

Real-Time PCR:  
Optimierung und Evaluation,  
Etablierung von Housekeeping-Genen  
und die Expressionsanalyse bei Fallotscher  
Tetralogie

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des  
Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Daniel Rawer  
aus Gießen

Gießen 2005

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin,  
Abteilung Kinderkardiologie,  
Universitätsklinikum Gießen-Marburg

Leiter der Abteilung Kinderkardiologie  
Prof. Dr. D. Schranz

Gutachter: Prof. Dr. Kreuter

Gutachter: PD Dr. Fink

Tag der Disputation: 28.11.2006

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Rawer D, Borkhardt A, Wilda M, Kropf S, Kreuder J (2003) Influence of stochastics on quantitative PCR in the detection of minimal residual disease. *Leukemia*, 17: 2527-2531

Weitere Teile wurden als Posterbeitrag präsentiert:

Rawer D, Akintürk H, Borkhardt A, Schranz D, Kreuder J: Myocardial gene expression analysis using real-time RT-PCR in paediatric patients: Methodical considerations and validation of potential reference genes. The Association for European Paediatric Cardiology Annual Meeting, May 2002, Porto, Portugal

Rawer D, Akintürk H, Borkhardt A, Schranz D, Kreuder J: Expression of ten potential housekeeping genes and marker genes for cardiac stress in patients with Tetralogy of Fallot. Pediatric Academic Societies' Annual Meeting, May 2003, Seattle, USA

Die Ergebnisse dieser Arbeit fanden Eingang in:

Hilgendorff A, Rawer D, Doerner M, Tutdibi E, Ebsen M, Schmidt R, Guenther A, Gortner L, Reiss I (2003) Synthetic and natural surfactant differentially modulate inflammation after meconium aspiration. *Intensive Care Med*, 29: 2247-2254

Wilda M, Bruch J, Harder L, Rawer D, Reiter A, Borkhardt A, Woessmann W (2004) Inactivation of the ARF-MDM-2-p53 pathway in sporadic Burkitt's lymphoma in children. *Leukemia*, 18(3):584-8

War einmal ein Bumerang,  
War ein Weniges zu lang.  
Bumerang flog ein Stück,  
Aber kam nicht mehr zurück.  
Publikum - noch stundenlang -  
Wartete auf Bumerang

Joachim Ringelnatz

---

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
PROTOKOLLVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
2 HINTERGRUND.....	3
2.1 FALLOTSCHE TETRALOGIE.....	3
2.1.1 Klinischer Hintergrund.....	3
2.1.2 Natriuretische Peptide.....	6
2.1.3 Angiogenetische Wachstumsfaktoren.....	8
2.2 METHODEN DER GENEXPRESSIONSANALYSE.....	10
2.2.1 Hybridisierungsassays: Northern Blot und DNA Microarrays.....	10
2.2.2 Quantitative PCR (qPCR).....	11
2.2.3 Funktionsprinzip der Real-Time PCR.....	15
2.3 QUANTIFIZIERUNGSSTRATEGIEN UND DER UMGANG MIT METHODISCHEN FEHLERN IN DER REAL-TIME PCR.....	19
2.3.1 Globale methodische Fehler: Ausgleich durch die Verwendung eines Housekeeping-Gens.....	20
Validität eines Housekeeping-Gens.....	22
2.3.2 Quantifizierungsstrategien in der Real-Time PCR.....	23
Analyse der Reaktionskinetik: Von der Fluoreszenz zum Ct.....	23
Allgemeine mathematische Beschreibung der PCR.....	29
Absolute Quantifizierung mittels Standard-Kurve und optional nachfolgender relativer Quantifizierung.....	31
Relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.....	33
2.3.3 Globale methodische Fehler: Strategien zur Evaluation von Housekeeping- Genen.....	36
2.3.4 Genspezifische methodische Fehler: Aufdeckung in Vorversuchen und Ableitung einer Strategie zu deren Minimierung.....	40
Vorversuche.....	40
Strategie zur Optimierung des Protokolls für die Prä-PCR.....	43
3 FRAGESTELLUNG.....	46
4 MATERIAL UND METHODEN.....	47
4.1 STUDIENKOLLEKTIV.....	47

4.1.1 Kollektiv der Patienten mit Fallot-Tetralogie und Fallot-artigen Herzfehlern.....	47
4.1.2 Kontrollkollektiv .....	49
4.2 UNTERSUCHTE GENE.....	50
4.2.1 Housekeeping-Gene.....	50
4.2.2 Zielgene.....	54
4.3 ÜBERSICHT DER METHODEN.....	55
4.4 PRÄ-PCR .....	56
4.4.1 Optimierung und Evaluation der Prä-PCR.....	56
Isolierung der RNA: Auswahl neuer Protokolle.....	56
Reverse Transkription: Evaluierung zahlreicher Protokollvariationen .....	60
4.4.2 Endgültiges Protokoll für die Prä-PCR und dessen Evaluation .....	63
4.5 cDNA-QUANTIFIZIERUNG.....	64
4.5.1 Konzept des neuen Protokolls zur Quantifizierung einzelsträngiger cDNA .....	64
4.5.2 Optimierung und Evaluation des Protokolls.....	66
4.5.3 Endgültiges Protokoll: Quantifizierung einzelsträngiger cDNA .....	68
4.6 REAL-TIME PCR .....	70
4.6.1 Allgemeines Protokoll: Real-Time PCR.....	70
4.6.2 Optimierung und Evaluation der Real-Time PCR für die untersuchten Gene .....	74
4.6.3 Synthese der Plasmid-Standards und des Kalibrators.....	81
4.6.4 Endgültiges Protokoll: Real-Time PCR der klinischen Proben.....	84
5 ERGEBNISSE.....	85
5.1 OPTIMIERUNG UND EVALUATION DER PRÄ-PCR.....	85
5.1.1 Optimierung der RNA-Isolierung.....	85
5.1.2 Optimierung der Reversen Transkription .....	87
5.1.3 Evaluation der gesamten Prä-PCR.....	90
5.2 OPTIMIERUNG UND EVALUATION DER cDNA-QUANTIFIZIERUNG..	91
5.3 OPTIMIERUNG UND EVALUATION DER REAL-TIME PCR FÜR DIE UNTERSUCHTEN GENE.....	94
5.3.1 Überprüfung der Sensitivität der Real-Time PCR .....	97
5.4 EVALUATION DER POTENTIELLEN HOUSEKEEPING-GENE .....	101
5.5 NATRIURETISCHE PEPTIDE UND ANGIOGENETISCHE WACHSTUMSFAKTOREN .....	106
5.5.1 Expression in den verschiedenen Patientengruppen .....	106

---

5.5.2 Zusammenhänge der Genexpressionen untereinander und mit den klinischen Merkmalen .....	108
6 DISKUSSION .....	115
6.1 METHODE.....	115
6.1.1 Prä-PCR.....	115
6.1.2 cDNA-Quantifizierung.....	118
6.1.3 Real-Time PCR.....	121
6.1.4 Die Sensitivität der Real-Time PCR und ihre diagnostische Bedeutung .	123
6.1.5 Housekeeping-Gene.....	125
6.1.6 Zusammenfassung der methodischen Fortschritte .....	128
6.2 EXPRESSIONSANALYSE BEI FALLOTSCHER TETRALOGIE .....	130
6.2.1 Plausibilität der klinischen Daten .....	130
6.2.2 Expression der natriuretischen Peptide .....	131
6.2.3 Expression der angiogenetischen Wachstumsfaktoren.....	135
6.3 AUSBLICK.....	139
7 ZUSAMMENFASSUNG .....	141
8 SUMMARY .....	143
ANHANG .....	i
DETAILS DES STUDIEN- UND KONTROLLKOLLEKTIVES.....	i
LITERATURVERZEICHNIS.....	i
MATERIALIEN .....	xiii
Spezialgeräte .....	xiii
Reagenzien und Verbrauchsmaterial .....	xiii
ERKLÄRUNG.....	xv
LEBENS LAUF.....	xvi
DANKSAGUNGEN .....	xx

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schritte der Genexpressionsanalyse .....	2
Abbildung 2: Fallotsche Tetralogie .....	3
Abbildung 3: Funktionsprinzip der PCR .....	12
Abbildung 4: Funktionsprinzip der Taqman-Sonden .....	15
Abbildung 5: Funktionsprinzip des ABI Prism Sequence Detection System 7700 .....	16
Abbildung 6: Globale methodische Fehler in der Prä-PCR: Ausgleich durch Verwendung eines Housekeeping-Gens .....	21
Abbildung 7: Beispiel eines vom SDS aufgezeichneten Rohspektrums .....	23
Abbildung 8: Beispiel von gespeicherten Rohspektren .....	24
Abbildung 9: Beispiel einer Multikomponenten-Darstellung .....	24
Abbildung 10: Beispiel eines Amplification Plots, lineare Darstellung von $R_n$ .....	25
Abbildung 11: Beispiel eines Amplification Plots, lineare Darstellung von $\Delta R_n$ .....	26
Abbildung 12: Beispiel eines Amplification Plots, log. Darstellung von $\Delta R_n$ .....	27
Abbildung 13: Beispiel einer Standard-Kurve im Rahmen der absoluten Quantifizierung .....	31
Abbildung 14: Evaluation von Housekeeping-Genen: Ausgleich der globalen methodischen Fehler durch Messung der Gesamt-RNA .....	37
Abbildung 15: Genspezifische methodische Fehler in der Prä-PCR müssen minimiert werden .....	45
Abbildung 16: Übersicht der Methoden .....	55
Abbildung 17: Beispiel einer Poisson'schen Verteilung .....	79
Abbildung 18: Einfluss verschiedener Protokollvariationen auf die relative Effizienz der Reversen Transkription. ....	87
Abbildung 19: Einfluss der RNA-Konzentration auf die relative Effizienz der Reversen Transkription. ....	88
Abbildung 20: Effekt der Messung der Gesamt-RNA als Bezugspunkt bei der Evaluation von potentiellen Housekeeping-Genen im Vergleich zur Messung von Gesamt-RNA .....	92
Abbildung 21: Beispiel einer Primermatrix von HPRT .....	94
Abbildung 22: Überprüfung der Sensitivität der Real-Time PCR: Erwartete und Gemessene Verteilung der Kopien pro Reaktionsgefäß bei niedriger Kopienzahl .....	98
Abbildung 23: Expression der zehn potentiellen Housekeeping-Gene in allen untersuchten Proben .....	101

---

Abbildung 24: Expression der zehn potentiellen Housekeeping-Gene, Unterscheidung zwischen den Gruppen.....	103
Abbildung 25: Effekt der Verwendung eines nicht validen Housekeeping-Gens.....	105
Abbildung 26: Expression der natriuretischen Peptide und angiogenetischen Wachstumsfaktoren in den untersuchten Gruppen .....	107
Abbildung 27: Zusammenhang der Expression der natriuretischen Peptide und angiogenetischen Wachstumsfaktoren mit dem Alter .....	110
Abbildung 28: Zusammenhänge der Expressionen der natriuretischen Peptide untereinander und mit den angiogenetischen Wachstumsfaktoren .....	113
Abbildung 29: Zusammenhänge der Expressionen der angiogenetischen Wachstumsfaktoren untereinander .....	114
Abbildung 30: Zusammenfassung der methodischen Fortschritte.....	129

