

**Aus dem Interdisziplinären Medizinischen Zentrum  
der Philipps-Universität Marburg  
Abteilung für Klinische Chemie und Zentrallaboratorium  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz**

**Entwicklung einer kompetitiven PCR zur  
Quantifizierung der mRNA von TGF-beta-1 und LTBP-1  
in Fettspeicherzellen der Leber von Rattus norvegicus**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von**

**Volker Müller  
aus Meppen**

**Marburg 2001**

**Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am  
06. September 2001**

**gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs**

|                        |                           |
|------------------------|---------------------------|
| <b>Dekan:</b>          | <b>Prof. Dr. Arnold</b>   |
| <b>Referent:</b>       | <b>Prof. Dr. Gressner</b> |
| <b>Korreferent:</b>    | <b>Prof. Dr. Renz</b>     |
| <b>2. Korreferent:</b> | <b>Prof. Dr. Dr. Katz</b> |

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Liste der verwendeten Abkürzungen</b>   | <b>6</b>  |
| <b>Zusammenfassung</b>   | <b>8</b>  |
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>10</b> |
| 1.1. Zytokinvermittelte, zelluläre Interaktionen im Rahmen der hepatischen Fibrogenese                       | 10        |
| 1.1.1. Aktivierte Hepatic Stellate Cells als Initiatoren der fibrotischen Transformation                     | 10        |
| 1.1.2. Pathophysiologische Auswirkungen der Leberfibrose   | 12        |
| 1.1.3. Transforming Growth Factor- $\beta$ als zentraler Mediator der Aktivierung von Hepatic Stellate Cells | 12        |
| 1.2. Kompetitive RT-PCR als sensitive Methode zur Quantifizierung von PCR-Amplifikaten                       | 14        |
| 1.2.1. Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 14        |
| 1.2.2. Grundlagen der kompetitiven RT-PCR  | 17        |
| <b>2. Material und Methoden</b>  | <b>21</b> |
| 2.1. Material  | 21        |
| 2.1.1. Versuchstiere   | 21        |
| 2.1.2. Reagenzien  | 21        |
| 2.1.3. Labormaterialien  | 23        |
| 2.1.4. Enzyme  | 24        |
| 2.1.5. Bakterienstämme   | 24        |
| 2.1.6. Primer  | 24        |
| 2.1.7. Lösungen und Puffer   | 25        |
| 2.1.7.1. Präparation von Hepatic Stellate Cells aus der Rattenleber  | 25        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.1.7.1.1. | Stocklösungen  | 25        |
| 2.1.7.1.2. | Gebrauchslösungen  | 27        |
| 2.1.7.2.   | Aussaat der Zellen   | 27        |
| 2.1.7.3.   | Präparation der Gesamt-RNA aus HSC/MFB   | 28        |
| 2.1.7.4.   | Agarosegelelektrophorese   | 29        |
| 2.1.8.     | Software   | 30        |
| 2.2.       | Methoden   | 31        |
| 2.2.1.     | Zellbiologische Methoden   | 31        |
| 2.2.1.1.   | Präparation von Hepatic Stellate Cells (HSC, syn. ITO-Zellen, Fettspeicherzellen, Sternzellen) | 31        |
| 2.2.1.1.1. | Aufbau der Perfusionsapparatur   | 31        |
| 2.2.1.1.2. | Durchführung der Zell-Präparation  | 32        |
| 2.2.1.1.3. | Zell-Elutriation   | 34        |
| 2.2.1.1.4. | Reinheitskontrollen der Zellen   | 35        |
| 2.2.1.1.5. | Zell-Aussaat   | 36        |
| 2.2.2.     | Molekularbiologische Methoden  | 37        |
| 2.2.2.1.   | Isolierung von Gesamt-RNA  | 37        |
| 2.2.2.2.   | Synthese der komplementären DNA (cDNA)   | 38        |
| 2.2.2.3.   | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)  | 39        |
| 2.2.2.4.   | Quantitative PCR   | 41        |
| 2.2.2.4.1. | Synthese der Standardsequenzen   | 41        |
| 2.2.2.4.2. | Isolierung der Standardsequenzen   | 44        |
| 2.2.2.4.3. | Durchführung der quantitativen PCR   | 47        |
| <b>3.</b>  | <b>Ergebnisse</b>  | <b>49</b> |
| 3.1.       | Präparation von Hepatic Stellate Cells   | 49        |
| 3.2.       | Präparation der Gesamt-RNA aus HSC/MFB   | 53        |
| 3.3.       | Synthese der komplementären DNA (cDNA)   | 54        |
| 3.4.       | Synthese der Standardsequenzen   | 55        |
| 3.5.       | Isolierung der Standardsequenzen   | 57        |
| 3.6.       | Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 63        |

|                               |  |            |
|-------------------------------|--|------------|
| 3.6.1.                        | Konzentrationsabgleich über ratS6  | 63         |
| 3.6.2.                        | Auswertung der quantitativen PCR   | 65         |
| 3.6.3.                        | Kontrollreaktionen   | 68         |
| 3.6.4.                        | Ergebnisse der quantitativen PCR   | 70         |
| <b>4. Diskussion</b>          |  | <b>74</b>  |
| 4.1.                          | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)  | 74         |
| 4.1.1.                        | Reaktionskinetik und Amplifikationseffizienz                                   | 74         |
| 4.2.                          | Unterschiedliche Modelle zur Quantifizierung von mRNA                          | 75         |
| 4.2.1.                        | Alternative Methoden zur quantitativen PCR                                     | 75         |
| 4.2.1.1.                      | Northern Blotting  | 76         |
| 4.2.1.2.                      | Nuclease Protection Assays   | 76         |
| 4.2.1.3.                      | In Situ Hybridization  | 77         |
| 4.2.2.                        | Quantitative PCR   | 77         |
| 4.2.2.1.                      | Quantitative PCR ohne Standard   | 77         |
| 4.2.2.2.                      | Quantitative PCR mit Standard  | 78         |
| 4.2.2.3.                      | Kompetitive PCR  | 80         |
| 4.2.2.4.                      | Real-Time Quantitative PCR   | 82         |
| 4.3.                          | Reliabilität und Validität der quantitativen PCR<br>- Bewertung der Ergebnisse | 85         |
| <b>Schrifttumsverzeichnis</b> |  | <b>90</b>  |
| <b>Anhang</b>                 |  | <b>105</b> |

## Liste der verwendeten Abkürzungen

|       |  |
|-------|--|
| AMV   | Avian Myeloblastoma Virus                          |
| APAAP | Alkalische Phosphatase/Anti-Alkalische Phosphatase |
| BSA   | Bovine Serum Albumin                               |
| BP    | Base Pair(es)                                      |
| BPL   | Base Pair Ladder                                   |
| cDNA  | Complementary Deoxyribonucleid Acid                |
| DEPC  | Diethylpyrocarbonat                                |
| DMEM  | Dulbecco's Modified Eagle Medium                   |
| dATP  | (desoxy)Adenosintriphosphat                        |
| dCTP  | (desoxy)Cytidintriphosphat                         |
| dGTP  | (desoxy)Guanosintriphosphat                        |
| dNTP  | (desoxy)Nukleotidtriphosphat                       |
| dTTP  | (desoxy)Thymidintriphosphat                        |
| DTT   | Dithiothreitol                                     |
| EC    | Endothelium Cells                                  |
| ECM   | Extracellular Matrix                               |
| EGF   | Epidermal Growth Factor                            |
| EtBr  | Ethidiumbromid                                     |
| FAM   | 6-Carboxy-Fluorescein                              |
| FGF   | Fibroblast Growth Factor                           |
| FKS   | Fetales Kälberserum                                |
| FRET  | Fluoreszenzresonanzenergietransfer                 |
| HBSS  | Hanks Balanced Salt Solution                       |
| HSC   | Hepatic Stellate Cells                             |
| IGF-1 | Insulin-Like Growth Factor-1                       |
| IPTG  | Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid               |
| IU    | International Unit                                 |
| KC    | Kupffer Cells                                      |
| LAP   | Latency-Associated Peptide                         |
| LTBP  | Latent TGF-Beta Binding Protein                    |

|           |   |
|-----------|---|
| mRNA      | Messenger Ribonucleid Acid                        |
| PBS       | Phosphate Buffer Salt Solution                    |
| PC        | Parenchymal Cells                                 |
| PDGF      | Platelet-Derived Growth Factor                    |
| RT - PCR  | Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction |
| RNA       | Ribonucleid Acid                                  |
| SDS       | Sodium Dodecyl Sulfate                            |
| TAMRA     | 6-Carboxytetramethylrhodamin                      |
| Taq       | Thermus Aquaticus                                 |
| TGF-alpha | Transforming Growth Factor-Alpha                  |
| TGF-beta  | Transforming Growth Factor-Beta                   |
| TNF-alpha | Tumor Necrosis Factor                             |
| X-Gal     | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid |

## Zusammenfassung

Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) ist eines der wichtigsten bekannten Zytokine in der Genese von fibrotischen Organveränderungen. Es initiiert u. a. die Aktivierung von Hepatic Stellate Cells (HSC) der Leber, und somit deren Transformation zu Myofibroblasten (MFB), welche die hauptsächlichen Produzenten von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) sind. TGF-beta wird zwar auch aus geschädigten Parenchymzellen freigesetzt, aber im wesentlichen von den nicht-parenchymatösen Zellen der Leber, HSC, Kupferzellen und wahrscheinlich auch Endothelzellen, als großer latenter TGF-beta-Komplex exprimiert. In diesem Komplex ist TGF-beta über Latency-Associated-Peptide (LAP) an Transforming Growth Factor- $\beta$  Binding Protein (LTBP) gebunden. Nach Aktivierung (proteolytische Lösung aus dem Komplex) entwickelt TGF-beta seine fibrogene Wirkung vor allem auf HSC.

Um Aufschluß über etwaige Änderungen des Gehaltes von sowohl TGF-beta, als auch LTBP zu gewinnen, wurde die Expression der mRNA von ratTGF-beta-1 und ratLTBP-1 in HSC und MFB von *Rattus norvegicus* im zeitlichen Verlauf untersucht. Hierzu wurde eine quantitative PCR entwickelt, die, über die Koamplifikation einer in ihrer Konzentration bekannten DNA-Sequenz (Standard) mit cDNA-Kopien der zu untersuchenden mRNA (Template), Rückschlüsse auf die Konzentration des Templates zuließ. Die eingesetzte Standard-DNA besaß dieselben Primerbindungsstellen wie das Template, unterschied sich aber von diesem durch eine geringere Fragmentlänge. Unter diesen Voraussetzungen konnten dieselben Primer benutzt werden, um eine Verdünnungsreihe des Standards zusammen mit jeweils konstanten Mengen des Templates kompetitiv zu amplifizieren. Standard und Template wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und konnten aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe nach Agarosegelelektrophorese unterschieden und densitometrisch ausgewertet werden. Der Gehalt an cDNA (und somit an mRNA) wurde durch Extrapolation gegen die Standardkurve rechnerisch ermittelt.

Da die Aussagekraft einer quantitativen RT-PCR wesentlich vom experimentellen Design abhängt, wurden in diesem Zusammenhang umfangreiche Kontrollen durchgeführt. Parallele Zellkulturen, parallele reverse Transkriptionen und letztlich parallele PCR-Ansätze zeigten die Reproduzierbarkeit der Reaktionen. Um Variabilität in der Effizienz von RNA-Extraktion und reverser Transkription zu minimieren, wurde vor der Quantifizierung eine Angleichung über ratS6 als internen Standard durchgeführt. Weiter wurde über verschiedene Arten der Standardisolierung das in der Reaktion insgesamt sensitivste Fragment gefunden.

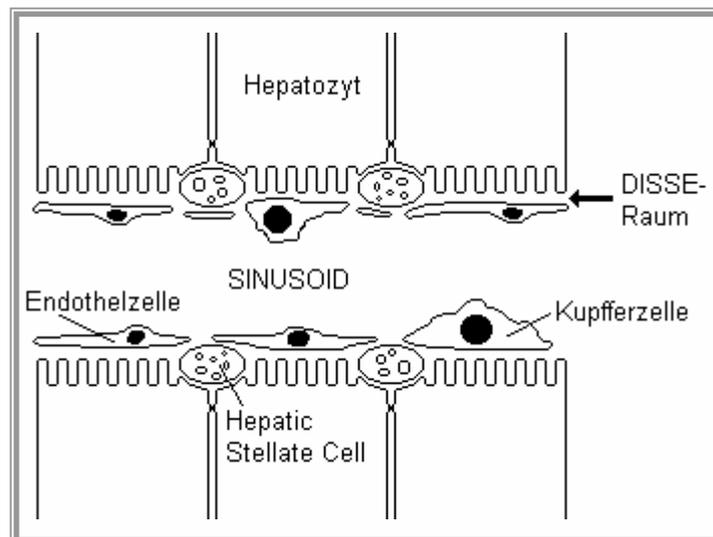
Erste Ergebnisse der untersuchten Zellreihen, 0, 2, 4 und 6 Tage kultivierte HSC und 4 Tage kultivierte MFB der Rattenleber, zeigten im zeitlichen Verlauf eine durchschnittliche Abnahme der Konzentration an mRNA von ratLTBP-1 um den Faktor 2,6, während die Konzentration von ratTGF-beta-1 relativ konstant blieb.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die hier verwendete Methode zur Quantifizierung von mRNA sehr gut geeignet ist. Die relative Aussage über Konzentrationsveränderungen von verschiedenen Messages (in einem definierten und standardisierten Umfeld) erwies sich als valide und verläßlich.

# 1. Einleitung

## 1.1. Zytokinvermittelte, zelluläre Interaktionen im Rahmen der hepatischen Fibrogenese

### 1.1.1. Aktivierte Hepatic Stellate Cells als Initiatoren der fibrotischen Transformation



**Abb. 1.1.:** Schematische Darstellung eines Sinusoids der Leber (modifiziert nach Gressner, 1996). Die Wand der Sinusoide wird von fenestrierten Endothelzellen gebildet. Zwischen diesen und den Parenchymzellen (Hepatozyten) liegt der perisinusoidale DISSE-Raum, in dem sich die Hepatic Stellate Cells (HSC) befinden. Dem Endothelverband angeschlossen sind zudem phagozytierende Kupferzellen.

Hepatic Stellate Cells (HSC, syn. ITO-Zellen, Fettspeicherzellen, Sternzellen) sind spezielle, nichtparenchymatöse Leberzellen, die im subendothelialen DISSE-Raum lokalisiert sind. Sie liegen dabei den Parenchymzellen (PC, syn. Hepatozyten) unmittelbar an und haben Kontakt zu Endothel- und Kupferzellen (Abb. 1.1.).

Die physiologische Hauptaufgabe der HSC in einer gesunden Leber liegt in der Akkumulation von exogen zugeführtem Vitamin A (Retinoid) in den intrazellulären Fettvakuolen (Blomhoff et al., 1990 u. 1991, Hendriks et al., 1985 u. 1987). In Bereichen, in denen Leberzellen lokal oder diffus geschädigt sind, werden HSC über die Transdifferenzierung zu Myofibroblasten (MFB) dazu angeregt, verstärkt Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) zu synthetisieren und zu sezernieren. Im einzelnen sind dies verschiedene Typen von Kollagenen (Friedman SL, 1990), strukturellen Glykoproteinen wie z. B. Entaktin (Ramadori et al., 1990), Fibronectin (Ramadori et al., 1987), Laminin (Maher et al., 1988) oder Tenaskin (Ramadori et al., 1990), Proteoglykanen wie Biglykan, Dekorin, Luminan, Aggrecan und Syndekan (Schäfer et al., 1987, Arenson et al., 1988) und Hyaluronan (Gressner et al., 1988).

Diese Aktivierung von HSC im Rahmen von entzündlichen und/oder nekrotisierenden Veränderungen in der Leber wird durch Zytokine gesteuert (Friedman et al., 1993, Gressner, 1992) und läßt sich in drei Phasen unterteilen (Gressner, 1996). In der ersten, präinflammatorischen Phase erfolgt die Einleitung der Aktivierung durch Freisetzung von Zytokinen (hauptsächlich TGF- $\alpha$ , IGF-1 und wahrscheinlich auch TGF- $\beta$ ) aus zerstörten PC, wodurch eine Steigerung der Mitoserate und somit der Proliferation der Zellen erreicht wird (Gressner et al., 1992 u. 1993, Hoffmann et al., 1994). In der folgenden, inflammatorischen Phase werden Kupfferzellen (Friedman et al., 1989, Matsuoka et al., 1990) durch Phagozytose von Zelldetritus aktiviert und produzieren v. a. TGF- $\beta$ -1, aber auch TGF- $\alpha$  und TNF- $\alpha$ . Thrombozyten produzieren TGF- $\beta$ -1, EGF-like factors und PDGF, was zusammen die Transformation von HSC zu MFB initiiert. In der postinflammatorischen Phase exprimieren MFB in verstärktem Ausmaß Mediatoren wie TGF- $\beta$ -1, TGF- $\alpha$  oder FGF, welche zum einen die begonnene Transformation aufrechterhalten, zum anderen die Transformation von noch nicht aktivierten HSC einleiten, wodurch sich der fibrotische Prozeß unabhängig von dem einst schädigenden Ereignis verselbstständigt.

Aktivierung von HSC bedeutet I. die Stimulation der Proliferation der Zellen, II. die Transformation zu MFB, III. die gesteigerte Produktion nahezu aller

Bestandteile der ECM und IV. die Erlangung kontraktile Eigenschaften (Bissell, 1992, Geerts et al., 1991, Herbst et al., 1992, Kawada et al., 1992 u. 1993, Rockey et al., 1992, Burt, 1993).

### 1.1.2. Pathophysiologische Auswirkungen der Leberfibrose

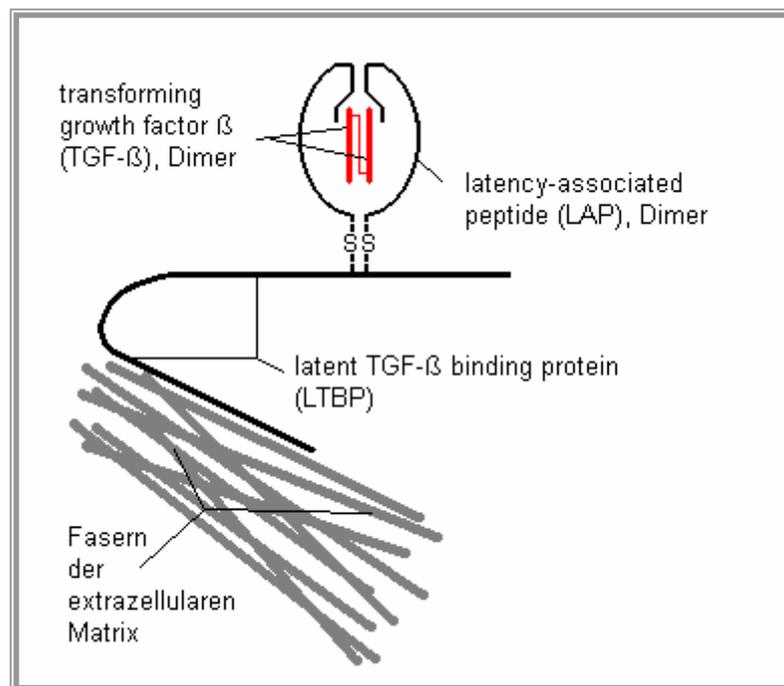
Die Leberfibrose (und die sich konsekutiv entwickelnde Zirrhose) nimmt, trotz unterschiedlicher Ätiologie (Alkoholabusus, Virushepatitiden, Stoffwechselerkrankungen, Intoxikationen), einen relativ stereotypen Verlauf (Kap. 1.1.1.). Vor allem die Mehrproduktion von Matrixproteinen hat großen Einfluß auf die physiologischen Funktionen des Organs. Die extrazelluläre Matrix macht nur etwa 0,6% des Gesamt(feucht)gewichtes der gesunden Leber aus (Gressner, 1994). Beispielsweise beträgt der Gehalt an Glykosaminoglykanen (Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat) in trockener, entfetteter Leber nur etwa 100 µg/g. In einer zirrhotisch veränderten Leber ist dieser mehr als fünffach höher (Murata et al., 1985). Diese Umstrukturierung der ECM, die „exzessive Kollagen-Deposition im Rahmen einer Neuformation der (Matrix-) Fasern“ (Anthony et al., 1978) im Rahmen der hepatischen Fibrogenese führt zu klinisch bedeutsamen Funktionseinschränkungen des Organs. Hierbei kommt es I. zu einer Vergrößerung der Diffusionsbarriere zwischen Sinusoid und Hepatozyt durch Veränderungen an der Basalmembran (Behinderung der metabolischen Austauschvorgänge) und II. zur Behinderung der sinusoidalen Perfusion durch Zunahme des interstitiellen Gewebes (intrahepatischer, postsinusoidaler Block → portale Hypertension) mit nachfolgender Entwicklung von Umgehungskreisläufen (gastro-ösophageal, gastro-phreno-renal, umbilikal, mesenteriko-hämorrhoidal) (Lauler, 1993).

### 1.1.3. Transforming Growth Factor-β als zentraler Mediator der Aktivierung von Hepatic Stellate Cells

TGF-beta ist der Prototyp eines multifunktionellen Zytokins und spielt, hauptsächlich in der Isoform 1, eine entscheidende Rolle bei der Entstehung

von fibrotischen Organveränderungen (Bedossa et al., 1995, Sanderson et al., 1995, Border et al., 1994). So wirkt TGF-beta als Regulator von Differenzierungs- und Regenerationsvorgängen (Grande, 1997, Michalopoulos, 1990), hat Einfluß auf die Synthese von Matrixproteinen (Border et al., 1994), vermittelt immunologische Reaktionen (Lawrence, 1995, Massague et al., 1992) und spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Entstehung des ‚programmierten Zelltodes‘, Apoptose, von Hepatozyten (Gressner et al., 1997).

TGF-beta liegt hauptsächlich in Form des großen latenten TGF-beta-Komplexes (LTBP-LAP-TGF-beta) vor (Gong et al., 1998, Roth et al., 1998). In diesem Komplex ist Latent TGF-beta Binding Protein (LTBP) kovalent über Disulfidbrücken an Latency-Associated Peptide (LAP) gebunden, welches eine nicht-kovalente Bindung mit TGF-beta eingeht (Miyazono et al., 1991 u. 1993). LTBP kann dabei an extrazelluläre Matrixfasern gebunden sein (Taipale et al., 1996) (Abb. 1.2.).



**Abb. 1.2.:** Schematische Darstellung des großen latenten TGF-beta-Komplexes.

Um wirksam zu werden, muß TGF-beta zuvor aus diesem Verband herausgelöst und somit aktiviert werden (Munger et al., 1997). Dieses geschieht

über proteolytische Mechanismen u. a. unter Zuhilfenahme des PAI-plasmin(ogen)-Systems der HSC (Knittel et al., 1996) oder der membranvermittelten Aktivierung (De Bleser et al., 1995).

Die Hauptproduzenten von TGF-beta sind die nicht-parenchymatösen Zellen der Leber, HSC, KC und EC (Bissell et al., 1995, De Bleser et al., 1997). Auch Hepatozyten einer normalen, gesunden Leber enthalten den latenten TGF-beta-Komplex, wahrscheinlich durch Aufnahme aus dem Extrazellularraum (Coffey et al., 1987). Der immunologische Nachweis von TGF-beta in Parenchymzellen ist häufig aber erst nach Aktivierung (durch Zellschädigung oder Kultivierung) möglich. So ist TGF-beta in fibrotischen oder chirurgisch entfernten Lebern nachweisbar. Auch in kultivierten Hepatozyten konnte TGF-beta gefunden werden (Gao et al., 1996, Strange et al., 1996). Werden Hepatozyten z. B. durch ein hepatozelluläres Karzinom maligne transformiert, exprimieren diese mRNA für TGF-beta-1 bzw. synthetisieren das Protein selbst (Bedossa et al., 1995). Der Ursprung eines erhöhten TGF-beta-Gehaltes in einer geschädigten Leber liegt demnach auch bei den parenchymatösen Zellen (Roth et al., 1998).

## 1.2. Kompetitive RT-PCR als sensitive Methode zur Quantifizierung von PCR-Amplifikaten

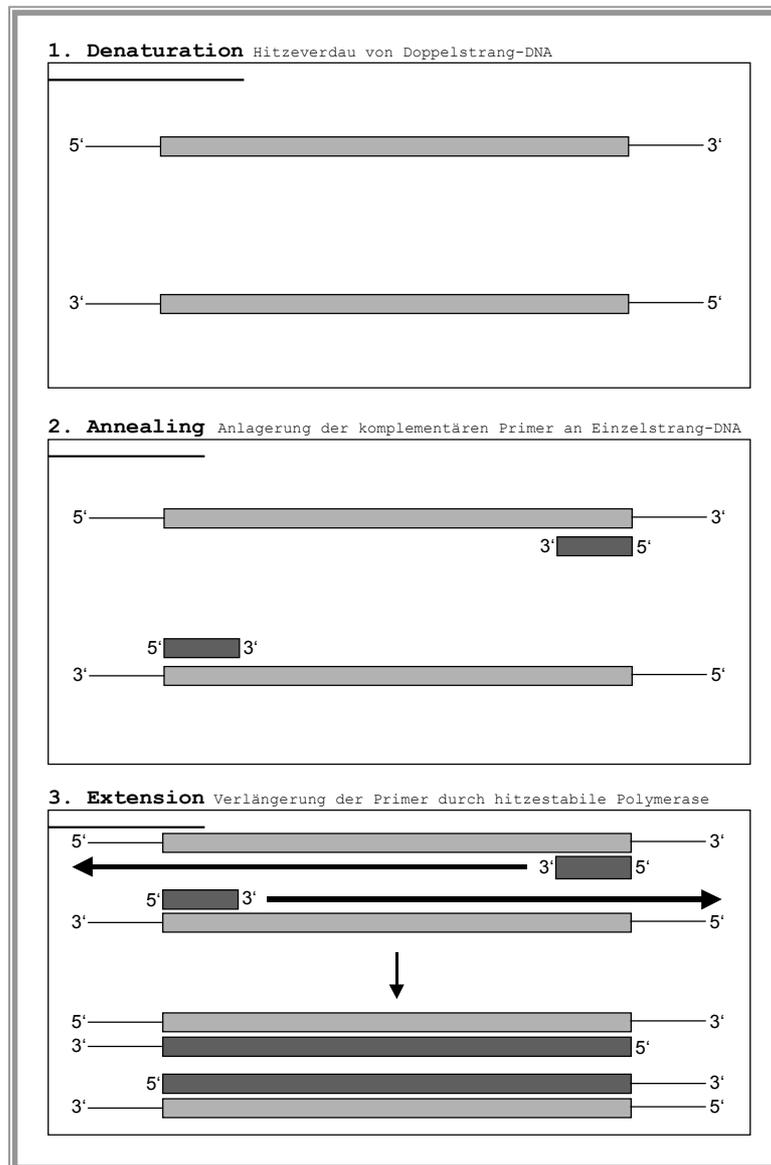
### 1.2.1. Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein molekularbiologisches in-vitro-Verfahren zur Produktion großer Mengen spezifischer, definierter Ziel-DNA (Saiki et al., 1985). Theoretisch reicht bereits ein einziges DNA-Molekül als Matrize aus (Li et al., 1988), um, nach sich wiederholenden Amplifikationszyklen, millionenfache Kopien der gewünschten Sequenz (Target) zu erhalten.

Die wesentlichen Komponenten einer PCR sind I. die zu untersuchende DNA-Sequenz, II. äquimolare Konzentrationen der vier Nukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), III. eine DNA Polymerase (z.B. *Taq*Polymerase), IV. ein hinsichtlich der Syntheseleistung der Polymerase optimierter Puffer und V. Oligonukleotidsequenzen, die als Primer den zu amplifizierenden Bereich des

Genoms umfassen und so die Eigenschaften des PCR-Produktes (wie z.B. Basenfolge, Fragmentlänge) genau festlegen.

