu wird ein Mini-Glaschip verwendet (siehe Abbildung 20), welcher aus einem Netzwerk untereinander verbundener Kanäle besteht. Diese werden mit einer Gelmatrix (mit enthaltenem Fluoreszenzfarbstoff) belegt und maximal 12 der zu untersuchenden RNA-Proben (1 μ l) mit einer Markersubstanz (5 μ l) in die dafür vorgesehenen Probenschächte pipettiert. Der Mini-Glaschip wird in den Bioanalyser überführt. Dort wird eine Spannung angelegt, durch die die Proben vom Probenschacht in die Mikrokanäle und in den Separationskanal wandern. Hier werden sie elektrophoretisch aufgetrennt und fluorometrisch untersucht. Die zugehörige Software erstellt anhand der Fluoreszenzsignale (Fluoreszenzfarbstoff s.o.) ein gelähnliches Bild mit aufgetrennten RNA-Banden als auch ein Elektropherogramm. Anhand eines RNA-Standards (Fa. Ambion) wird computergesteuert nochmals die RNA-Konzentration berechnet. Die genaue Ermittlung der RNA-Konzentration ermöglicht den Einsatz von 100 ng an Gesamt-RNA in die Synthese der cDNA (siehe 3.9.2).

Weiterhin wird die RNA-Qualität bestimmt. Dabei wird das gesamte Elektropherogramm durch eine Software analysiert und bewertet. Das Ergebnis der Bewertung wird als RNA Integrity Number (RIN) dargestellt. Die RNA-Qualität wird hierbei auf einer Skala von 1–10 angegeben (1 = geringe RNA-Integrität, 10 = hohe RNA-Integrität).

3.5 Konventionelle PCR

3.5.1 RT und 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 (Suplie 2005).

3.5.2 Reverse Transkription (qualitativ)

Die als Template dienende Gesamt-RNA wird vor dem Einsatz in die PCR durch die Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (Erststrangsynthese = first-strand-synthesis). Diese fungiert für die anschließende PCR als Template-DNA. Zur reversen Transkription wird ein RT-Probenmix (Tabelle 16) hergestellt und auf der Heizplatte 5 Minuten bei 75°C inkubiert. Danach wird der RT-Mix (Tabelle 17) hinzupipettiert. Nach einer Inkubation der Mischung aus RT-Probenmix und RT-Mix für 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgen weitere Inkubationsschritte auf der Heizplatte für 45 Minuten bei 42°C und anschließend für 5 Minuten bei 95°C. Die erhaltenen cDNA-Proben werden in der Gelelektrophorese (siehe 3.6.1) weiter analysiert. Sie sind bei -20°C stabil.

3.5.3 Recherche und Herstellung synthetischer Oligonukleotide für die konventionelle PCR

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

Da das Primerpaar (Sense und Antisense Primer) einen spezifischen RNA- bzw. DNA-Bereich hybridisieren soll, muss dieser Sequenzbereich bekannt sein. RNA-

und DNA-Sequenzen sowie deren komplementäre Aminosäuresequenzen können über Internetseiten wie NCBI oder Ensembl (siehe 8.5.2) 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 3.6.2), 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), einen mittleren GC-Gehalt ($\text{GC} = 50\%$) sowie nur kurze zusammenhängende Abschnitte eines Nukleotides (Runs) besitzen. Sequenzbereiche, welche diese Kriterien erfüllen, werden EDV-gestützt mit dem Programm Primer3 (siehe 8.8.3.1) ermittelt. Sind adäquate Primer gefunden, werden diese kommerziell synthetisiert (Fa. MWG). Gelieferte Primer werden nach Anweisung der Hersteller in Aqua purificata gelöst ($100 \text{ pmol} / \mu\text{l} = \text{Stammlösung}$). Die Arbeitslösung wird durch Verdünnung auf $20 \text{ pmol} / \mu\text{l}$ hergestellt und so in der PCR eingesetzt (Suplie 2005).

3.6 Durchführung der konventionellen PCR

Nach der Recherche und Herstellung der Primer für die PCR werden die Reaktionsbedingungen optimiert. Die Amplifikation wird in Reaktionsansätzen von $50 \mu\text{l}$ durchgeführt, wobei $2\text{--}10 \mu\text{l}$ cDNA als Matrize dienen. Der Ansatz wird entsprechend Tabelle 12 pipettiert. Anschließend wird die cDNA zugefügt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um ein Verdampfen des Reaktionsansatzes zu verhindern. Der PCR-Ansatz wird im Thermocycler nach dem in Tabelle 19 aufgeführten Protokoll inkubiert.

3.6.1 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Elektrophorese stellt eine Methode zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen dar. Als Vergleich dient ein DNA-Größenstandard (Gemisch aus Oligonukleotiden bekannter Länge).

Als Laufmedium wird ein 1,3%iges Agarosegel in TAE-Puffer verwendet (siehe 8.5.3.1). Nach Lösung der Agarose durch Erhitzung in der Mikrowelle und anschließender Abkühlung auf 60°C wird eine Ethidiumbromidlösung (0,4 µg/ml Endkonzentration) hinzugefügt. Je 10 µl der einzelnen Proben werden in 2 µl Ladepuffer (siehe 8.5.3.1) aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard dienen 5µl DNA-Leiter-Marker (100 bp). Das Gel wird 40–50 Minuten bei 80 V (Spannung) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die DNA-Banden auf einem UV-Transluminator bei 312 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografiert.