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Ergebnisse der Vorversuche zur Prä-PCR.....	41
Tabelle 2: Ausgewählte klinische Parameter der Patienten.....	48
Tabelle 3: Kontrollkollektiv.....	49
Tabelle 4: Die untersuchten potentiellen Housekeeping-Gene .....	53
Tabelle 5: Auswahl der neuen Protokolle für die RNA-Isolierung.....	56
Tabelle 6: Unterschiede der beiden Basisprotokolle für die Reverse Transkription...	60
Tabelle 7: Die verwendeten Primer und Sonden .....	73
Tabelle 8: Effekt der Messung der Gesamt-RNA als Bezugspunkt bei der Evaluation von potentiellen Housekeeping-Genen im Vergleich zur Messung von Gesamt- RNA .....	93
Tabelle 9: PCR-Effizienzen, bestimmt anhand von cDNA- und Plasmid- Verdünnungsreihen .....	95
Tabelle 10: Intra- und Inter-Assay-Variabilitäten der Real-Time PCR.....	96
Tabelle 11: Überprüfung der Sensitivität der Real-Time PCR: Vergleich der Erwartungswerte und der beobachteten Mittelwerte.....	99
Tabelle 12: Variationsbreite der Expression der zehn potentiellen Housekeeping- Gene in allen untersuchten Proben.....	102
Tabelle 13: Zusammenhänge der natriuretischen Peptide und der angiogenetischen Wachstumsfaktoren untereinander und mit den klinischen Parametern .....	109
Tabelle 14: Klinische Parameter des Studien- und Kontrollkollektives .....	ii

---

## PROTOKOLLVERZEICHNIS

Protokoll 1: Allgemeine Richtlinien beim Umgang mit RNA .....	58
Protokoll 2: Probengewinnung, RNA-Isolierung und –Aufreinigung, Qualitätskontrolle .....	58
Protokoll 3: Reverse Transkription, Basisprotokoll I nach Borkhardt 1994 (RT I)....	61
Protokoll 4: Reverse Transkription, Basisprotokoll II nach Matathias 1999 (RTII) ..	61
Protokoll 5: Evaluation verschiedener Variationen der RT-Protokolle .....	62
Protokoll 6: Endgültiges Protokoll für die Prä-PCR .....	63
Protokoll 7: Evaluation der gesamten Prä-PCR.....	63
Protokoll 8: Optimierung des Protokolls zur Quantifizierung von ss cDNA .....	66
Protokoll 9: Evaluation des Protokolls zur Quantifizierung von ss cDNA .....	67
Protokoll 10: Quantifizierung einzelsträngiger cDNA .....	68
Protokoll 11: Real-Time PCR, allgemeines Protokoll .....	70
Protokoll 12: Design der Primer und Sonden.....	74
Protokoll 13: Konventionelle PCR mit den Primern der Real-Time PCR.....	76
Protokoll 14: Primermatrix.....	76
Protokoll 15: Sondenmatrix.....	77
Protokoll 16: Bestimmung der PCR-Effizienz anhand einer cDNA-Verdünnungsreihe .....	77
Protokoll 17: Bestimmung der Intra- und Inter-Assay-Variabilität der Real-Time PCR.....	78
Protokoll 18: Überprüfung der Spezifität der Real-Time PCR auf cDNA-Sequenzen	78
Protokoll 19: Überprüfung der Sensitivität und Präzision der Real-Time PCR.....	80
Protokoll 20: Synthese der Plasmid-Standards .....	81
Protokoll 21: Synthese der Kalibrator-cDNA .....	83
Protokoll 22: Real-Time PCR der klinischen Proben.....	84

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

18S	18S ribosomale RNA
Abb.	Abbildung
ABL	abelson
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
B2M	$\beta$ 2-microglobulin
BNP	brain-type Natriuretisches Peptid
CASQ2	Calsequestrin 2
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
c-MYC	c-MYC Proto-Onkogen
dATP	Desoxyribo-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxyribo-Cytidin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyribo-Guanosin-5'-Triphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
DORV	double outlet right ventricle
ds-cDNA	double-stranded complementary desoxyribonucleic acid
dsDNA	double-stranded desoxyribonucleic acid
dTTP	Desoxyribo-Thymidine-5'-Triphosphat
dUTP	Desoxyribo-Uridin-5'-Triphosphat
GAPDH	glyceraldehyde-P-dehydrogenase
gDNA	genomic desoxyribonucleic acid
GUSB	$\beta$ -glucuronidase
HIF1A	hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$
HPRT	hypoxanthine-phosphoribosyl-transferase
mRNA	messenger ribonucleid acid
NA	nucleic acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTC	non template control, Leerwert ohne Template in der Real-Time PCR
P RA mean	Rechtsatrialer Mitteldruck
P RV ed	Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck
P RV peak	Rechtsventrikulärer Spitzendruck
PBGD	porphobilinogen deaminase
PCR	polymerase chain reaction
PS	Pulmonalstenose

---

$Q_p/Q_s$	Quotient aus pulmonalarteriellen und systemarteriellen Fluss
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RA	Rechtsatrial
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	ribonucleid acid
RPLP0	large ribosomal protein P0
rRNA	ribosomal ribonucleid acid
RT	Reverse transcription
RT-PCR	Reverse transcription – polymerase chain reaction
RV	rechtsventrikulär
Sa O <sub>2</sub>	Arterielle Sauerstoffsättigung
ss-cDNA	single-stranded complementary desoxyribonucleic acid
ssDNA	single-stranded desoxyribonucleic acid
TGFβ	transforming growth factor β
TNNI3	Troponin I
TOF	Tetralogy of Fallot
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGF-121	vascular endothelial growth factor, isoform 121
VEGF-165	vascular endothelial growth factor, isoform 165
VEGF-189	vascular endothelial growth factor, isoform 189
VEGF-R1	vascular endothelial growth factor receptor 1
VEGF-R2	vascular endothelial growth factor receptor 2
VSD	Ventrikelseptumdefekt



## 1 EINLEITUNG

Die Fallotsche Tetralogie (Tetralogy of Fallot, TOF) stellt einen der häufigsten angeborenen Herzfehler dar. Ein weitergehendes Verständnis der molekularen Mechanismen sowohl der gestörten Morphogenese des Herzens als auch der myokardialen Anpassungsreaktionen auf die unphysiologische rechtsventrikuläre Druckbelastung ist deshalb anzustreben (Apitz 2002, Schumacher 2001). Für die natriuretischen Peptide ANP und BNP (Atriales natriuretisches Peptid und Brain-type natriuretisches Peptid) sowie die angiogenetischen Wachstumsfaktoren HIF1A (Hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ ) und VEGF (Vascular endothelial growth factor) wurde zum einen bei verschiedenen kardialen Erkrankungen eine Rolle bei der Anpassungsreaktion auf Druckbelastung im Sinne einer fetalen Reexpression beschrieben, zum anderen wurden bei Patienten mit Fallotscher Tetralogie erhöhte Plasmaspiegel dieser Faktoren nachgewiesen (siehe Abschnitte 2.1.1, 2.1.2 und 2.1.3, Tulevski 2001, Norozi 2005). Da die langfristige Regulation der Genexpression bei chronischer Belastung auch im Myokard auf Ebene der mRNA stattfindet, soll diese quantifiziert werden.

Die Real-Time Polymerasekettenreaktion (Real-Time PCR, siehe Abschnitte 2.2.3 und 2.3.2) ist eine etablierte, präzise und sensitive Methode zur Genexpressionsanalyse (Heid 1996, Lockey 1998). Methodische Fehler treten weniger während der Real-Time PCR selbst auf, sondern vor allem während der Probenaufarbeitung von der Gewinnung der Biopsie bis zur Synthese der komplementären DNA (zusammenfassend als Prä-PCR bezeichnet, siehe Abbildung 1, Bustin 2000).

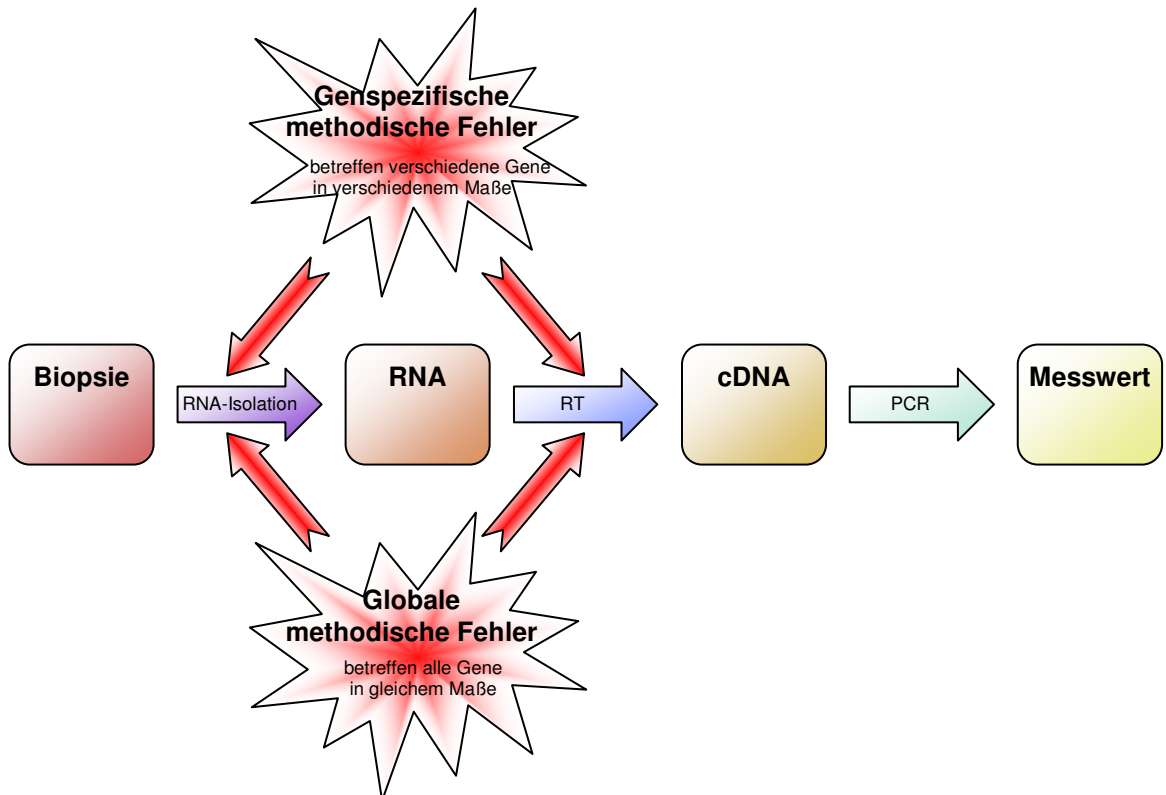
Um diese methodischen Fehler zu analysieren und so weit wie möglich zu kompensieren oder zu minimieren, sollen sie in dieser Arbeit unterschieden werden in

- 1) globale methodische Fehler, welche die Messung der Expression aller Gene in einer Biopsie in gleichem Maße verfälschen, und
- 2) genspezifische methodische Fehler, welche die Expression einzelner Gene in einer Biopsie in unterschiedlichem Maße verfälschen.