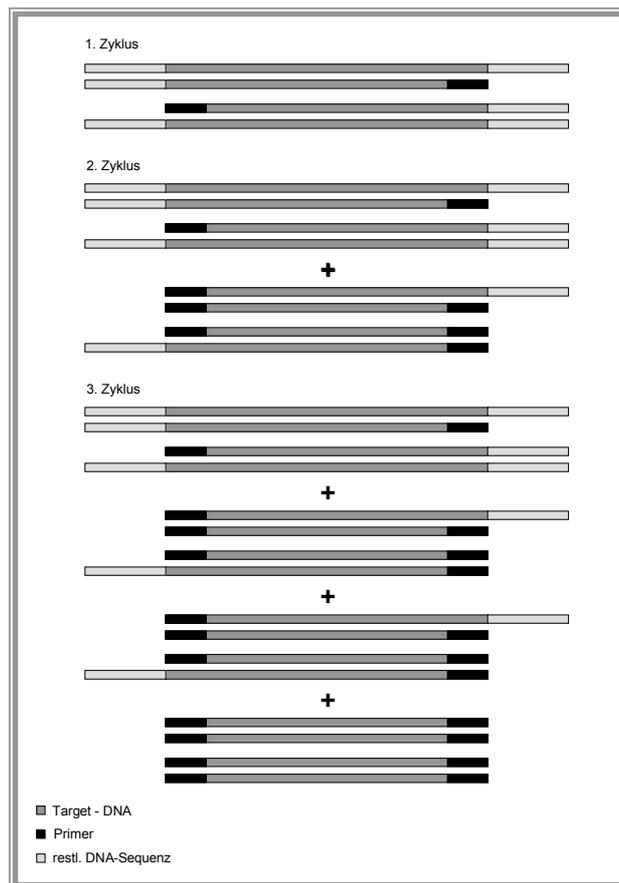
Die Amplifikation verläuft in sich wiederholenden Zyklen, die aus drei definierten, aufeinander folgenden Stadien (Abb. 1.3.) bestehen.



**Abb. 1.3.:** Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus

Im ersten Schritt - ‚Denaturation‘ - wird die Doppelstrang-DNA gespalten. Dies wird durch Erhöhung der Reaktionstemperatur für 45 - 60 s auf 90 - 96 °C erreicht. Nach Abkühlung auf 40-60 °C erfolgt im anschließenden Schritt -

„Annealing“ - die Primerbindung an die vorliegenden Einzelstränge (45 - 120 s). Der Minus-Primer bindet am 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz auf dem Plus-Strang und der Plus-Primer am entsprechenden 3'-Ende auf dem Minus-Strang (Rapley et al., 1992). Durch Verlängerung des 3'-Endes der Primer erfolgt im abschließenden Schritt - „Extension“ - die komplementäre Strangsynthese durch eine DNA Polymerase. Bei einem Temperaturoptimum von 72 °C liegt die geschätzte Einbaugeschwindigkeit der *Taq*Polymerase bei 60 Basen/s (PCR Appl. Man., Boehringer Mannheim, 1995), so daß ca. 60 s für diesen Reaktionsschritt ausreichend sind. Am Ende eines jeden Zyklus wird so (theoretisch) die Molekülzahl verdoppelt (Kap. 4.1.1.), im dritten Zyklus liegen erstmals in ihrer Länge genau festgelegte Targetsequenzen vor (Abb. 1.4.).



**Abb. 1.4.:** Amplifikation in den ersten drei Zyklen der Reaktion.

Diese werden in jedem weiteren Zyklus exponentiell vermehrt, während der Zuwachs von Molekülen mit nur einem definierten Ende linear erfolgt und am Ende der Reaktion nicht nachweisbar ist (Wenham, 1992). Dauer und Temperatur der einzelnen Stadien müssen, abhängig von den Eigenschaften des Targetmoleküls, optimiert werden. Vor allem die ‚Annealing‘-Temperatur muß sorgfältig ausgewählt werden (Rychlik et al., 1990), da zu geringe Temperaturen unspezifische Bindungen ermöglichen, während bei zu hoch gewählten Temperaturen keine Primerbindung erfolgt und eine Amplifikation somit ausbleibt.

Da es nicht möglich ist, RNA direkt in die PCR einzusetzen, wird vor der Amplifikation eine reverse Transkription durchgeführt (RT-PCR → Reverse Transkription - Polymerase-Kettenreaktion). Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, ist ein virales Enzym, welches, ausgehend von RNA als Vorlage, die entsprechende komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert.

### 1.2.2. Grundlagen der kompetitiven RT-PCR

Bereits seit 1987 wird die RT-PCR dafür verwendet, Tumor-assoziierte Gene, die von (zirkulierenden) Zellen exprimiert werden, zu detektieren, noch bevor das eigentliche Genprodukt selbst nachweisbar wird (Corey et al., 1997). Tyrosinase beim Malignen Melanom (Wang X et al., 1994) oder Tyrosinhydroxylase beim Neuroblastom (Miyajima et al., 1995) sind nur zwei Beispiele hierfür. Auch bei der Diagnostik hereditärer Erkrankungen und dem Nachweis spezifischer Infektionen kommt der RT-PCR eine immer wichtiger werdende Bedeutung zu (Rapley et al., 1992).

Meist sind solche Informationen qualitativer Natur, d. h. es können zunächst nur Aussagen darüber gemacht werden, ob eine genetische Information (z. B. ein Tumormarker oder eine virale DNA) vorhanden ist oder nicht.

Eine Methode, um darüber hinaus auch quantitative Informationen zu erhalten, ist die kompetitive RT-PCR (Wang AM et al., 1989, Becker-André et al., 1989, Gilliland et al., 1990). Ein in seiner Konzentration unbekanntes Targetmolekül wird mit einer Standardsequenz koamplifiziert, deren Konzentration bekannt ist.

Um einen solchen Standard zu synthetisieren (Kap 2.2.2.4.1.), wird zunächst eine PCR mit den standardspezifischen Primern durchgeführt. Hierbei wird derselbe Plus-Primer, der auch die Targetsequenz amplifiziert, jedoch ein anderer Minus-Primer verwendet. Dieser Minus-Primer besteht aus einem Teil der Sequenz des Target-Minus-Primers. Die restliche Sequenz des Standard-Minus-Primers ist komplementär zu einer Basenfolge, die sich zwischen den Bindungsstellen von Plus- und Minus-Primer des Targets befindet. Die so amplifizierte Standardsequenz ist kürzer als das Targetmolekül, trägt aber einen Teil dessen (Minus-)Primersequenz. Vervollständigt wird diese Sequenz durch die zweite PCR, diesmal mit den targetspezifischen Primern. Der so synthetisierte Standard besitzt eine unterschiedliche Länge, aber dieselben Primerbindungsstellen wie das Target, kann also eine echte, kompetitive Reaktion eingehen.

Zur Quantifizierung wird eine Verdünnungsreihe des Standards zusammen mit einer jeweils konstanten Menge Target koamplifiziert. Nach Abschluß der PCR können beide PCR-Produkte aufgrund ihrer unterschiedlichen Fragmentlänge unterschieden und in Bezug zueinander gesetzt werden. Dieses geschieht durch EtBr-Färbung und Darstellung im Agarosegel.

Die grundsätzliche Idee der kompetitiven, quantitativen PCR ist, daß, wenn beide Fragmente mit der gleichen Effizienz amplifiziert werden, das Verhältnis ihrer Amplifikationsprodukte im exponentiellen Teil der Reaktion konstant bleibt. Somit läßt sich, über den Vergleich der nach Amplifikation erhaltenen Mengen von Standard und Target anhand der bekannten Standardkonzentration auf die Konzentration des Targets rückschließen. Es gilt:

$$N_{0t}/N_{0s} = N_t/N_s = A_t/A_s$$

**N<sub>0t</sub>**: Konzentration der eingesetzten Targetmoleküle

**N<sub>0s</sub>**: Konzentration der eingesetzten Standardmoleküle

**N<sub>t</sub>**: Konzentration der Targetmoleküle nach PCR

**N<sub>s</sub>**: Konzentration der Standardmoleküle nach PCR

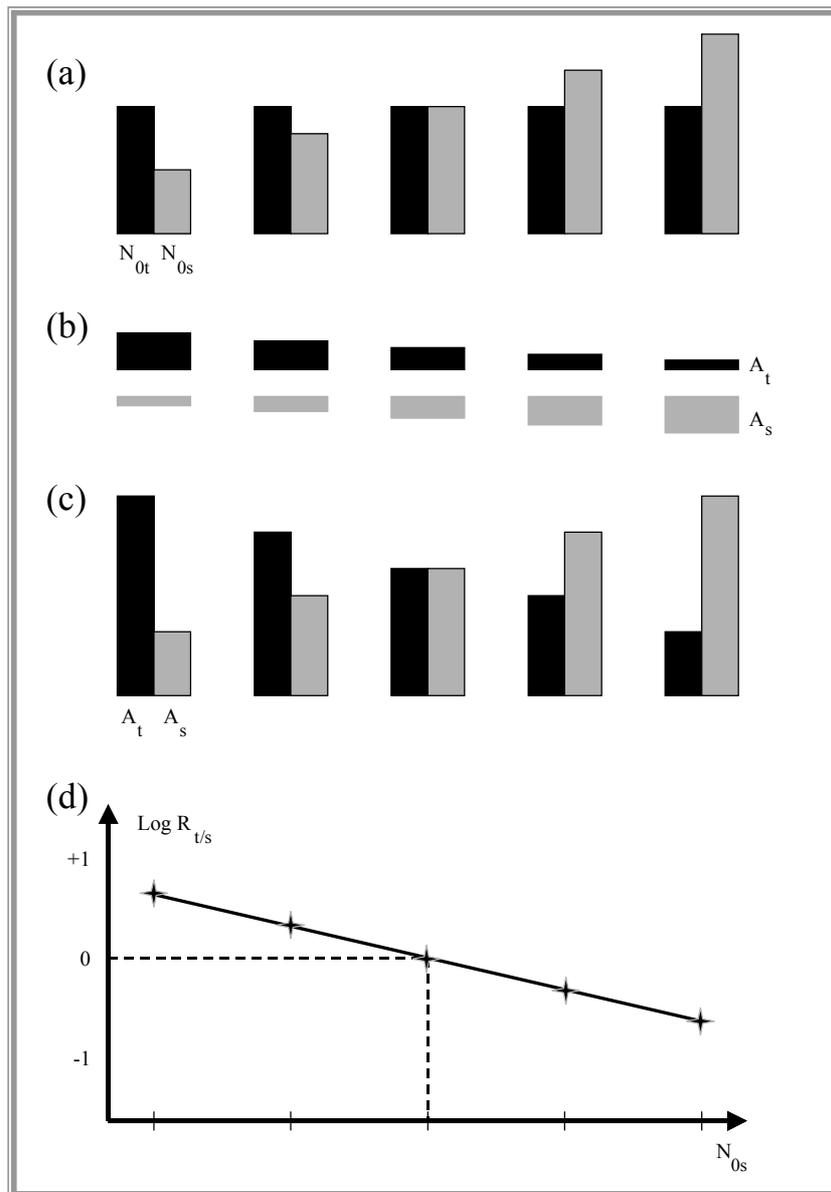
**A<sub>t</sub>**: Menge des Targets nach PCR (in %IntOD)

**A<sub>s</sub>**: Menge des Standards nach PCR (in %IntOD)

Obiger Gleichung zufolge ist das Verhältnis von Standard und Target vor der Reaktion gleich dem Verhältnis der Reaktionsprodukte (Nedelman et al., 1992, Bouaboula et al., 1992). Dieser Bezug ist zulässig, solange die PCR noch nicht die Plateauphase erreicht hat. Die Verdünnungen des Standards sind so zu wählen, daß der Bereich, in dem  $A_t$  gleich  $A_s$  ist, dargestellt wird. Rückschließend auf die eingesetzten Konzentrationen bedeutet dies:  $N_{0t}$  ist gleich  $N_{0s}$ , so daß die eingesetzte Konzentration des Targets ermittelt ist (Piatak Jr. et al., 1993). Eine zusammenfassende Darstellung der Verhältnisse von Target und Standard zeigt Abb. 1.5.

Neben der Polymerase-Kettenreaktion lassen sich weitere Methoden zur Quantifizierung von mRNA finden, auf die in Kap. 4.2.1. eingegangen wird. Auch die PCR selbst wurde immer wieder modifiziert, bis es gelang, durch einen kompetitiven Ansatz eine höchstmögliche Verlässlichkeit und Genauigkeit der Ergebnisse zu erzielen (Kap. 4.2.2.). Sie stellt somit die Methode dar, um mit höchster Sensitivität - bei vertretbarem Arbeitsaufwand - eine genaue Quantifizierung von RNA Molekülen durchzuführen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine kompetitive PCR zur Messung der mRNA-Expression von TGF-beta-1 und LTBP-1 in Hepatic Stellate Cells der Rattenleber entwickelt. Als Standard dienten zum Target homologe, exogene DNA-Sequenzen, die 68 bp (ratLTBP-1) bzw. 56 bp (ratTGF-beta-1) kürzer waren.



**Abb. 1.5.:** Schematische Darstellung der Zusammenhänge der kompetitiven PCR.

(a) Konstante Konzentrationen des Targets ( $N_{0t}$ ) werden mit einer Verdünnungsreihe des Standards ( $N_{0s}$ ) koamplifiziert. Die Signalintensität der Banden (b) entspricht dem Verhältnis beider Sequenzmengen nach PCR (c). Hierbei bestimmt der relative Konzentrationsüberschuß eines Reaktionspartners die jeweilige Dichte der Darstellung (%IntOD). Sind beide Reaktionspartner in gleicher Konzentration vorhanden, so sind auch die Bandenstärken identisch.

(d) Der Logarithmus des Verhältnisses von Target zu Standard ( $\text{Log } R_{t/s}$ ) wird über die bekannten Eingangskonzentrationen des Standards ( $N_{0s}$ ) aufgetragen und die Eingangskonzentration des Targets ( $N_{0t}$ ) bei  $\text{Log}_{t/s} = 0$  ( $t/s = 1$ ) abgelesen (zur Auswertung siehe auch Kap. 3.6.2.).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Versuchstiere

Im Mittel 650 g schwere, männliche Sprague-Dawley Ratten, Charles-River Wiga GmbH, Sulzfeld wurden für die Präparation verwendet.

#### 2.1.2. Reagenzien

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 2-Mercaptoethanol                             | Merck, Darmstadt            |
| 5x AMV-Puffer                                 | Boehringer, Mannheim        |
| 10x Taq-Puffer (mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> ) | Boehringer, Mannheim        |
| 100-base-pair-ladder                          | Boehringer, Mannheim        |
| Agarose, analytical grade                     | Biozym, Hess. Oldendorf     |
| Ampicillin                                    | Sigma, Deisenhofen          |
| Ampuwa®                                       | Fresenius, Bad Homburg      |
| β-Mercaptoethanol                             | Merck, Darmstadt            |
| Borsäure                                      | Merck, Darmstadt            |
| Bromphenolblau                                | Merck, Darmstadt            |
| BSA   | Sigma, Deisenhofen          |
| Chloroform                                    | Merck, Darmstadt            |
| DEPC  | Sigma, Deisenhofen          |
| DMEM  | Boehringer, Mannheim        |
| dNTP-Mix, ultra pure, 1,25 mM                 | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| dNTP-Mix, ultra pure, 2,0 mM                  | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| DTT, 0,1 M                                    | Gibco BRL, Eggenstein       |
| Essigsäure, konz.                             | Riedel-de Haen, Seelze      |
| Ethanol, absolut                              | Riedel-de Haen, Seelze      |

|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| Ethidiumbromid, 10 mg/ml                                     | Sigma, Deisenhofen                  |
| FKS  | PAA, Linz, Österreich               |
| Glycerin   | Merck, Darmstadt                    |
| Guanidiniumthiocyanat  | Sigma, Deisenhofen                  |
| HBSS   | PAA, Linz, Österreich               |
| HBSS, ohne Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup>                | PAA, Linz, Österreich               |
| IPTG   | Sigma, Deisenhofen                  |
| Isoamylalkohol   | Merck, Darmstadt                    |
| JetSorb DNA Extraction Kit                                   | Genomed, Bad Oeynhausen             |
| Ketavet, 100 mg/ml   | Pharmacia & Upjohn Grp., Heppenheim |
| LB-Platten   | Sigma, Deisenhofen                  |
| L-Glutamine, 200 mM  | Flow Laboratories, Bonn             |
| NaOH   | Merck, Darmstadt                    |
| Natriumacetat  | Merck, Darmstadt                    |
| Natriumcitrat  | Merck, Darmstadt                    |
| N-Laurosylsarkosyl   | Sigma, Deisenhofen                  |
| Nycodenz, analytical grade                                   | Nycomed AS, Oslo, Norwegen          |
| Oligo-dT-Primer, 0,5 mg/ml                                   | Gibco BRL, Eggenstein               |
| Original TA Cloning Kit                                      | Invitrogen, NV Leek, Niederlande    |
| PBS-Dulbecco-Pulver, ohne Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup> | Biochrom KG, Berlin                 |
| Penicillin/Streptomycin                                      | Biochrom KG, Berlin                 |
| Phenol   | Roth, Karlsruhe                     |
| Qiagen Plasmide Kit  | Qiagen, Hilden                      |
| QIAquick PCR Purification Kit                                | Qiagen, Hilden                      |
| Rompun, 2%   | Bayer, Leverkusen                   |
| SDS  | Sigma, Deisenhofen                  |
| SOC-Medium   | Sigma, Deisenhofen                  |
| Titriplex II   | Merck, Darmstadt                    |
| Titriplex III  | Roth, Karlsruhe                     |
| Tris-Base  | Roth, Karlsruhe                     |
| Trypanblau   | Riedel-de Haen, Seelze              |
| X-Gal  | Sigma, Deisenhofen                  |

Zitronensäure

Merck, Darmstadt

Alle weiteren Chemikalien stammten aus kommerziellen Quellen und hatten die höchste verfügbare Reinheit.

### 2.1.3. Labormaterialien

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| Braunüle, MT2-G1, 7 cm                   | Braun, Melsungen            |
| Cell Scraper                             | Costar, Cambridge, UK       |
| Clean Bench                              | Heraeus, Hanau              |
| Elektrophoresegerät                      | Pharmacia, Freiburg         |
| Gewebekulturflaschen, 750 ml             | Greiner, Frickenhausen      |
| Inkubationsschrank                       | Heraeus, Hanau              |
| Kühlzentrifuge                           | Hermle, Wehingen            |
| Millidisk, Cartridge Filter Unit, 0,2 µm | Millipore, Eschborn         |
| Mixer                                    | Eppendorf, Hamburg          |
| Multiwell Zellkulturplatten              | Greiner, Frickenhausen      |
| Neubauer-Zählkammer                      |                             |
| Nylongaze, 20 TI-56                      | Nytral, Thal, Schweiz       |
| Petrischalen                             | Greiner, Frickenhausen      |
| Photometer                               | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| pH-Meter                                 | WTW, Weilheim               |
| Pumpenschläuche                          | Ismatech, Zürich, Schweiz   |
| Reaktionsgefäße, save-lock, 0,5 ml       | Eppendorf, Hamburg          |
| Reaktionsgefäße, 1,5 ml                  | Eppendorf, Hamburg          |
| Reaktionsgefäße, 2 ml                    | Eppendorf, Hamburg          |
| Schlauchpumpe, Typ I P-12                | Ismatech, Zürich, Schweiz   |
| Siliconschläuche, 3 mm                   | Kobe, Marburg               |
| Thermocycler Trioblock                   | Biometra, Göttingen         |
| UV-Transilluminator mit Kamera           | MWG Biotech, Ebersberg      |
| Wasserbad                                | Köttermann, Hänigsen        |
| Water Purification System                | Millipore, Eschborn         |

|                                    |                        |
|------------------------------------|------------------------|
| Zentrifuge mit Ausschwingrotor     | Sigma, Deisenhofen     |
| Zentrifugenröhrchen, steril, 50 ml | Greiner, Frickenhausen |

#### 2.1.4. Enzyme

|                                    |                      |
|------------------------------------|----------------------|
| 10x Trypsin/EDTA                   | Boehringer, Mannheim |
| AMV-Reverse Transkriptase, 25 U/ml | Boehringer, Mannheim |
| Collagenase H                      | Boehringer, Mannheim |
| Desoxyribonuklease                 | Boehringer, Mannheim |
| Enzymes for molecular biology      | Boehringer, Mannheim |

*Kit, bestehend aus div. Enzymen und den entsprechenden Puffern, u. a:*

Restriktionsendonuklease EcoR I

|                          |                      |
|--------------------------|----------------------|
| Pronase E                | Merck, Darmstadt     |
| RNAse-Inhibitor, 40 U/ml | Boehringer, Mannheim |
| Taq-Polymerase, 1 U/μl   | Boehringer, Mannheim |

#### 2.1.5. Bakterienstämme

|                                 |                    |
|---------------------------------|--------------------|
| Escherichia coli, TOP 10' cells | Sigma, Deisenhofen |
|---------------------------------|--------------------|

#### 2.1.6. Primer

ratLTBP-1 Primer Roth, Karlsruhe

→ Sense-Primer:

P14: 5' > GGA CTT CAG TGA ACA GTA TGG < 3'

→ Antisense-Primer:

M13: 5' > GGC TTG TCA GAT GGT ACG < 3'

→ Standard-Primer:

M13M11: 5' > AGA TGG TAC GCA TCC GAT TAT TCA GCT CG < 3'

### ratS6-Primer

Roth, Karlsruhe

→ Sense-Primer:

rS6f: 5' > ATG AAG CTG AAT ATC TCC TTC < 3'

→ Antisense-Primer:

rS6r: 5' > TTA TTT TTG ACT GGA CTC AGA < 3'

### ratTGF-beta-1 Primer

Roth, Karlsruhe

→ Sense-Primer:

P36: 5' > TTC AAT ACG TCA GAC ATT CG < 3'

→ Antisense-Primer:

M21: 5' > GGT TGT GTT GGT TGT AGA GG < 3'

→ Standard-Primer:

M21M17: 5' > GTT GTA GAG GAC AGA AGT TGG CAT GGT AGC < 3'

Der Hybrid-Primer zur Amplifikation des jeweiligen Standards von ratLTBP-1 (M13M11) und ratTGF-beta-1 (M21M17) bestand zum Teil aus der Nucleotidfolge des Minusprimers (M13 bzw. M21). Diese Entsprechungen sind unterstrichen dargestellt.

## 2.1.7. Lösungen und Puffer

### 2.1.7.1. Präparation von Hepatic Stellate Cells aus der Rattenleber

#### 2.1.7.1.1. Stocklösungen

##### HBSS, modifiziert, ohne NaCl:

HBSS ohne NaCl wurde zum Lösen des Nycodenz angesetzt. Hierzu wurden folgende Substanzen mit Ampuwa® angelöst:

|         |                                 |
|---------|---------------------------------|
| 1,000 g | D-Glukose                       |
| 0,400 g | KCl                             |
| 0,060 g | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |

|         |   |
|---------|---|
| 0,200 g | MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                |
| 0,350 g | NaHCO <sub>3</sub>                                    |
| 0,060 g | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O |

Um ein Ausfällen zu vermeiden, wurden 0,185 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O in einem separaten Gefäß gelöst und unter ständigem Rühren dem obigen Ansatz zugefügt.

Die Lösung wurde dann auf etwa 700 ml mit Ampuwa® aufgefüllt und ein pH-Wert von 7,3 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung bis zum Endvolumen von 1.000 ml mit Ampuwa® aufgefüllt und sterilfiltriert.

#### HBSS, modifiziert, mit BSA:

2,5 g BSA pro 1.000 ml HBSS wurden unter 30minütigem Rühren gelöst und durch eine Filterpatrone (0,2 µm) unter geringem Druck sterilfiltriert.

#### Nycodenz Stocklösung (28,7% (w/v), in HBSS ohne NaCl):

Zu 200 ml HBSS ohne NaCl wurden 71,75 g Nycodenz gegeben und unter Schütteln innerhalb von 1 bis 2 Stunden vollständig gelöst.

Anschließend wurde ein pH-Wert von 7,3 eingestellt, die Lösung auf 250 ml mit HBSS ohne NaCl aufgefüllt und, nach Sterilfiltration, à 25 ml in Greinerröhrchen aliquotiert.

Die fertige Nycodenz-Stocklösung hatte eine Osmolalität von 320 - 330 mosmol/kg und einen Brechungsindex von 1,378.

#### Trypanblau Stocklösung:

0,5 g Trypanblau wurden in 100 ml PBS gelöst.

#### DMEM mit Glutamin:

Aus dem Gesamtvolumen des Mediums (500 ml) wurden 10 ml entnommen und durch 10 ml Glutamin (200 mM) ersetzt, so daß die Konzentration von Glutamin im Medium 4 mM betrug.

Penicillin/Streptomycin:

10.000 IU Penicillin wurden mit 10 mg/ml Streptomycin in PBS gelöst.

### 2.1.7.1.2. Gebrauchslösungen

Lösung 1:

200 ml HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$

Lösung 2:

350 mg Pronase E in 100 ml HBSS mit NaCl

Lösung 3:

15 mg Kollagenase (0,57 U/mg) in 60 ml HBSS mit NaCl

Lösung 4:

100 mg Pronase E und 10 mg DNase in 100 ml HBSS mit NaCl

Alle Lösungen wurden auf 37 °C erwärmt. Lösung 4 wurde erst unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

### 2.1.7.2. Aussaat der Zellen

Kulturmedium:

Auf ein Endvolumen von 50 ml wurden 5 ml FKS (10%), 0,5 ml Penicillin/Streptomycin (1%) und 0,1 ml Insulin (entspricht einer Aktivität von 1 IE in 50 ml Kulturmedium) mit DMEM aufgefüllt.

1x Trypsin:

Die 10x Stocklösung wurde im Verhältnis 1:10 mit HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  verdünnt.

### 2.1.7.3. Präparation der Gesamt-RNA aus HSC/MFB

Sämtliche Reagenzien hatten die höchste verfügbare Reinheit. Alle Lösungen wurden - soweit möglich - vor Gebrauch autoklaviert.

#### DEPC-H<sub>2</sub>O (0,1% (v/v)):

1 ml DEPC wurde in 1 Liter Aqua bidest. über Nacht eingerührt und danach autoklaviert.

#### Natriumcitrat (1,0 M, pH 7,0):

294,10 g Natriumcitrat wurden in 900 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und der pH-Wert mittels Zitronensäure auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde das Endvolumen von 1 Liter mit DEPC-H<sub>2</sub>O eingestellt.

#### N-Laurosylsarkosyl (10% (w/v)):

10,00 g N-Laurosylsarkosyl wurden in 100 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

#### Natriumacetat (2,0 M, pH 4,2):

164,06 g wasserfreies Natriumacetat wurden in 240 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Der pH-Wert von 4,2 wurde mit konzentrierter Essigsäure und das Endvolumen von 1 Liter mit DEPC-H<sub>2</sub>O eingestellt.

#### Wassergesättigtes Phenol (pH 4,5):

100,00 g Phenol wurden im Überschuß mit DEPC-H<sub>2</sub>O vermischt und im Wasserbad bei 65 °C so lange gelöst, bis zwei Phasen zu erkennen waren, wobei die untere die Phenolphase darstellte.

#### Chloroform/Isoamylalkohol (25:1):

28 ml Chloroform wurden mit 2 ml Isoamylalkohol vermischt.

#### Ethanol (70% (v/v)):

70 ml Ethanol absolut wurden mit 30 ml DEPC-H<sub>2</sub>O vermischt.

Denaturierungslösung:

125,00 g Guanidiniumthiocyanat wurden bei 37 °C in 146 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und 8,8 ml Natriumcitrat (1,0 M, pH 7,0) und 13,2 ml N-Laurosylsarkosyl (10% (w/v)) zugegeben.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden pro 100 ml Lösung 720 µl 2-Mercaptoethanol zugegeben.

#### 2.1.7.4. Agarosegelelektrophorese

SDS (10% (w/v)):

10,00 g SDS wurden in autoklaviertem Aqua bidest. gelöst.

EDTA (0,5 M, pH 8,0):

14,61 g Titriplex II wurden in 60 ml Aqua bidest gelöst und ein pH-Wert von 8,0 mit NaOH eingestellt. Nach Auffüllen auf 100 ml wurde diese Lösung autoklaviert.

Tris-HCL (1,0 M, pH 7,5):

121,13 g Tris-Base wurden in 800 ml Aqua bidest gelöst, ein pH-Wert von 7,5 eingestellt, auf 1 l mit Aqua bidest aufgefüllt und autoklaviert.

10x DNA-Proben-Auftragspuffer:

34,9 ml Glycerin (86%), 10,0 ml SDS (10% (w/v)), 10,0 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0), 1,0 ml Tris-HCl (1,0 M, pH 7,5) und 0,3 g Bromphenolblau wurden auf 100 ml mit autoklaviertem Aqua bidest aufgefüllt.

10x TBE-Puffer (pH 8,3):

540,00 g Tris-Base, 275,00 g Borsäure und 37,00 g Titriplex III wurden auf 5 l mit autoklaviertem Aqua bidest. aufgefüllt und ein pH-Wert von 8,3 (mit Borsäure oder Tris-Base) eingestellt.

### 1x TBE-Puffer

Der 10x TBE-Puffer wurde im Verhältnis 1:10 mit autoklaviertem Aqua bidest. verdünnt.