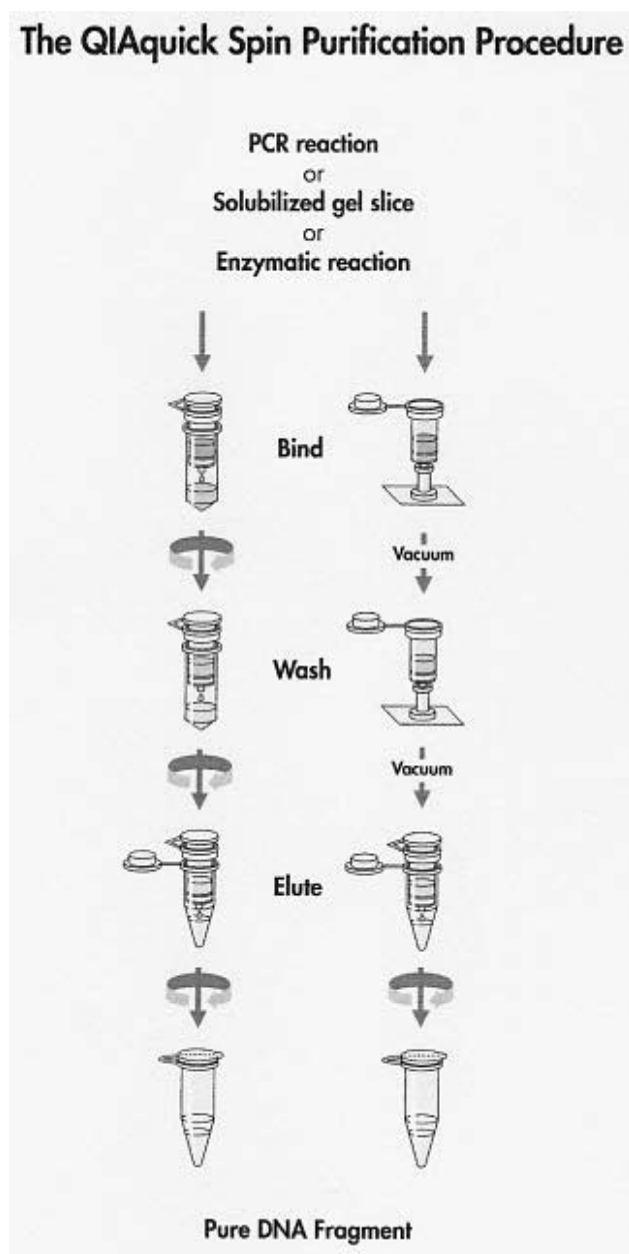


Abbildung 21 Prinzip der Gelextraktion nach Qiagen

3.6.2. Präparative Gelelektrophorese und Extraktion einer DNA-Bande

Die präparative Agarosegelelektrophorese dient der DNA-Isolierung bestimmter Banden. Sie schließt sich einem Restriktionsenzymverdau oder einer PCR-Amplifikation an. Analog zu den unter 3.6.1 genannten Bedingungen wird die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird die gewünschte Bande mit einer Rasierklinge auf dem UV-Transluminator aus dem Gel geschnitten. Es folgt eine DNA-Isolierung. In dieser Arbeit wurde das „QIAquick Gel Extraktion Kits“ verwendet (siehe Abbildung 21 und 8.5.4). Die Isolierung wird den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Durch die Zugabe eines speziellen salzhaltigen Puffers werden Bindungsbedingungen für Nukleinsäuren geschaffen. Durch den Entzug

der Hydrathülle kann die DNA an die Kieselgelmembran gebunden werden. Mit Waschpuffer werden die Salze entfernt und die DNA mit Tris-Puffer eluiert. Anschließend erfolgt die photometrische Konzentrationsbestimmung der gereinigten DNA. Diese kann nun bei -20°C gelagert oder zur weiteren Untersuchung eingesetzt werden.

3.7 Klonierung von Plasmiden

3.7.1 Klonierung von DNA in Plasmiden allgemein

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

Ein PCR-Produkt wird in ein bakterielles Plasmid (Vektor) ligiert (siehe 3.7.2), in kompetente Bakterien transformiert (siehe 3.7.5), und nach Selektion plasmidtragender Bakterien (siehe 3.7.5) werden Kopien des ursprünglichen Fragments auf diese Weise reproduziert (Suplie 2005).

3.7.2 Ligationsprotokoll

Bei der Ligation wird ein PCR-Produkt enzymatisch in einen Vektor (Plasmid) integriert. Als Plasmid wurde in dieser Arbeit der „pGEM-T Easy Vektor“ (siehe 8.6.1) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Vektor, der in linearer Form vorliegt und einen T-Überhang besitzt. Hierdurch ist es möglich PCR-Produkte mit einem einzelsträngigen A-Überhang 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 „pGEM-T Easy Vektor“ 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 3.7.4), 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.