Globale methodische Fehler können grundsätzlich durch die Verwendung eines so genannten Housekeeping-Genes ausgeglichen werden. Dabei handelt es sich um ein möglichst konstant exprimiertes Gen, dessen Menge in jeder Probe als Bezugspunkt für die des eigentlich zu untersuchenden Zielgenes dient. Die konstante Expression der Housekeeping-Gene muss für jedes neue Studienprotokoll neu evaluiert werden.

Hierbei müssen jedoch genau diejenigen globalen methodischen Fehler beachtet werden, die später durch die Verwendung des Housekeeping-Gens ausgeglichen werden sollen (siehe Abschnitt 2.3.3, Bustin 2000).

Genspezifische methodische Fehler lassen sich nicht durch die Verwendung eines Housekeeping-Gens beherrschen. Daher müssen die einzelnen Schritte der Prä-PCR auf mögliche Fehlerquellen hin untersucht und optimiert werden (siehe Abschnitt 2.3.4).



#### Abbildung 1: Schritte der Genexpressionsanalyse

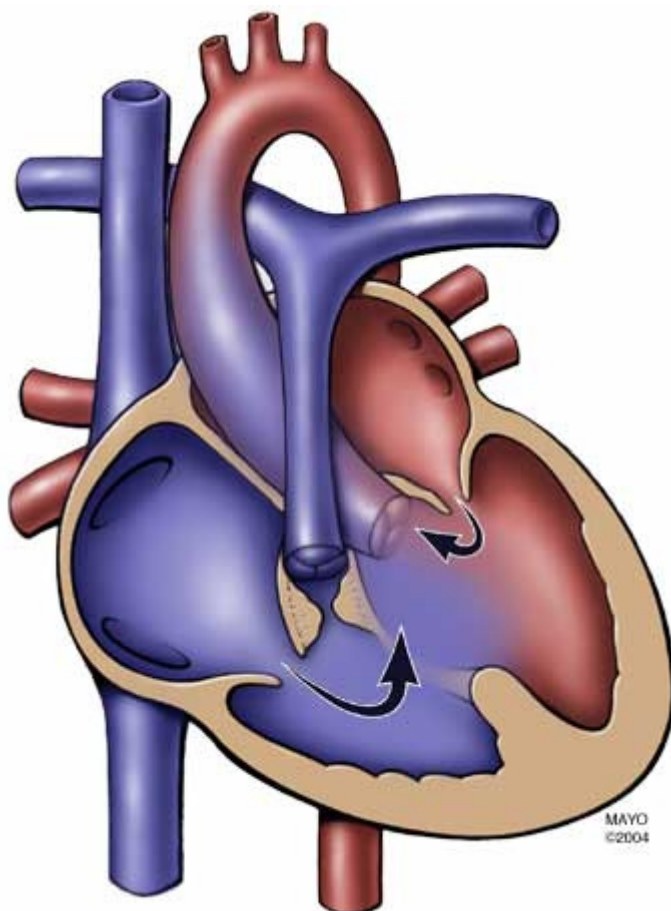
Dargestellt sind die einzelnen Schritte der Probenaufarbeitung: RNA-Isolation, Reverse Transkription (RT) zur komplementären DNA (cDNA) und die Real-Time PCR. Methodische Fehler können vor allem während der ersten beiden Schritte auftreten, die als Prä-PCR zusammengefasst werden.

## 2 HINTERGRUND

### 2.1 FALLOTSCHE TETRALOGIE

#### 2.1.1 Klinischer Hintergrund

Angeborene Herzfehler stellen mit einer Inzidenz von 5-8 pro 1000 Lebendgeborenen die größte Gruppe angeborener Fehlbildungen dar. Hiervon entfallen wiederum 8% auf die Fallotsche Tetralogie (Apitz 2002, Schumacher 2001). Es handelt sich um einen kombinierten Herzfehler mit einer subvalvulären und valvulären Pulmonalstenose (PS), einem Ventrikelseptumdefekt (VSD) im Auslaßseptum, einer überreitenden (d.h. über dem Ventrikelseptumdefekt positionierten und aus beiden Ventrikeln gespeisten) Aorta und einer rechtsventrikulären (RV) Hypertrophie (s. Abbildung 2). Das Ausmaß der PS bestimmt die Hämodynamik, mit zunehmender PS nimmt der Rechts-Links-Shunt über den VSD zu. Der rechte Ventrikel ist druckbelastet, es kommt zur RV Hypertrophie (Apitz 2002, Schumacher 2001).



**Abbildung 2: Fallotsche Tetralogie**

Aus: <http://www.mayoclinic.org>

Klinisch imponiert eine in den ersten Lebenswochen bis -monaten auftretende Zyanose. Die chirurgische Korrektur kann meist im Säuglingsalter durch Patchverschluss des VSD und Beseitigung der PS mit Resektion der häufig vorhandenen infundibulär stenosierenden hypertrophierten Muskelbündel erfolgen. Bei hypoplastischen Pulmonalarterien muss zunächst deren Wachstum durch Verbesserung der Lungenperfusion mittels Anlage einer aortopulmonalen Anastomose (Blalock-Taussig-Anastomose) oder Ballondilatation der Pulmonalklappe angeregt werden (Apitz 2002, Schumacher 2001). Bei im späteren Leben auftretenden Restdefekten (PS oder VSD) sind gelegentlich Reoperationen notwendig (Murphy 1993, Nollert 1997, Oechslin 1999).

Die Prognose ist durch die Frühkorrektur gut. Die 36-Jahre-Überlebensrate beträgt 85%, die Lebensqualität wird von 82% der Patienten als „exzellent“ oder „gut“ beschrieben (Daliotto 2002). Bekannt sind jedoch Spätkomplikationen als Folge der präoperativen Druckbelastung, intraoperativ erworbener Myokardläsionen oder der postoperativ gestörten Hämodynamik auf dem Boden einer Rest-Stenose oder Pulmonalklappeninsuffizienz. Ventrikuläre Arrhythmien und rechtsventrikuläre Dysfunktion stellen die häufigsten Spätkomplikationen dar (Nollert 1997, Murphy 1993, Oechslin 1999).

Vor diesem Hintergrund ist das Verständnis der molekularen Mechanismen dieser Anpassungsreaktionen von großer Bedeutung, nicht nur für sich eventuell neu ergebende Therapieoptionen, sondern auch für die Anwendung und Evaluation bereits bestehender Behandlungsprinzipien. Hierbei steht die Fallotsche Tetralogie nicht alleine. Erkenntnisse über die Regulation bestimmter Gene und Genkaskaden im Rahmen anderer kardialer Erkrankungen können beim Verständnis der Fallotschen Tetralogie helfen und umgekehrt kann die Fallotsche Tetralogie als Modell für andere Erkrankungen dienen (Kaynak 2003).

Es bietet sich daher an, das im Rahmen der Korrekturoperation resezierten RV Myokard auf die Expression solcher Gene hin zu untersuchen, die bei der Anpassung an die chronische RV Druckbelastung eine Rolle spielen könnten. Da die mittel- und langfristige Regulation zahlreicher Gene im Myokard auf der Ebene der Transkription stattfindet, muss bei einer solchen Genexpressionsanalyse die messenger RNA (mRNA) möglichst exakt quantifiziert werden (Taegtmeier 2000).

---

Eine Genexpressionsanalyse bei angeborenen Herzfehlern bildet jedoch immer ein Nebeneinander von sekundären Anpassungsreaktionen auf den Herzfehler und primären Veränderungen, die mit der Entwicklung des Herzfehlers in Zusammenhang stehen, ab. Dies mag die Interpretation der Ergebnisse erschweren, bietet gleichzeitig aber die Chance, Hinweise auf Elemente der Ätiologie und der Pathogenese zu erhalten (Kaynak 2003).

### 2.1.2 Natriuretische Peptide

Neben seiner mechanischen Pumpfunktion hat das Herz auch Eigenschaften eines endokrinen Organs. Als Reaktion auf Druck- und Volumenbelastung werden das atriale natriuretische Peptid (ANP, atrialer natriuretischer Faktor, ANF) und das Brain-type natriuretische Peptid (BNP) synthetisiert und sezerniert. ANP entstammt größtenteils den Vorhöfen, zum kleineren Teil auch den Ventrikeln. Der Plasmaspiegel wird überwiegend durch die Sekretion aus gespeicherten Granula bestimmt. BNP, dessen Konzentration im Blut unter physiologischen Bedingungen deutlich unter der des ANPs liegt, entstammt ebenfalls überwiegend den Vorhöfen. Der Plasmaspiegel von BNP ist im Vergleich zu dem von ANP stärker auf der Ebene der Proteinsynthese reguliert. Bei verstärkter myokardialer Belastung wird BNP zunehmend und überwiegend von ventrikulären Kardiomyozyten synthetisiert. BNP wird deshalb in Abgrenzung zu ANP oft als ventrikelspezifisch bezeichnet (de Bold 2001, Mair 2001, Goetze 2004).

Als Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des Sympathikus wirken vor allem ANP aber auch BNP natriuretisch und diuretisch, vasodilatativ und hemmend auf das RAAS durch Inhibierung der Aldosteronsynthese sowohl in der Nebenniere als auch direkt im Myokard (de Bold 2001, Yoshimura 2001). Sowohl ANP als auch BNP wirken protektiv gegen myokardiale Hypertrophie und Fibrose (Tamura 2000, Wang 2003).

Der wichtigste Trigger für die vermehrte Expression von ANP und BNP ist die myokardiale Dehnung (de Bold 2001). Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine zumindest teilweise humoral gesteuerte ANP- und BNP-Sekretion (Iso 1997). Neuere Studien konnten nachweisen, dass ANP und BNP auch durch Hypoxie getriggert werden (Goetze 2004, Rück 2004). Verschiedene Transkriptionsfaktoren konnten mit der Steuerung der Expression der natriuretischen Peptide in Zusammenhang gebracht werden: GATA4, Nkx2-5, Tbx5 und Irx4 (Bruneau 2002, Charron 1999, Bruneau 2001).

Die unmittelbar postnatal stark ansteigenden Plasmaspiegel von ANP und BNP fallen ab dem 3. Tag nach der Geburt ab, um im Alter von 3 Monaten die adulten Werte zu erreichen. Im höheren Lebensalter steigen die Plasmaspiegel wieder an (Mir 2002, Mir 2003, Yoshibayashi 1995, Mair 2001, Kato 2002).