### 2.1.8. Software

ONE-Dscan, v. 1.0

PCRPLAN

Scanalytics

PC/GENE

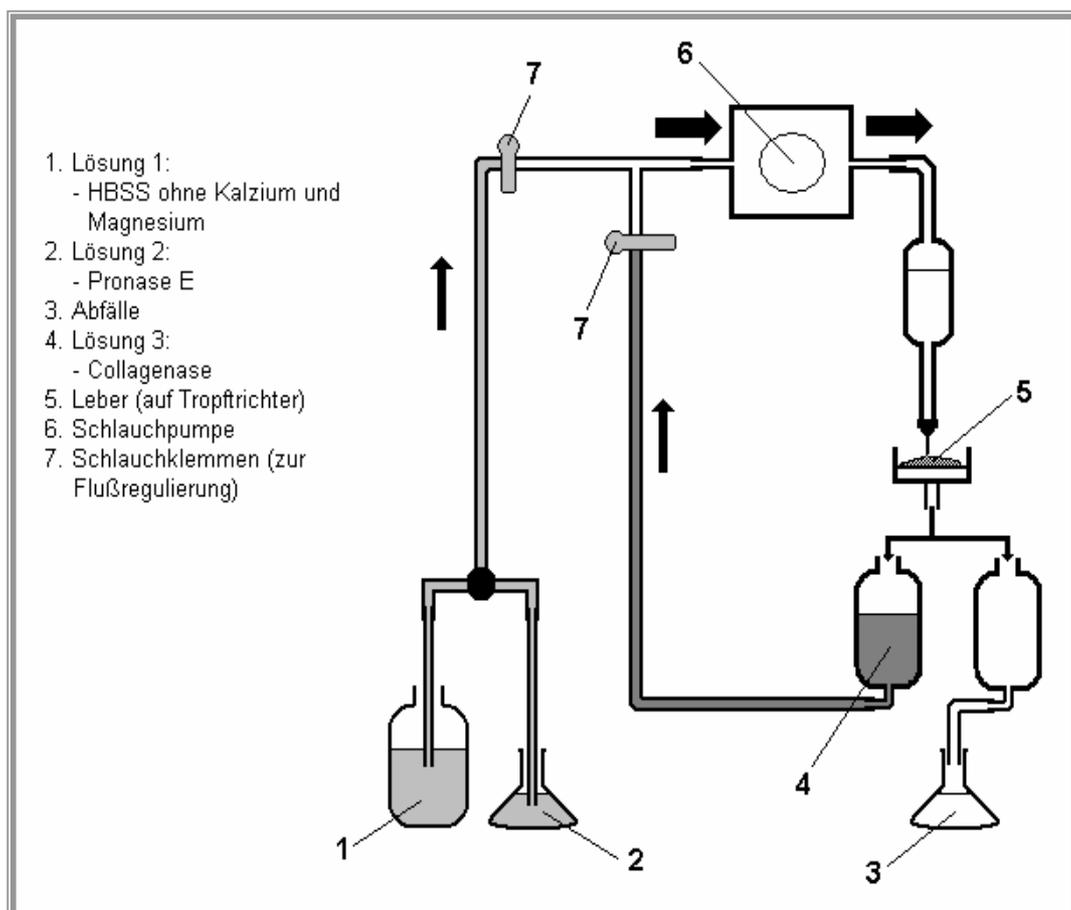
## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Präparation von Hepatic Stellate Cells (HSC, syn. ITO-Zellen, Fettspeicherzellen, Sternzellen)

##### 2.2.1.1.1. Aufbau der Perfusionsapparatur

Die Perfusionsapparatur (siehe Abb. 2.1.) wurde in einem Inkubationsschrank bei 37 °C aufgebaut und das Schlauchsystem mit Lösung 1 aufgefüllt.



**Abb. 2.1.:** Schematische Darstellung des Perfusionsystems

### 2.2.1.1.2. Durchführung der Zell-Präparation

Hepatic Stellate Cells (HSC) der Rattenleber wurden nach etablierten Verfahren isoliert (Schäfer et al., 1987). Die Präparation wurde über die Pronase-Kollagenase Methode durchgeführt (Knook et al., 1982) und die HSC durch Dichtegradientenzentrifugation mit Nycodenz separiert.

Zur Narkotisierung der Ratte wurden 100 mg Ketavet/kg und 7 mg Rompun/kg gemischt und i.m. injiziert. Die Bauchhaut der Ratte wurde rasiert, desinfiziert, das Abdomen eröffnet und vorsichtig die V. portae mit der Braunüle kanüliert. Weiter wurde die Braunüle fixiert und anschließend mit dem Perfusionssystem verbunden, wobei darauf zu achten war, daß keine Luftblasen in das System gelangten.

Als erstes wurde Lösung 1 mit einer Flußrate von 10 ml/min eingepumpt. Um eine ungehinderte Perfusion der Leber zu gewährleisten, wurde direkt nach dem Anschluß des Perfusionssystems die Aorta abdominalis des Tieres eröffnet. Während der in-situ-Perfusion mit Lösung 1 wurde die Leber sorgsam, ohne die Kapsel zu beschädigen, herausgelöst.

Nach Freipräparation der Leber wurde, nach kurzem Anhalten der Pumpe, auf Lösung 2 umgeschaltet und die Perfusion auf einem Tropftrichter im Inkubationsschrank bei 37 °C fortgesetzt.

Nach dem Aufbrauchen der 100 ml von Lösung 2 wurde das System auf Lösung 3 umgestellt und die rezirkulierende Perfusion für 30 min mit einer Flußrate von 10 ml/min begonnen. Kurz vor Beendigung der rezirkulierenden Perfusion wurde die Lösung 4 angelöst und auf 37 °C erwärmt.

Die Leber wurde in eine sterile Petrischale überführt und von Zwerchfell, Bindegewebe und Gefäßen befreit. Nach dem Übergießen der Leber mit einem Teil von Lösung 4 (50 ml) wurde diese mittels Pinzette zerkleinert und in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt. Hierzu wurde dann die restliche Lösung 4 gegeben und die Zellsuspension im Wasserbad bei 37 °C für 10 min gerührt. Während dieser Zeit wurde der pH-Wert konstant bei 7,3 gehalten und etwaige Abweichungen mit 1N NaOH korrigiert. Nachdem die Zellen steril durch

Nylongaze in Greinerröhrchen à 50 ml filtriert worden waren, wurde mit 4 °C kaltem HBSS nachgespült.

Nach Zentrifugation (450 g, 4 °C, 7 min) wurde der Überstand dekantiert und das verbliebene Zellpellet pro Röhrchen in 2 ml 4 °C kaltem HBSS + BSA resuspendiert.

Es folgte die Dichtegradientenzentrifugation, wofür die Zellsuspension zunächst in einen sterilen, vorgekühlten Meßzylinder überführt wurde. Die erforderlichen Mengen an HBSS+BSA und Nycondenz, die der Suspension zugefügt wurden, hingen von der erhaltenen Sedimentmenge ab (siehe Tab. 2.1.)

**Tab. 2.1.:** Mengenverhältnisse für den Dichtegradienten in Abhängigkeit von der Zellsedimentmenge

| <b>Sedimentmenge</b> | <b>Ad x ml<br/>HBSS + BSA</b> | <b>Nycodenz-<br/>Stocklösung</b> | <b>Endvolumen</b> | <b>Benötigte<br/>Röhrchen</b> |
|----------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| bis 15 ml            | 28,5 ml                       | 11,5 ml                          | 40 ml             | 2                             |
| bis 25 ml            | 43,0 ml                       | 17,4 ml                          | 60 ml             | 3                             |
| bis 35 ml            | 57,0 ml                       | 23,0 ml                          | 80 ml             | 4                             |
| bis 45 ml            | 71,5 ml                       | 28,5 ml                          | 100 ml            | 5                             |
| bis 55 ml            | 85,5 ml                       | 34,5 ml                          | 120 ml            | 6                             |

Nach Mischen von Zellen und Reagenzien wurde die entsprechende Anzahl Zentrifugenröhrchen bereitgestellt und jeweils 6 ml HBSS+BSA (4 °C) vorgelegt. Je 20 ml der Zellsuspension wurden unterschichtet und bei 1.400 x g und 4 °C für 22 min zentrifugiert.

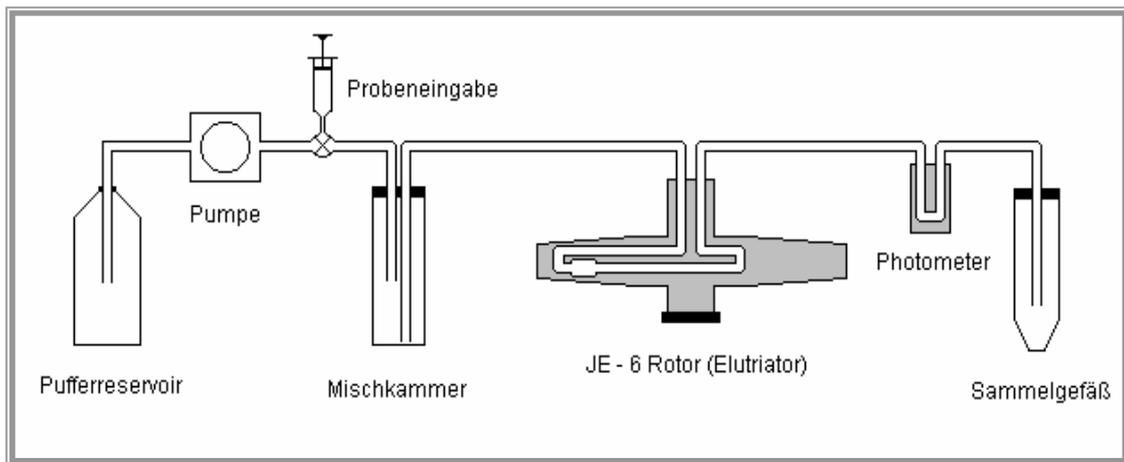
Die HSC-Bande wurde vorsichtig aus dem Gradienten entnommen, auf 50 ml mit HBSS aufgefüllt und bei 450 x g und 4 °C für weitere 7 min zentrifugiert. Dieser Versuchsschritt war aufgrund der Kontaminationsgefahr mit Kupfer- oder Endothelzellen für die resultierende Reinheit der Zellen erforderlich (siehe auch Kap. 2.2.1.1.4. Reinheitskontrolle der Zellen).

Die zentrifugierten Zellen wurden, nach Dekantieren des Überstandes, in 1x DMEM aufgenommen und elutriert.

### 2.2.1.1.3. Zell-Elutriation

Um die Reinheit der Zellen zu erhöhen, mußten sie vor der Weiterverwendung elutriert werden (Separation in Abhängigkeit von Masse und Größe).

Das Elutriationssystem bestand aus einer Zentrifuge, einem entsprechenden Rotor (JE - 6 Rotor (Elutriator)) und einem Photometer mit Durchlaufküvette (siehe Abb. 2.2.).



**Abb. 2.2.:** Schematischer Aufbau des Elutriationssystems

Die Elutriation erfolgte bei 4 °C und 2.500 rpm. Der Puffer als Träger der Zellen bestand aus HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  und enthielt 1% FKS (v/v) und 1% Penicillin/Streptomycin. Dieser Puffer konnte in verschiedenen Flußraten in das System gepumpt werden, um den gewünschten Zelltyp zu isolieren. (siehe Tab. 2.2.)

Der Fluß der Zellen wurde photometrisch überwacht, und nachdem die HSC gesammelt waren, wurden sie bei 450 x g für 7 min zentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets in 1x Dulbecco-Medium resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

**Tab 2.2.:** Korrelation der jeweiligen Flußraten zu den isolierten Zelltypen

| Elutrierter Zelltyp | Flußrate [ml/min] |
|---------------------|-------------------|
| HSC                 | 13,5              |
| EC                  | 22,0              |
| KC                  | 41,0              |

#### 2.2.1.1.4 Reinheitskontrollen der Zellen

Zur Kontrolle der Präparation wurde zunächst eine Vitalitätsbestimmung mit 0,25%igem Trypanblau durchgeführt und der Vitalitätsindex bestimmt:

$$\text{Vit. [\%]} = (\text{lebende Zellen} / (\text{lebende} + \text{tote Zellen})) \times 100$$

Um etwaige Kontaminationen mit typfremden Zellen wie z.B. Kupfferzellen, Endothelzellen oder Hepatozyten zu erkennen, wurden die Zellen nach erfolgter Elutriation und vor Aussaat mikroskopisch, färberisch sowie immunzytochemisch verifiziert (siehe Tab. 2.3.).

**Tab. 2.3.:** Darstellung allgemeiner Differenzierungskriterien der einzelnen Zell-Subpopulationen der Leber. (+) = vorhanden/darstellbar, (-) = nicht vorhanden/nicht darstellbar. (siehe auch Kap. 3.1.)

| Zelltyp | Desmin | Vimentin | Dil-Ac-LDL | Latex | Peroxidase | APAAP ED2 | RT-PCR Biglycan/Decorin |
|---------|--------|----------|------------|-------|------------|-----------|-------------------------|
| KC      | -      | +        | +          | +     | +          | +         | -                       |
| EC      | -      | +        | +          | -     | -          | -         | -                       |
| HSC     | +      | +        | -          | -     | -          | -         | +                       |
| PC      | -      | -        | -          | -     | +          | -         | -                       |

Im Hinblick auf die später erfolgte quantitative RT-PCR wurden insgesamt drei solcher HSC-Präparationen aus drei verschiedenen Lebern durchgeführt und jede isoliert als Doppelbestimmung in Aussaat gebracht.

#### 2.2.1.1.5. Zell-Aussaat

Pro Gewebekulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) wurden 3,5 x 10<sup>6</sup> Zellen ausgesät, wobei darauf zu achten war, daß sich die Zellen in einer möglichst homogenen Suspension befanden. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Die nicht adhärenen Zellen wurden ca. 4 bis 6 h nach Aussaat durch Mediumwechsel entfernt.

Zur Erstellung einer zeitlichen Kinetik wurden die HSC in ihrem Wachstum nach jeweils 2, 4 und 6 d gestoppt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Präparation der RNA bei -80 °C gelagert. Zudem wurden frisch präparierte HSC zur Vervollständigung der Zellreihe ohne Kultivierung tiefgefroren (0d).

Um die Transformation der Zellen zu MFB auszulösen wurden 6 d kultivierte HSC nach Mediumabnahme dreimal mit 15 ml HBSS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gewaschen. Anschließend wurden 2 ml 1x Trypsin hinzugefügt und die Zellen für 15 min bei 37 °C inkubiert.

Nach erfolgter Ablösung der Zellen wurden diese in 15 ml Kulturmedium aufgenommen, bei 30 x g kurz abzentrifugiert und, nach Dekantieren des Überstandes, in 15 ml Medium resuspendiert.

Die erneute Aussaat der Zellen erfolgte zu den gleichen Bedingungen wie die Erstaussaat der HSC.

Die transformierten MFB wurden nach 4 d gestoppt und ebenfalls bei -80 °C bis zur RNA-Isolation gelagert.

## 2.2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Das verwendete Material wurde vor Gebrauch - soweit möglich - für 6 Stunden bei 180 °C gebacken. Benutzte Einmalartikel waren steril oder wurden zuvor autoklaviert. Die verwendeten Lösungen und Puffer (siehe Kap. 2.1.7.3.) waren DEPC-behandelt und wurden vor Gebrauch - soweit möglich - autoklaviert. Gesamt-RNA wurde im folgenden über eine saure Phenol-Extraktion isoliert (Chomczynski et al., 1987).

Die Zellen wurden auf Eis mit 400-500 µl Denaturierungslösung lysiert. Die Zellsuspension wurde vom Boden der Kulturschalen abgeschabt und solange durch eine 0,6 mm Kanüle geschert, bis sie nicht mehr viskos war. Beim Überführen in ein 2 ml Eppendorf-Cup wurde das Volumen der Zellsuspension bestimmt, 0,1 Volumen Natriumacetat (2,0 M, pH 4,2) und 1 Volumen wassergesättigtes Phenol (pH 4,5) zugegeben und gut vermischt. Sodann wurden 0,2 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol zugesetzt, 20 s gründlich geschüttelt und die Lösung anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Die zugegebenen, anteiligen Volumina bezogen sich jeweils auf das erhaltene Volumen der Zellsuspension. Nach Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C für 20 min wurde die wässrige Phase entnommen und - nach genauer Volumenbestimmung - in ein separates Eppendorf-Cup überführt. Die RNA wurde dann durch Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem 70%igem Ethanol über Nacht bei -20 °C präzipitiert.

Nach erneutem Zentrifugieren (14.000 x g, 4 °C, 30 min) wurde der Überstand vollständig dekantiert und das erhaltene RNA-Pellet mit 1 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation (14.000 x g, 4 °C, 5 min) wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet getrocknet und in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 150 µl Denaturierungslösung (ohne Mercaptoethanol) resuspendiert.

Nach erneutem Ausfällen der RNA in 500 µl abs. Ethanol für 1 Stunde bei -20 °C und Zentrifugation für 20 min bei 14.000 x g und 4 °C wurde der Überstand

dekantiert und das Pellet mit 1 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend folgte ein nochmaliger Zentrifugationsschritt (14.000 x g, 4 °C, 5 min), der Überstand wurde entfernt, das Pellet sorgfältig getrocknet und je nach zu erwartendem RNA-Gehalt in 25-100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Die Quantifizierung der präparierten RNA erfolgte durch photometrische Messung bei 260 nm. Die Reinheit der RNA wurde durch den Quotienten OD 260/280 nm bestimmt, der idealerweise zwischen 1,8 und 2,2 liegen sollte. Weiter wurde die Qualität der aus der Präparation erhaltenen RNA durch Darstellung in einem Agarosegel (siehe auch Kap. 2.2.2.2.) überprüft. 1 µg Gesamt-RNA wurde hierzu in einem einprozentigen Agarosegel (50 ml 1xTBE, 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)) bei 10 V/cm Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die ribosomalen Anteile der RNA mit einem UV-Transilluminator visuell dargestellt und mit einer digitalen Kamera fotografiert.

#### 2.2.2.2. Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Zunächst wurde 1 µg Gesamt-RNA in einem Reaktionsgefäß (save-lock, 0,5 ml) in 7,5 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt und 2 µl Oligo-dT- Primer hinzugefügt. RNA und Primer denaturierten für 10 min bei 70 °C im Thermocycler, so daß in der Zwischenzeit der Reaktionsansatz hergestellt werden konnte, welcher aus folgenden Komponenten bestand:

6,0 µl 5x AMV-Puffer; 3,0 µl DTT; 8,0 µl dNTP-Mix (1,25 mM/Nukleotid); 1,5 µl RNase-Inhibitor und 2,0 µl AMV Reverse Transkriptase. Gemäß der Anzahl der cDNA-Synthesen wurden die jeweiligen Mengen entsprechend multipliziert und ein Mastermix angesetzt.

Nach dem Denaturieren wurden RNA und Primer für 1 min auf Eis gestellt, um eine Renaturierung beider Komponenten zu verhindern. 20,5 µl des Reaktionsansatzes wurden nach sorgfältigem Mischen und kurzem Abzentrifugieren (max. 5 s) dann zum RNA/Primergemisch hinzugefügt, erneut kurz zentrifugiert und anschließend zurück in den Thermocycler gestellt. Die weitere Reaktion lief dann für 10 min bei 25 °C (Anlagerung der Primer an den RNA-Strang), anschließend für 1 Stunde bei 42 °C (Ergänzung zum

komplementären DNA-Strang) und letztlich für 5 min bei 95 °C (Denaturierung der Reversen Transkriptase) ab.

Die Qualität und Sauberkeit der cDNA zum einen, die Möglichkeit von Kreuzkontaminationen zum anderen wurde in mehreren Schritten überprüft:

Parallel zur Synthese der cDNA wurde über einen Leerwert die Qualität der verwendeten Reagenzien überprüft. Hierzu wurden 7,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O ohne RNA in die Reaktion eingebracht.

Eine weitere Kontrolle der cDNA erfolgte über den Nachweis von ratS6, einem ribosomalen Protein, welches unter anderem in HSC und MFB ubiquitär exprimiert wird. Dieser Nachweis geschah mittels PCR, die Primer hierfür wurden nach bereits veröffentlichten Sequenzen (Chan et al., 1988) synthetisiert (Größe des Amplifikates: 750 bp). Im Gegensatz hierzu sollte es bei der Amplifikation des Leerwertes aus der cDNA-Synthese in der Geldarstellung keine Signale geben, da ansonsten von einer Kontamination der verwendeten Reaktionskomponenten oder des Arbeitsplatzes mit DNA-Fragmenten auszugehen ist.

Um Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde zudem die präparierte Gesamt-RNA (siehe Kap 2.2.2.1., eingesetzte Menge: 1 µg) der PCR mit ratS6 ohne vorheriger reverser Transkription zugeführt, wobei auch hier keine Banden im Agarosegel registriert werden sollten.

### 2.2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Durchführung der PCR geschah an einem separaten Arbeitsplatz, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Clean-Bench wurde mit UV-Licht für mindestens 30 min vorbestrahlt und die Reaktionskomponenten für die PCR - mit Ausnahme der Polymerase - auf Eis aufgetaut. In ein steriles Reaktionsgefäß (save-lock, 0,5 ml) wurde dann 1 µl cDNA auf 10 µl mit Ampuwa® verdünnt. Entsprechend der Anzahl der Reaktionen wurde ein Mastermix hergestellt. Einfachkonzentration der Komponenten: 5,0 µl dNTP-Mix (2 mM/Nukleotid); 5,0 µl 10x Taq-Puffer (mit 15 mM MgCl<sub>2</sub>); je 5,0 µl ratS6-Primer (sense und antisense, je 10 pmol/µl); 18,0 µl steriles Ampuwa® und

zuletzt 2,0 µl Taq-Polymerase. Aus dem Mastermix wurden je 40 µl zu den verdünnten cDNA-Proben gegeben, so daß das Endvolumen jeweils 50 µl betrug. Nach kurzem Abzentrifugieren in der Kühlzentrifuge wurden die Proben in den Thermocycler gestellt, der Heizdeckel aufgesetzt und das Programm (siehe Tab. 2.4.) gestartet.

**Tab. 2.4.:** Programm für die Amplifikation von ratS6

| Zeit  | Temperatur | Schritt      | Anzahl Zyklen |
|-------|------------|--------------|---------------|
| 60 s  | 96°C       | Denaturation | 3             |
| 60 s  | 59°C       | Annealing    |               |
| 60 s  | 72°C       | Extension    |               |
| 45 s  | 94°C       | Denaturation | 36            |
| 45 s  | 59°C       | Annealing    |               |
| 60 s  | 72°C       | Extension    |               |
| 45 s  | 94°C       | Denaturation | 1             |
| 45 s  | 59°C       | Annealing    |               |
| 600 s | 72°C       | Extension    |               |

Die Amplifikate wurden nach Agarosegelelektrophorese unter UV-Licht dargestellt. Zu 10 µl des PCR-Ansatz wurde hierzu 1 µl Probenauftragspuffer gegeben, sorgfältig gemischt, kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen.

Die nachfolgenden PCR und Agarosegelelektrophoresen wurden grundsätzlich in der oben beschriebenen Art und Weise durchgeführt. Die Unterschiede betrafen jeweils die Menge und Art des Targets (Standards), das Amplifikationsprogramm (hier speziell die Annealingtemperatur und die Zyklenzahl) und die Konzentration des Agarosegels (1,0% für ratTGF-beta-1 und 1,5% für rat-LTBP-1).

## 2.2.2.4. Quantitative PCR

### 2.2.2.4.1. Synthese der Standardsequenzen

Für die kompetitive PCR war es notwendig, zum einen targetspezifische Primer zu finden, das heißt Oligonukleotidsequenzen, welche den gewünschten Bereich der jeweiligen cDNA umfassten. Zum anderen mußte ein dritter Primer gefunden werden, der in der zu amplifizierenden Sequenz lag und ein kürzeres Produkt lieferte, so daß sich beide (Target und Standard) über die Visualisierung im Agarosegel unterscheiden ließen.

Hierzu wurden mit Unterstützung der Kinderklinik der Universität Gießen über Primer-Generierungssoftware (PCR Plan v. PC Gene) Sequenzen gefunden, die unseren Anforderungen genügten (siehe Kap. 2.1.6.)

#### ratLTBP-1:

Gesamtgröße der Sequenz: 6244 bp

Größe des Targets: 324 bp

Größe des Standards: 256 bp

#### ratTGF-beta-1:

Gesamtgröße der Sequenz: 1585 bp

Größe des Targets: 640 bp

Größe des Standards: 584 bp

Die Durchführung der Standardsynthese (modifiziert nach Siebert et al., 1993) beinhaltete zunächst die Amplifikation aus der jeweiligen Zielsequenz (ratLTBP-1 und ratTGF-beta-1). Nachdem die Amplifikation mit den standardspezifischen Primern (P14 und M13M11 für ratLTBP-1, P36 und M21M17 für ratTGF-beta-1) erfolgt war, mußte anschließend, um den korrekten Einbau der Target-Antisense-Primer (M13 bzw. M21) zu gewährleisten, eine zweite PCR, diesmal mit den targetspezifischen Primern erfolgen (zur schematischen Darstellung der Standardsynthese siehe Abb. 2.3.).

Diese Reaktionen liefen jeweils auf maximalem Amplifikationsniveau mit 41 Zyklen in den jeweiligen Programmen (siehe Tab. 2.5.) ab. Das eingesetzte Volumen cDNA betrug 1,0 µl.

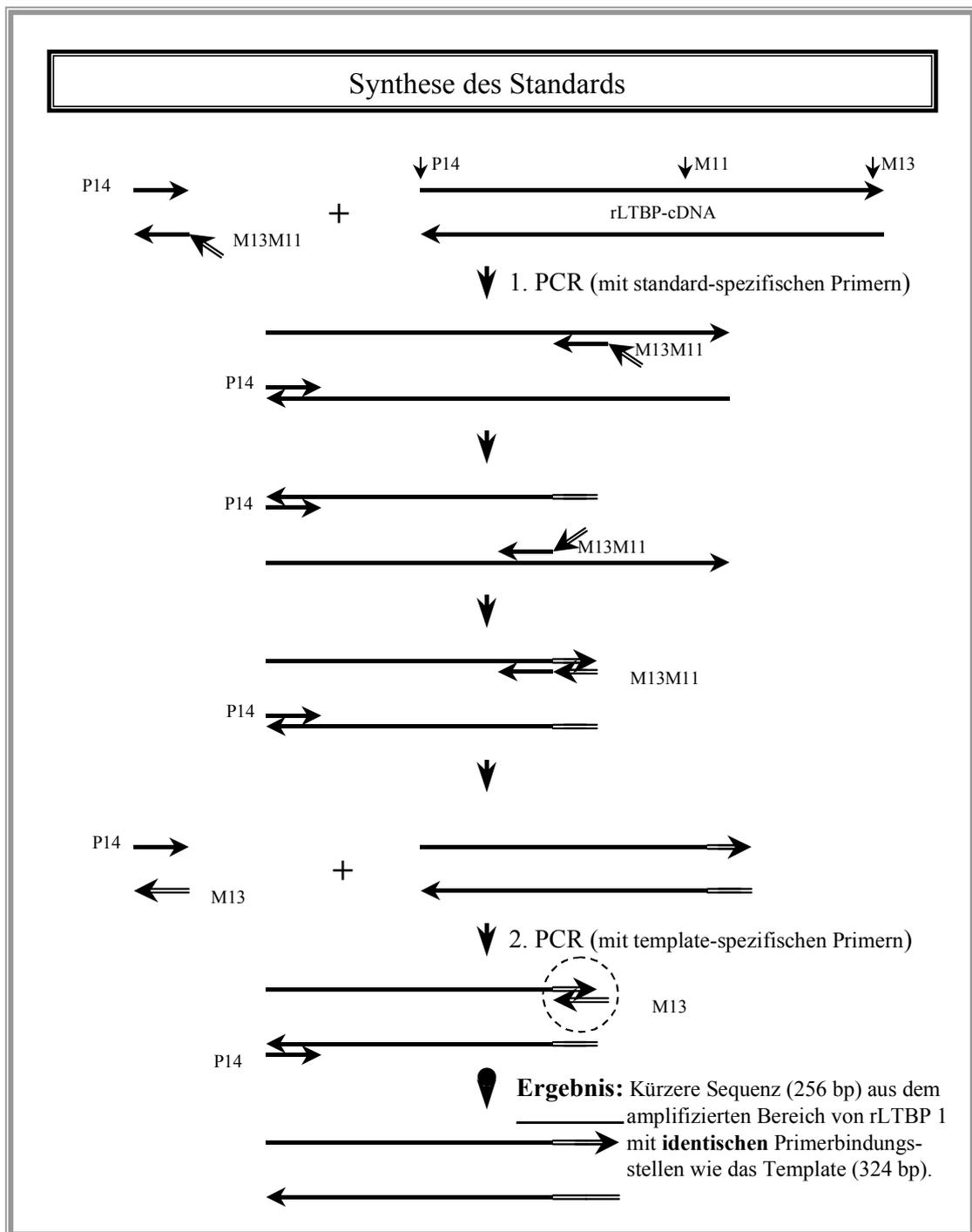
**Tab. 2.5.:** Programm für die Amplifikation der Standardsequenzen von ratLTBP-1 und ratTGF-beta-1

| Zeit  | Temp. [°C] |               | Schritt      | Zyklen |
|-------|------------|---------------|--------------|--------|
|       | ratLTBP-1  | ratTGF-beta-1 |              |        |
| 60 s  | 96         | 96            | Denaturation | 3      |
| 60 s  | 60         | 55            | Annealing    |        |
| 60 s  | 72         | 72            | Extension    |        |
| 45 s  | 94         | 94            | Denaturation | 37     |
| 45 s  | 60         | 55            | Annealing    |        |
| 60 s  | 72         | 72            | Extension    |        |
| 45 s  | 94         | 94            | Denaturation | 1      |
| 45 s  | 60         | 55            | Annealing    |        |
| 600 s | 72         | 72            | Extension    |        |

Es wäre möglich gewesen, das Produkt aus der ersten, standardspezifischen Amplifikation direkt in den nächsten (targetspezifischen) Amplifikationsschritt einzubringen. Um eine höhere Spezifität zu erreichen und potentielle Störfaktoren auszuschalten, wurde dieses Amplifikat aber zunächst durch einen Klonierungsschritt (s.u.) gereinigt und erst dann die PCR mit den targetspezifischen Primern durchgeführt:

10 µl wurden jeweils eingesetzt, wobei hierzu eine sehr hohe Verdünnung der aus der Maxipräparation (s.u.) erhaltenen Produkte gewählt wurde, um den Vektoranteil möglichst gering zu halten. Die eingesetzten Konzentrationen waren 62,5 pg cDNA (ratLTBP-1) und 77,5 pg cDNA (ratTGF-beta-1).