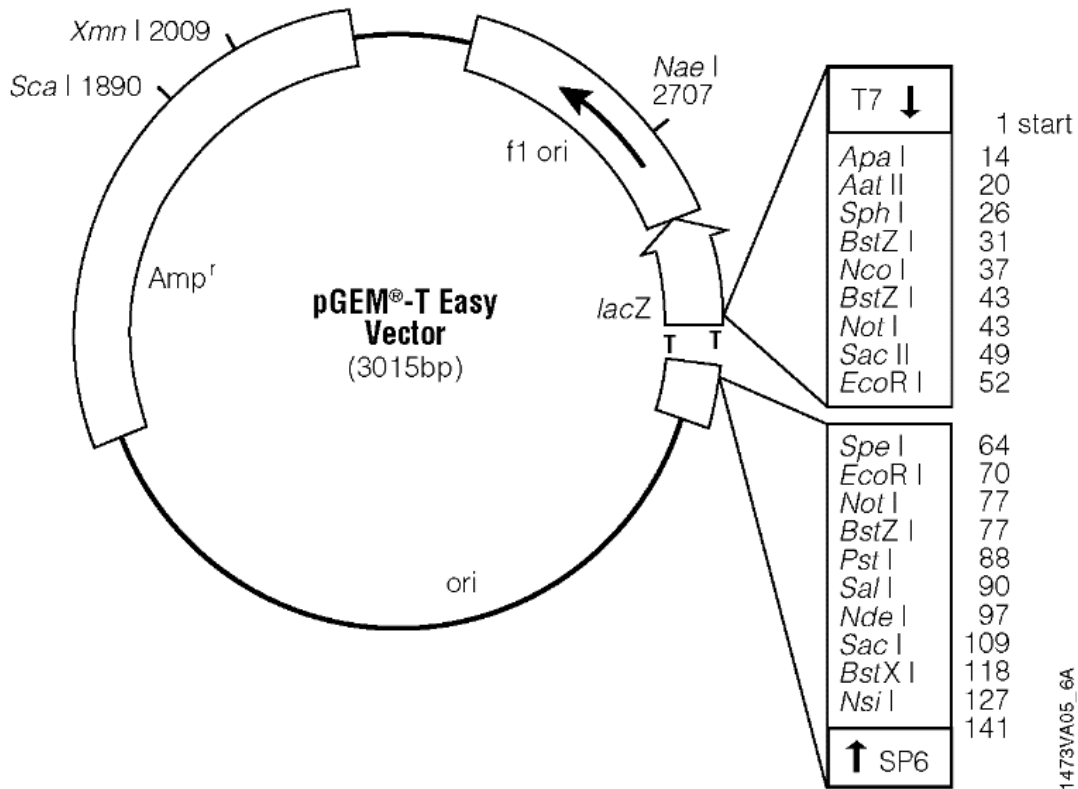


Abbildung 22 Grafische Darstellung des verwendeten Vektors (pGEM-T Easy der Fa. Promega)

Die PCR-Fragmente und Vektoren (1–5 ng/μl) werden nach Gel-Extraktion (siehe 3.6.2) im Verhältnis 3:1 in die Ligation eingesetzt. Weiterhin werden 1 μl 10x Ligase Puffer, 0,5–1 μl T4 DNA Ligase (3 U/μl) und ad 10 μl Aqua bidest. hinzugegeben und die Probe bei 4°C über Nacht inkubiert. Das Endprodukt der Ligation stellt der Vektor mit integriertem PCR-Produkt dar. Dieser Vektor wird im folgenden Transformationsschritt in ein kompetentes Bakterium eingeschleust (siehe 3.7.4).

3.7.3 Präparation kompetenter E. coli

Für die Transformation werden die Vektoren mit integrierter DNA-Sequenz (siehe 3.7.1 und 3.7.2) und kompetente Bakterien benötigt, die diese Vektoren aufnehmen. Zur Amplifizierung der rekombinanten Plasmide wurden in dieser Arbeit kompetente Bakterien des E.-coli-Stamms Top 10, LMG 194 und Top 10FÇ verwendet. Zur Herstellung der kompetenten Bakterien werden folgende Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Eine Kolonie des genannten E.-coli-Stammes wird in 5 ml LB(Luria-Bertani)-Medium (siehe 8.6.2.2.1 und Tabelle 20) gegeben und für 14–16 h bei 37°C geschüttelt. Danach erfolgt die Zugabe von 1 ml der Kultur in 50 ml LB-Medium. Diese Zellsuspension wird bei 37°C geschüttelt, bis die optische

Dichte bei 600 nm einen Wert von 0,5 erreicht, und dann in ein gekühltes 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend folgt ein Inkubationsschritt auf Eis. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 3500 U/min und 4°C wird der Überstand vorsichtig entfernt, das Pellet in 10 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 5 Minuten auf Eis gestellt. Es schließt sich ein weiterer Zentrifugationsschritt über 10 Minuten bei 3500 U/min und 4°C an. Hiernach wird der Überstand entfernt, das Pellet in 2 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung gelöst und zu je 200 µl in 10 Eppendorfröhrchen verteilt. Die Zellen werden umgehend in der Transformation verwendet.

3.7.4 Transformation








Beim Transformationsschritt werden die Plasmide (siehe 3.7.2) in kompetente Bakterien (siehe 3.7.3) eingeschleust. Hierzu werden Bakterienkulturplatten hergestellt. 200 ml LB-Agar (8.6.3) wird aufgekocht, im Wasserbad auf 50°C temperiert und mit Ampicillin, X-gal und IPTG (siehe 8.6.3.1.1 und Tabelle 21) versetzt. Unter sterilen Bedingungen werden die Kulturschalen mit jeweils etwa 15 ml des LB-Agars befüllt. Nach Erstarren und vollständigem Auskühlen werden die Platten mit Parafilm verschlossen und können bei 4°C aufbewahrt werden.