Die Reexpression fetaler Gene ist eine allgemeine Anpassungsreaktion des Myokards auf Druck- und Volumenbelastung. Auch in diesem Zusammenhang ist die im Vergleich zum physiologischen postnatalen Niveau erhöhte Expression von ANP und BNP im Rahmen von rechtsventrikulärer Druckbelastung (Carroll 1995, Bauer 1998) sowie von kardialer Hypertrophie und Herzversagen zu sehen (Hoshijima 2002, de Bold 2001).

Die Plasmaspiegel von ANP und BNP können daher bei Herzinsuffizienz diagnostisch zur Abschätzung der Behandlungseffizienz und der Prognose verwendet werden, ANP vor allem beim akuten Herzversagen mit akuter Volumenbelastung, BNP beim manifesten oder drohenden chronischen Herzversagen (Clerico 2004). Die therapeutische Gabe von ANP oder BNP beim akuten Herzversagen zeigte positive Resultate (Yoshimura 2001).

Zur Bedeutung von ANP und BNP bei der Fallotschen Tetralogie existieren widersprüchliche Studien. Während einige Autoren (Matsuoka 1988, Kikuchi 1987) keinen Anstieg des ANP-Plasmaspiegels feststellen konnten, wiesen andere (Oberhansli 1990, Hayabuchi 1999) einen Anstieg gegenüber den Kontrollen nach und konnten diesen durch Vergleich des Spiegels im rechten Vorhof und im Pulmonalarterienstamm dem rechten Ventrikel zuordnen (Oberhansli 1990).

Eine Quantifizierung der mRNA von ANP und BNP bei Patienten mit Fallotscher Tetralogie fand bisher lediglich in rechtsatrialen Biopsien statt. Hierbei wurde eine im Vergleich zu anderen Herzfehlern (Ventrikelseptumdefekt und komplexen Herzfehlern) signifikant erniedrigte Expression festgestellt (Iasone 1999).

### 2.1.3 Angiogenetische Wachstumsfaktoren

Der Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der vor allem für seine Rolle bei der Gefäßneubildung und der metabolischen Adaptation unter Hypoxie bekannt ist. HIF-1 ist ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. HIF-1 $\alpha$  (HIF1A) ist die Sauerstoff-regulierte Untereinheit (Semenza 1999). Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A, im folgenden vereinfachend als VEGF bezeichnet) ist ein wichtiger von HIF-1 gesteuerter Wachstumsfaktor, der an der Gefäßneubildung beteiligt ist. (Robinson 2001, Ferrara 2003). Für zahlreiche Gene wurde eine Induktion durch HIF-1 nachgewiesen. Neben VEGF sind dies vor allem metabolische Gene oder auch Erythropoetin (Semenza 1999, Robinson 2001).

Die Aktivität von HIF1A wird vor allem auf Proteinebene durch Ubiquitinierung und proteosomale Degradation unter nicht-hypoxischen Bedingungen reguliert (Jung 2002, Semenza 1999). Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine Regulation auf mRNA-Ebene (Catron 2001). Für den Mechanismus des Einflusses von O<sub>2</sub> auf HIF1A existieren zahlreiche Hypothesen, letztendlich ist diese Frage jedoch noch ungeklärt (Semenza 1999, Semenza 2001). Es wurde mittlerweile nachgewiesen, dass die Aktivität von HIF-1 A auch durch myokardiale Dehnung gesteigert wird (Kim 2002). Die Induktion von VEGF im Myokard kann zum einen durch HIF-1 unter Hypoxie oder bei myokardialer Dehnung stattfinden (Robinson 2001, Kim 2002, Carrol 1995), zum anderen ist auch eine Steigerung der Expression von VEGF durch Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) bei myokardialer Dehnung nachgewiesen worden (Li 1997). Andere Wachstumsfaktoren wie epidermal growth factor (EGF), keratinocyte growth factor, insulin-like growth factor (IGF), fibroblast growth factor (FGF) und platelet-derived growth factor (PDGF) und inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1 und IL-6 können ebenfalls die VEGF-Expression steigern (Ferrara 2003).

Durch alternatives Splicing können sechs verschiedene Isoformen von VEGF gebildet werden. Die wichtigsten und im Myokard am stärksten exprimierten sind VEGF-121, VEGF-165 und VEGF-189. VEGF-121 und VEGF-165 werden mehr der Angiogenese (also der Gefäßneubildung ausgehend von bestehenden Gefäßen), VEGF-189 wird mehr der Vaskulogenese (also der de novo Genese) zugeordnet (Robinson 2001, Carmeliet 1999, Ng 2001, Ferrara 2003). Die Mechanismen der Steuerung des alternativen Splicings von VEGF ist ungeklärt (Robinson 2001, Bacic 1995).

Es existieren verschiedene Rezeptoren für VEGF, allen voran VEGF-Rezeptor 1 (VEGF-R1, auch flt1) und VEGF-Rezeptor 2 (VEGF-R2, auch flk1 oder KDR). Alle

VEGF-Isoformen können an beide Rezeptoren binden, VEGF-189 allerdings nur nach Prozessierung (Robinson 2001). VEGF-R2 ist der wesentliche Mediator der mitogenen, angiogenetischen und Permeabilitätssteigernden Effekte von VEGF (Ferrara 2003). In ruhenden, nicht proliferierenden Gefäßen ist VEGF-R2 wenig exprimiert (Quinn 1993, Eichman 1997). Die Funktion von VEGF-R1 ist unklar. Zum einen gibt es Hinweise für eine Funktion bei der Erhaltung von Gefäßen, zum anderen existiert die Hypothese, VEGF-R1 sei ein „Köder“-Rezeptor (negativer Regulator), der die Konzentration von frei verfügbarem VEGF reguliert (Robinson 2001, Ferrara 2003).

Die Expression von VEGF-R1 wird von HIF-1 stimuliert und ist somit abhängig von der lokalen Sauerstoffverfügbarkeit. Die Expression von VEGF-R2 wird von VEGF selbst gesteuert (Gerber 1997, Shen 1998).

Bei der Maus steigen die mRNA-Konzentrationen von VEGF im Herz intrauterin an und fallen postnatal auf niedrigere adulte Werte ab, die Relation der einzelnen Isoformen ändert sich postnatal wenig (Ng 2001). Beim Menschen fällt der Plasmaspiegel von VEGF innerhalb der ersten drei Lebensmonate auf adulte Werte ab (Himeno 2003).

Eine vermehrte Expression von HIF1A und VEGF wurde im ischämischen Myokard beschrieben (Lee 2000). Während einige Studien kein HIF1A oder VEGF in nicht-ischämischem Myokard nachweisen konnten (Lee 2000), zeigten andere eine erhöhte Expression von VEGF im hypertrophen Myokard (Li 1996).

Bei Patienten mit zyanotischen Herzfehlern wurden erhöhte Plasmaspiegel von VEGF beschrieben, wobei das Ursprungsorgan unklar ist und eine Korrelation mit der arteriellen Sauerstoffsättigung nur in einem Teil der Studien hergestellt werden konnte (Ootaki 2003, Himeno 2003, Starnes 2000).

Studien zur Untersuchung von HIF1A und VEGF mit seinen Isoformen und Rezeptoren im Myokard von Patienten mit Fallotscher Tetralogie liegen bislang nicht vor.

## 2.2 METHODEN DER GENEXPRESSIONSANALYSE

Zur Untersuchung der Genexpression wird RNA entweder direkt nachgewiesen, oder es wird durch eine Reverse Transkription (RT) zunächst eine komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. Bei der Quantifizierung von Nukleinsäuren kommen verschiedene Funktionsprinzipien zur Anwendung. Zahlreiche Methoden basieren auf dem direkten Nachweis von Nukleinsäuren mittels Hybridisierung. Andere Ansätze kombinieren eine spezifische Amplifikation durch die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR; bei Untersuchung von RNA mit vorausgehender Reverser Transkription als RT-PCR bezeichnet) mit einer anschließenden Messung des PCR-Produkts, wodurch eine sehr große Sensitivität erreicht werden kann. Einige dieser Methoden und ihre Anwendungsgebiete sollen im Folgenden kurz beschrieben werden, um die Bedeutung der Real-Time PCR im diesem Kontext herauszustellen.

### 2.2.1 Hybridisierungsassays: Northern Blot und DNA Microarrays

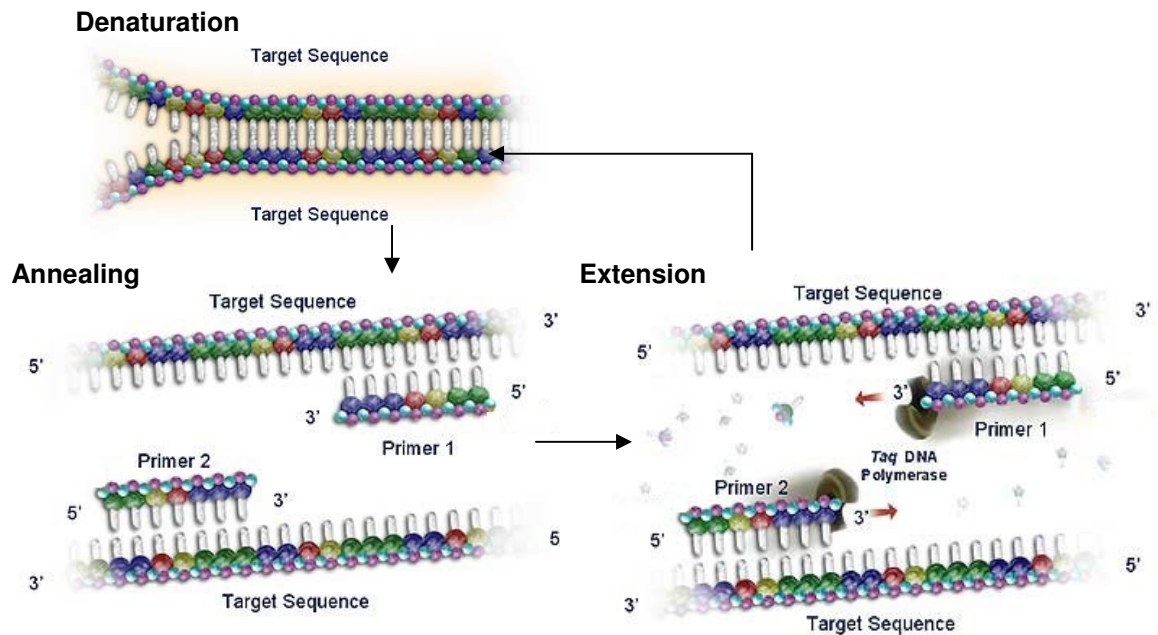
Hybridisierungsassays wie der Northern Blot oder DNA Microarrays basieren auf der Hybridisierung einer Nukleinsäure bekannter Sequenz mit der komplementären Zielsequenz innerhalb eines heterogenen Pools verschiedener Nukleinsäuren. Einer der beiden Reaktionspartner ist markiert, z.B. radioaktiv oder mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes, so dass die Hybride nach einem Reinigungsschritt quantifiziert werden können.