Als Resultat der oben beschriebenen Reaktionen entstand eine Sequenz, die mit demselben Primerpaar wie das jeweilige Target amplifiziert werden konnte, aber ein kürzeres Fragment, den Standard, lieferte.



**Abb. 2.3.:** Schematische Darstellung der Standardsynthese (modifiziert nach Methods&Applications Book 3, CLONTECH Lab.), exemplarisch für ratLTBP-1. Die Pfeilrichtung der Nucleotidstränge verläuft von 5' nach 3'.

#### 2.2.2.4.2. Isolierung der Standardsequenzen

Um die Sequenzen in eine kompetitive PCR einbringen zu können, war es notwendig, den erhaltenen Standard zu isolieren, ihn also von den restlichen Komponenten der abgelaufenen PCR zu befreien und anschließend seine genaue Konzentration zu bestimmen.

Dieses geschah zunächst mit dem JetSorb DNA Extraction Kit. Nachdem das erhaltene Amplifikat über eine Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht wurde, wurden die Banden ausgeschnitten und die Extraktion gemäß Arbeitsvorschrift des Kits durchgeführt:

Die Agarose wurde zunächst gelöst, die DNA gebunden, in mehreren Schritten gewaschen, resuspendiert und schließlich in TE-Puffer eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm, eine abschließende Geldarstellung der erhaltenen DNA dokumentierte die Richtigkeit der Extraktion.

Desweiteren wurde die Aufreinigung des amplifizierten Standards mit dem QIAquick PCR Purification Kit durchgeführt, welches eine direkte Isolierung des PCR-Produktes (ohne vorherige Geldarstellung) ermöglichte. Auch hier wurde gemäß Arbeitsvorschrift des Kits verfahren.

Schließlich, um eine weitere Vergleichsmöglichkeit zu erhalten, wurde die Isolierung des Standards durch erneute Klonierung in einen Vektor mit folgender Maxipräparation durchgeführt. Hierzu wurde das Original TA Cloning Kit verwendet:

1,5 µl Amplifikat (ratTGF-beta-1 und ratLTBP-1), 1,0 µl 10x Ligationspuffer, 2,0 µl pCR II Vektor (25 ng/µl), 4,5 µl steriles Wasser, 1,0 µl T4 DNA Ligase (4 Weiss Units) wurden vorsichtig vermischt und über Nacht bei 14 °C stehen gelassen. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit sterilem Wasser an Stelle des Amplifikates angesetzt. Es folgte die Transformation der kompetenten Bakterienzellen (*Escherichia coli* TOP 10') und die Auswahl eines geeigneten Klons für die Plasmidextraktion.

Das Wasserbad wurde auf 42 °C erhitzt und SOC-Medium sowie LB-Platten (+Ampicillin 75 µg/ml) entsprechend der Probenanzahl bei Raumtemperatur

bereitgestellt. Auf die Mediumplatten wurden dann 40 µl X-Gal und 40 µl IPTG hinzupipettiert und ausplattiert. 2 µl β-Mercaptoethanol (0,5 M) wurden zu den Bakterien (TOP 10') hinzupipettiert. Dieser Schritt wurde sehr vorsichtig auf Eis durchgeführt, da die Bakterien gegenüber mechanischen und thermischen Reizen sehr anfällig waren. Danach wurden 2 µl des Ligationsmixes zupipettiert und die Proben nach vorsichtigem Mischen für 30 min auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden die Proben für 30 s bei 42 °C hitzegeschockt und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach weiteren 2 min wurden jeweils 450 µl SOC-Medium hinzupipettiert und die Proben für 1 h bei 37 °C unter ständigem Rühren (bei 225 rpm) inkubiert.

Je 200 µl wurden dann auf eine LB-Platte gleichmäßig ausplattiert und bei 37 °C über Nacht (min. 18 h) im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wiesen die Platten im Mittel 200 bis 300 Kolonien auf, von denen ca. 80% weiß waren. Die Platte mit der Negativkontrolle ohne Amplifikat wies weniger als 50 Kolonien auf, die in der Mehrzahl blau waren.

Je 10 weiße Kolonien der Amplicon-Klone für rat-LTBP-1 und rat-TGFβ-1 wurden gepickt, d. h. in 2-3 ml LB-Medium (mit 75 µg/ml Ampicillin) inokuliert und bei 37 °C im Inkubator über Nacht geschüttelt. Die Überprüfung der präparierten Plasmide auf korrekten Einbau der PCR-Sequenzen erfolgte über eine PCR (mit den jeweils targetspezifischen Primern für ratLTBP-1 und ratTGF-beta-1) sowie über einen Restriktionsverdau mit EcoR I. Für den Restriktionsverdau wurde folgender Ansatz hergestellt:

9,7 µl steriles Wasser, 1,5 µl Puffer, 3,0 µl DNA (über eine Minipräparation mit dem Qiagen Plasmide Kit aus den Plasmiden isoliert - siehe das dem Kit beiliegende Versuchsprotokoll) und 0,8 µl EcoR I wurden zusammen für 2 h bei 37 °C inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit waren ca. 50% der Inserts enzymatisch herausgelöst. Beide Sequenzen wurden nun vergleichend auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei das über den Restriktionsverdau ausgeschnittene Produkt ca. 20 bp größer als die PCR-Sequenz war.

Nach vorheriger Anzucht in 2 ml LB-Medium plus Ampicillin (75 µg/ml) wurde die Maxipräparation der als richtig identifizierten Klone durchgeführt. Hierzu wurde gemäß Arbeitsvorschrift des Qiagen Plasmide Kits vorgegangen.

Es resultierte saubere, gut quantifizierbare Plasmid-DNA, deren Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt wurde.

Die als richtig identifizierten Plasmide wurden bei -20 °C, die entsprechenden Klone als Glycerolstock bei -80 °C aufbewahrt.

Abschließend wurden Verdünnungsstufen der Standards von ratTGF-beta-1 und ratLTBP-1 angefertigt und, in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Targets, optimiert (siehe Tab. 2.7.).

**Tab. 2.7.:** Verdünnungsreihen der Standards von ratLTBP-1 und ratTGF-beta-1. Die Ausgangskonzentration der jeweiligen Verdünnungsstufe war 1 ng/µl. A und B sind unterschiedlich konzentrierte Verdünnungsreihen beider Standards

|           | Verdünnungsreihe A für<br>ratTGF-beta-1 bzw. ratLTBP-1 |                          | Verdünnungsreihe B für<br>ratTGF-beta-1 bzw. ratLTBP-1 |                          |
|-----------|--|--------------------------|--|--------------------------|
|           | Verdünnung<br>(1:x)                                    | Konzentration<br>(pg/µl) | Verdünnung<br>(1:x)                                    | Konzentration<br>(pg/µl) |
| <b>1</b>  | 100  | 10                       | 1.000  | 1,0                      |
| <b>2</b>  | 200  | 5                        | 2.000  | 0,5                      |
| <b>3</b>  | 400  | 2,5                      | 4.000  | 0,25                     |
| <b>4</b>  | 800  | 1,25                     | 8.000  | 0,125                    |
| <b>5</b>  | 1.600  | 0,63                     | 16.000   | 0,063                    |
| <b>6</b>  | 3.200  | 0,31                     | 32.000   | 0,031                    |
| <b>7</b>  | 6.400  | 0,16                     | 64.000   | 0,016                    |
| <b>8</b>  | 12.800   | 0,08                     | 128.000  | 0,008                    |
| <b>9</b>  | 25.600   | 0,04                     | 256.000  | 0,004                    |
| <b>10</b> |  |                          | 512.000  | 0,002                    |
| <b>11</b> |  |                          | 1.024.000  | 0,001                    |
| <b>12</b> |  |                          | 2.048.000  | 0,0005                   |
| <b>13</b> |  |                          | 4.096.000  | 0,00025                  |

#### 2.2.2.4.3. Durchführung der quantitativen PCR

Bevor die eigentliche Quantifizierung durchgeführt werden konnte, war es notwendig, die cDNA-Konzentrationen der einzelnen Proben innerhalb einer Präparation abzugleichen. Dieses geschah über die Amplifikation von ratS6:

1 µl cDNA der 0, 2, 4 und 6 d alten HSC, sowie der 4 d alten MFB aus den drei Präparationen wurden in Doppelbestimmung amplifiziert, wobei das Programm noch deutlich vor Erreichen der Plateauphase nach 25 Zyklen beendet wurde. 10 µl des Amplifikates wurden anschließend, nach Zugabe von 1 µl Probenauftragspuffer, auf einem einprozentigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden von ratS6 wurden unter UV-Licht dargestellt und das Bild digital abgespeichert. Durch den Vergleich der optischen Dichte der Banden konnten diese über entsprechende Software (ONE-Dscan, s. u.) in Bezug zueinander gesetzt und rechnerisch angeglichen werden, so daß innerhalb einer Zellreihe stets gleiche Mengen an cDNA in die PCR eingesetzt wurden.

Aus der cDNA der drei Zellreihen (0, 2, 4, 6 d kultivierte HSC und 4 d kultivierte MFB) wurden die Target- und Standardsequenzen von ratLTBP-1 und ratTGF-beta-1 koamplifiziert:

Es wurden je 10 µl des jeweiligen Standards in den Verdünnungsstufen B6 bis B11 (siehe Tab. 2.7.) in Reaktionsgefäße, save-lock, 0,5 ml pipettiert. Hierzu wurden die über den ratS6-Abgleich ermittelten Volumina der cDNA aus den Zellreihen gegeben, beide Komponenten vermischt und kurz (5 s) abzentrifugiert. Der Mastermix wurde - wie bereits beschrieben - angesetzt und die Proben auf das jeweilige Endvolumen von 50 µl ergänzt. Nach Mischen und kurzem Abzentrifugieren starteten die Reaktionen in den entsprechend programmierten Thermocyclern (siehe Tab. 2.8.).

**Tab 2.8.:** Programm für die kompetitive Amplifikation von Target und Standard aus den Sequenzen von ratLTBP-1 und ratTGF-beta-1.

| Zeit  | Temp. [°C] |               | Schritt      | Zyklen |
|-------|------------|---------------|--------------|--------|
|       | ratLTBP-1  | ratTGF-beta-1 |              |        |
| 60 s  | 96         | 96            | Denaturation | 3      |
| 60 s  | 60         | 55            | Annealing    |        |
| 60 s  | 72         | 72            | Extension    |        |
| 45 s  | 94         | 94            | Denaturation | 26     |
| 45 s  | 60         | 55            | Annealing    |        |
| 60 s  | 72         | 72            | Extension    |        |
| 45 s  | 94         | 94            | Denaturation | 1      |
| 45 s  | 60         | 55            | Annealing    |        |
| 600 s | 72         | 72            | Extension    |        |

Nach der Geldarstellung und Abspeicherung der Bilder wurden die optischen Dichten der Target- und Standardbanden berechnet und zueinander in Bezug gesetzt. Dieses geschah unter Zuhilfenahme von Analysesoftware (ONE-Dscan, Version 1.0, Scanalytics).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Präparation von Hepatic Stellate Cells

Die Lebern von drei Sprague-Dawley Ratten wurden an drei verschiedenen Tagen präpariert. Das Gewicht der Tiere lag bei 520 gr. (Präparation 1), 545 gr. (Präparation 2) und bei 590 gr. (Präparation 3).

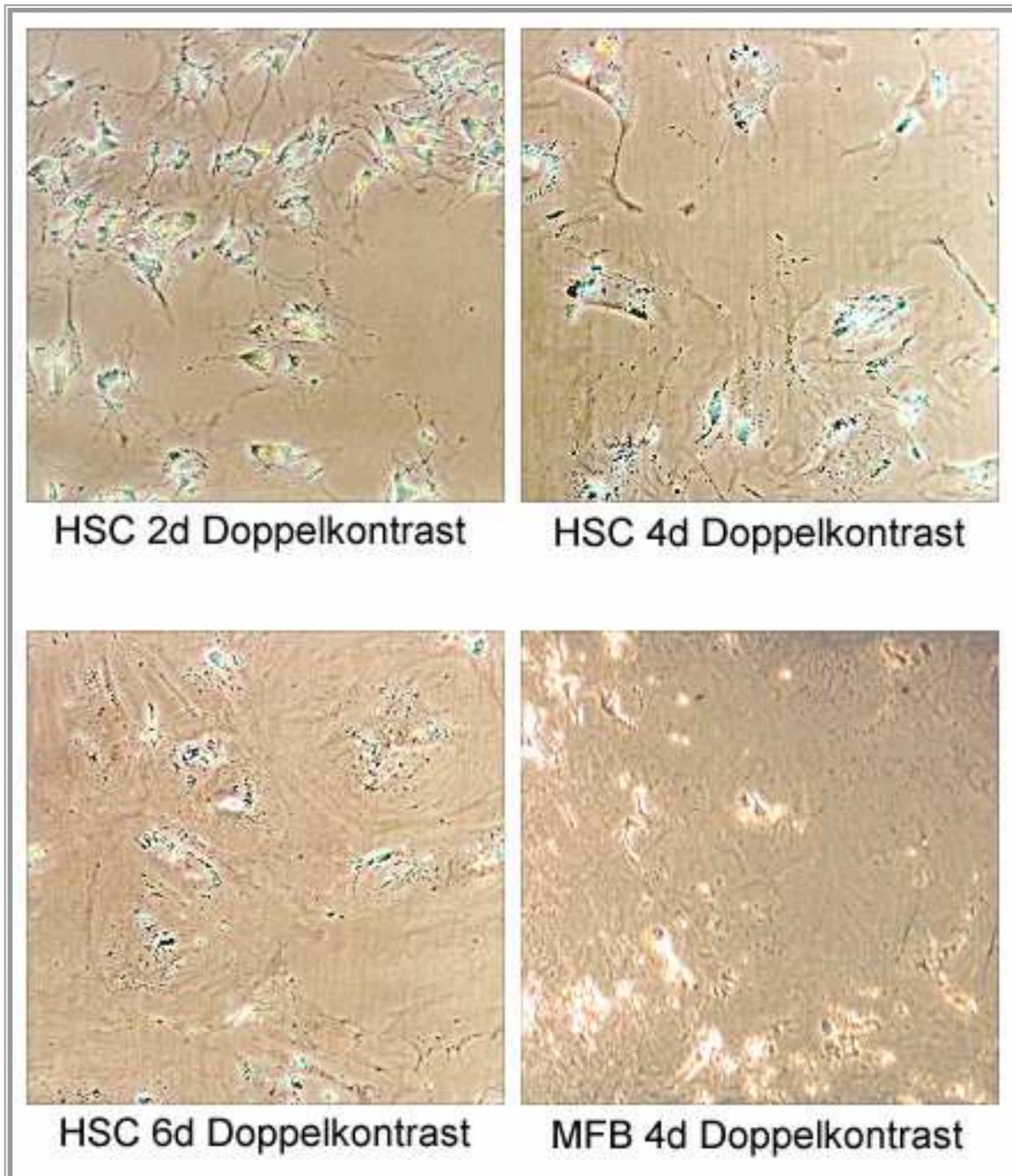
Tab. 3.1. gibt die wesentlichen Resultate der drei Zellpräparationen wieder. Zudem wird die deutliche Steigerung der Reinheit der Zellen, die durch die Elutriation erreicht werden kann, dargestellt.

**Tab. 3.1.:** Ausbeute und Reinheit (nach lichtmikroskopischen Kriterien) der präparierten ITO-Zellen vor und nach Elutriation

| <b>Präparation</b> | <b>Ausbeute<br/>vor Elutriation</b> | <b>Reinheit<br/>vor Elutriation</b> | <b>Ausbeute<br/>nach Elutriation</b> | <b>Reinheit<br/>nach Elutriation</b> |
|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>1</b>           | 42 Mio.                             | 87 %                                | 31 Mio.                              | 95 %                                 |
| <b>2</b>           | 28 Mio.                             | 73 %                                | 12 Mio.                              | 93 %                                 |
| <b>3</b>           | 52 Mio.                             | 80 %                                | 17 Mio.                              | 97 %                                 |

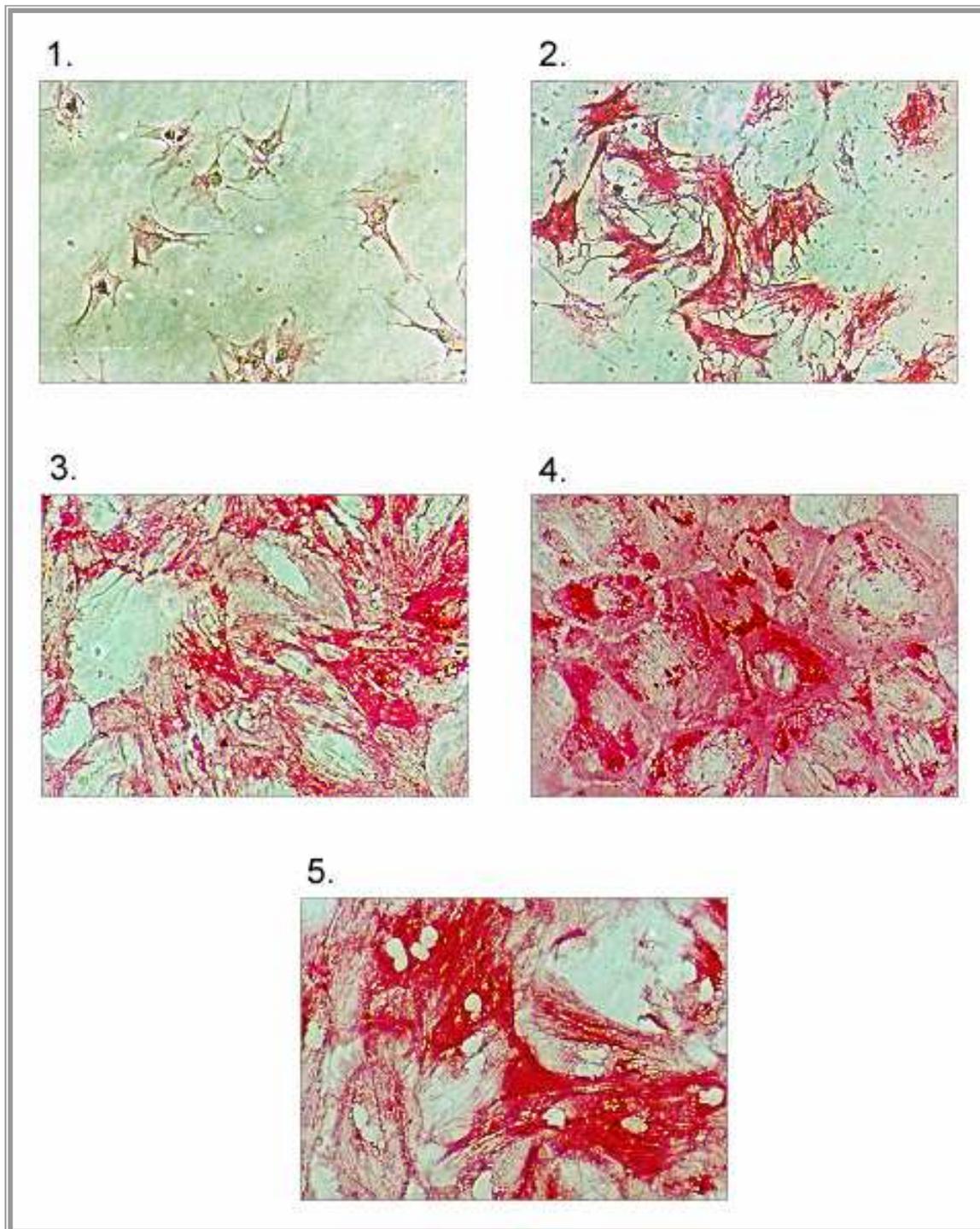
Kontaminationen mit typfremden Leberzellen (Kupfferzellen, Endothelzellen oder Hepatozyten) wurden zudem färberisch überprüft. Kupfferzellen zeigten in der Fluoreszenzmikroskopie eine positive Latex-Phagozytose. Eine Kontamination mit Endothelzellen stellte sich durch eine positive Dil-Ac-LDL-Reaktion dar (siehe auch Tab. 2.3.). Hierbei fanden sich in allen drei Präparationen vereinzelt solche fremden Zellen, daher betrug die Reinheit der ITO-Zellen auch in keinem Fall 100%. Die hier erreichten Werte von deutlich über 90% waren jedoch ausreichend, um in den folgenden, molekularbiologischen Methoden hinreichend genaue Ergebnisse zu erzielen. Die Zellen wurden anschließend ausgesät (zum Verlauf siehe Abb. 3.1.), wobei

die plating efficiency der ersten Präparation 50 %, die der zweiten 50 % und die der dritten 65 % betrug.



**Abb. 3.1.:** Verlauf der Kultivierung (200fache Vergr., Doppelkontrast).

Das Wachstum der HSC und deren Transformation zu MFB ließ sich anhand einer APAAP-Färbung von smooth-muscle-alpha-Actin verfolgen (Abb. 3.2.). Die Anfärbung erfolgte hierbei entsprechend dem Differenzierungsgrad der Zellen: Je weiter das Zellwachstum im Kulturverlauf fortgeschritten war, vor allem aber nach Transformation der HSC zu MFB, desto stärker war die Expression an sm-alpha-Actin und damit die Rotfärbung. Am ausgeprägtesten färbten sich die demnach die MFB an.



**Abb. 3.2.:** APAAP-Immunfärbung von sm-alpha-Actin in HSC und MFB unterschiedlicher Kulturdauer (200fache Vergr.).

1. Negativkontrolle (HSC, 2 d), 2. HSC 2 d, 3. HSC 4d, 4. HSC 6d, 5. MFB 4d

### 3.2. Präparation der Gesamt-RNA aus HSC/MFB

Die Präparation der RNA aus den drei Zellreihen lieferte die in Tab. 3.2. dargestellten Ergebnisse.

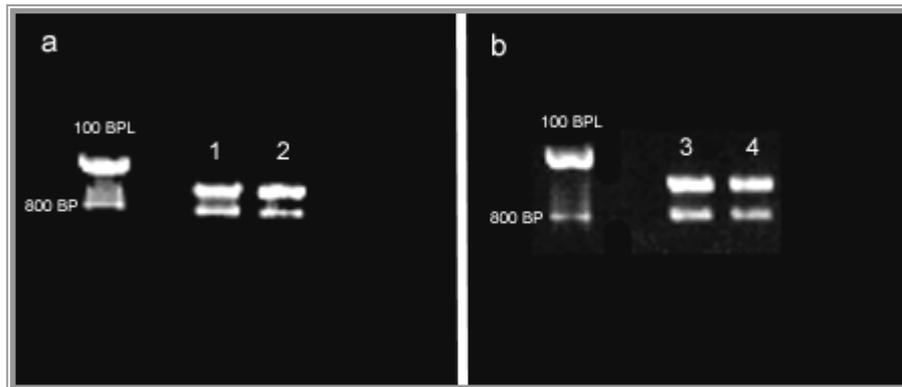
**Tab. 3.2.:** Präparation der RNA. Aufgeführt sind die Extinktionen bei 260 nm und 280 nm, das Verhältnis der beiden Extinktionswerte sowie die Totalausbeute an RNA in  $\mu\text{g}$  bezogen auf 1 ml Lösungsvolumen.

| Präparation | Zelltyp | A260 nm | A280 nm | Ratio<br>A260/A280 | Konzentration<br>der RNA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |
|-------------|---------|---------|---------|--------------------|--|
| <b>1</b>    | HSC, 0d | 0,172   | 0,116   | 1,48               | 690  |
|             | HSC, 2d | 0,259   | 0,176   | 1,47               | 1.038  |
|             | HSC, 4d | 0,156   | 0,101   | 1,54               | 625  |
|             | HSC, 6d | 0,260   | 0,172   | 1,51               | 1.042  |
|             | MFB, 4d | 0,084   | 0,056   | 1,50               | 336  |
| <b>2</b>    | HSC, 0d | 0,347   | 0,235   | 1,48               | 1.389  |
|             | HSC, 2d | 0,048   | 0,032   | 1,50               | 190  |
|             | HSC, 4d | 0,074   | 0,049   | 1,51               | 277  |
|             | HSC, 6d | 0,314   | 0,211   | 1,49               | 1.256  |
|             | MFB, 4d | 0,479   | 0,313   | 1,53               | 1.918  |
| <b>3</b>    | HSC, 0d | 0,240   | 0,155   | 1,55               | 479  |
|             | HSC, 2d | 0,048   | 0,032   | 1,50               | 96   |
|             | HSC, 4d | 0,249   | 0,154   | 1,62               | 482  |
|             | HSC, 6d | 0,564   | 0,359   | 1,57               | 1.127  |
|             | MFB, 4d | 0,270   | 0,176   | 1,53               | 540  |

Der Vergleich des jeweiligen Zelltyps innerhalb der drei Zellreihen zeigte allerdings Schwankungen in Bezug auf die Ausbeute an RNA. So lag die RNA-Konzentration von 4 d alten MFB der ersten Präparation bei 336  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , die der zweiten bei 1.918  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und die der dritten bei 540  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Das Verhältnis der Extinktionswerte (Ratio A260/A280) gab Aufschluß über die Reinheit der RNA-Präparation. Bei 260 nm lag das Extinktionsmaximum der RNA, bei 280 nm das von Phenol und denaturierten Proteinen. Die Werte der

drei beschriebenen Präparationen lagen alle sehr einheitlich zwischen 1,5 und 1,6. Zusätzliche Informationen über die Reinheit und Qualität der präparierten RNA lieferte die Darstellung im Agarosegel. Hierbei stellten sich die ribosomalen Untereinheiten der rRNA aller drei Präparationen sauber und klar abgrenzbar dar. Abb. 3.3. zeigt exemplarisch die elektrophoretische Auftrennung der RNA aus der ersten Präparation (ohne Myofibroblasten).



**Abb. 3.3.:** a) **Bahn 1:** HSC, 0 d; **Bahn 2:** HSC 2 d; b) **Bahn 3:** HSC 4 d; **Bahn 4:** HSC 6 d. (exempl. für die 1. Pröp.). Zur Orientierung wurde jeweils ein 100 base-pair-ladder (100BPL) aufgetragen, die Bande der Länge von 800 base pairs ist markiert (800 BP). Die Laufdauer von Gel b war länger als die von Gel a, daher der hier etwas weitere Abstand der Banden.