200 µl der kompetenten Zellen werden mit maximal 10 µl der Ligationsprobe versetzt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Mischung 45–50 Sekunden lang auf 42°C erwärmt und erneut 1–2 Minuten auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 950 µl NZY-Medium (8.6.3.1.2 und Tabelle 22) schließt sich ein Inkubationsschritt unter Schütteln über 90 Minuten bei 37°C an. Danach werden je 100–150 µl der transformierten Bakterien auf selektive Medien (hier: LB-Ampicillin(100µg/ml)-Agarplatten) pipettiert und gleichmäßig ausgestrichen. Nach einer Inkubation der Bakterien über Nacht bei 37°C werden weiße Bakterienkolonien selektiert (siehe 3.7.5) und in ein Flüssigmedium überführt.

3.7.5 Selektion plasmidtragender Bakterien

Nach der 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 Restriktionsverdaus (siehe 3.7.7) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsfragmente (siehe 3.6.1) kann abschließend die Größe des fremden DNA-Fragments überprüft werden.

Protocol at a glance (Rev. 02) Plasmid DNA Purification

Mini	
NucleoSpin® Plasmid	
1 Cultivate and harvest bacterial cells	 30 s 11,000 x g
2 Cell lysis	 Buffer A1 250 µl Buffer A2 250 µl Buffer A3 300 µl
3 Clarification of lysate	 5 - 10 min 11,000 x g
4 Bind DNA	 load supernatant 1 min 11,000 x g
5 Wash silica membrane	 (optional: Buffer AW 500 µl) Buffer A4 600 µl 1 min 11,000 x g
6 Dry silica membrane	 2 min 11,000 x g
9 Elute highly pure DNA	 50 µl buffer AE RT 1 min 1 min 11,000 x g

3.7.6 Präparation von Plasmid-DNA

Um den Klonierungserfolg von DNA in bakterielle Plasmide zu kontrollieren, werden serienweise Einzelkolonien von den zu selektierenden Bakterienkolonien gepickt (siehe 8.6.4) und in 5 ml ampicillinhaltigem (100 µg/ml) LB-Medium (siehe 8.6.2.2.1) bei 37°C und 120 U/min über Nacht inkubiert. Von den Übernachtskulturen werden ca. 1,5 ml in sterile 1,5-ml-Eppendorf-Gefäße überführt und bei 12000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Nach vollständigem Entfernen des Überstands werden die Pellets an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNA wird anschließend mithilfe des NucleoSpin Plasmid Kits (Macherey und Nagel) (siehe 8.6.4) laut Herstellerangaben isoliert. Als Endprodukt liegt gereinigte Plasmid-DNA in wässriger Lösung vor.

Abbildung 23 Prinzip der Plasmid-DNA-Präparation nach Macherey-Nagel

3.7.7 Restriktionsenzymverdau

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.

Zur restriktionsenzymatischen Spaltung wird Plasmid-DNA in Ansätzen von bis zu 1 µg DNA pro 25 µl Volumen (siehe 8.6.5.1 und Tabelle 23) mit dem Restriktionsenzym (hier stets EcoR I) geschnitten. Der Restriktionsansatz inkubiert 2 h bei optimaler Enzymtemperatur (in der Regel bei 37°C) und wird zur Kontrolle auf ein Agarosegel (siehe 3.6.1) aufgetragen. Als Marker wurde ein 100-bp-Größenstandard verwendet. Zwei der das gewünschte Insert tragenden Bakterienkulturen (siehe 3.7.6) werden in einem Verhältnis von 1:1 mit Glycerin versetzt und bei -80°C zur weiteren Verarbeitung konserviert.

3.8 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden bei der Firma SeqLab (Göttingen) (siehe 8.7) vorgenommen. Zur Sequenzierung werden 600 ng gereinigter Plasmid-DNA (siehe 3.7.6) mit 20 pmol Primer zu einem Gesamtvolumen von 7 µl vermengt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Primer M13 forward und M13 reverse eingesetzt. Die Bindungsstellen dieser Primer flankieren die Insertionsstelle des PCR-Produkts im Vektor von 5'- bzw. 3'-wärts. Daher können diese Primer unabhängig von der Sequenz des inserierten PCR-Produkts zur Sequenzierung eingesetzt werden. Resultat der Sequenzierung ist die Sequenz des codierenden und komplementären Strangs des inserierten PCR-Produkts im Kontext des Vektors.

3.9 Quantitative PCR

3.9.1 Allgemeines

Für die Erstellung von Genexpressionsprofilen muss die Kopienzahl der gesuchten mRNA-Spezies relativ quantifiziert werden. Dieses erfolgt durch Reverse Transkription und anschließende quantitative PCR. Die quantitative oder „real-time“ PCR (qPCR) repräsentiert eine spezifische und sensitive Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren (Freeman, Walker et al. 1999; Wilhelm and 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, Dollinger et al. 1992; Higuchi, Fockler et al. 1993). Mit beiden Methoden werden *in vitro* geringste Mengen spezifischer DNA-Abschnitte amplifiziert und detektiert.

Bei der qPCR wird ein Thermocycler (siehe 8.8.2) eingesetzt, der ein optisches Detektionsmodul zur Messung der Fluoreszenz eines Farbstoffs (SYBR-Green) enthält (Bustin 2002). Dieser Cyanin-Farbstoff bindet ausschließlich an doppelsträngige (ds) DNA (Morrison, Weis et al. 1998) und wird als Interkalator unspezifisch in die Windungen der dsDNA eingebaut. SYBR-Green fluoresziert im gebundenen Zustand nach Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge (497 nm), wobei die Emissionswellenlänge 520 nm beträgt (Higuchi, Dollinger et al. 1992; Higuchi, Fockler 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

Enzymerschöpfung, 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 mithilfe 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.