Beim Northern Blot handelt es sich um ein etabliertes und bewährtes Verfahren, das den großen Vorteil bietet, dass gleichzeitig Menge und Größe eines Transkriptes bestimmt werden können. So können auch Isoformen unterschiedlicher Größe identifiziert werden (Strachan 1999). Allerdings ist die Sensitivität um mehrere Zehnerpotenzen geringer als bei PCR-basierten Methoden (Sambrook 2001). Wie auch bei anderen Verfahren zur Genexpressionsanalyse bezieht sich die quantitative Aussage beim Northern Blot häufig auf ein Housekeeping-Gen. Dies ist besonders interessant für die vorliegende Arbeit, weil die Verwendung zahlreicher Gene als Housekeeping-Gen am Northern Blot etabliert und validiert wurde, bevor neuere Methoden wie die Real-Time PCR zur Verfügung standen. Erkenntnisse über stärkere Schwankungen in der Expression von vermeintlichen Housekeeping-Genen sind vor diesem Hintergrund zu sehen.

In den letzten Jahren führten Fortentwicklungen in der Miniaturisierung und die Fortschritte bei der Sequenzierung des Genoms zahlreicher Organismen zur Entwicklung von DNA Microarrays (Skena 1995). Hierbei werden tausende von kurzen DNA-Sequenzen auf einer Glasplatte oder einer Membran fixiert und mit markierter cDNA hybridisiert. Im Gegensatz zum Northern Blot oder den PCR-basierten Methoden liegt der Schwerpunkt bei DNA Microarrays weniger auf der Messung der Expression einzelner Gene in einzelnen Proben als auf groß angelegten Expressionscreenings. Hierbei werden in der Regel Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Gruppen von Proben herausgearbeitet. Bei der Verwendung von Microarrays mit Zehntausenden Spots kann so prinzipiell das Screening der Expression eines vollständigen Genoms erfolgen (Strachan 1999). Allerdings muss einschränkend gesagt werden, dass zahlreiche Störfaktoren die quantitative Aussage verfälschen können. Und obwohl einige dieser Fehlerquellen durch Normierungen ausgeglichen werden können, ist sich eine Überprüfung der Ergebnisse mittels präziserer Methoden wie der Real-Time PCR unerlässlich (Kaynak 2003).

### **2.2.2 Quantitative PCR (qPCR)**

Der große Vorteil der Methoden der quantitativen PCR (qPCR), zu denen auch die Real-Time PCR zählt, liegt in der großen Sensitivität, die durch die exponentielle Amplifikation der Zielsequenz vor der Quantifizierung erreicht werden kann. Gleichzeitig ist diese Amplifikation jedoch grundsätzlich sehr anfällig für Störfaktoren. Erst durch zahlreiche Schritte zur Optimierung und Normierung der PCR konnten Methoden entwickelt werden, die nicht nur eine sehr sensitive, sondern auch sehr präzise Quantifizierungen erlaubten (Reischl 1999).



**Abbildung 3: Funktionsprinzip der PCR**

Aus: [www.pharmaceutical-technology.com](http://www.pharmaceutical-technology.com)

Das Prinzip der PCR zur *in vitro* Amplifikation von Nukleinsäuren wurde 1985 von Mullis entwickelt (Saiki 1985). Wie Abbildung 3 zu entnehmen ist, handelt es sich bei der PCR um ein zyklisches Verfahren, bei dem eine bestimmte DNA-Sequenz (Amplikon) innerhalb eines heterogenen Pools verschiedener Nukleinsäuren selektiv exponentiell vervielfältigt wird. Die Spezifität wird vermittelt durch zwei Oligonukleotide (Primer), die komplementär sind zu den Enden des Amplikons auf jeweils einem Strang der DNA-Matrize (Template, Target Sequence). Ein Zyklus besteht aus drei durch die Reaktionstemperatur bestimmten Schritten: 1) Denaturierung (Denaturation): Bei 93-95°C werden DNA-Doppelstränge aufgetrennt. 2) Anlagerung (Annealing): Bei 50-70°C hybridisieren die Primer an das Template. 3) Verlängerung (Extension): Eine thermostabile DNA-Polymerase (i.d.R. Taq-Polymerase oder deren Fortentwicklungen) synthetisiert bei 70-75°C ausgehend von den Primern einen neuen DNA-Strang, der komplementär zum Template ist. Hierzu werden in der Regel die vier Triphosphat-Nukleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP verwendet (allgemein werden diese auch als dNTPs bezeichnet). Dieser neue Strang steht im nächsten Zyklus wieder als Template zur Verfügung.

Die so synthetisierte DNA ist definiert durch die von den Primern vorgegebenen Enden und weist somit eine bestimmte Länge auf, was eine Unterscheidung von anderen Nukleinsäuren nach Größe, z.B. mittels Gelelektrophorese, ermöglicht. Da durch die starke Amplifikation des Templates andere, nicht amplifizierte Sequenzen bei der Quantifizierung der Nukleinsäuremenge an Bedeutung verlieren, ist eine Messung des PCR-Produktes grundsätzlich auch durch nicht sequenzspezifische

Verfahren wie zum Beispiel Ethidiumbromid (EtBr)-Färbung möglich (Reischl 1999).

Theoretisch kann es bei jedem Zyklus zu einer Verdopplung des PCR-Produktes kommen, entsprechend einer Effizienz der PCR von 100%. Diese optimale Kinetik entspricht jedoch nicht der Realität. Zum einen schließt sich der Phase der exponentiellen Amplifikation eine Plateauphase an, in der sich die Reaktion durch kompetitive Effekte zwischen Primer und Template oder durch absolute oder relative Verarmung an einem der nötigen Reaktionspartner (z.B. begrenzte oder gar im Verlauf der Reaktion abnehmende Enzymaktivität bei steigender Templatekonzentration oder Verbrauch der Primer) verlangsamt und schließlich zum Erliegen kommt (siehe auch Abbildung 11, Abschnitt 2.3.2). Zum anderen beeinflussen zahlreiche systematische und zufällige Faktoren die PCR-Effizienz auch während der exponentiellen Phase: Die Sequenzen von Template und Primer, die Auswahl und Konzentrationen der Reaktionspartner und der Pufferverhältnisse (z.B.  $Mg^{2+}$ ), die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren (z.B. Heparin oder Hämoglobin), sowie Pipettierfehler und selbst die Position der Reaktion im Thermocycler (Reischl 1999, Newton 1997). Es ist daher nicht zulässig, ohne weiteres von der Menge des PCR-Produktes am Ende der Reaktion auf die Menge des PCR-Eduktes zu Beginn der Reaktion zu schließen. Es muss eine sehr sorgfältige Optimierung und Normierung der PCR stattfinden.

Es existieren verschiedene Ansätze zur Entwicklung einer solchen quantitativen PCR.

Mit der Methode der Koamplifikation ist eine quantitative Aussage möglich auf Basis lediglich einer Messung in der exponentiellen Phase oder sogar in der Plateauphase der PCR. Werden in der selben Reaktion zwei verschiedene Sequenzen koamplifiziert, so kann unter der Annahme, dass die PCR-Effizienzen für beide Sequenzen über den gesamten Verlauf der Reaktion gleich sind, davon aufgegangen werden, dass das Mengenverhältnis der beiden Amplikons zueinander während der gesamten Reaktion konstant bleibt. Ist nun die Ausgangsmenge eines der beiden Partner (Standard) bekannt, so kann aus dem Messwert der Relation beider Partner die Ausgangsmenge des anderen Partners (Zielgen) berechnet werden (Nedelman 1992).

Sind Standard und Zielgen nicht homolog und benötigen sie somit verschiedene Primerpaare, so spricht man von nichtkompetitiver quantitativer PCR. Häufig wird hierbei ein Housekeeping-Gen als endogener Standard verwendet (Reaymaekers 1999). Neben den grundsätzlichen Fragen zur Validität eines Housekeeping-Genes besteht bei dieser nichtkompetitiven qPCR das Problem darin, dass es sich äußerst

schwierig gestaltet, die PCR-Effizienzen von Standard und Ziel gleich zu halten, insbesondere beim Eintritt in die Plateauphase. Zu selten wird dieses Problem zufrieden stellend gelöst. Um dennoch eine Aussage machen zu können, wird die Messung meist vor Ende der exponentiellen Phase vorgenommen (Mallet 1999).

Die Bedingung gleicher PCR-Effizienzen ist wesentlich leichter zu erfüllen, wenn Standard und Ziel nahezu identisch sind. Dies ist der Fall bei der kompetitiven qPCR, bei der zwei hochhomologe Sequenzen um die selben Primer konkurrieren. Der Standard wird in vitro synthetisiert, beispielsweise durch Einfügen einer kurzen Deletion (Raeymaekers 1999, Mallet 1999).

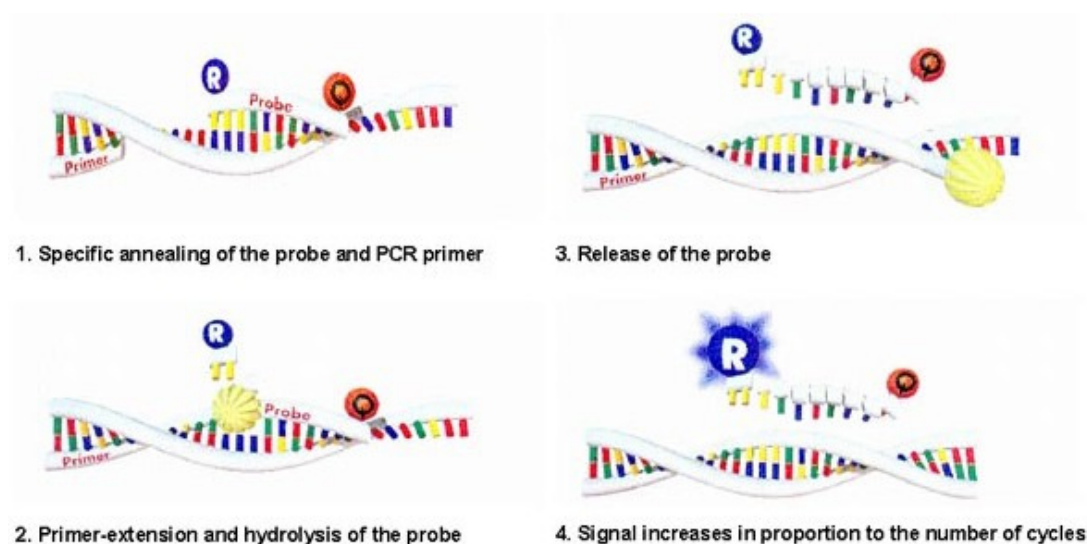
Zusammenfassend muss in Hinblick auf konventionelle qPCR, wie sie vor allem mit Hilfe der Koamplifikation durchgeführt wird, gesagt werden, dass sie zwar einen großen Fortschritt bei der Quantifizierung von Nukleinsäuren in Hinblick auf die Sensitivität darstellt, dass jedoch zahlreiche Fehlerquellen existieren, die die Präzision und die Richtigkeit der Methode limitieren können. Diese Fehlerquellen in den Griff zu bekommen hat sich als eine schwierige Aufgabe erwiesen (Reischl 1999). Hierauf ist besonderes Augenmaß zu lenken bei der Beurteilung von Arbeiten, die mit diesen Methoden Housekeeping-Gene verwendet oder evaluiert haben.