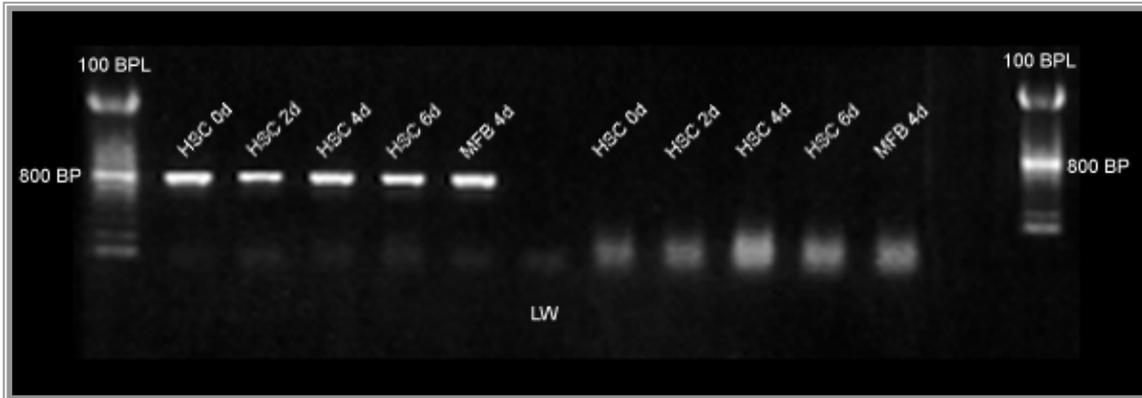
Insgesamt sollte die RNA-Elektrophorese nur so lange dauern, bis die Banden gerade unterscheidbar sind, um eine vorzeitige Denaturierung zu verhindern.

### 3.3. Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Nachdem 1 µg Gesamt-RNA in 7,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt war, wurde die Synthese nach Programm durchgeführt. Zusätzlich wurden Reaktionsansätze mit doppelten Ausgangsmengen hergestellt. Die Synthese funktionierte hierbei in beiden Fällen, wie die anschließende PCR (Anneal bei 59 °C, 41 Zyklen) mit ratS6 bewies.

Um die zuvor präparierte RNA auf Kontaminationen mit genomischer DNA zu überprüfen, wurde auch hier (eingesetzte Menge: 1 µg RNA) eine PCR mit ratS6 durchgeführt. In Abb. 3.4. stellt sich das ratS6-Amplifikat der cDNA

sauber und ohne weitere, unspezifische Banden dar. Die Elektrophorese der mit ratS6 amplifizierten RNA zeigt keine Kontamination mit genomischer DNA.



**Abb. 3.4.:** Überprüfung von cDNA und RNA (exemplarisch für die erste Präparation). Dargestellt sind jeweils ein 100 BPL zur Orientierung, die Bande der Länge von 800 BP ist markiert.

Bahn 2-6: c-DNA-Amplifikat ratS6 (750 BP) (HSC 0d - MFB 4d).

Bahn 7: LW = Leerwert (Reagenzienblank)

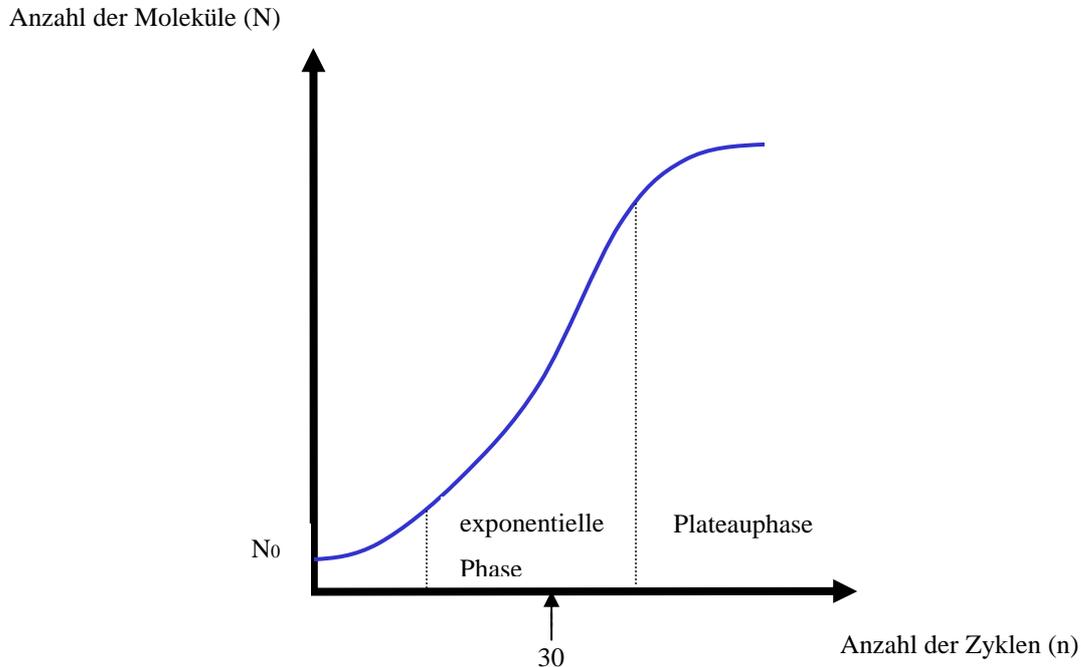
Bahn 8-12: RNA-Amplifikat ratS6 (HSC 0d - MFB 4d).

Die Darstellung bezog sich auf die erste Präparation. Für die Präparationen 2 und 3 wurden vergleichbar gute Ergebnisse erzielt.

### 3.4. Synthese der Standardsequenzen

Zunächst wurden Kontrollreaktionen mit beiden Primerpaaren (P14+M13 und P14+M13M11 für ratLTBP-1, P36+M21 und P36+M21M17 für ratTGF-beta-1) aus den jeweiligen Sequenzen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Amplifikationen unter den gegebenen Bedingungen funktionierten. Vor allem die Höhe der Annealingtemperatur und die unterste Zyklenzahl, mit der gerade noch eine Darstellung in der Agarosegelelektrophorese erreicht werden konnte, waren von Interesse. Es zeigte sich hierbei, dass eine sichere Darstellung der Sequenzen erst ab einer Gesamtzyklenzahl von 30 erreicht werden konnte. Eine weitere Erhöhung der Zyklenzahl führte zwar zu einem noch deutlicheren Signal, jedoch war die Aussagekraft der Ergebnisse einer quantitativen PCR um so eingeschränkter, je weiter sich die Reaktion der Plateauphase annäherte

(siehe hierzu Abb. 3.5.). Die ermittelten Annealingtemperaturen betragen  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  für ratLTBP-1 und  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  für ratTGF-beta-1.



**Abb. 3.5.:** Skizzierte Darstellung der Verlaufsform einer typischen PCR. Nach einem initial langsamen Beginn erreicht die Reaktion schnell die exponentielle Phase, um dann gegen Ende in die Plateauphase überzugehen. Die für die quantitative PCR benutzte Zyklenzahl von 30 wurde experimentell ermittelt und hier schematisch aufgetragen.  $N_0$ : Anzahl der Moleküle zu Beginn der Reaktion.

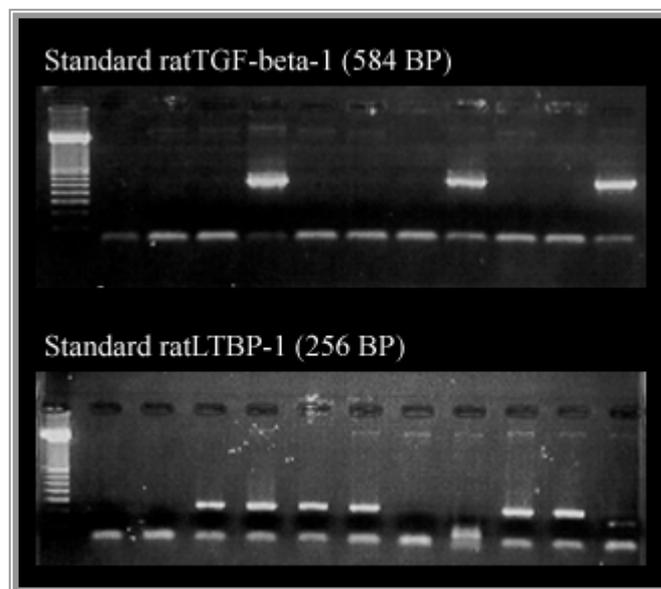
Nachdem optimale Bedingungen, unter denen die Reaktionen ablaufen konnten, ermittelt waren, wurde zuerst die PCR mit den standardspezifischen Primern durchgeführt. Die so erhaltenen, noch unvollständigen Sequenzen der Standards für ratTGF-beta-1 und ratLTBP-1 wurden danach, um sie als Ausgangsprodukt für die Synthese in dauerhaftem Zustand zu erhalten, kloniert und als Glycerol-Stock bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren (zum genauen Ablauf der Klonierung s. u.) .

Zur Vervollständigung der Sequenzen wurde anschließend eine zweite PCR, diesmal mit den targetspezifischen Primern, durchgeführt. 62,5 pg cDNA der ratLTBP-1-Sequenz und 77,5 pg cDNA der ratTGF-beta-1-Sequenz wurden hierfür eingesetzt. Die nachfolgenden Gelelektrophoresen bestätigten dann die Qualität der Reaktionen.

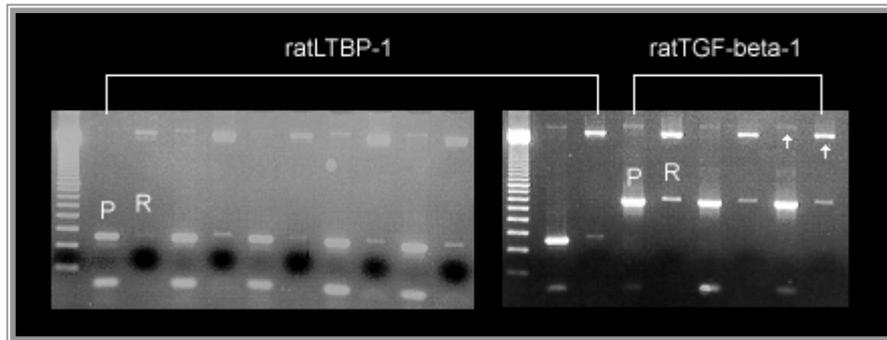
### 3.5. Isolierung der Standardsequenzen

Verschiedene Verfahren wurden angewendet, um die Standards von den übrigen Komponenten der PCR zu befreien. Wie schon zuvor wurden in einem weiteren Klonierungsschritt die beiden Standardsequenzen in einen Vektor eingebracht. Nach Inkubation wurde dann eine Minipräparation der Plasmid-DNA von je 10 positiven Kolonien durchgeführt. Den Beweis, daß die Transformation erfolgreich war, lieferte die PCR mit den entsprechenden (targetspezifischen) Primern (Abb. 3.6.).

Eine zusätzliche Überprüfung des korrekten Einbaus der jeweiligen Sequenzen in die Plasmid-DNA erfolgte durch einen Restriktionsverdau: Mit dem Restriktionsenzym EcoR I wurden die Standardsequenzen wieder aus den Plasmiden der als positiv identifizierten Kolonien herausgeschnitten, und den Produkten der PCR im Agarosegel gegenübergestellt (siehe Abb. 3.7.).



**Abb. 3.6.:** Überprüfung der Transformation: Von 10 nach der Kultivierung scheinbar positiven Kolonien waren tatsächlich bei rat-TGF-beta-1 drei, bei rat-LTBP-1 sechs Transformationen erfolgreich.  
Bahn 1: 100 BPL, jeweils rechts daneben wurde der Reagenzienleerwert aufgetragen



**Abb. 3.7.:** Vergleich der über einen Restriktionsverdau extrahierten Standards mit denen aus der PCR. Aufgetragen sind jeweils die 100 BPL als Längenmarker sowie die Sequenzen von ratLTBP-1 und ratTGF-beta-1. Im oberen Bereich der Gele (mit Pfeilen gekennzeichnet) stellt sich das Plasmid dar.

P: Standard aus PCR

R: Standard aus Restriktionsverdau

Die über den Restriktionsverdau isolierten Standards sind etwas länger als die eigentlichen Sequenzen, da die Positionen in der DNA-Sequenz, an denen das Enzym schneidet, zuaddiert werden müssen (ca. 20 BP). Folglich ist das sich darstellende Plasmid (ca. 3.900 BP) dementsprechend kleiner.

Je eine der als richtig identifizierten Kolonien wurde erneut angezchtet (in 2 ml LB-Medium + Ampicillin (75 µg/ml) bei 37 °C über Nacht) und die Maxipräparation der Plasmide durchgeführt. Diese war gegenüber der zuvor durchgeführten Minipräparation zwar wesentlich aufwendiger, das Ergebnis war allerdings auch sauberer, so daß letztlich hochreine, gut quantifizierbare Plasmid-DNA resultierte (siehe auch Tab. 3.3.)

Eine weitere Möglichkeit, die Standards aufzureinigen, war die direkte Extraktion. Zum einen wurden die Standards mit dem JetSorb Gel Extraction Kit nach erfolgter Gelelektrophorese ausgeschnitten, zum anderen der PCR-Ansatz als solcher über mehrere Zentrifugationsschritte mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt.

Unterschiede zwischen den verschiedenen Arten der Aufreinigung betrafen zunächst den Aufwand der Durchführung. So war die Klonierung der Sequenzen bei weitem am aufwendigsten und nahm zudem mehrere Tage in Anspruch, während die Verwendung des QIAquick Kits einfach war und schon

nach ca. 2 Stunden das gewünschte Produkt lieferte. Tab. 3.3. zeigt, daß auch die Ausbeute unterschiedlich war.

**Tab. 3.3.:** Photometrische Konzentrationsmessung der Standards beider Sequenzen bei 260 nm (in µg/ml).

\*Die Konzentration der Produkte aus der Klonierung (nach Plasmid-Maxipräparation) wurde rechnerisch ermittelt, da in die photometrische Bestimmung der Standards auch das Plasmid (ca. 3900 BP) einging.

|                      | JetSorb | QIAquick | Klonierung*   |          |
|----------------------|---------|----------|---------------|----------|
|                      |         |          | Gesamtplasmid | Standard |
| <b>ratTGF-beta-1</b> | 24 , 1  | 39 , 2   | 520 , 0       | 68 , 0   |
| <b>ratLTBP-1</b>     | 7 , 8   | 32 , 4   | 430 , 0       | 26 , 0   |

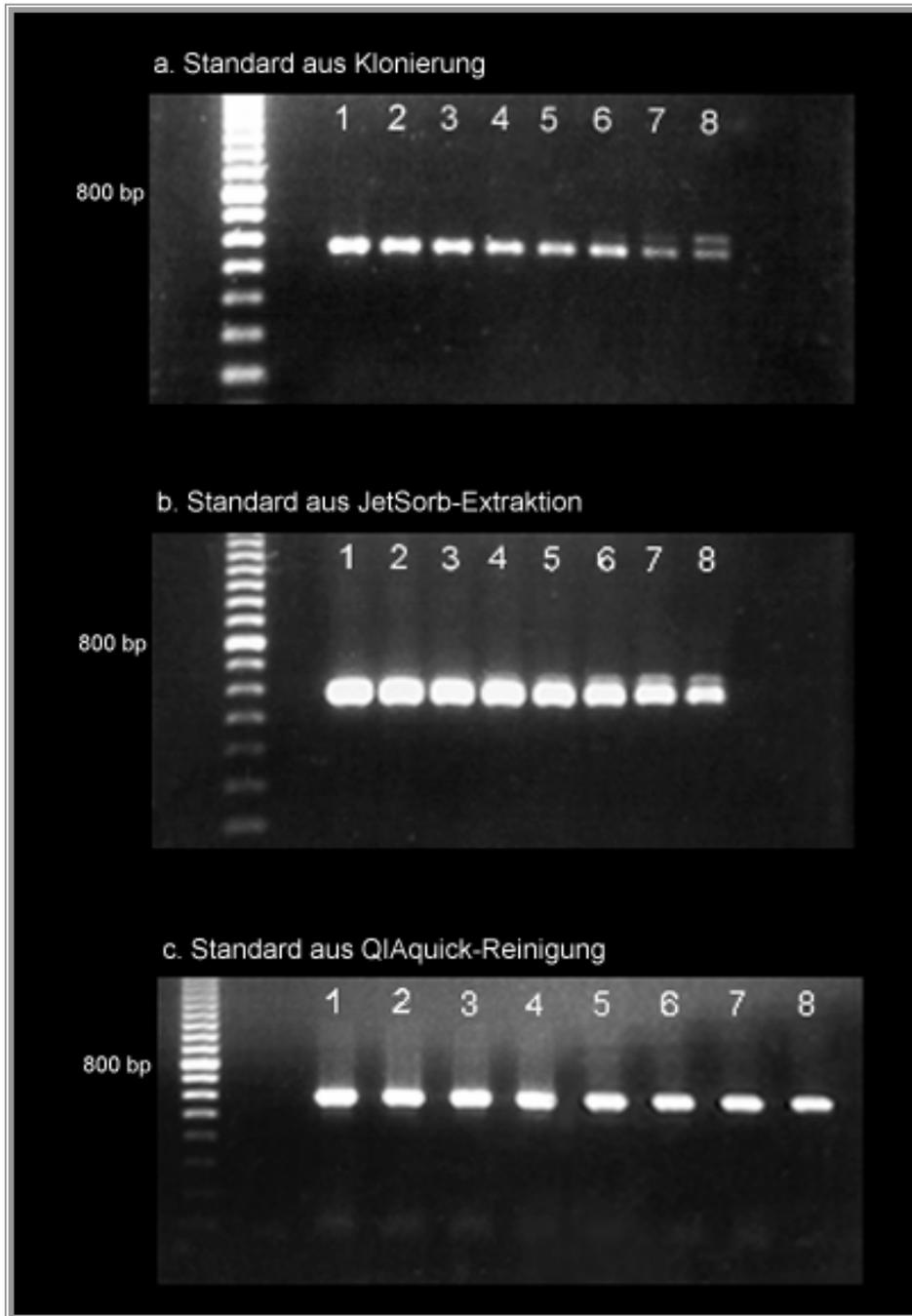
Der wesentliche Unterschied zwischen den drei Arten der Standardaufreinigung betraf die Amplifikationseffizienz. Um diesen darzustellen, wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der einzelnen Standards (A1 - A8, siehe Tab. 2.7.) hergestellt und diese mit einem Target koamplifiziert. Hierzu wurden je 10 µl der Standards (exemplarisch für ratTGF-beta-1) in den einzelnen Verdünnungen und je 2 µl cDNA von 4 d alten MFB zusammenpipettiert. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten der PCR sowie deren Ablauf wurden bereits beschrieben (Kap. 2.2.2.2. Synthese der komplementären DNA (cDNA)). Tab. 3.4. zeigt das Programm, unter dem die Reaktionen abliefen.

Anschließend folgte die elektrophoretische Darstellung in einem 1,0%igen Agarosegel. Es zeigte sich hierbei, daß die Affinität der einzelnen, unterschiedlich aufgereinigten Standards zur Reaktion - obwohl in gleicher Konzentration eingebracht - gänzlich unterschiedlich war. So waren die Standards, welche über das QIAquick Kit aufgereinigt wurden, in der PCR am sensitivsten und bereits in geringerer Konzentration signalgebend als z. B. die durch eine Klonierung gewonnenen Sequenzen.

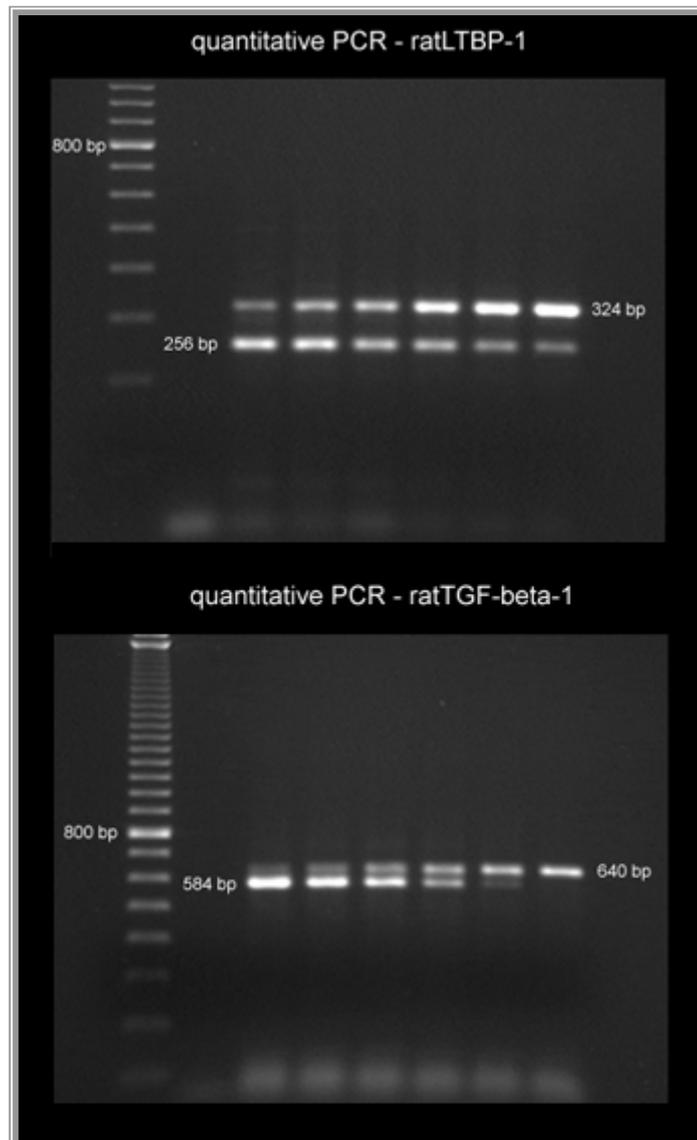
**Tab. 3.4.:** Programm für die kompetitive Amplifikation von Target und Standard aus der Sequenz von ratTGF-beta-1

| Zeit  | Temperatur | Schritt      | Anzahl Zyklen |
|-------|------------|--------------|---------------|
| 60 s  | 96°C       | Denaturation | 3             |
| 60 s  | 55°C       | Annealing    |               |
| 60 s  | 72°C       | Extension    |               |
| 45 s  | 94°C       | Denaturation | 21            |
| 45 s  | 55°C       | Annealing    |               |
| 60 s  | 72°C       | Extension    |               |
| 45 s  | 94°C       | Denaturation | 1             |
| 45 s  | 55°C       | Annealing    |               |
| 600 s | 72°C       | Extension    |               |

Abb. 3.8. zeigt, daß die Koamplifikation mit dem klonierten Standard unter den gegebenen Bedingungen (25 Zyklen) bereits eine Darstellung von sowohl Standard als auch Target (hier: 4 d alte MFB) brachte. Zudem liegt der Äquivalenzpunkt bei etwa 0,8 pg. Der JetSorb-Standard stellt sich in der kompetitiven PCR bereits deutlich stärker dar, die cDNA der Myofibroblasten ist jedoch noch signalgebend. Bei Verwendung des QIAquick-Standards liegt dieser soweit im Konzentrationsüberschuß vor, daß das Target nicht mehr dargestellt wird.



**Abb. 3.8.:** Vergleich der auf unterschiedlichen Wegen aufgereinigten Standards von ratTGF-beta-1, hier exemplarisch koamplifiziert mit 2 µl der cDNA von 4 d kultivierten MFB. Der Standard wurde in der Verdünnungsreihe A1 bis A8 (Tab. 2.7.) in die Reaktion eingebracht. Target: 640 bp, Standard: 584 bp. Aufgetragen wurden jeweils der 100 base-pair-ladder, folgend der Reagenzienleerwert, dann die Koamplifikate: **1)** MFB, 4d + 100 pg Standard, **2)** + 50 pg, **3)** + 25 pg, **4)** + 12,5 pg, **5)** + 6,3 pg, **6)** + 3,1 pg, **7)** + 1,6 pg, **8)** + 0,8 pg (es wurden jeweils 10 µl der Konzentrationsreihe eingesetzt).



**Abb. 3.9.:** Quantitative PCR im optimalen Verdünnungsbereich der Standards. Aufgetragen sind jeweils der 100 BPL, folgend der Reagenzienleerwert und die Koamplifikate (Standardkonzentrationsreihe B6 bis B11, Tab 2.7.). Gelkonzentration: ratTGF-beta-1: 1%, ratLTBP-1: 1,5%

Die folgenden, quantitativen Reaktionen wurden mit den über das QIAquick PCR Purification Kit erhaltenen Standardsequenzen für ratTGF-beta-1 und ratLTBP-1 durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode lag zum einen in der sehr einfachen Durchführung, die - verglichen mit den beiden anderen Methoden - zudem auch am wenigsten manipulativ war, zum anderen haben die

Ergebnisse aus vergleichenden Messungen (s.o.) gezeigt, daß dieser Standard in der kompetitiven PCR am sensitivsten reagiert.

Zur Durchführung der Quantifizierungsreaktionen wurde zunächst eine Verdünnung experimentell ermittelt, die für beide Sequenzen den Äquivalenzpunkt darstellt (siehe Tab. 2.7. und Abb. 3.9.). Die Verdünnung lag sowohl bei ratTGF-beta-1 als auch bei ratLTBP-1 im selben Bereich. Dieser umfaßte die Standardkonzentrationen von 0,031 pg/µl bis 0,001 pg/µl.

### 3.6. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 3.6.1. Konzentrationsabgleich über ratS6

In allen Zellen - unabhängig von Alter und Typ - von *rattus norvegicus* wird das ribosomale Protein S6 in gleichen Konzentrationen exprimiert. Vor der Quantifizierung wurde eine Konzentrationsbestimmung von ratS6-RNA (bzw. cDNA) durchgeführt, um sicherzustellen, daß die in einer quantitativen PCR festgestellten Konzentrationsunterschiede tatsächlich auf einen unterschiedlichen Expressionsgehalt an mRNA von TGF-beta-1 und LTBP-1 zurückzuführen sind, und nicht auf zufälligen Fehlern (z.B. während der RNA-Isolierung oder cDNA-Synthese) beruhen.

Zunächst wurde überprüft, ob diese Art der Angleichung verlässliche Ergebnisse lieferte. In Vierfachbestimmung wurde eine Zellreihe von 0, 2, 4, 6 d kultivierten HSC und 4 d kultivierten MFB (eingesetzte Menge: 1 µl cDNA) mit ratS6 im exponentiellen Bereich amplifiziert (Tab. 2.4., 25 Zyklen), im Agarosegel dargestellt und photometrisch mittels ONE-Dscan ausgewertet (siehe auch Kap. 3.6.2.). Tab. 3.6. zeigt die Verteilung der optischen Dichten (OD) und dementsprechend der Konzentrationen der eingesetzten cDNA innerhalb des untersuchten Feldes. Das stärkste Signal wurde dann als 100% gesetzt und die in die PCR eingebrachten Mengen der anderen, schwächer dargestellten, cDNA-Proben dementsprechend angeglichen.

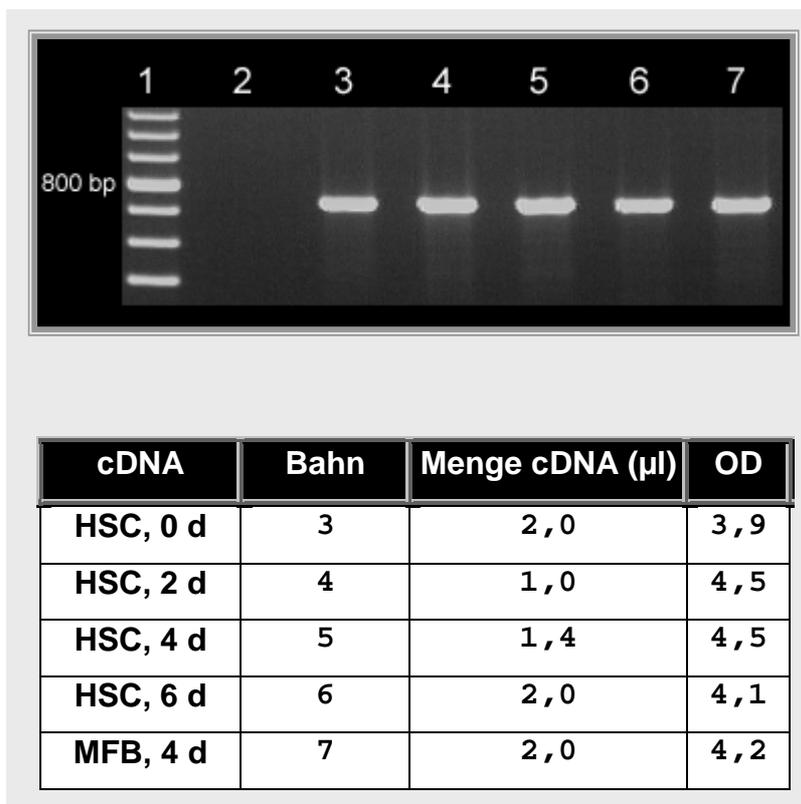
Abb. 3.14. zeigt die PCR einer Zellreihe nach Angleichung mit ratS6. Eingesetzt wurden hierbei 2,0 µl der cDNA von 0 d HSC, 1,0 µl von 2 d HSC, 1,4 µl von 4 d

HSC, 2,0 µl von 6 d HSC und 2,0 µl von 4 d MFB. Die photometrische Auswertung der OD zeigt den Erfolg der Angleichung.