3.9.2 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 8.8.1.1) 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 24 und Tabelle 25 zu entnehmen. An der stabilen cDNA werden nun die Gehalte der verschiedenen Ziel- und Kontrollsequenzen mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bestimmt (siehe 3.9).

3.9.3 Protokoll der qPCR

Die in der reversen Transkription (siehe 3.9.2) hergestellte cDNA wird zur Erstellung des Expressionsprofils des gesuchten Gens durch qPCR untersucht. Ein Reaktionsansatz (siehe Tabelle 26) 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 3.9.1). 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 27 beschriebenen Temperaturprofil behandelt. Dabei wird in jedem Zyklus die Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenzanalyse (Data acquisition) findet in Zyklus 2, Schritt 2 sowie in Zyklus 5 statt.

3.9.4 Etablierungsverfahren

3.9.4.1 Recherche und Herstellung synthetischer Oligonucleotide für die qPCR

PCR-Primer werden anhand verschiedener Regeln in Homologie zur nachzuweisenden Nucleotidsequenz (target sequence) ausgewählt. Als „target sequence“ fungieren die experimentell ermittelten Nucleotidsequenzen der klonierten PCR-Produkte des entsprechenden GOI (siehe 3.6, 3.7). Bei der Primersuche für die qPCR müssen Kriterien berücksichtigt werden, welche bei jeder Form der PCR von Bedeutung sind (siehe 3.5.3), und solche, die für die qPCR spezifisch sind (Amplikonlänge 70–120bp, Exon-Exon-Grenze im PCR-Produkt).

Für die vorliegende Arbeit wurden die Oligonucleotide mit Hilfe der Software „Primer3“ (siehe 8.8.3.1) 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 8.8.3.1) im Humangenom recherchiert und sequenzspezifisch

übertragen. Die Primersynthese erfolgte durch die Firma MWG Biotech; Ebersberg (siehe 8.8.3.2).

3.9.4.2 Bestimmung des Temperaturoptimums

Das verwendete qPCR-Protokoll (siehe 3.9.3) beinhaltet einen kombinierten Annealing-Elongationsschritt (siehe Tabelle 27). Die optimale Annealing-Temperatur, bei welcher ein maximaler Abstand zwischen spezifischer Amplifikation und Negativkontrollamplifikation besteht, kann zwischen PCR-Produkten variieren. Daher wird zur Bestimmung des Temperaturoptimums ein qPCR-Lauf mit einem Temperaturgradienten von 53 bis 67°C während der Annealing-Elongationsphase durchgeführt. Jeder Ansatz wird hierfür dreifach (Triplet) pipettiert. Weiterhin werden jeweils Negativkontrollen mitgeführt.

3.9.4.3 Bestimmung der PCR-Effizienz

Die PCR-Effizienz ist für die präzise Quantifizierung von Bedeutung und charakterisiert den Anteil an target-cDNA, welcher während der Annealing-Elongationsphase verdoppelt wird. Bei einer Effizienz von 100 % findet pro Zyklus eine Verdoppelung der Menge an PCR-Produkt statt. Nach 3,333 Zyklen liegt bei einer hundertprozentigen Effizienz eine Verzehnfachung der Ausgangsmenge vor. Die Effizienz wird durch Variablen wie Amplikonlänge, Sekundärstruktur und Primerqualität beeinflusst und sollte für die Primerkombinationen der Ziel- und Referenzsequenzen gleich sein (Pfaffl 2001).

Zur Effizienzbestimmung werden Plasmide als target-cDNA eingesetzt, welche die Sequenz des qPCR-Produkts enthalten (siehe 3.6, 3.7). So wird gewährleistet, dass die im Folgenden ermittelten Daten eines qPCR-Assays spezifisch für das GOI sind. Ausgehend von einer Konzentration von 1 ng / μ l Plasmid-DNA wird eine 6-stufige Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfaktor von 10^{-1} erstellt und jeweils als Dreifachansatz (Triplet) mit Negativkontrollen in einem qPCR-Experiment eingesetzt. Nach der Amplifikation werden die Ausgangsmengen an target-cDNA in einer logarithmischen Funktion als Regressionsgerade gegen den C_T -Wert dargestellt. Bei einer Effizienz von 100 % liegt pro PCR-Zyklus eine Verdopplung der target-cDNA vor, und die Steigung (Slope) der hieraus resultierenden Regressionsgeraden beträgt -3,333. Die Steigung der Regressionsgeraden gilt als ein Indikator für die Amplifikationseffizienz (siehe Gleichung 1). Der Toleranzbereich der Effizienz wurde in der vorliegenden Arbeit auf 95 % < 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 1

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

Im Anschluss an die qPCR zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz wurde eine Schmelzkurvenanalyse (siehe 3.9.1) 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.

3.9.5 Referenzgene

Alle Test- und Basiswerte der Proben werden zur relativen Quantifizierung der Expression auf die Expressionsrate von Referenzgenen („Housekeeping Genes“, „Housekeeper“) bezogen, um biologische Variationen bei der Ergebnisinterpretation zu berücksichtigen (siehe 3.9.8). „Housekeeper“ sind Gene, die essentiell für den Erhalt der Zellfunktion sind, ubiquitär exprimiert werden und deren Transkription nicht von experimentellen Bedingungen beeinflusst wird (Weisser, Haferlach et al. 2004; Zhang, Ding 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 (Rasmussen 2001).