Einen anderen Weg beschreitet der Kinetische Ansatz. Unterbricht man gleichartige PCR-Reaktionen zu verschiedenen Zeitpunkten während der exponentiellen Phase, so kann man im Prinzip von der Menge des PCR-Produktes zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Menge zu Beginn der Reaktion schließen (Raeymaekers 1999). Dieses in der Praxis recht aufwändige Vorgehen kann als Vorläufer der Real-Time PCR gesehen werden.

1992 führte Higushi (Higushi 1992) mit der Real-Time PCR ein Verfahren auf Grundlage des kinetischen Ansatzes ein, das den Verlauf der Reaktion kontinuierlich, zunächst über Färbung mit EtBr, später auch mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green, messen kann. Erweitert wurde diese Methode um die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten dritten Oligonukleotids als Sonde, die sich zwischen den beiden Primern anlagert und während des Extension Steps durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase gespalten wird (Holland 1991, Heid 1996). Mit diesem so genannten 5' Nuclease Assay (nach dem Handelsnamen oft auch Taqman-PCR genannt) können die Sensitivität der PCR mit der spezifischen Detektion eines Hybridisierungsverfahren vereint werden. Es steht nun eine Methode zur Verfügung, die eine sehr präzise und robuste kinetische Quantifizierung erlaubt (Strachan 1999).

### 2.2.3 Funktionsprinzip der Real-Time PCR

Mit Hilfe der Real-Time PCR ist es möglich, während des Verlaufs der PCR kontinuierlich das entstehende PCR-Produkt zu messen. Dies geschieht entweder durch die Messung eines Fluoreszenz-Farbstoffes, der auf die Interkalierung in Nukleinsäuren mit Verstärkung der Fluoreszenz reagiert (SYBR-Green), oder aber es wird ein drittes Oligonukleotid als Sonde verwendet. Diese Taqman-Sonde lagert sich während des kombinierten Annealing/Extension Steps zwischen den beiden Primern an. Sie ist an beiden Enden mit jeweils einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und kann am 3' Ende nicht verlängert werden. Während der Verlängerung der Primer wird diese Sonde durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert (Abbildung 4).

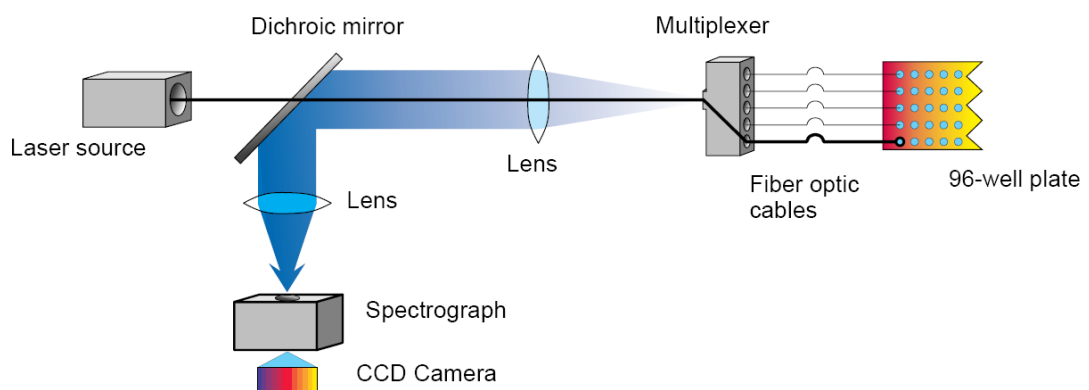


**Abbildung 4: Funktionsprinzip der Taqman-Sonden**

Aus: [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)

Wenn sich zwei Fluoreszenzfarbstoffe in enger räumlicher Nähe befinden, so kann zwischen ihnen ein Fluoreszenz-Energietransfer (FET) stattfinden (Förster 1948). Im Falle der Taqman-Sonde findet bei intakter Sonde und somit räumlicher Nähe ein FET vom Farbstoff am 5' Ende (Reporter, R) zu dem am 3' Ende (Quencher, Q) statt. Hierdurch ist das Fluoreszenzsignal des Reporters gegenüber dem freien Farbstoff erniedrigt, das des Quenchers erhöht. Wird die Sonde nun gespalten, so wird die Nähe von Reporter und Quencher aufgehoben, ein FET kann nicht mehr stattfinden, das Reporter-Signal wird stärker und das Quencher-Signal schwächer. Somit stellt das Reporter-Signal ein Maß für den Fortschritt der PCR dar (Holland 1991, Heid 1996).

Die praktische Durchführung der Real-Time PCR findet in speziellen Geräten statt, wie dem in dieser Studie verwendeten ABI Prism Sequence Detection System 7700 (SDS 7700) von Applied Biosystems. Das Gerät besteht aus einem Thermocycler, in dem zeitgleich 96 Reaktionen auf so genannten 96-Well-Plates stattfinden können, sowie einer optischen Einrichtung mit einem Argon-Laser und einer Charge-Coupled Device (CCD) Kamera (Abbildung 5). Der Laserstrahl wird durch einen dichroiden Spiegel und ein Linsensystem zu einem Multiplexer geleitet, der ihn über Glasfasern nacheinander in die einzelnen Reaktionsgefäße lenkt. Durch den geschlossenen Deckel hindurch werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt. Das Fluoreszenzsignal gelangt auf demselben Weg zurück zum dichroiden Spiegel, wird von diesem reflektiert, durch ein weiteres Linsensystem geleitet und von einem Spektrograph in sein Spektrum zerlegt. Dieses wird von einer CCD Kamera aufgezeichnet.



**Abbildung 5: Funktionsprinzip des ABI Prism Sequence Detection System 7700**

Aus dem Handbuch des SDS 7700

Sowohl der Detektion der PCR mittels SYBR-Green als auch der Verwendung der Taqman-Sonden ist gemeinsam, dass die Messung kontinuierlich und durch den Deckel des geschlossenen Reaktionsgefäßes hindurch geschehen kann. Fehler oder Cross-Kontaminationen durch die Handhabung nach der PCR sind also ausgeschlossen.

Die Verwendung der Taqman-Sonde als drittes Oligonukleotid bietet im Vergleich zur unspezifischen Detektion mit SYBR-Green den Vorteil einer größeren Spezifität. Während einer PCR werden nämlich häufig neben der zu untersuchenden Sequenz andere, unerwünschte Sequenzen amplifiziert. Diese werden mit Taqman-Sonden nicht detektiert.

Weisen die beiden verwendeten Primer intra- oder intermolekulare Homologien auf, die zu einer Hybridisierung zweier Primer-Moleküle (Primer-Dimer) führen können, bei denen ein 5' Ende eines Primers übersteht, so kann die DNA-Polymerase dieses überstehende Ende als Template verwenden und ausgehend vom 3' Ende des anderen Primers einen neuen Strang synthetisieren. Dieser steht in folgenden PCR-Zyklen natürlich wieder als Template für die Anlagerung des entsprechenden Primers zur Verfügung. Diese Amplifikation von Primer-Dimeren ist kompetitiv zu der Zielsequenz, daher findet sie verstärkt statt, wenn wenig Ziel-Template im Reaktionsgefäß vorhanden ist. Bei der Verwendung von SYBR-Green kann durch eine solche Primer-Dimer-Amplifikation das Fluoreszenzsignal also falsch hoch ausfallen, insbesondere beim Versuch, eine niedrig konzentrierte Sequenz nachzuweisen. Und obwohl die Möglichkeit besteht, mit Hilfe der so genannten Schmelzkurvenanalyse eine qualitative Aussage über das Vorhandensein und die Größenordnung einer solchen Amplifikation zu machen, kann die Verfälschung der quantitativen Aussage hiermit nicht vollständig ausgeglichen werden. Die Taqman-Sonde bietet hingegen den Vorteil, dass sie an ein Primer-Dimer nicht hybridisieren kann und somit auch kein falsches Signal liefert.

Ein weiteres Problem bei der Untersuchung von Genexpressionen, vor allem bei Betrachtung niedrigexprimierter Gene, stellt die potentielle Verunreinigung der zu untersuchenden RNA (beziehungsweise der durch RT erhaltenen komplementären cDNA) mit genomischer DNA (gDNA) dar. Eine Unterscheidung ist in der Regel dadurch möglich, dass sich die Sequenz einer mRNA von der entsprechenden Sequenz der gDNA durch das Fehlen der Introns unterscheidet, die während des Splicings entfernt worden sind. Die mRNA enthält also meist mehrere zusammengefügte Exons. Bei Verwendung des Taqman-Assays wird die Sonde daher so platziert, dass sie zentral über einer solchen Exon-Exon-Grenze (Intron-spanning) liegt. Eine stabile Anlagerung der Sonde, wie sie für die korrekte Spaltung durch die DNA-Polymerase nötig wäre, an eine der beiden Exon-Enden auf der genomischen Sequenz ist nicht möglich. Verunreinigende gDNA produziert kein falsch positives Signal. Im SYBR-Green-Assay besteht dahingegen nur die Möglichkeit, einen Primer auf einer Exon-Exon-Grenze zu platzieren. Dies kann eine Detektion von gDNA jedoch nicht vollständig ausschließen, da selbst eine Übereinstimmung von wenigen Basen am 3' Ende eines Primers ausreicht, um eine - wenn auch schwache - Amplifikation zu starten (Strachan 1999).

Mit dem Taqman-Assay in der Real-Time PCR steht somit eine Methode zur Verfügung, die sich durch hohe Sensitivität, Spezifität und Präzision auszeichnet

(Heid 1996). So kann prinzipiell selbst der Nachweis eines einzigen Moleküls erfolgen (Lockey 1998, siehe auch Abschnitt 5.3 und Rawer 2003). Diese Qualitätskriterien gaben den Ausschlag bei der Wahl dieses Verfahrens für die vorliegende Arbeit. Im Folgenden wird vereinfachend oft lediglich der Begriff „Real-Time PCR“ verwendet. Dies bezieht sich - soweit nicht anders angegeben - auf die Anwendung des Taqman-Assays in der Real-Time PCR.

### 2.3 QUANTIFIZIERUNGSSTRATEGIEN UND DER UMGANG MIT METHODISCHEN FEHLERN IN DER REAL-TIME PCR

Bevor in Abschnitt 2.3.2 die mathematischen Details der Quantifizierungsstrategien bei der Real-Time PCR erläutert werden, soll zunächst die Systematik der methodischen Fehler näher beleuchtet und in Abschnitt 2.3.1 die Verwendung eines Housekeeping-Gens erläutert werden. In den Abschnitten 2.3.3 und 2.3.4 werden dann die Strategien für den Umgang mit den methodischen Fehlerquellen hergeleitet.