Dieser Abgleich wurde bei allen drei Zellreihen durchgeführt und die so angepaßten Mengen der cDNA in die quantitative PCR eingebracht (siehe Kap. 3.6.4.).

**Tab 3.6.:** Angleichung der cDNA-Synthesen durch Vergleich der ratS6-Amplifikation im exponentiellen Bereich (exempl. für die 1. Präp.). Die optische Dichte (OD) der jeweiligen Bande wurde über ONE-Dscan ermittelt. Das stärkste Signal lieferte die cDNA von HSC, 2d der ersten PCR (6,2). Dieser Wert wurde als 100% gesetzt und die OD der restlichen cDNAs prozentual zum Maximum berechnet.

| cDNA                | PCR | OD  | OD % vom Maximum | Volumen für die quant. PCR |
|---------------------|-----|-----|------------------|----------------------------|
| <b>HSC,<br/>0 d</b> | 1   | 3,1 | 50,6             | 2,0 µl                     |
|                     | 2   | 3,5 | 56,2             | 1,8 µl                     |
|                     | 3   | 2,9 | 47,9             | 2,1 µl                     |
|                     | 4   | 3,3 | 54,1             | 1,8 µl                     |
| <b>HSC,<br/>2 d</b> | 1   | 6,2 | 100,0            | 1,0 µl                     |
|                     | 2   | 5,7 | 92,2             | 1,1 µl                     |
|                     | 3   | 4,5 | 73,7             | 1,4 µl                     |
|                     | 4   | 5,9 | 96,1             | 1,0 µl                     |
| <b>HSC,<br/>4 d</b> | 1   | 4,4 | 71,8             | 1,4 µl                     |
|                     | 2   | 4,5 | 73,9             | 1,4 µl                     |
|                     | 3   | 4,7 | 76,5             | 1,3 µl                     |
|                     | 4   | 4,7 | 75,6             | 1,3 µl                     |
| <b>HSC,<br/>6 d</b> | 1   | 3,1 | 49,5             | 2,0 µl                     |
|                     | 2   | 2,5 | 39,9             | 2,5 µl                     |
|                     | 3   | 3,5 | 56,5             | 1,8 µl                     |
|                     | 4   | 4,2 | 67,9             | 1,5 µl                     |
| <b>MFB,<br/>4 d</b> | 1   | 3,1 | 50,3             | 2,0 µl                     |
|                     | 2   | 3,9 | 64,1             | 1,6 µl                     |
|                     | 3   | 3,9 | 63,6             | 1,6 µl                     |
|                     | 4   | 4,1 | 66,9             | 1,5 µl                     |

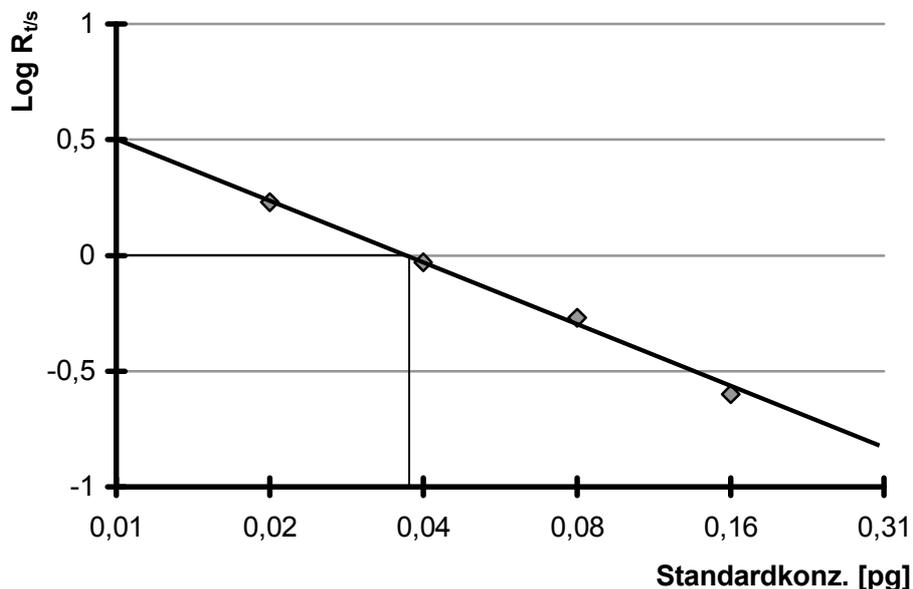


**Abb. 3.14.:** RatS6-PCR (25 Zyklen) einer Zellreihe mit angeglichenen Mengen cDNA. Bahn 1: 100 BPL, Bahn 2: Reagenzienleerwert, Bahn 3 bis 6: siehe Tab.

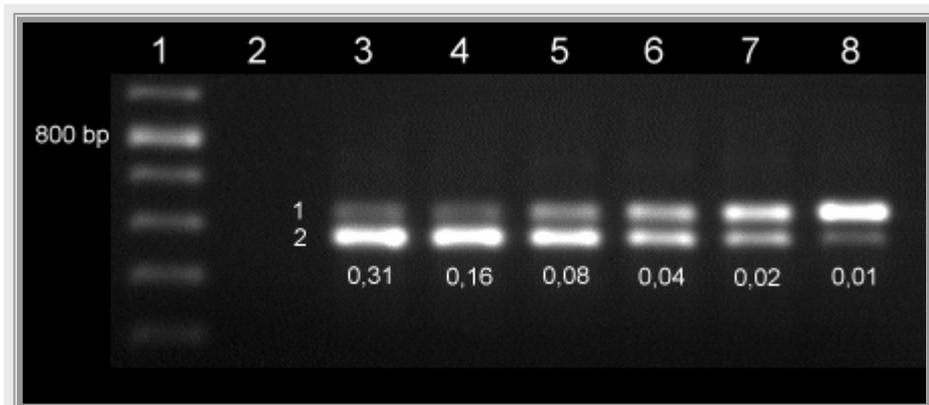
### 3.6.2. Auswertung der quantitativen PCR

Nach Durchführung der Agarosegelelektrophorese wurden die Banden unter UV-Licht dargestellt, die Gele digital abfotografiert und im ‚Tagged-Image File Format (TIFF)‘ abgespeichert (UV-Transilluminator mit Kamera, MWG Biotech, Ebersberg). Die weitere Analyse wurde mittels Software durchgeführt (ONE-Dscan, v. 1.0, Scanalytics), welche die optische Dichte der dargestellten Banden ausmaß und in Bezug zueinander setzte. Die beiden Banden der quantitativen PCR (Standard und Target) wurden zusammen als 100% gewertet und der jeweilige Anteil, den Standard und Target einnahmen, errechnet (%IntOD). So ließ sich - im optimalen Verdünnungsbereich des Standards - das Verhältnis ermitteln, bei dem die Signalintensität von Standard- und Targetbande gleich war. Im Rückschluß auf die eingesetzten Konzentrationen

war in diesem Äquivalenzpunkt die zuvor unbekannte Konzentration des Targets gleich der bekannten Konzentration des Standards. In Abb. 3.16. stellt sich der Äquivalenzpunkt auf Bahn 6 bei einer eingesetzten Standardkonzentration von 0,04 pg dar. Hier ist die Signalintensität der Standardbande (51,8%) am ehesten gleich der der Targetbande (48,2%). Nach rechnerischer Mittellung ( $48,2/51,8 * 0,04$ ) ergibt sich in diesem Falle eine Targetkonzentration von 0,037 pg (relativ zum Standard). Da es praktisch nur ausnahmsweise vorkam, daß das Verhältnis beider Banden im Äquivalenzpunkt genau 50% zu 50% war, wurde die genaue Targetkonzentration in jedem Fall (mehr oder minder deutlich) rechnerisch angeglichen. Graphisch wurde der Äquivalenzpunkt durch Auftragen des Logarithmus vom Quotienten der beiden Amplifikationsprodukte ( $\text{Log } R_{t/s}$ ) gegen die eingesetzte Standardkonzentration dargestellt (Abb. 3.15.). Wenn die Signalintensitäten von Target und Standard identisch waren, betrug dieser Quotient genau 1, der Logarithmus entsprechend 0 und demnach ist hier die Konzentration des Targets gleich der des Standards.



**Abb. 3.15.:** Darstellung der Regressionsgeraden für den linearen Bereich der quantitativen PCR. Der Logarithmus des Quotienten der Amplifikationsprodukte ( $\text{Log } R_{t/s}$ ) ist als Funktion der eingesetzten Standardkonzentration aufgetragen. Bei  $\text{Log } R_{t/s} = 0$  läßt sich die Konzentration von 0,037 pg für den Standard und somit auch für das Target ablesen. Siehe auch Abb. 3.16.



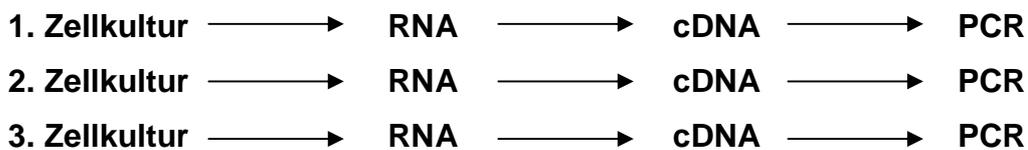
| Bahn | Bande        | %IntOD | Log R <sub>ts</sub> |
|------|--------------|--------|---------------------|
| 3    | 1 - Target   | 21,3   | -0,57               |
|      | 2 - Standard | 78,7   |                     |
| 4    | 1            | 20,0   | -0,60               |
|      | 2            | 80,0   |                     |
| 5    | 1            | 34,7   | -0,27               |
|      | 2            | 65,3   |                     |
| 6    | 1            | 48,2   | -0,03               |
|      | 2            | 51,8   |                     |
| 7    | 1            | 63,0   | 0,23                |
|      | 2            | 37,0   |                     |
| 8    | 1            | 86,1   | 0,79                |
|      | 2            | 13,9   |                     |

**Abb. 3.16.:** Auswertung einer quantitativen PCR (cDNA von 4 d alten MFB). Amplifiziert wurde die Message von ratTGF-beta-1 (Standard: 584 bp, Target: 640 bp). Bahn 1: **100 BPL**, Bahn 2: **Reagenzienleerwert**. Unterhalb der Banden ist die eingesetzte Konzentration des Standards dargestellt.

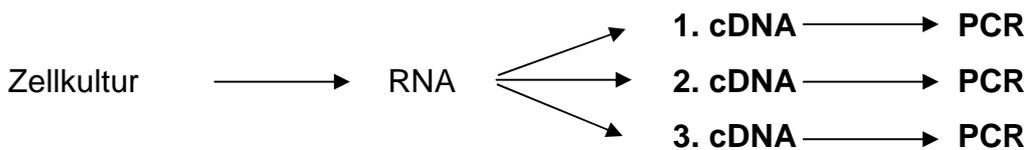
### 3.6.3. Kontrollreaktionen

Die cDNA von 4 d kultivierten MFB wurde zusammen mit einer Verdünnungsreihe des Standards exemplarisch aus der Sequenz von ratTGF-beta-1 koamplifiziert. Diese Reaktionen geschahen jeweils in Dreifachbestimmung an verschiedenen Stadien des gesamten Verlaufs:

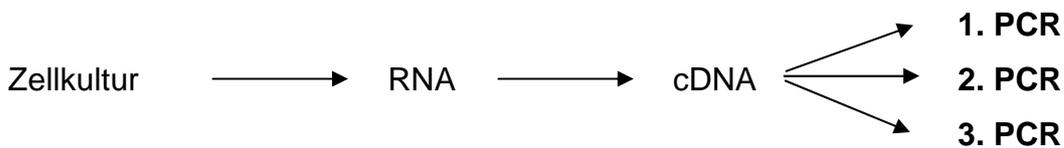
a.



b.



c.



**Abb. 3.10.:** Kontrollreaktionen (exemplarisch für ratTGF-beta-1 aus MFB, 4d):

- a. Kontrolle der Zell-Präparation/RNA-Isolierung,
- b. Kontrolle der cDNA-Synthese,
- c. Kontrolle der PCR.

Zur Überprüfung der Zell-Präparation und RNA-Isolierung wurde cDNA aus drei parallelen Zellpräparationen von verschiedenen Lebern und aus deren paralleler RNA-Extraktion eingesetzt. Um die Präzision der cDNA-Synthese (Reverse Transkription) zu überprüfen, wurde cDNA aus drei parallelen Synthesen (aus einer Leberzellpräparation) mit der Standardreihe

koamplifiziert. Letztlich wurde zur Kontrolle der PCR eine Dreifachbestimmung aus einer cDNA-Synthese durchgeführt.

**Tab. 3.7.:** Zusammenfassung der Ergebnisse (siehe Abb. 3.10.).

Dargestellt ist der entsprechende Äquivalenzpunkt als eingesetzte Konzentration des Standards ( $N_{0s}$ ). Die Intensität der Standardbande ( $IntOD_s$ ) ist hier am ehesten gleich der Targetbande ( $IntOD_t$ ), der Logarithmus des Verhältnisses beider Intensitäten am ehesten 0 ( $\text{Log } R_{t/s} = 0$ ). Da  $\text{Log } R_{t/s}$  nur selten genau 0 war, musste durch rechnerischen Abgleich die exakte Konzentration des Targets ( $N_{0t}$ ) ermittelt werden (siehe Kap. 3.6.2.).

Als Target diente die ratTGF-beta-1-Sequenz von 4 d kultivierten MFB.

**a.** Kontrolle der Zell-Präparation/RNA-Isolierung

|                | Äquivalenzpunkt<br>[ $N_{0s}$ in pg] | Log $R_{t/s}$ am<br>Äquivalenzpunkt | Targetkonz.<br>[rechnerisch, in pg] |
|----------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. Präparation | 0,08                                 | -0,13                               | 0,060                               |
| 2. Präparation | 0,08                                 | -0,09                               | 0,064                               |
| 3. Präparation | 0,04                                 | -0,03                               | 0,037                               |

Mittelwert (der Targetkonzentrationen bei  $\text{Log } R_{t/s} = 0$ ): 0,054 pg

Standardabweichung (der Targetkonzentrationen bei  $\text{Log } R_{t/s} = 0$ ): 0,015 pg

**b.** Kontrolle der cDNA-Synthese

|                  | Äquivalenzpunkt<br>[ $N_{0s}$ in pg] | Log $R_{t/s}$ am<br>Äquivalenzpunkt | Targetkonz.<br>[rechnerisch, in pg] |
|------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. cDNA-Synthese | 0,08                                 | 0,00                                | 0,080                               |
| 2. cDNA-Synthese | 0,04                                 | 0,09                                | 0,050                               |
| 3. cDNA-Synthese | 0,04                                 | 0,06                                | 0,046                               |

Mittelwert (der Targetkonzentrationen bei  $\text{Log } R_{t/s} = 0$ ): 0,059 pg

Standardabweichung (der Targetkonzentrationen bei  $\text{Log } R_{t/s} = 0$ ): 0,019 pg

### C. Kontrolle der PCR

|        | Äquivalenzpunkt<br>[N <sub>0s</sub> in pg] | Log R <sub>t/s</sub> am<br>Äquivalenzpunkt | Targetkonz.<br>[rechnerisch, in pg] |
|--------|--|--|-------------------------------------|
| 1. PCR | 0,08                                       | -0,17                                      | 0,054                               |
| 2. PCR | 0,08                                       | -0,10                                      | 0,064                               |
| 3. PCR | 0,08                                       | -0,09                                      | 0,065                               |

Mittelwert (der Targetkonzentrationen bei Log R<sub>t/s</sub> = 0): 0,061 pg

Standardabweichung (der Targetkonzentrationen bei Log R<sub>t/s</sub> = 0): 0,006 pg

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß die Reaktionen insgesamt gut reproduzierbar waren. Die Meßwerte lagen deutlich innerhalb der Grenzen der 2fachen Standardabweichung. Am genauesten waren die wiederholten PCR, aber selbst für die Überprüfung der Präparation, welche die Zellisolierung, RNA-Extrahierung, cDNA-Synthese und PCR beinhaltet, wurden exakte Ergebnisse erzielt. Zudem ließ die Gesamtbetrachtung der Kontrollreaktionen erkennen, daß die Konzentrationen der mRNA (bzw. cDNA) von ratTGF-beta-1 bei 4 d kultivierten MFB insgesamt nur wenig Schwankungen aufwiesen (siehe entsprechende Mittelwerte).

#### 3.6.4. Ergebnisse der quantitativen PCR

Die drei Zellreihen wurden hinsichtlich der Expression von mRNA für ratTGF-beta-1 und ratLTBP-1 untersucht. Dieses geschah durch die Amplifikation der korrespondierenden cDNA durch eine quantitative (RT-)PCR unter Verwendung einer cDNA - Sequenz als Standard. Die Vorversuche haben hierbei gezeigt, daß die Aussage nach dem tatsächlichen Gehalt an mRNA der Einzelzelle problematisch ist (siehe Kap. 4.3.). Aus diesem Grunde wurden nur Aussagen darüber gemacht, ob der Gehalt an mRNA für beide Messages im Verlauf der Zellkultivierung ansteigt, abfällt oder gleichbleibt (Tab. 3.10. und 3.11. u. Abb. 3.17.).

**Tab. 3.10.:** Ergebnisse für ratLTBP-1.

| Präp.    | cDNA    | Äquivalenzpunkt<br>[Standardkonz. in pg] | Verhältnis %IntOD |      | Targetkonz.<br>[rechnerisch, in pg] |
|----------|---------|--|-------------------|------|-------------------------------------|
|          |         |  | Target - Standard |      |                                     |
| <b>1</b> | HSC, 0d | 0,04                                     | 56,9              | 43,1 | 0,053                               |
|          | HSC, 2d | *  | *                 | *    | *                                   |
|          | HSC, 4d | 0,08                                     | 47,9              | 52,1 | 0,074                               |
|          | HSC, 6d | 0,04                                     | 48,4              | 51,6 | 0,038                               |
|          | MFB, 4d | 0,02                                     | 51,6              | 48,4 | 0,021                               |
| <b>2</b> | HSC, 0d | 0,08                                     | 49,6              | 50,4 | 0,079                               |
|          | HSC, 2d | *  | *                 | *    | *                                   |
|          | HSC, 4d | *  | *                 | *    | *                                   |
|          | HSC, 6d | 0,08                                     | 49,6              | 50,4 | 0,079                               |
|          | MFB, 4d | 0,04                                     | 42,1              | 57,9 | 0,029                               |
| <b>3</b> | HSC, 0d | 0,08                                     | 51,3              | 48,7 | 0,084                               |
|          | HSC, 2d | *  | *                 | *    | *                                   |
|          | HSC, 4d | 0,08                                     | 47,3              | 52,7 | 0,072                               |
|          | HSC, 6d | 0,04                                     | 51,9              | 48,1 | 0,043                               |
|          | MFB, 4d | 0,04                                     | 44,2              | 55,8 | 0,032                               |

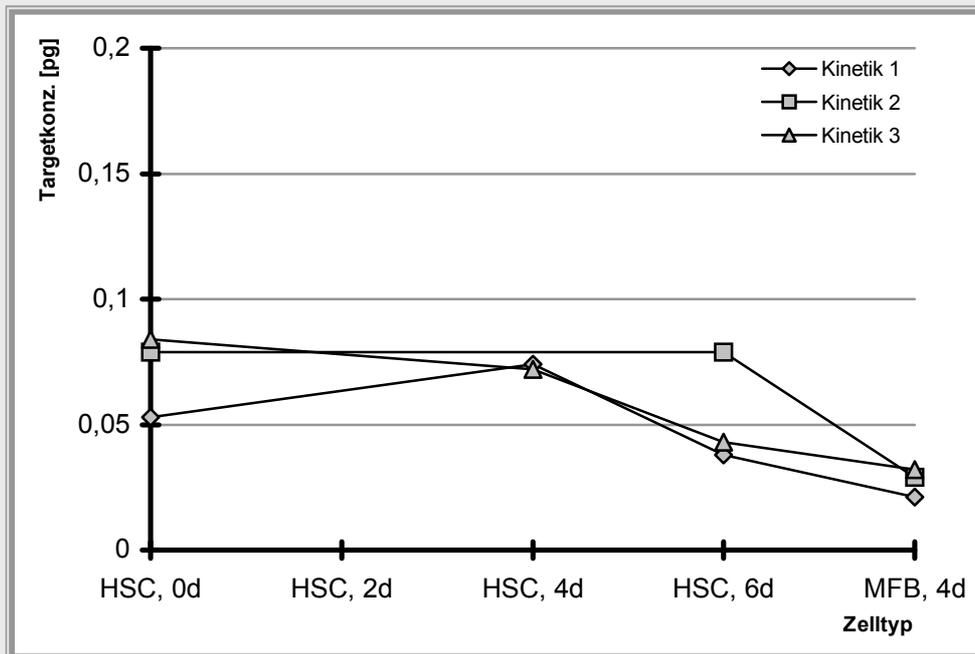
(\* - Meßwerte ließen sich nicht ermitteln)

**Tab. 3.11.:** Ergebnisse für ratTGF-beta-1.

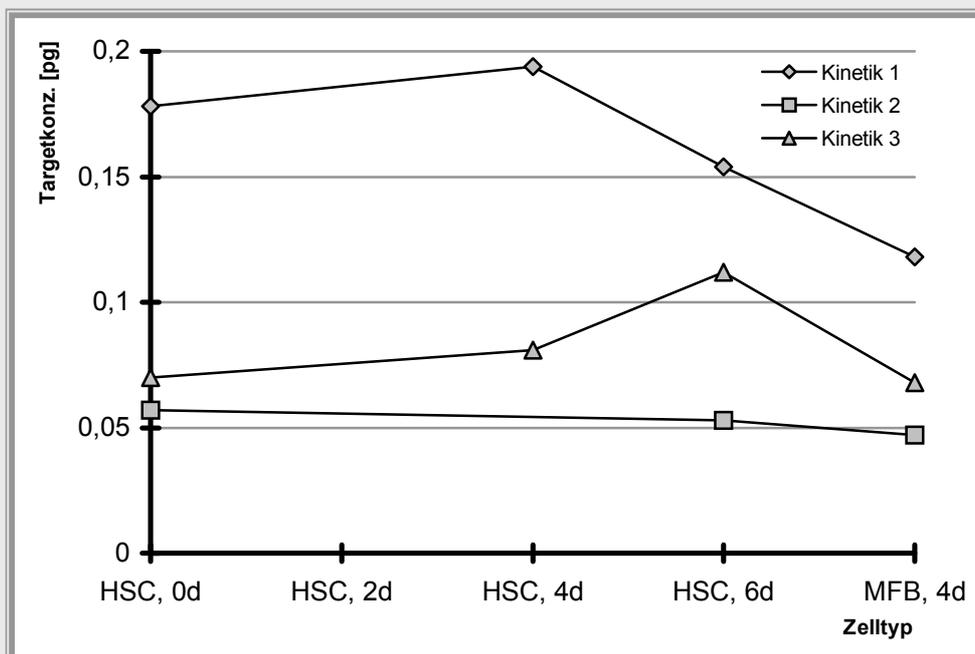
| Präp.    | cDNA    | Äquivalenzpunkt<br>[Standardkonz. in pg] | Verhältnis %IntOD |      | Targetkonz.<br>[rechnerisch, in pg] |
|----------|---------|--|-------------------|------|-------------------------------------|
|          |         |  | Target - Standard |      |                                     |
| <b>1</b> | HSC, 0d | 0,16                                     | 52,7              | 47,3 | 0,178                               |
|          | HSC, 2d | *  | *                 | *    | *                                   |
|          | HSC, 4d | 0,16                                     | 54,8              | 45,2 | 0,194                               |
|          | HSC, 6d | 0,16                                     | 49,0              | 51,0 | 0,154                               |
|          | MFB, 4d | 0,08                                     | 59,5              | 40,5 | 0,118                               |
| <b>2</b> | HSC, 0d | 0,08                                     | 41,8              | 58,2 | 0,057                               |
|          | HSC, 2d | *  | *                 | *    | *                                   |
|          | HSC, 4d | *  | *                 | *    | *                                   |
|          | HSC, 6d | 0,08                                     | 39,8              | 60,2 | 0,053                               |
|          | MFB, 4d | 0,04                                     | 54,1              | 45,9 | 0,047                               |
| <b>3</b> | HSC, 0d | 0,08                                     | 46,7              | 53,3 | 0,070                               |
|          | HSC, 2d | *  | *                 | *    | *                                   |
|          | HSC, 4d | 0,08                                     | 50,2              | 49,8 | 0,081                               |
|          | HSC, 6d | 0,08                                     | 58,3              | 41,7 | 0,112                               |
|          | MFB, 4d | 0,08                                     | 46,0              | 54,0 | 0,068                               |

(\*Meßwerte ließen sich nicht ermitteln)

### A. ratLTBP1



### B. ratTGF-beta-1



**Abb. 3.18.:** Graphische Darstellung der Ergebnisse. Die fehlenden Werte (HSC 2d, teils auch HSC 4d) wurden interpoliert.

Die Untersuchungen zeigten im Verlauf, daß der Gehalt an mRNA beider Sequenzen tendenziell leicht abnahm. Schwierigkeiten bereitete aber die Quantifizierung von 2 d kultivierten HSC. Es war in keiner der Zellreihen möglich, in der quantitativen PCR ausreichende Signale zu erhalten, die eine Berechnung ermöglicht hätten. Probleme mit diesem Zelltyp zeichneten sich auch schon bei der RNA-Präparation ab. So war die Ausbeute an RNA bei Präp. 2 und 3 so gering, daß eine cDNA-Synthese kaum möglich war. Und obwohl Präp. 1 mit 1.038 µg/ml (siehe Tab. 3.2.) scheinbar sehr erfolgreich war, war auch hier eine Quantifizierung nicht möglich. Ähnliche Probleme bereitet auch die Quantifizierung von 4 d kultivierten HSC der 2. Präp. Ursächlich hierfür sind möglicherweise Verunreinigungen der Proben, Degradation der mRNA oder ein - gerade bei Beginn der Kultivierung - (noch) zu geringer Gehalt an mRNA.

## 4. Diskussion

### 4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 4.1.1. Reaktionskinetik und Amplifikationseffizienz

In der Theorie verdoppelt sich die Molekülmenge in jedem weiteren Zyklus einer PCR, der Zuwachs erfolgt exponentiell nach  $N = N_0 2^n$ , wobei  $N_0$  die Anzahl der anfänglich in die Reaktion eingebrachten Moleküle darstellt,  $N$  die Anzahl der Moleküle nach PCR und  $n$  die Zyklenzahl.

In der Praxis hat es sich gezeigt, daß es diese theoretische PCR so nicht gibt, denn nicht alle Moleküle des vorangegangenen Reaktionsschrittes werden im nächsten Zyklus weiteramplifiziert. Die Amplifikationseffizienz ( $E$ ) ist der Anteil an Molekülen, der in einer PCR (von Zyklus zu Zyklus) tatsächlich amplifiziert wird.  $E$  nimmt Werte zwischen 0 und 1 an, wobei 0 bedeutet, daß keines der Moleküle verdoppelt wurde ( $N=N_0$ ) und 1, daß alle Moleküle reagiert haben ( $N = N_0 2$ ). In Abänderung der obigen Formel und auf die gesamte Reaktion bezogen bedeutet dies:  $N = N_0(1+E)^n$ .

$E$  ist abhängig von der Auswahl der zu untersuchenden Sequenz (hier v. a. von der Fragmentlänge), dem Primerdesign, den Reaktionsbedingungen (z. B. Annealingtemperatur und  $MgCl_2$  - Konzentration) und von eventuellen Kontaminationen der Proben. Experimentell wurde eine Streuung von  $E$  bei Amplifikationen unterschiedlicher Gensequenzen ermittelt, die zwischen 0,46 und 0,99 lag (Wang AM et al., 1989, Chelly et al., 1988, Choi et al., 1989). Bei wiederholter PCR derselben Sequenz unter gleichen Bedingungen (‘tube-to-tube variation’) lagen die Werte von  $E$  zwischen 0,8 und 0,99 (Wiesner 1992). In Kap. 3.6.3. wird gezeigt, daß, obwohl bei der Kontrolle der PCR jeweils identische Konzentrationen an cDNA unter identischen Bedingungen amplifiziert wurden, die Ergebnisse - wenn auch minimal - unterschiedlich waren.