3.9.6 Kontrollen

Als Positivkontrolle dient ein qPCR-Lauf, in welchem Plasmide bekannter Sequenz als Template eingesetzt werden (siehe 3.9.4). Als Negativkontrolle fungiert ein Ansatz ohne Template („No Template Control“, NTC; siehe 3.9.3). Zur Prüfung der RNA-Präparationen (siehe 3.4) auf DNA-Verunreinigungen wird für jede RNA-Probe eine β -Aktin-PCR ohne vorherige reverse Transkription durchgeführt (No RT Control, NRT, 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.

3.9.7 Auswertung der qPCR-Ergebnisse

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

3.9.7.1 Analyse der Amplifikationskurve

Zur Darstellung der Amplifikations- bzw. Schmelzkurve wird die Fluoreszenz (Relative Fluorescence Units, RFU) gegen die Zykluszahl bzw. Temperatur aufgetragen. Die Kurven eines Triplets verlaufen im Idealfall identisch. Die verschiedenen Amplifikationskurven vergleicht man anhand ihrer C_T -Werte (Threshold Cycle Value; siehe 3.9.1). Der C_T -Wert wird als Zahl ausgedrückt und repräsentiert die Zusammenfassung der Amplifikationskurve in einem numerischen Wert. Der C_T -Wert verhält sich indirekt proportional zur vorhandenen DNA-Menge der Probe. Je höher der C_T -Wert (d.h. je höher die Zykluszahl ist, bei der die Fluoreszenzkurve den Schwellenwert überschreitet), desto weniger cDNA bzw. mRNA befindet sich in der untersuchten Probe. Aus den 3 erhaltenen C_T -Werten (Triplet) wird pro Probe das arithmetische Mittel gebildet. Zur Bewertung der Spannweite dreier C_T -Werte einer Probe wird der Mittelwert mit einem laborintern definierten „Confidence-Wert“ belegt. Die Bedeutung des Confidence-Wertes ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Proben mit einem Confidence-Wert von 0 und 1 werden nicht ausgewertet und müssen wiederholt werden.

Tabelle 3 Bewertungsschema verschiedener C_T-Werte innerhalb eines Triplets

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

3.9.8 Relative Quantifizierung (ddC_T-Methode)

Die gemittelten C_T-Werte einer Probe werden zur Bestimmung der Expressionsrate des GOI mithilfe der ddC_T-Methode zur relativen Quantifizierung untersucht (Livak and Schmittgen 2001). Bei diesem Berechnungsschema wird der gemittelte C_T-Wert (siehe 3.9.7.1) des GOI jeder Probe zunächst gegen den gemittelten C_T-Wert des Referenzgens (siehe 3.9.5) normalisiert. Anschließend werden die normalisierten C_T-Werte des GOI unterschiedlicher Proben miteinander verglichen, um die Abweichung in der Expressionsrate des GOI zwischen den Proben zu ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Definition der verwendeten Proben und C_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 (hier Karzinomgewebe), bei welcher die Abweichung der Expressionsrate des GOI gemessen werden soll, wird als *Testprobe (Test)* bezeichnet. Die experimentell unbeeinflusste Probe (hier neoplastisch unverändertes Mammagewebe), die als Bezug für die Testprobe dient, wird als *Basisprobe (Ctrl)* bezeichnet.

Für eine relative Quantifizierung müssen die C_T-Werte des Targets (*TargTest*, *TargCtrl*) und der Referenz (*RefTest*, *RefCtrl*) in der Test- und Basisprobe bekannt sein. Der Expressionsunterschied des GOI in Basis- und Testprobe, normalisiert gegen das Referenzgen, wird in der ddC_T-Methode mithilfe folgender Formel berechnet.

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

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

exponentiellen Berechnungsformel (siehe Gleichung 2) liegen Werte von $0,5 < FC < 2$ in einem Bereich, innerhalb dessen keine zuverlässige Aussage über Genregulation möglich ist, und werden daher als unverändert gegenüber der Kontrolle bewertet. Bei FC-Werten von 0 bis 0,5 ist das GOI in der Testprobe gegenüber der Basisprobe herabreguliert (down-regulated). Bei FC-Werten von über 2 ist das GOI in der Testprobe gegenüber der Basisprobe hochreguliert (up-regulated).

In dem verwendeten Rechenmodell wird keine Korrektur für divergierende PCR-Effizienzen (siehe 3.9.4.3) zwischen den Nachweisreaktionen für Target- und Referenzgen durchgeführt. Daher muss die Effizienz der verwendeten qPCR-Reaktionen annähernd 100 % betragen. Bei der Etablierung der qPCR-Assays wurde daher die PCR-Effizienz geprüft, und es wurden nur solche PCR-Assays verwendet, die eine Effizienz von mindestens 95 % besitzen (siehe 3.9.4.3).

3.9.9 Boxplots

Zur Darstellung der Ergebnisse (siehe Abbildung 31, 33 und Abbildung 34, 36) wurden Boxplots in Sigma-Plot (Version 8.0) erstellt. Boxplots bieten eine schnelle Übersicht über die Verteilung der Werte einer Stichprobe und eignen sich zum Vergleich der Verteilungen mehrerer (Teil-)Stichproben miteinander. Sie geben weiterhin Hinweise auf mögliche Ausreißer und unplausible Werte in einer Stichprobe. Abbildung 24 skizziert die Bedeutung der Symbole in einem Boxplot.