Die Real-Time PCR ist eine gut etablierte, präzise und sensitive Methode (Heid 1996, Lockey 1998). Der überwiegende Teil möglicher methodischer Fehler resultiert daher nicht aus der Messung durch die Real-Time PCR selbst, sondern durch die Probenaufbereitung während der Prä-PCR (Bustin 2000).

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, sollen die methodischen Fehler in der Prä-PCR unterschieden werden in

- 1) globale methodische Fehler, welche die Messung der Expression aller Gene in einer Biopsie in gleichem Maße verfälschen, und
- 2) genspezifische methodische Fehler, welche die Expression einzelner Gene in einer Biopsie in unterschiedlichem Maße verfälschen.

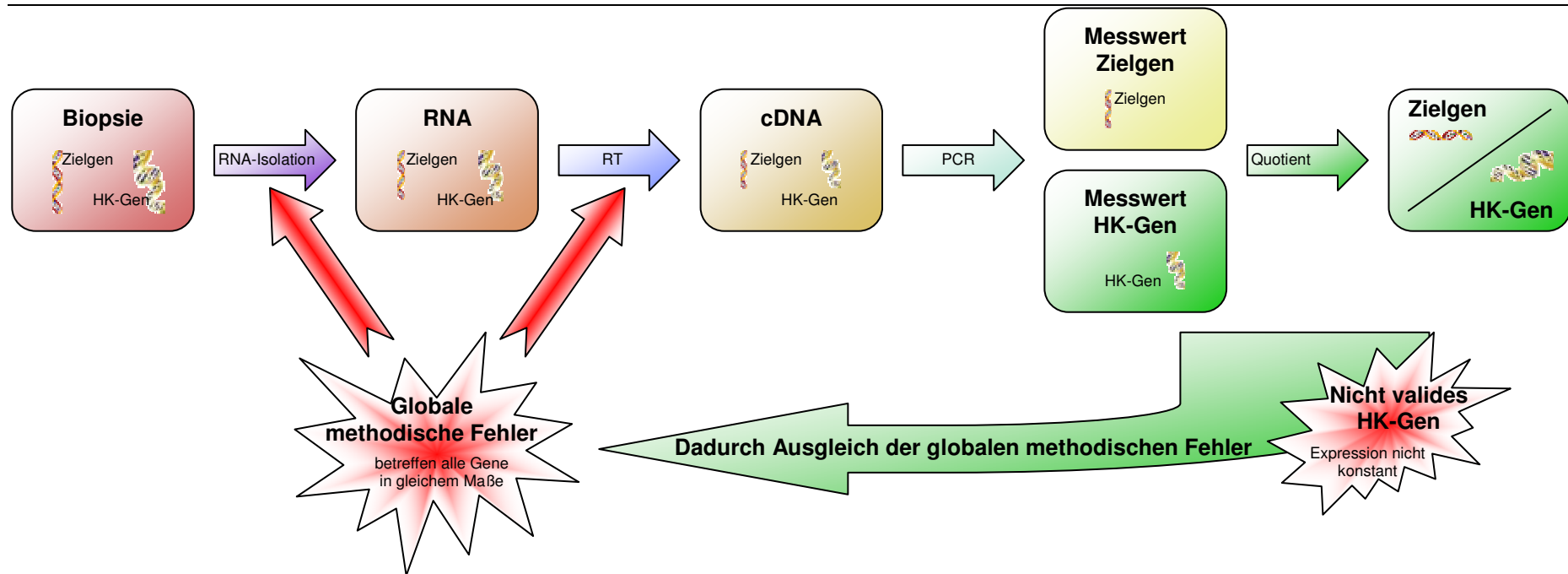
Globale methodische Fehler können grundsätzlich durch die Verwendung eines so genannten Housekeeping-Genes ausgeglichen werden. Genspezifische methodische Fehler lassen sich nicht durch die Verwendung eines Housekeeping-Gens beherrschen. Daher müssen die einzelnen Schritte der Prä-PCR auf mögliche Fehlerquellen hin untersucht und optimiert werden.

### 2.3.1 Globale methodische Fehler: Ausgleich durch die Verwendung eines Housekeeping-Gens

Die Quantifizierung einer Zielsequenz (bei Genexpressionsanalysen ist dies das Zielgen) im Rahmen der Real-Time PCR kann absolut oder relativ erfolgen. Bei der absoluten Quantifizierung wird die Anzahl der Startkopien des Zielgens in der cDNA einer bestimmten Probe bestimmt. In vielen Fällen ist jedoch eine solche Quantifizierung nicht zielführend, da viele Faktoren bei der Probenaufarbeitung bis hin zur cDNA die Aussage verfälschen können. Beispielsweise hängt die Anzahl der Startkopien in einer Probe cDNA von der Größe der Gewebeprobe ab, aus der die cDNA synthetisiert wurde. Außerdem beeinflussen andere Faktoren die Menge an cDNA, die letztendlich in die PCR eingesetzt wird: verschiedene Biopsien werden verschieden gelagert, die RNA Isolierung und die RT gelingen bei verschiedenen Proben nie mit exakt derselben Effizienz. (Holodniy 1999). Diese Fehlerquellen sind Beispiele für globale methodische Fehler.

Aufgrund dieser Fehlerquellen steht daher meist eine andere Fragestellung im Vordergrund, nämlich die, wie viele RNA-Kopien eines Zielgenes pro Zelle in einer Gewebeprobe vorhanden waren. Grundsätzlich könnte dieser Frage begegnet werden, indem beispielsweise die absolute Kopienzahl bezogen wird auf die Anzahl der Zellen, aus denen die untersuchte RNA stammt, oder das Gewicht der ursprünglichen Gewebeprobe. In diesen Fällen würden jedoch methodische Fehler in der weiteren Probenaufbereitung bis hin zur cDNA nicht berücksichtigt werden.

Um dennoch ein Maß für die Kopienzahl pro Zelle zu erhalten, findet der Bezug auf das Housekeeping-Gen als endogene Kontrolle statt (Abbildung 6). Hierbei wird zunächst lediglich die Existenz eines solchen Housekeeping-Genes postuliert, das in allen betrachteten Proben konstant exprimiert ist, dessen RNA somit also in jeder Zelle in einer konstanten Kopienzahl vorliegt. Unter der zusätzlichen Annahme, dass die Einflussfaktoren der Probenaufarbeitung in gleicher Weise auf Zielgen und Housekeeping-Gen wirken (also globale methodische Fehler vorliegen), stellt der Quotient aus beiden das gewünschte Maß für die Kopienzahl der Zielgenes pro Zelle dar (Schild 1999). Die relative Quantifizierung über ein Housekeeping-Gen führt somit nicht nur zu einer biologisch sinnvollen quantitativen Aussage, sondern sie kann auch globale methodische Fehler in der Prä-PCR ausgleichen. Dieser Ausgleich ist auch dann möglich, wenn der globale methodische Fehler von Biopsie zu Biopsie unterschiedlich ist. Er muss nur innerhalb einer Probe konstant für alle Gene sein.



**Abbildung 6: Globale methodische Fehler in der Prä-PCR: Ausgleich durch Verwendung eines Housekeeping-Gens**

Globale methodische Fehler beeinflussen alle Gene einer Probe in gleichem Maße. Im dargestellten Beispiel reduziert sich die Anzahl der Moleküle des Zielgens und des Housekeeping (HK)-Gens durch RNA-Isolation und Reverse Transkription (RT), beispielsweise durch nicht optimale Effizienz beider Schritte (dargestellt als kleiner werdende DNA-Symbole). Beide Gene werden durch die Real-Time PCR quantifiziert. Durch Bildung eines Quotienten aus Ziel- und Housekeeping-Gen können die globalen methodischen Fehler ausgeglichen werden (dargestellt als DNA-Symbole in der ursprünglichen Größe). Dieser Ausgleich ist auch dann möglich, wenn der globale methodische Fehler von Biopsie zu Biopsie unterschiedlich ist. Er muss nur innerhalb einer Probe konstant für alle Gene sein. Die Validität der relativen Quantifizierung mit Hilfe eines Housekeeping-Gens steht und fällt jedoch mit der konstanten Expression des Housekeeping-Gens in allen Proben und unter allen Bedingungen.

### **Validität eines Housekeeping-Gens**

Die Validität der relativen Quantifizierung mit Hilfe eines Housekeeping-Gens steht und fällt mit der tatsächlichen Invariabilität der Expression des Housekeeping-Gens in allen Proben und unter allen Bedingungen. Treten hier Schwankungen auf, so kann das Ergebnis verfälscht werden. Es ist möglich, dass tatsächlich vorhandene Zusammenhänge der Expression des Zielgenes mit klinischen Daten unerkannt bleiben, mit geringerer Sicherheit bestätigt werden können oder dass vermeintliche Zusammenhänge erkennbar werden, obwohl tatsächlich keine vorhanden sind (Bustin 2000).

Beispielhaft sei auf die Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH) hingewiesen. Dies ist eines der am häufigsten verwendeten Housekeeping-Gene. Es wurde für die Verwendung im Northern Blot etabliert und hat sich dort auch bewährt. Es wurde und wird auch als Housekeeping-Gen in der Real-Time PCR verwendet, in den letzten Jahren haben sich jedoch die Berichte über starke Expressionsschwankungen gehäuft (Bustin 2000). Insbesondere hat sich auch gezeigt, dass die Expression von GAPDH im Myokard vielfältig reguliert ist (Taegtmeier 2000). Vergleichbares gilt für zahlreiche andere Gene.

Bei der Anwendung eines Housekeeping-Genes ist also großer Wert auf eine sorgfältige Evaluation zu legen, bei der die Konstanz der Expression unter allen untersuchten Bedingungen überprüft wird. Die kritiklose Verwendung vermeintlich bewährter Housekeeping-Gene ist zu vermeiden. Es ist festzustellen, dass in zahlreichen Studien eine solche Evaluation des Housekeeping-Genes unzureichend beachtet worden ist oder teilweise sogar ganz ausgeblieben ist (Bustin 2000). Einer der Gründe für diesen Umstand liegt sicher darin, dass die Durchführung einer solchen Evaluation neue Fragestellungen und Probleme aufwirft. Diese werden im Abschnitt 2.3.3 erläutert.

Ein Überblick über die im Rahmen dieser Studie evaluierten potentiellen Housekeeping-Gene sowie ausgewählte Quellen zu deren Evaluation findet sich in Tabelle 4, Abschnitt 4.2.1.