Die Amplifikation der Sequenzen von einem PCR-Zyklus zum Nächsten wird, je weiter die Reaktion voranschreitet, zunehmend limitiert (Abb. 3.5.). Ab einem

gewissen Punkt erfolgt dann - auch bei weiter zunehmender Zyklenzahl - keine Zunahme der Molekülzahl mehr. Verantwortlich für diesen Plateau-effekt sind I. die zunehmende Molekülzahl, dadurch Behinderung der Anlagerung von Primern und Polymerase, II. die abnehmende Aktivität der Polymerase (z. B. durch zunehmende Konzentrationen von Inhibitoren, zunehmende Hitzedeaktivierung), III. das Verbrauchen einer oder mehrerer Reaktionskomponenten. In Bezug auf die Amplifikationseffizienz spielt es eine besondere Rolle, zu welchem Zeitpunkt der Reaktion Abweichungen auftreten. So hat, aufgrund des exponentiellen Charakters, eine Störung der Amplifikation während der frühen Zyklen wesentlich mehr Einfluß auf das Endergebnis als zu einem späteren Zeitpunkt.

Die meisten Protokolle geben eine Zahl zwischen 30 und 50 PCR-Zyklen an, um die Plateauphase zu erreichen. Quantitative Messungen müssen in der exponentiellen Phase der Reaktion erfolgen, daher muß die Anzahl an Zyklen, nach denen die PCR in die Plateauphase übergeht, sorgfältig ermittelt werden. Hierbei spielen vor allem die Eigenschaften der zu amplifizierenden Sequenz sowie deren anfängliche Konzentration eine Rolle (Morrison et al., 1994). In unserem Fall war 30 die optimale Zyklenzahl, sowohl für die Amplifikation von ratTGF-beta-1 als auch ratLTBP-1. In Abänderung der sonst üblichen Protokolle wurden die ersten drei Zyklen mit einer jeweils 15 s längeren Denaturierungs- und Anlagerungsphase durchgeführt. Hierdurch konnte der normalerweise eher träge Beginn der Reaktion schneller durchlaufen und der exponentielle Bereich eher erreicht werden. (vergl. Reaktionskinetik einer PCR - Abb 3.5.).

## 4.2. Unterschiedliche Modelle zur Quantifizierung von mRNA

### 4.2.1. Alternative Methoden zur quantitativen PCR

Im folgenden wird ein kurzer Überblick über andere Methoden zur Quantifizierung von mRNA gegeben (Ambion TechNotes, 1999):

#### 4.2.1.1. Northern Blotting

Die aus Zellen isolierte, denaturierte RNA wird zunächst der Größe nach durch eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Trägermatrix (Nylonmembran) transferiert und dort fixiert. Der Nachweis spezifischer RNA gelingt durch Hybridisierung mit markierten Sonden.

Die Analyse von mRNA über Northern Blotting ist die einfachste Methode zur Bestimmung der Fragmentgröße und zur Darstellung von Splice-Varianten. Voraussetzung für eine Quantifizierung ist die Integrität der RNA. Schon geringe Degradation verfälscht die Ergebnisse der Northern Blot Analyse. Zudem ist, vor allem im Vergleich mit der kompetitiven RT-PCR, die Sensitivität der Reaktion gering.

#### 4.2.1.2. Nuclease Protection Assays (NPA)

Hier bindet eine markierte, ca. 100 - 400 bp große RNA-Sonde an die in Einzelsträngen vorliegende Ziel-RNA. Die übrigen, nicht gebundenen RNA-Sequenzen werden anschließend durch Nukleasen abgebaut, so daß nur die, durch Bindung mit der Sonde geschützte, Ziel-RNA übrig bleibt. Diese wird abschließend auf einem Polyacrylamidgel dargestellt.

Verglichen mit der Northern Blot Analyse ist sowohl die Sensitivität, als auch die maximale Detektionsmenge des NPA größer. Zudem wird die Reaktion nicht in dem Ausmaß durch teilweise Degradation der RNA gestört, da die Hybridisierung der Sonde meist nicht die komplette Sequenzlänge der Ziel-RNA betrifft. Der NPA eignet sich vor allem zur gleichzeitigen Detektion verschiedener RNA-Sequenzen (unterschiedlicher Größe). Da die Sonde das RNA-Fragment zwar spezifisch, aber nicht in voller Länge bindet, können mit dem NPA nur schwer Aussagen über die genaue Länge der Fragmente gemacht werden. Auch ist gerade bei Quantifizierungen die Spezifität der Bindung ein möglicher Nachteil der Reaktion, denn eine bis zu 400 bp große RNA-Sonde muß spezifisch sämtliche komplementären Fragmente binden, um sie vor dem abschließenden Nukleasenverdau zu schützen.

#### 4.2.1.3. In Situ Hybridization (ISH)

Im Gegensatz zur Northern Blot Analyse oder dem Nuclease Protection Assay ist es bei der In-Situ Hybridisierung nicht erforderlich, RNA zu extrahieren oder elektrophoretisch aufzutrennen. Die Hybridisierung mit der Sonde findet direkt in der Zelle bzw. dem Gewebe statt (in situ). Durch ISH lassen sich Informationen über die lokale Verteilung von RNA ermitteln.

Die Proben werden zunächst formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Nach Schneiden der Proben wird über eine Reihe von Waschschritten das Paraffin wieder entfernt und die Schnitte werden rehydriert. Jetzt folgt die Bindung der markierten Sonden. Die Auswertung erfolgt entsprechend der Art der Markierung durch Abfotografieren (radioaktive Markierung) bzw. Messung von Fluoreszenz (nicht-radioaktive Markierung).

Größter Nachteil der ISH ist die hohe Arbeitsintensivität. Zudem ist sie von allen hier beschriebenen Methoden am wenigsten zur (absoluten) Quantifizierung von mRNA geeignet.

#### 4.2.2. Quantitative PCR

Das Ziel einer quantitativen PCR ist es, von der nach Amplifikation erhaltenen Menge an DNA-Molekülen auf die initial eingesetzte Konzentration rückschließen zu können. Zur Quantifizierung von PCR-Produkten wurden verschiedene Modelle entwickelt, die im wesentlichen auf zwei grundsätzlichen Methoden aufbauen, nämlich I. Konzentrationsmessung über in das Target eingebaute, markierte Nukleotide oder Primer und II. Konzentrationsmessung nach Hybridisierung mit unterschiedlich markierten Sonden (Kellogg et al., 1990, Jalava et al., 1993, Pannetier et al., 1993).

##### 4.2.2.1. Quantitative PCR ohne Standard

Eine quantitative PCR ohne Verwendung von Standards muß zwei Bedingungen erfüllen. Erstens muß die Streuung von E (‘tube-to-tube-variation’)

minimal sein, zweitens muß die Quantifizierung erfolgt sein, bevor die Reaktion die Plateauphase erreicht hat (letzteres ist Voraussetzung für alle Quantifizierungen). Sind beide Voraussetzungen erfüllt, dann besteht zwischen dem Logarithmus von  $N$  und  $N_0$  ein linearer Zusammenhang (Nakayama et al., 1992). Die Quantifizierung ohne Standard liefert allerdings nur relative, vergleichende Werte zwischen zwei RNA(cDNA)-Proben. Eine absolute Quantifizierung kann so nicht durchgeführt werden.

#### 4.2.2.2. Quantitative PCR mit Standard

Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR (Zimmermann et al., 1996) und der damit verbundenen Störanfälligkeit läßt sich  $E$  (auch unter identischen Bedingungen) nicht sicher konstant halten. Um eine mögliche Streuung von  $E$  in die Quantifizierung einbeziehen zu können, werden interne Standardsequenzen mitamplifiziert. Dies können I. Transkripte sein, die natürlicherweise in der zu untersuchenden mRNA in konstanter Konzentration vorhanden sind (endogene Sequenzen) oder II. von außerhalb zugeführte (exogene) Sequenzen. Die Amplifikation der Standardsequenz erfolgt durch ein zweites Primerpaar, zusammen mit dem Target oder in einer separaten Reaktion. Nach Abschluß der Reaktion wird die Menge des amplifizierten Targets ins Verhältnis gesetzt zur Menge des amplifizierten Standards, und so auf das Verhältnis beider Sequenzen vor Reaktionsbeginn zurückgeschlossen. Auch hier muß die Quantifizierung erfolgen, bevor die Reaktion die Plateauphase erreicht (s.o.).

Aber auch über den einfachen Vergleich von Target und Standard nach PCR ist eine - relative - Quantifizierung möglich. Wenn die interne Standard-RNA (cDNA) in zwei verschiedenen Proben in gleicher Konzentration vorliegt, dann zeigt das jeweilige Verhältnis der PCR-Produkte von Target und Standard den relativen Expressionsgehalt des Targets an (Horikoshi et al., 1992).

Die Verwendung von endogenen Sequenzen als interner Standard hat den Vorteil, daß diese, zusammen mit dem Target, in allen Reaktionen (RNA-Extraktion, cDNA-Synthese, PCR) stets denselben Bedingungen unterliegen. Auch wenn die Amplifikationseffizienz des Standards nicht gleich der des

Targets ist, sind Aussagen über relative Konzentrationsänderungen des Targets zulässig, wenn  $E$  innerhalb der Standard- und Targetamplifikationsreihe konstant ist. Nachteilig ist, daß die Konzentrationsunterschiede zwischen Target und Standard sehr groß sein können. Folglich ist es möglich, daß der Standard bereits die Plateauphase erreicht hat, während das Target noch nicht einmal darstellbar ist (Murphy et al., 1990). Damit vergleichende Aussagen zwischen Target und Standard zulässig sind, muß der endogene Standard zudem in allen zu untersuchenden Proben in konstanter (gleicher) Konzentration exprimiert sein. Weiter ist zu berücksichtigen, daß, da zwei verschiedene Primerpaare zur Amplifikation von Standard und Target eingesetzt werden, es zudem möglich ist, daß diese sich gegenseitig behindern und die Ausbeute der Reaktion drastisch vermindern (Murphy et al., 1990).

Die Verwendung exogener Standardsequenzen beruht ebenso auf dem Prinzip, daß ein Anstieg der Standardkonzentration während der PCR proportional zu einem Anstieg der Targetkonzentration ist (bei jeweils konstantem  $E$ ). Anders als bei Verwendung einer endogenen Sequenz, bei der der Standard lediglich in konstanter Konzentration vorliegen muß, ist die Konzentration einer exogen zugefügten Sequenz genau bekannt, so daß eine absolute Quantifizierung möglich ist. Hierzu ist es erforderlich, daß Standard und Target mit gleicher Effizienz amplifiziert werden, d. h.  $E_t = E_s$ . Wenn der Größenunterschied zwischen Standard und Target gering ist, und die Größe beider Fragmente unter 1000 bp liegt, dann hat die Auswahl der Primer den größten Einfluß auf  $E$  (Wang AM et al., 1989).

Zusammenfassend muß, um eine absolute Quantifizierung der ursprünglich vorhandenen Targetmoleküle ( $N_{0t}$ ) durchführen zu können, die Konzentration des eingesetzten Standards ( $N_{0s}$ ) bekannt sein. Weiter muß es möglich sein, zwischen der erhaltenen Menge Target ( $A_t$ ) und der erhaltenen Menge Standard ( $A_s$ ) nach Amplifikation unterscheiden zu können. Dies geschieht über eine unterschiedliche Fragmentgröße oder mittels Hybridisierung mit markierten Sonden, die spezifisch eine der beiden Sequenzen binden.

### 4.2.2.3. Kompetitive PCR

Die kompetitive PCR verwendet eine exogene Sequenz als internen Standard. Dieser Standard hat identische Primerbindungsstellen wie das Target, so daß beide Sequenzen während der Amplifikation um dieselben Primer konkurrieren. Die Konstruktion eines möglichst optimalen Standards ist die Grundlage der kompetitiven PCR. Vor allem die Auswahl der Primer ist wesentliche Voraussetzung für eine verlässliche Quantifizierung (Dieffenbach et al., 1993), denn verschiedene Primer für dasselbe Gen können (abhängig von der Lage auf der Sequenz, der Länge und Basenzusammensetzung) die Amplifikationseffizienz in unterschiedlichem Maße beeinflussen (He et al., 1994). Unter Zuhilfenahme spezieller Generierungssoftware (PCRPLAN v. PC/GENE) wurden, durch Definition der relevanten Parameter (Tab. 4.1.), geeignete Primersequenzen für ratTGF-beta-1 und ratLTBP-1 gefunden.

**Tab. 4.1.:** Wesentliche, softwareseitig definierte Parameter zum Primerdesign

|   |              |
|---|--------------|
| Optimale Primerlänge  | <b>20 bp</b> |
| Minimale Primerlänge  | <b>15 bp</b> |
| Maximale Primerlänge  | <b>30 bp</b> |
| Maximale Zahl aufeinander folgender Basenwiederholungen       | <b>2 bp</b>  |
| Relativer Gehalt an GC (Guanin - Cytosin)                     | <b>50 %</b>  |
| Max. Folge zu sich selbst komplementärer Basen pro Primer     | <b>4 bp</b>  |
| Max. Folge komplementärer Basen zwischen Minus- u. Plusprimer | <b>3 bp</b>  |
| Max. Anteil zu anderen Targetregionen komplementärer Basen    | <b>70 %</b>  |

Die Standardsynthese kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen, der Standard ist, entsprechend der gewählten Methode, länger oder kürzer als das Target. Hauptsächlich durchgeführte Methoden sind I. Exzision eines (50 bis 100 bp großen) Fragmentes aus der Targetsequenz durch Restriktionsendonukleasen, II. Amplifikation der 3' - bzw. 5' - nahen Sequenzanteile des Targets (durch zwei separate Reaktionen) und

anschließende Religation der beiden Fragmente, III. Insertion eines kurzen DNA-Fragmentes in die Targetsequenz und IV. Standardsynthese durch Verwendung eines Hybridprimers (Strehlau et al., 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die letztgenannte Methode verwendet (Kap. 1.2.2. und Kap 2.2.2.4.1.).

Vor einer simultanen Amplifikation müssen exakte Bedingungen für die Reaktionen definiert sein. Neben der beschriebenen, optimalen Primerauswahl und -konzentration sind eine optimale Konzentration von Polymerase,  $Mg^{2+}$  und dNTP Voraussetzung dafür, daß beide Sequenzen mit derselben Effizienz amplifiziert werden können, denn gerade bei der Koamplifikation von zwei Sequenzen in einer Reaktion können die einzelnen Reaktionskomponenten limitierende Faktoren darstellen (Ballagi-Pordány et al., 1991).

Zur Quantifizierung wird eine Verdünnungsreihe des Standards zusammen mit einer jeweils konstanten Menge cDNA (=Target) koamplifiziert. Nach Abschluß der PCR können beide PCR-Produkte aufgrund ihrer unterschiedlichen Fragmentlänge unterschieden und in Bezug zueinander gesetzt werden. Dieses geschieht durch EtBr-Färbung und Darstellung im Agarosegel. Das Verhältnis von Standard zu Target bleibt während der exponentiellen Phase der Reaktion konstant, so daß, bei gleicher Amplifikationseffizienz von Standard und Target, gilt:  $N_{0t}/N_{0s} = N_t/N_s = A_t/A_s$ . (Kap. 1.2.2.). Es wurde zudem beschrieben, daß selbst bei Erreichen des Beginns der Plateauphase das Verhältnis beider Sequenzen im Verlauf noch konstant bleibt (Dassi et al., 1998).

Wenn DNA als Standard eingesetzt wird, ist zu berücksichtigen, daß auch die Effizienz der reversen Transkription Einfluß auf die Messungen nimmt, denn die Ausbeute einer cDNA-Synthese beträgt nur 40-50% (Berger et al., 1983, Ferre<sup>2</sup> et al., 1994). Um Unregelmäßigkeiten in der Effizienz der reversen Transkription in die Quantifizierung einbeziehen und somit kontrollieren zu können, wird immer mehr dazu übergegangen, RNA direkt als Kompetitor einzusetzen.

Wie bereits beschrieben, müssen Standard und Target die gleichen Primerbindungsstellen haben, um kompetitiv amplifiziert werden zu können. Zusätzlich müssen beide Sequenzen nach Amplifikation unterscheidbar sein, was meist durch eine unterschiedliche Sequenzlänge erreicht wird. Da jedoch

die Amplifikationseffizienz einer DNA-Sequenz mit steigender Fragmentlänge abnimmt (McCulloch et al., 1995), sollte der Längenunterschied zwischen Target und Standard so gering wie möglich sein (Stolovitzky et al., 1996). Desweiteren binden längere Fragmente in der abschließenden Agarosegelelektrophorese mehr Ethidiumbromid, so daß auch hier ein zu großer Längenunterschied zwischen den Fragmenten zu verfälschten Ergebnissen führt. Dieses kann durch Einbeziehung eines Ausgleichsfaktors in die Quantifizierung kontrolliert werden. Der Längenunterschied zwischen Standard und Target betrug bei ratTGF-beta-1 56 bp und bei ratLTBP-1 68 bp, so daß hier die Amplifikation kaum beeinflusst wurde, Standard und Target beider Sequenzen aber gut differenzierbar waren.

Die Sequenz des Standards kann homolog zur Sequenz des Targets sein (Becker-André et al., 1989, Gilliland et al., 1990). Möglicher Nachteil bei der Verwendung von homologen Standardsequenzen ist die Bildung von Heteroduplexen (Thorgersen et al., 1998). Wenn die Molekülzahl in späteren Zyklen der PCR schon sehr groß ist, ist es möglich, daß sich der Minus-Strang des Targets an den Plus-Strang des Standards bindet, und umgekehrt. Das Entstehen solcher Standard/Target-Hybride (Henco et al., 1990) kann die Quantifizierung erschweren, und zwar insbesondere dann, wenn die Unterscheidung zwischen den Sequenzen mittels Restriktionsverdau erfolgen soll. Durch die Verwendung von heterologen Standards, also DNA (RNA) - Fragmenten, deren Primärstruktur nicht gleich der des Targets ist, können derartige Schwierigkeiten vermieden werden (Siebert et al., 1993, Masuhara et al., 1996). Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß bei der Verwendung heterologer Fragmente die unterschiedliche Basenzusammensetzung ein die Amplifikationseffizienz limitierender Faktor ist.

#### 4.2.2.4. Real-Time Quantitative PCR

Zur Durchführung einer Real-Time PCR, bei der DNA-Konzentrationen über Messung von Fluoreszenz bestimmt werden können, sind derzeit das ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) und die

LightCycler Technologie (Roche Diagnostics) gebräuchlich. Das detektierte Fluoreszenzsignal kann I. durch Spaltung einer markierten Sonde während der Extensionsphase, oder II. durch Messung des Fluoreszenzresonanzenergietransfers (FRET) zwischen zwei markierten Sonden während der Anlagerungsphase der PCR entstehen (Nitsche et al., 1999):

I. Bei der ersten Form der Fluoreszenzentwicklung wird die entsprechende Targetsequenz durch eine komplementäre, spezifische Sonde, die zwischen Plus- und Minus-Primer bindet, markiert. Diese Sonde besteht aus einer Oligonukleotidsequenz mit einem an das 5' Ende gebundenen 'Reporter' (z. B. FAM [6-carboxy-fluorescein]) und einem an das 3' Ende gebundenen 'Quencher' (z.B. TAMRA [6-carboxytetramethylrhodamine]). Wenn die Sonde intakt ist, wird durch die Nähe des 'Quenchers' zum 'Reporter' dessen fluoreszierende Farbwirkung unterdrückt. Die Detektion erfolgt, wenn die gebundene Sonde durch die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase (Lyamichev et al., 1993) gespalten wird (Lee et al., 1993). Die supprimierende Wirkung des 'Quenchers' entfällt, und es kommt zu einem Anstieg der Fluoreszenz, die proportional zur Anzahl der freigesetzten 'Reporter' (und somit der neusynthetisierten DNA-Stränge) ist (Heid et al., 1996.). Die Messung kann hier sowohl mit dem ABI PRISM 7700 als auch mit dem LightCycler erfolgen.

Die Spezifität der Reaktion beruht darin, daß nur die an die komplementäre Targetsequenz gebundene Sonde bei der Amplifikation gespalten wird. Freie Sonden werden nicht gespalten, und auch unspezifische Amplifikationen ergeben kein Signal, da die Sonde so konstruiert ist, daß sie ausschließlich am zu detektierenden Targetmolekül bindet. Die Fluoreszenz der intakten Sonde muß allerdings vollständig unterdrückt werden, während die Fluoreszenz der gespaltenen Sonde nicht gestört sein darf, so daß dem Design der Sonde besondere Bedeutung zukommt. Weiter muß die Sonde mit der höchstmöglichen Effizienz an die entsprechenden Targetstränge binden, da die Amplifikation selbst unabhängig vom Vorhandensein der Sonde erfolgt, aber nur gebundene Sonden gespalten werden. Die Fragmentation der Sonde durch die DNA-Polymerase setzt deren 5'-Exonukleaseaktivität voraus. Hier existieren allerdings große Unterschiede zwischen den DNA-Polymerasen verschiedener

Anbieter. Dieses betrifft zum einen die Amplifikationsleistung, zum anderen aber auch das Ausmaß der 5'-Exonukleaseaktivität, die bei einigen Enzymen sogar vollkommen fehlte (Kreutzer et al., 2000).

II. Bei der zweiten Form der Fluoreszenzentwicklung findet die LightCycler Technologie Verwendung (Wittwer et al., 1997). Es binden hierbei zwei voneinander unabhängige, markierte Oligonukleotide in unmittelbarer Nachbarschaft auf der Targetsequenz. Das erste („upstream“) Oligonukleotid ist am 3'-Ende mit Fluoreszein, das zweite („downstream“) Oligonukleotid am 5'-Ende mit z. B. LightCycler Red 640 (LC Red) markiert. Das 3'-Ende dieser zweiten Sonde enthält zudem eine Phosphatgruppe, um eine mögliche Extension während der PCR zu verhindern. Durch Anregung über eine Lichtquelle findet ein Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) vom Fluoreszein zum LC Red statt (Ke et al., 2000). Dieses geschieht nur, wenn sich beide Sonden in direkter Nachbarschaft (1 bis ca. 7 Basen Entfernung voneinander) befinden (Nitsche et al., 1999). Die Signalstärke läßt sich in direkten Bezug zur Konzentration des Targets (vor Erreichen der Plateauphase) setzen. Die Fluoreszenz wird bei steigender Temperatur aufgezeichnet, bis der Punkt erreicht ist, an dem sich die detektierende Sonde vom Target löst (melting point) und der FRET beendet ist. So entstehen charakteristische „Schmelzprofile“ (melting curve analysis), über die sich z. B. Punktmutationen nachweisen lassen, denn das Vorhandensein eines nicht korrespondierenden Basenpaares zwischen Sonde und Target resultiert in einem entsprechend niedrigerem melting point (Nauck et al., 2000).

Beide Methoden erlauben die Quantifizierung in Echtzeit und zu jedem beliebigen Zeitpunkt der Reaktion. Auch die sonst notwendigen Reaktionsschritte nach abgelaufener PCR wie z. B. Ethidiumbromidfärbung und Agarosegelelektrophorese entfallen, was zum einen eine Arbeitersparnis darstellt, zum anderen mögliche Kontaminationen minimiert. Zudem können viele Proben gleichzeitig untersucht werden, da die Reaktionen in einem geschlossenen System in Mikrotiterplatten (ABI PRISM 7700) bzw. Glaskapillaren (LightCycler) durchgeführt werden. Die Reaktionen der Real-Time PCR laufen zudem schneller als die der konventionellen PCR ab. So lässt

sich mit dem LightCycler eine vollständige Amplifikationsanalyse innerhalb von ca. 20 min. durchführen.

#### 4.3. Reliabilität und Validität der quantitativen PCR - Bewertung der Ergebnisse

Die PCR ist mittlerweile Routine in den meisten biologischen und medizinischen Laboren. Einer ihrer Nachteile liegt in der Schwierigkeit der Quantifizierung einer ursprünglich vorhandenen Menge an spezifischen Nukleinsäuren. Es wurden verschiedene Versuche unternommen, die Situation hinsichtlich der Quantifizierung spezifischer mRNA zu verbessern. Die Methode, mit der die Amplifikate nach PCR detektiert werden, sollte so wenig manipulativ wie möglich sein, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen (Jenkins, 1994). Die meisten beschriebenen Methoden basieren derzeit auf der Messung von Größe und Intensität der Banden in Ethidiumbromid-gefärbten Polyacrylamid-Gelen. Das Detektionslimit der gesamten Methode hängt dabei von der Probengewinnung, dem Probenhandling, der Zellisolierung, RNA-Extraktion und der RT-PCR selbst ab. Auch Genauigkeit und Verlässlichkeit der erhaltenen Ergebnisse werden nicht allein durch die Sensitivität der RT-PCR, sondern ebenfalls durch die vorangegangenen Reaktionen entscheidend mitbeeinflusst. Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Variabilität der Ergebnisse trotz der vielen notwendigen Reaktionen in engen Grenzen konstant gehalten werden kann.

Durch den exponentiellen Charakter der PCR und der hohen Sensitivität der Reaktion werden die Auswirkungen von zunächst nur kleineren Abweichungen auf die Ergebnisse enorm vergrößert. Die Angleichung über endogene Referenzsequenzen kann diese Einflüsse normalisieren (Coutlée et al., 1995). Auch die unterschiedliche Effizienz und eventuelle Degradation von RNA während der Isolierung läßt sich auf diese Weise kontrollieren. Die hierzu verwendeten Transkripte, sog. ‚housekeeping-genes‘, müssen in jeder zu untersuchenden Probe, unabhängig von Faktoren wie z.B. dem Alter der Zellen, in gleichem Ausmaß synthetisiert werden. Findet sich eine unterschiedliche

Konzentration dieser Referenzmoleküle in zwei miteinander zu vergleichenden Proben, dann muß dieses unter den genannten Voraussetzungen auf eine unterschiedliche Effizienz der RNA-Isolierung oder unterschiedliche Reaktionseffizienz in der RT-PCR, und nicht auf eine unterschiedliche Expression zurückzuführen sein.

Das ribosomale Protein S6 der Ratte (ratS6) ist eine solche Referenzsequenz. Im Verlauf der Zellreihe (frisch isolierte (0d) sowie 2, 4, 6 d kultivierte HSC und 4 d kultivierte MFB) sollte die Konzentration der mRNA von ratS6 bei jedem Zelltyp identisch sein. Die aktuell festgestellten Abweichungen waren nur gering (Kap. 3.6.1.), und die cDNA-Konzentrationen zur Quantifizierung von ratTGF-beta-1 und ratLTBP-1 wurden entsprechend angeglichen. Im Rahmen einer absoluten Quantifizierung kann die Konzentrationsbestimmung der Referenzsequenz auch über eine kompetitive PCR erfolgen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer quantitativen PCR für ratTGF-beta-1 und ratLTBP-1. Für den notwendigen Konzentrationsabgleich von ‚housekeeping genes‘ in nachfolgenden Expressionsstudien beider Sequenzen sollten kommerziell verfügbare Kits für die kompetitive PCR, z. B. Beta-actin oder Cyclophilin (Takara Biochemicals über Fa. Biowhittaker, Belgien) genutzt werden.

Das verwendete Standardmolekül spielt eine besondere Rolle bei der kompetitiven PCR. Die Verwendung eines DNA-Fragmentes ist hier legitim, da die Vorversuche die hohe Präzision der RT bestätigt haben (Kap. 3.6.3.). Die Überprüfung der Präzision einer wiederholten PCR von ratTGF-beta-1 aus 4 d kultivierten MFB ergab einen Mittelwert von 0,061 pg pro µg eingesetzte cDNA mit einer Standardabweichung von 0,006 pg. Unter Einbezug der RT lag der Mittelwert bei 0,059 pg, die Standardabweichung bei 0,019 pg. In den neueren Studien zur kompetitiven PCR (Dassi et al., 1998, Thorgersen et al., 1998) werden zunehmend RNA-Fragmente eingesetzt (siehe auch Kap. 4.2.2.3.). Die Synthese dieser Fragmente kann z. B. über das Umschreiben von DNA in RNA durch DNA-abhängige RNA-Polymerasen geschehen. Limitationen sind mögliche Verluste beim Transkriptionsschritt von DNA zu RNA sowie die

allgemein höhere Empfindlichkeit von RNA-Fragmenten z.B. gegen Verdau durch RNAsen oder Hitze.