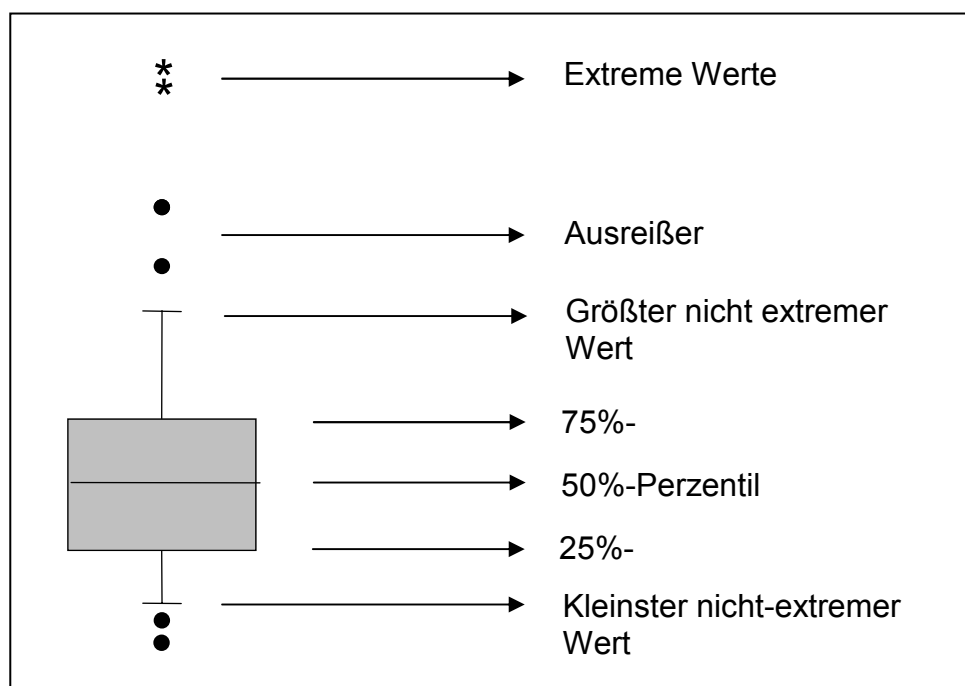


Abbildung 24 Bedeutung der Symbole in einem Boxplot

Die graue Box repräsentiert den Bereich der 50% mittleren Werte. Dies sind die Werte zwischen dem 25%- und dem 75%-Perzentil. Der Median, also der 50%-Perzentil, wird durch einen schwarzen Strich innerhalb der Box dargestellt. Die horizontal verlaufenden Striche über und unter der Box kennzeichnen den größten und den kleinsten Wert, der nicht als extremer Wert oder als Ausreißer klassifiziert wird. Ausreißer werden durch kleine Kreise, extreme Werte durch Sternchen dargestellt.

Ausreißer und extreme Werte sind folgendermaßen definiert:

- Ausreißer: Ausreißer sind Werte, deren Abstand vom 25%-Perzentil nach unten bzw. vom 75%-Perzentil nach oben zwischen dem 1,5fachen und dem 3fachen der Boxhöhe liegt. Die Boxhöhe gibt den Abstand zwischen dem 25%- und dem 75%-Perzentil wieder.
- Extreme Werte: Der Abstand extremer Werte von dem 25%- oder dem 75%-Perzentil beträgt mehr als das Dreifache der Boxhöhe.

In der vorliegenden Arbeit wurden für das Targetgen (hier p21 und p27) und das Kontrollgen (hier β -Aktin) jeweils Boxplots der Testgruppe (Tumorgewebe) und Basisgruppe (neoplastisch unverändertes Mammagewebe) gegenübergestellt (siehe 4.6.3).

Im Falle der Boxplots für p21 und p27 ist der Median des Boxplots der Basisgruppe stets 1, so dass der Median des Boxplots der Testgruppe den besten Hinweis auf eine transkriptionelle Regulation von p21 und p27 gegenüber neoplastisch unverändertem Mammagewebe darstellt. Die Größe der Box und der Perzentile ist der beste Hinweis auf die Streuung der Werte der einzelnen Proben, sowohl in der Gruppe der Testproben, als auch in der Gruppe der Basisproben.

Im Falle des Boxplots für die p21- und p27-Kontrolle (hier β -Aktin) ist der Median der Basisgruppe stets 1, so dass der Median des Boxplots der Testgruppe den besten Hinweis auf eine systematische Abweichung der Transkriptionsrate des Kontrollgens (hier β -Aktin) im Tumorgewebe von der mittleren Transkriptionsrate des Kontrollgens im neoplastisch unveränderten Mammagewebe darstellt.

Die Größe der Box und der Perzentile weisen sowohl in der Gruppe der Testproben sowie der Gruppe der Basisproben auf die Streuung der β -Aktin-Werte der einzelnen Proben hin.