Es wurde beschrieben, daß die Amplifikationseffizienz von Target- und Standardsequenz nicht durch die Menge des zugegebenen Standards beeinflusst wird (Zhou et al., 1997). Theoretisch wäre demnach eine Ein-Punkt-Messung zur Quantifizierung ausreichend: Eine bekannte Konzentration des Standards würde mit einer unbekanntem Konzentration Target koamplifiziert und das Verhältnis beider Amplifikationsprodukte erlaube den Rückschluß auf die eingesetzte Menge Target. Es wurde jedoch gezeigt, daß die Genauigkeit der Quantifizierung am größten ist, wenn das Verhältnis von Target zu Standard gleich oder zumindest ähnlich ist (Arnold et al., 1992, Raeymaekers et al., 1993). Wenn das Verhältnis von Target zu Standard zwischen 0,66 und 1,5 liegt, haben die Ergebnisse einer quantitativen PCR eine geschätzte Ungenauigkeit von bis zu 10%. Der von Becker-André und Hahlbrock zuerst beschriebene Ansatz einer kompetitiven RT-PCR hat eine Unpräzision zwischen 14% und 27% (Barlett et al., 1995). Ferre beschreibt eine analytische Unpräzision von 19% (Ferre<sup>1</sup>, 1994). Bei einem Verhältnis, das außerhalb dieser Grenzen liegt, steigt die Ungenauigkeit der Ergebnisse drastisch an. Beträgt das Verhältnis von Target zu Standard 2, dann erreichen die Abweichungen der Ergebnisse vom tatsächlichen Wert bis zu 60 % (Souazé et al., 1996). Daher ist es notwendig, die Koamplifikation einer konstanten Menge Target mit einer Verdünnungsreihe des Standards durchzuführen, um den Äquivalenzpunkt zu finden. Barlett, Saric und Thorgersen haben die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der kompetitiven PCR überprüft (Barlett et al., 1996, Saric et al., 1997, Thorgersen et al., 1998), indem sie eine weitere Reaktion durchführten: Nach Ermittlung der Targetkonzentration im ersten kompetitiven Schritt werden in einer folgenden kompetitiven PCR Verdünnungen von Target und Standard in jeweils gleicher Konzentration eingesetzt. Das Verhältnis von Target und Standard sollte (im exponentiellen Bereich) in allen Verdünnungen gleich sein (Souazé et al., 1996). Die minimale initiale Menge, die durch die kompetitive PCR detektiert werden kann, sind 10 mRNA-Kopien (Piatak et al., 1993).

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit eine kompetitive PCR zur Quantifizierung der mRNA von ratTGF-beta-1 und ratLTBP-1 aus in-vitro kultivierten Zellen entwickelt. Die Ergebnisse haben gezeigt, daß die Detektion kleinster RNA-Mengen reproduzierbar gelingt. Große diagnostische Bedeutung hat diese Methode in der Früherkennung bestimmter Krankheiten, z. B. die Organfibrose. So können sich bereits auf RNA-Ebene Veränderungen erkennen lassen, bevor diese auf Protein-Ebene sichtbar werden. Der qualitative Nachweis von spezifischer Messenger-RNA ist bereits ein unschätzbare diagnostisches Instrument, durch die Quantifizierung lassen sich unmittelbare Zusammenhänge zwischen RNA-Expression und Krankheitsentwicklung aufzeigen.

Hier wurde der Expressionsverlauf zweier im Rahmen von fibrogenen Prozessen wichtiger Zytokine im Verlauf einer gesunden Leberzellkultur untersucht. Die Ergebnisse erster quantitativer Untersuchungen haben gezeigt, daß die Konzentration der mRNA von ratLTBP-1 über den zeitlichen Kulturverlauf (frisch isolierte HSC bis 4 d kultivierten MFB, Gesamtkulturdauer 10 d - siehe Kap. 2.2.1.1.5.) durchschnittlich um den Faktor 2,6 abnimmt. Die Änderung der Konzentration der mRNA von ratTGF-beta-1 war demgegenüber nicht so ausgeprägt, sie blieb im zeitlichen Verlauf relativ konstant. Die Expressionslevel beider Sequenzen waren ähnlich. Die gemessenen Konzentrationen für ratLTBP-1 lagen in einem Bereich von 0,021 pg bis 0,084 pg , die für ratTGF-beta-1 von 0,047 pg bis 0,194 pg. Grund hierfür ist, daß TGF-beta-1 von den meisten Zellen als biologisch inaktiver Komplex sezerniert wird. Aktivierung bedeutet das Herauslösen von TGF-beta-1 aus dem Verbund mit LAP und LTBP. Aktives TGF-beta-1 und dessen latente Bindungsproteine (hier: LTBP) lassen sich demnach in vergleichbaren Konzentrationen nachweisen (Lawrence 1995).

Es handelt sich hier um erste Daten im Rahmen der Evaluation einer neuen Methode, die validiert werden sollten. Um weitere Aussagen über das Verhältnis der RNA-Expression zur Proteinkonzentration dieser Zytokine machen zu können, kann über die quantitative PCR der RNA-Gehalt in Zellkulturen einer fibrotischen Leber untersucht werden. Weiter lassen sich die

Auswirkungen verschiedener fibrogener Noxen (z. B. Alkohol oder CCL<sub>4</sub>) auf die Expression von ratTGF-beta-1 und ratLTBP-1 in Leberzellen untersuchen. Grasl-Kraupp hat nachgewiesen, daß nach teilweiser Hepatektomie die Konzentration von TGF-beta-1 in der Leber deutlich erhöht ist, um reparative Prozesse zu initiieren. Im Gegensatz hierzu wurde kein nennenswerter Konzentrationsanstieg von TGF-beta-1 bei der Induktion von hyperplastischem Wachstum, z. B. durch die Behandlung von Lebergewebe mit Phenobarbital, beobachtet. Im Gegensatz zu reparativen Vorgängen nach Leberzellschädigung scheint TGF-beta-1 demnach bei normalem bzw. durch Mitogene stimuliertem, hyperplastischem Wachstum keine zentrale Rolle zu spielen (Garcia-Allan et al., 1997). Während der regenerativen Vorgänge nach Intoxikation der Leber mit CCl<sub>4</sub> erhöht sich die mRNA-Konzentration von TGF-beta-1 um das 10fache, während sich die Konzentration des Proteins nur verdoppelt. Ursächlich hierfür sind posttranskriptionale Regulationsvorgänge, die die aktuelle Proteinkonzentration kontrollieren (Grasl-Kraupp et al., 1998). So erhöht Retinsäure die Stabilität der TGF-beta-1 mRNA, während Tamoxifen (ein Antiöstrogen) die Zahl der Translationsvorgänge am Transkript reduziert (Wakefield et al., 1990, Perry et al., 1995).

Auch die Ausweitung der Untersuchungen auf andere Zytokine (FGF, TNF-alpha) kann helfen, fibrogene Pathomechanismen noch vor dem Auftreten von Organveränderung zu erkennen.

## Schrifttumsverzeichnis

- (1) **Ambion TechNotes.** Strategies for Detecting mRNA. Newsletter 1999, Vol. 6, N° 3, International Edition.
- (2) **Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH.** The morphology of cirrhosis. J Clin Pathol 1978; 31: 395-414
- (3) **Arenson DM, Friedman SL, Bissell DM.** Formation of extracellular matrix in normal rat liver: lipocytes as a major source of proteoglycan. Gastroenterology 1988; 95: 441-447
- (4) **Arnold BL, Itakura K, Rossi JJ.** PCR-based quantitation of low levels of HIV-1 DNA by using an external standard. Genet Anal Tech Appl 1992; 9: 113-116
- (5) **Ballagi-Pordány A, Ballagi-Pordány A, Funa K.** Quantitative Determination of mRNA Phenotypes by the Polymerase Chain Reaction. Anal Biochem 1991; 196: 89-94
- (6) **Barlett JM, Hulme MJ, Miller WR.** Analysis of cAMP RI alpha mRNA expression in breast cancer: evaluation of quantitative polymerase chain reaction for routine use. Br J Cancer 1996; 73: 1538-1544
- (7) **Barlett LM, Markvardsen P, Bjerke T, Rüdinger N, Schiotz PO, Gregersen N, Justesen J, Paladan K.** A polymerase chain reaction-based method for the semiquantitative study of interleukin-8 mRNA in human basophil leukocytes. Scand J Clin Lab Invest 1995; 55: 487-493

- (8) **Becker-André M, Hahlbrock K.** Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 9437-9446
- (9) **Bedossa P, Paradis V.** Transforming growth factor-beta (TGF-beta): a key role in liver fibrogenesis. *J Hepatol* 1995; 22: 37-42
- (10) **Bedossa P, Peltier E, Terris B, Franco D, Poynard T.** Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology* 1995; 21: 760-766
- (11) **Berger SL, Wallace DM, Puskas RS, Eschenfeldt VH.** Reverse transcriptase and its associated ribonuclease H: Interplay of two enzymes activity controls the yield of single-stranded complementary deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 1983; 22: 2365-2372
- (12) **Bissell DM.** Lipocyte activation and hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 1992; 102: 1803-1805
- (13) **Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ.** Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver - evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1995; 96: 447-455
- (14) **Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR.** Transport and storage of vitamin A. *Science* 1990; 250: 399-404
- (15) **Blomhoff R, Wake K.** Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J* 1991; 5: 271-277.
- (16) **Border WA, Noble NA.** Mechanisms of disease: transforming growth factor-beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292

- (17) **Bouaboula M, Legoux P, Pességué B, Delpech B, et al.** Standardisation of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control. *J Biol Chem* 1992; 267: 21830-21838
- (18) **Burt AD.** Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. *J Pathol* 1993; 170: 105-114
- (19) **Chan YL, Woll IG.** The primary structure of rat ribosomal protein S6. *J Biol Chem* 1988; 263: 2891-2896
- (20) **Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A.** Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* 1988; 333: 858-860
- (21) **Choi Y, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P, Kappler J.** Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin „super antigens“ with human T-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8941-8945
- (22) **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159
- (23) **Coffey RJ, Kost LJ, Lyons RM, Moses HL, LaRusso NF.** Hepatic processing of transforming growth factor beta in the rat. Uptake, metabolism, and biliary excretion. *J Clin Invest* 1987;80:750-757
- (24) **Corey E, Arfman EW, Liu AY, Vessella RL.** Improved reverse transcriptase-polymerase chain reaction protocol with exogenous internal competitive control for prostate-specific antigen mRNA in blood and bone marrow. *Clin Chem* 1997; 43.3: 443-452

(25) **Coutlée F, He Y, Saint-Antoine P, Olivier C, Kessous A.** Coamplification of HIV type 1 and  $\beta$ -globin gene DNA sequences in a nonisotopic polymerase chain reaction assay to control for amplification efficiency. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 363-371

(26) **Dassi C, Signorini S, Gerthoux P, Cazzaniga M, Brambilla P.** Cytochrome P450 1B1 mRNA measured in blood mononuclear cells by quantitative reverse transcription PCR. *Clin Chem* 1998; 44 N° 12: 2416-2421

(27) **De Bleser PJ, Jannes P, Buul-Offers va SC, Hoogerbrugge CM, Schravendijk van CFH, Niki T, Rogiers V, et al.** Insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor is expressed on CCl<sub>4</sub>-exposed rat fat-storing cells and facilitates activation of latent transforming growth factor-beta in cocultures with sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 1995; 21: 1429-1437

(28) **De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A.** Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997; 26: 886-893

(29) **Dieffenbach CW, Lowe TMJ, Dveksler GS.** General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl* 1993; 3: S30-S37

(30) **Ferre<sup>1</sup> F.** Polymerase Chain Reaction and HIV. *Clin Lab Med* 1994; 14: 313-318

(31) **Ferre<sup>2</sup> F, Marchese A, Pezzoli P, Griffin S, Buxton E, Boyer V.** Quantitative PCR - An overview. *Polymerase Chain Reaction*. Birkhauser Boston, Cambridge, MA 1994; 67-88

(32) **Friedman SL.** Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 20-29

(33) **Friedman SL.** The cellular basis of hepatic fibrosis. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835

(34) **Friedman SL, Arthur JP.** Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. *J Clin Invest* 1989; 84: 1780-1785

(35) **Gao C, Gressner G, Zoremba M, Gressner AM.** Transforming growth factor-beta (TGF-beta) expression in isolated and cultured rat hepatocytes. *J Cell Physiol* 1996; 167: 394-405

(36) **Garcia-Allan C, Loughlin, J, Orton T, Lord, P.** Changes in protein and mRNA levels of growth factor/growth factor receptors in rat livers after administration of phenobarbitone or methylclofenapate. *Arch Toxicol* 1997; 71: 409-415

(37) **Geerts A, Lazou JM, De Bleser P, Wisse E.** Tissue distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride-injured rat liver. *Hepatology* 1991; 13: 1193-1202

(38) **Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF.** Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 2725-2729

(39) **Gong WR, Roth S, Michel K, Gressner AM.** Isoforms and splice variant of transforming growth factor beta-binding protein in rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1998; 114: 352-363

(40) **Grande JP.** Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214: 27-40

(41) **Grasl-Kraupp B, Rossmannith W, Ruttkay-Nedecky, Müllauer L, Kammerer B, Bursch W, Schulte-Hermann R.** Levels of Transforming Growth Factor  $\beta$  and Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptors in Rat Liver During Growth, Regression by Apoptosis and Neoplasia. *Hepatology* 1998; 28(3): 717-726

(42) **Gressner AM.** Hepatic fibrogenesis: The puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops and extracellular matrix molecules. *Z Gastroenterol* 1992; 30 (Suppl 1): 5-16

(43) **Gressner AM.** Activation of Proteoglykan Synthesis in Injured Liver - A Brief Review of Molecular and Cellular Aspects. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 225-237

(44) **Gressner AM.** Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: A key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int* 1996; 49: S39-S45.

(45) **Gressner AM, Haarmann R.** Hyaluronic acid synthesis and secretion by rat liver fat-storing cells (perisinusoidal lipocytes) in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 151: 222-229

(46) **Gressner AM, Lahme B, Mannherz HG, Polzar B.** TGF-beta-mediated hepatocellular apoptosis by rat and human hepatoma cells and primary rat hepatocytes. *J Hepatol* 1997; 26: 1079-1092

(47) **Gressner AM, Lotfi S, Gressner G, Haltner E, Kropf J.** Synergism between hepatocytes and Kupffer cells in the activation of fat storing cells (perisinusoidal lipocytes). *J Hepatol* 1993; 19: 117-132

- (48) **Gressner AM, Lotfi S, Gressner G, Lahme B.** Identification and partial characterisation of a hepatocyte-derived factor promoting proliferation of cultured fat storing cells (parasinusoidal lipocytes). *Hepatology* 1992; 16: 1250-1266
- (49) **He Q, Marjamäki M, Soini H, Mertsola J, Viljanen MK.** Primers are decisive for sensitivity of PCR. *BioTechniques* 1994; 17: 82-87
- (50) **Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM.** Real Time Quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986-994
- (51) **Henco K, Heibey M.** Quantitative PCR: The determination of template copy numbers by temperature gel gradient electrophoresis (TGGE). *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6733-6734
- (52) **Hendriks HFJ, Brouwer A, Knook DL.** The rule of hepatic fat-storing (stellate) cells in retinoid metabolism. *Hepatology* 1987; 7: 1368-1371.
- (53) **Hendriks HFJ, Verhoffstad WAMM, Brouwer A, De Leeuw AM, Knook DL.** Perisinusoidal fat storing cells are the main vitamin A-storage sites in rat liver. *Exp Cell Res* 1985; 160: 138-149
- (54) **Herbst H, Milani S, Heinrichs O, Schuppan D.** Pathomorphologie akuter und chronischer Stadien der CCL<sub>4</sub>-induzierten Leberfibrose: Immunhistochemische und in situ Hybridisierungs-Untersuchungen. *Z. Gastroenterol* 1992; 30 (Suppl. 1): 21-28
- (55) **Hoffmann C, Lahme B, Brenzel A, Gressner AM.** The relation between hepatocellular damage and activation of fat storing cell proliferation in vitro. *Int Hepatol Commun* 1994; 2: 29-36

(56) **Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer THW, Volkenandt M, Shea LCC, Aigner K, et al.** Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1992; 52: 108-116

(57) **Jalava T, Lehtovaara P, Kallio A, Ranki M, Söderlund H.** Quantification of Hepatitis B virus DNA by competitive amplification and hybridization on microplates. *BioTechniques* 1993; 15: 134-137

(58) **Jenkins FJ.** Basic methods for the detection of PCR products. *PCR Methods Appl* 1994; 3: S77-S82

(59) **Kawada N, Klein H, Decker K.** Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells. *Biochem J* 1992; 285: 367-371

(60) **Kawada N, Tranthi TA, Klein H, Decker, K.** The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances - Possible involvement of endothelin-1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* 1993; 213: 815-823

(61) **Ke D, Ménard CH, Picard JF, Boissinot M, Ouellette M, Roy PH, Bergeron MG.** Developemt of Conventional and Real-Time PCR Assays for the Rapid Detection of Group B Streptococci. *Clin Chem* 2000; 46 (3): 324-331

(62) **Kellogg DE, Sninsky JJ, Kwok S.** Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1990; 189: 202-208

(63) **Knittel T, Fellmer P, Ramadori G.** Gene expression and regulation of plasminogen activator inhibitor type I in hepatic stellate cells of rat liver. *Gastroenterology* 1996; 111: 745-754

- (64) **Knook DL, DeLeeuw AM.** Isolation and characterization of fat storing cells from the rat liver, In: Knook DL, Wisse E, eds. Sinusoidal Liver Cells. Rijswijk, the Netherlands: Elsevier Biomedical Press 1982: 45-52.
- (65) **Kreutzer KA, Bohn A, Lass U, Peters R, Schmidt CA.** Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan™ probe format in the LightCycler™ instrument. Mol Cell Probes 2000; 14: 57-60
- (66) **Lawrence, DA.** Transforming growth factor-beta: an overview. Kidney Int 1995; 47: 19-23
- (67) **Lauler DP.** An overview of the pathophysiology and management of portal hypertension and ascites. J Hepatol 1993; 17 (Supl. 2): S1-S3
- (68) **Lee LG, Connell CR, Bloch W.** Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucl Acids Res 1993;21:3761-3766
- (69) **Li HH, Gyllensten UB, Cui XF, et al.** Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. Nature 1988; 335: 414-417
- (70) **Lyamichev V, Brow MAD, Dahlberg, JE.** Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. Science 1993; 260: 778-783
- (71) **Maher JJ, Friedman SL, Roll FJ, Bissell DM.** Immunolocalisation of laminin in normal rat liver and biosynthesis of laminin by hepatic lipocytes in primary culture. Gastroenterology 1988; 94: 1053-1062
- (72) **Massague J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph DA, Weis FMB.** Transforming Growth factor-beta. Cancer Surv 1992; 12: 81-103

(73) **Masuhara M, Yasunaga M, Tanigawa K, Tamura F, et al.** Expression of Hepatocyte Growth Factor, Transforming Growth Factor-alpha and Transforming Growth Factor-beta1 Messenger RNA in Various Human Liver Diseases and Correlation With Hepatocyte Proliferation. *Hepatology* 1996; 24: 323-329

(74) **Matsuoka M, Zhang MY Tsukamoto H.** Sensitization of hepatic lipocytes by high-fat diet to stimulatory effects of Kupffer cell-derived factors: Implication in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* 1990; 11: 173-182

(75) **McCulloch RK, Choong CS, Hurley DM.** An evaluation of competitor type and size for use in the determination of mRNA by competitive PCR. *PCR Methods Appl* 1995; 4: 219-226

(76) **Michalopoulos GK.** Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J* 1990; 4: 176-187

(77) **Miyajima Y, Kata K, Numata S, Horibe K.** Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood at diagnosis by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA. *Cancer* 1995; 75: 2757-2761

(78) **Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH.** A role of the latent TGF- $\beta$ 1 binding protein in the assembly and secretion of TGF- $\beta$ 1. *EMBO J* 1991; 10: 1091-1101

(79) **Miyazono K, Ichijo H, Heldin CH.** Transforming growth factor- $\beta$ : Latent forms, binding proteins and receptors. *Growth factors* 1993; 8: 11-22

(80) **Morrison C, Gannon F.** The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1219: 493-498

(81) **Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB.** Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* 1997; 51: 1376-1382

(82) **Murata K, Ochiai Y, Akashio K.** Polydispersity of acidic glycosaminoglycan components in human liver and changes at different stages in liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1985; 89: 1248-1257

(83) **Murphy LD, Herzog CE, Rudick, JB, Fojo AT, Bates SE.** Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of mdr-1 gene expression. *Biochemistry* 1990; 29: 10351-10356

(84) **Nakayama H, Yokoi H, Fujita J.** Quantification of mRNA by non-radioactive RT-PCR and CCD imaging system. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 4939

(85) **Nauck M, Hoffmann MM, Wieland H, März W.** Evaluation of the Apo E Genotyping Kit on the LightCycler. *Clin Chem* 2000, 46 (5): 722-724

(86) **Nedelman J, Heagerty P, Lawrence F.** Quantitative PCR with internal controls. *CABIOS* 1992; 8: 65-70

(87) **Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA, Landt O, Siegert W.** Different Real-Time PCR Formats Compared for the Quantitative Detection of Human Cytomegalovirus DNA. *Clin Chem* 1999; 45 (11): 1932-1937

(88) **Pannetier C, Delassus S, Darche S, Saucier C, Kourilsky P.** Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 577-583

(89) **Perry RR, Kang Y, Greaves BR.** Relationship between tamoxifen-induced transforming growth factor  $\beta$ 1 expression, cytostasis and apoptosis in human breast cancer cells. *Br J Cancer* 1995; 72(6): 1441-1446

(90) **Piatak Jr M, Ka-Cheung L, Williams B, Lifson JD.** Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *BioTechniques* 1993; 14: 70-81

(91) **Raeymaekers L.** Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications. *Anal Biochem* 1993; 214: 582-585

(92) **Ramadori G, Rieder H, Knittel Th, Dienes HP, Meyer-zum-Büschel KH.** Fat storing cells (FSC) of rat liver synthesize and secrete fibronectin. Comparison with hepatocytes. *J Hepatol* 1987; 4: 190-197

(93) **Ramadori G, Schwögler S, Veit T, Rieder H, Chung AE, Meyer-zum-Büschel KH.** Fat storing (Ito) cells (FSC) of rat liver synthesize and secrete entactin (nidogen): comparison with other liver cells. (Abst.) *Gastroenterology* 1990; 98: 623

(94) **Ramadori G, Veit T, Schwögler S, Dienes HP, Knittel T, Rieder H, Meyer-zum-Büschel KH.** Expression of the gene of the alpha-smooth-muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (Ito) cells. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1990; 59: 349-357

(95) **Rapley R, Theophilus BDM, Bevan IS, Walker MR.** Fundamentals of the polymerase chain reaction: A future in clinical diagnostics? *Med Lab Sci* 1992; 49: 119-128

(96) **Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G, Friedman SL.** Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1992; 24:193-203

- (97) **Roth S, Michel K, Gressner AM.** (Latent) Transforming Growth Factor  $\beta$  in Liver Parenchymal Cells, its Injury-Dependent Release, and Paracrine Effects on Rat Hepatic Stellate Cells. *Hepatology* 1998; 27:1003-1012
- (98) **Roth-Eichhorn S, Kühl K, Gressner AM.** Subcellular Localization of (Latent) Transforming Growth Factor  $\beta$  and the Latent TGF- $\beta$  Binding Protein in Rat Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells. *Hepatology* 1998; 28: 1588-1596
- (99) **Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE.** Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6904-6912
- (100) **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al.** Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis of sickle cell anaemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354
- (101) **Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS.** Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2572-2576
- (102) **Saric T, Shain SA.** Semiquantitative PCR. Enhancement of assay accuracy and reproducibility. *Biotechniques* 1997; 22: 630-634
- (103) **Schäfer S, Zerbe O, Gressner AM.** The synthesis of proteoglycans in fat storing cells of rat liver. *Hepatology* 1987; 7: 680-687.
- (104) **Siebert PD, Larrick JW.** PCR MIMICs: Competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *BioTechniques* 1993; 14: 244-249

- (105) **Siebert PD, Munch Y, Mayo K, Miller A, et al.** Quantitative RT-PCR. Methods&Applications BOOK 3. CLONTECH Laboratories, Inc. 1993
- (106) **Souazé F, Ntodou-Thomé A, Tran CY, Rostène W, Forgez P.** Quantitative RT-PCR: Limits and Accuracy. BioTechniques 1996; 21: 280-285
- (107) **Stolovitzky G, Cecchi G.** Efficiency of DNA replication in the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci 1996; 93: 12947-12952
- (108) **Strange J, Roberts RA.** Reduced expression of mature TGF-beta1 correlates with the suppression of rat hepatocyte apoptosis by the peroxisome proliferator, nafenopin. Mutat Res 1996; 372: 107-113
- (109) **Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, Strom TB.** Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 695-700
- (110) **Taipale J, Saharinen J, Hedman K, Keski-Oja J.** Latent transforming growth factor-beta1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. J Histochem Cytochem 1996;44:875-889
- (111) **Thorgersen VB, Bross P, Gregersen N, Nexø E.** Quantitative Analysis of the Human Epidermal Growth Factor Receptor Messenger RNA Using Reverse Transcription-PCR: A Methodological Study of Imprecision. Clin Chem 1998; 44 N° 6: 1344-1346
- (112) **Wakefield L, Kim SJ, Glick A, Winokur T, Colletta A, Sporn M.** Regulation of transforming growth factor- $\beta$  subtypes by members of the steroid hormone superfamily. J Cell Sci Suppl 1990; 13: 139-148

(113) **Wang AM, Doyle MV, Mark DF.** Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9717-9721

(114) **Wang X, Heller R, Van Voorhis N, Cruse CW, Glass F, Fenske N. et al.** Detection of submicroscopic lymph node metastasis with polymerase chain reaction in patients with malignant melanoma. *Ann Surg* 1994; 220: 768-774

(115) **Wenham PR.** DNA-based techniques in clinical biochemistry: a beginner's guide to theory and practice. *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 598-624

(116) **Wiesner RJ.** Direct quantification of picomolar concentrations of mRNAs by mathematical analysis of a reverse transcription/exponential polymerase chain reaction assay. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 5863-5864

(117) **Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ.** The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997; 22: 176-181

(118) **Zimmermann K, Mannhalter JW.** Technical Aspects of Quantitative Competitive PCR. *BioTechniques* 1996; 21: 268-279

(119) **Zhou NM, Matthys P, Polacek C, Fiten P, Sato A, Billiau A, Froyen G.** A competitive RT-PCR Method for the Quantitative Analysis of Cytokine mRNAs in Mouse Tissues. *Cytokine* 1997; 9: 212-218

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren

in Marburg:

Prof. Dr. Arnold, Prof. Dr. Dr. Basler, Prof. Dr. Baum, Prof. Dr. Beato, PD Dr. Christiansen, Prof. Dr. Daut, Prof. Dr. Engel, Prof. Dr. Eschenbach, Prof. Dr. Ganz, Prof. Dr. Geus, Prof. Dr. Gotzen, Prof. Dr. Gressner, Prof. Dr. Griss, Prof. Dr. Habermehl, Prof. Dr. Happle, Prof. Dr. Huffmann, Prof. Dr. Kern, Prof. Dr. Klenk, Prof. Dr. Krieg, Prof. Dr. Kroll, Prof. Dr. Kummer, Prof. Dr. Lang, Prof. Dr. Lennartz, Prof. Dr. Mannherz, Prof. Dr. Meyer-Breiting, Prof. Dr. Oertel, Prof. Dr. Pohlen, Prof. Dr. Dr. Remschmidt, Prof. Dr. Riedmiller, Prof. Dr. Rothmund, Prof. Dr. Schachtschabel, Prof. Dr. Schäfer, Prof. Dr. Schulz, Prof. Dr. Dr. Seifert, Prof. Dr. Steiniger, PD Dr. Stinner, Prof. Dr. Thomas, Dr. Vohland

in Oldenburg (akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Göttingen):

Prof. Dr. Bär, PD Dr. Brüggemann, Prof. Dr. Drescher, Prof. Dr. Gerken, Prof. Dr. Halbfaß, PD Dr. Seidenberg, Prof. Dr. Reil

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. A. M. Gressner für die Möglichkeit, unter seiner Leitung ein interessantes und anspruchsvolles Thema im Rahmen meiner Dissertation bearbeiten zu dürfen. Weiter danke ich Frau Dipl.-Biol. K. Michel und besonders Frau Dr. rer. nat. S. Roth-Eichhorn für ihre konstruktive Kritik und Hilfestellung bei der theoretischen Planung und praktischen Durchführung der Arbeit. Für die tatkräftige Unterstützung durch die Medizinisch Technischen Assistentinnen und Assistenten der Abteilung, Frau B. Heitmann, Frau B. Lahme, Herr J. Kurz und allen voran Frau A. Nassauer, bin ich besonders dankbar. Ich danke den Mitarbeitern der Kinderklinik der Universität Gießen für die Unterstützung bei der Suche nach den richtigen Primersequenzen.

Letztlich gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, ohne die nichts von alledem möglich gewesen wäre.