Microarray-Analyse

3.10.1 Allgemeines

Microarrays stellen ein organisiertes Raster von spezifischen 5000 bis 10.000 Gensonden dar, die in der Regel auf einem behandelten Glas-Objekträger in Festphase angebracht sind. Die einzelnen Gensonden entsprechen spezifischen Gentranskripten und werden auf der Grundlage bestehender Sequenzinformationen chemisch synthetisiert. Zudem können die Gensonden doppelsträngige PCR-Produkte oder cDNAs sein, die von einer definierten oder undefinierten cDNA-Bibliothek stammen. Im Idealfall spiegelt die Gesamtheit der Gensonden auf einem Microarray den molekularen Phänotyp eines Gewebes oder eines Zelltyps wider. Die Vollständigkeit des Phänotyps hängt von der Anzahl der Gensonden auf dem Microarray ab.

3.10.2 Methode

Die RNA der zu untersuchenden neoplastisch veränderten Gewebeprobe (Testprobe) und eine nicht neoplastische Gewebeprobe (Basisprobe) wurde wie unter 3.4.2 beschrieben aus den stabilisierten Gewebeproben (siehe 3.4.1) isoliert und aufgereinigt. Anschließend erfolgt die reverse Transkription zu cDNA. Zur Erfassung der auf dem Microarray gebundenen cDNA werden die cDNAs der Basis- und der Testprobe mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Reporter-Molekülen) markiert. Hierzu nutzt man z.B. Rhodamin (rot) und Fluoreszein (grün). Nach der cDNA-Markierung erfolgt der Hybridisierungsschritt. Hierbei binden die markierten cDNAs an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array. An jeder Position des Microarrays liegt ein Überschuss an oberflächengebundener Gensonde vor, sodass es zu keiner gegenseitigen Beeinflussung der Basis- und der Testprobe kommt. Nach Entfernung nicht gebundener cDNA durch Detergenzien wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des Microarrays mittels eines Lasers analysiert. Positionen mit einer größeren Menge gebundener cDNA zeigen ein stärkeres diejenigen mit einer geringeren Menge gebundener cDNA ein schwächeres Fluoreszenzsignal. Positionen, an denen ausschließlich Basisproben-cDNA, gebunden ist, zeigen das Fluoreszenzsignal des einen Reporter-Moleküls (siehe Abbildung 25: grüner Fluoreszenzfarbstoff), die, die ausschließlich Testproben-cDNA binden, das Signal des anderen Reporters (siehe Abbildung 25: roter

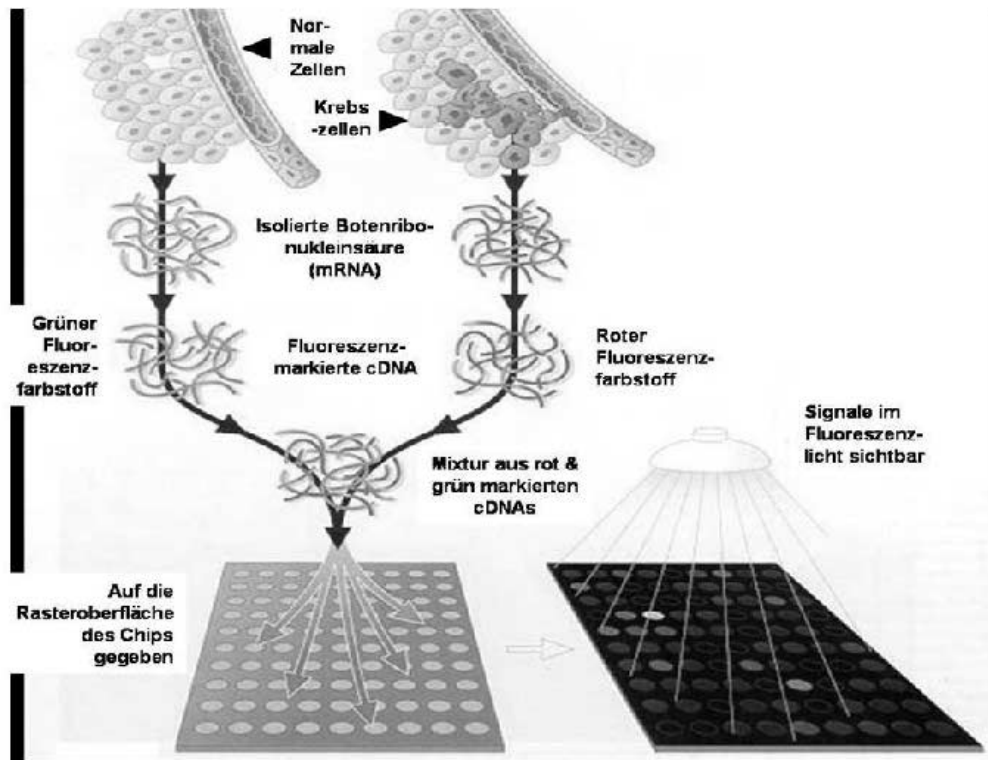


Abbildung 25 Schematische Darstellung der Microarray-Analyse

Fluoreszenzfarbstoff). Die Positionen, an denen sowohl Basisproben als auch Testproben-cDNA binden, zeigen ein gemischtes Fluoreszenzsignal. Auf diesem Weg wird die relative Expression zahlreicher unterschiedlicher cDNA-Sequenzen in Basis- und Testprobe innerhalb eines Experiments ermittelt.

3.10.3 Durchführung

Es wurde die RNA aus 15 caninen Adenokarzinomen und jeweils korrespondierenden neoplastisch unveränderten caninen Mammagewebeproben isoliert und in cDNA revers transkribiert. Die Microarray-Analyse erfolgte wie oben beschrieben in Kooperation mit der Medizinischen Klinik III (Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin) der Charité – Campus Benjamin Franklin.