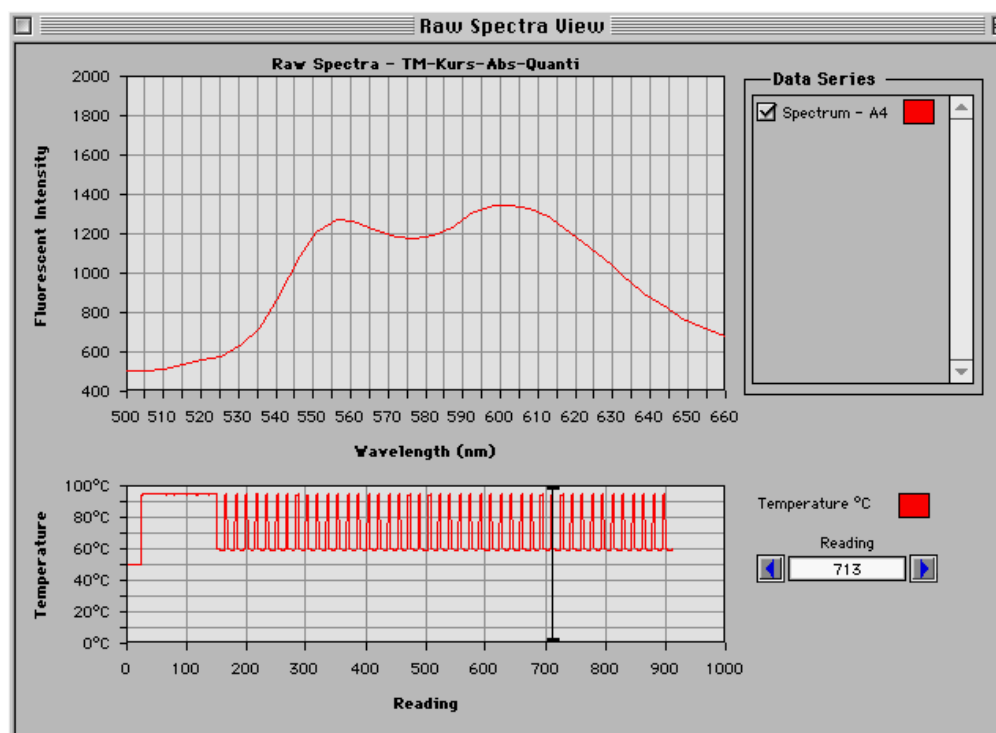
### 2.3.2 Quantifizierungsstrategien in der Real-Time PCR

Im Folgenden sollen die Details der Quantifizierungsstrategien der Real-Time PCR ausgehend von ihren mathematischen Grundlagen erläutert werden, um ihre Voraussetzungen sowie ihre Möglichkeiten und Grenzen aufzuzeigen.

#### Analyse der Reaktionskinetik: Von der Fluoreszenz zum Ct

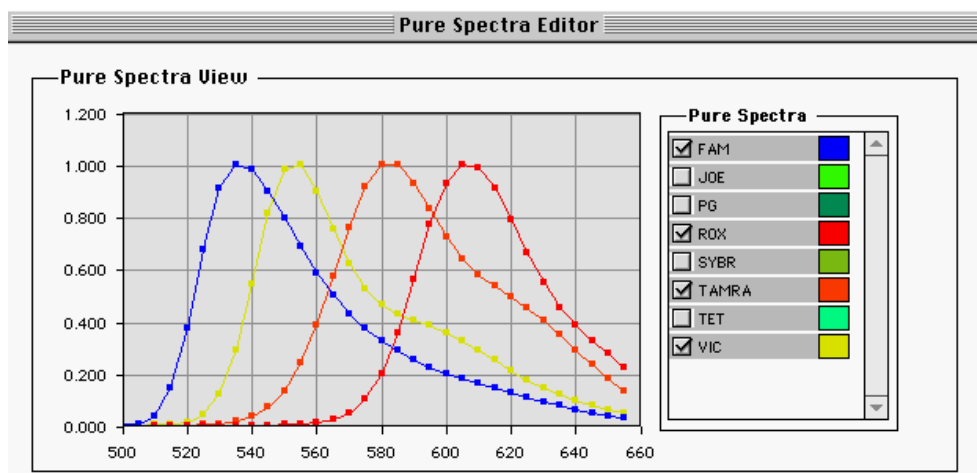
Die Aufbereitung der gemessenen Fluoreszenzwerte bei der Real-Time PCR umfasst eine Reihe von Normierungsschritten, die dazu dienen, Schwankungen zwischen einzelnen Versuchsplatten, einzelnen Versuchsgefäßen einer Platte, sowie innerhalb eines Versuchsgefäßes während eines Versuches auszugleichen. Dies ist die Grundlage für spätere präzise Quantifizierungen. Am Ende dieser meist vom Gerät automatisch durchgeführten Datenaufbereitung steht der so genannt Threshold Cycle (Ct) (Heid 1996).

Während der PCR zeichnet das Gerät kontinuierlich die Fluoreszenz über ein Spektrum von 500 bis 660 nm auf (Abbildung 7). Die anschließende automatische Analyse der Rohdaten mit Hilfe der Sequence Detection System Software 1.6.3 umfasst eine Reihe von Schritten.



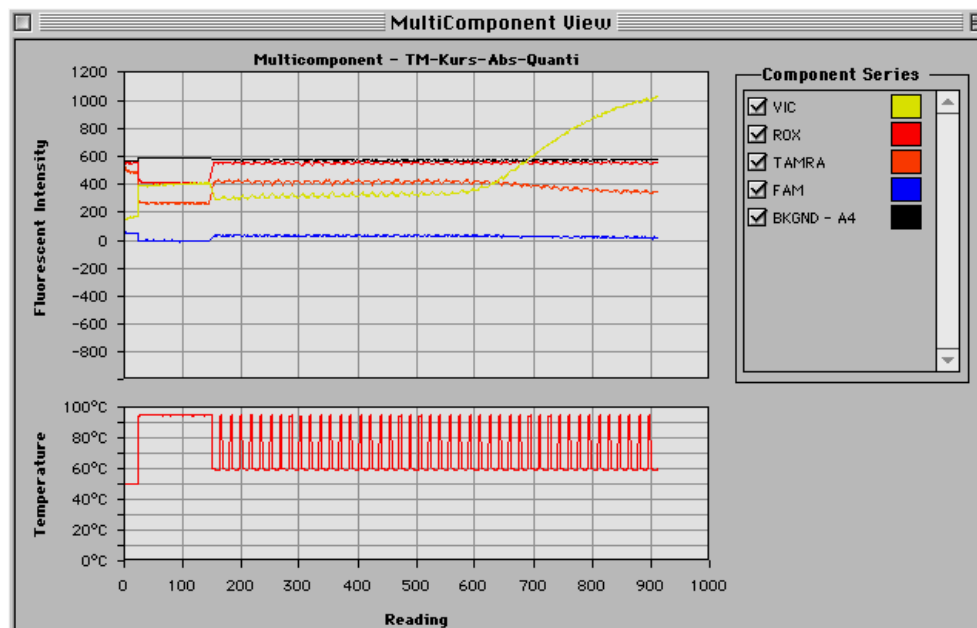
**Abbildung 7: Beispiel eines vom SDS aufgezeichneten Rohspektrums**  
Screenshot eines Versuchs.

Auf der Basis gespeicherter Daten über die Fluoreszenzspektren verschiedener Farbstoffe und des Hintergrundsignals (Abbildung 8) wird das Rohspektrum über einen komplexen Algorithmus für jeden Zeitpunkt in einzelne Fluoreszenzkomponenten zerlegt: Den Reporter-Farbstoff, meist FAM (6-carboxy-fluorescein) oder VIC (die chemische Formel wird vom Hersteller Applied Biosystems nicht bekanntgegeben); den Quencher-Farbstoff, TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine); die so genannte Passive Referenz ROX (ein komplexes Farbstoffgemisch mit dem Hauptbestandteil 6-carboxy-X-rhodamine) sowie das durch Streulicht oder die Eigenfluoreszenz sonstiger Reaktionspartner bedingte Hintergrundsignal (Abbildung 9).



**Abbildung 8: Beispiel von gespeicherten Rohspektren**

Screenshot eines Versuchs.

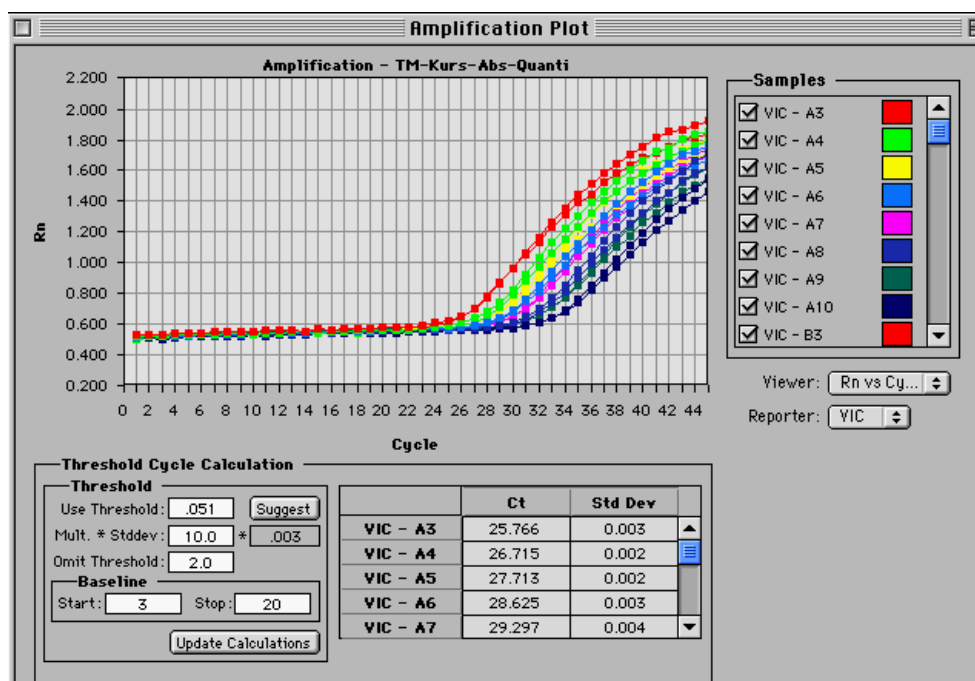


**Abbildung 9: Beispiel einer Multikomponenten-Darstellung**

Screenshot eines Versuchs.

Die passive Referenz ROX ist jeder Reaktion in konstanter Konzentration beigelegt. Für jeden Zeitpunkt wird ein Quotient aus dem Signal des verwendeten Reporter-Farbstoffes (R) und dem Signal von ROX gebildet. Dieser Quotient wird als normiertes Reporter-Signal ( $R_n$ ) bezeichnet. Der Verlauf von  $R_n$  über die Zeit wird als Amplifikation Plot bezeichnet. Diese Normierung gleicht nicht nur Fluoreszenzschwankungen von einem Reaktionsgefäß zum anderen aus (Well-to-Well Schwankungen, bedingt beispielsweise durch Unterschiede in der Optik für der einzelnen Wells oder Pipettierfehler), sondern auch Fluoreszenzschwankungen von einer 96-Well-Plate zur anderen (Plate-to-Plate Schwankungen, zum Beispiel durch zeitliche Unterschiede der Laser-Intensität).

Wie Abbildung 10 zu entnehmen ist, schwankt  $R_n$  im ersten Teil der PCR um einen konstanten Wert. Dieser entspricht dem Fluoreszenzsignal der intakten Sonde. Erst ab einer bestimmten Anzahl gespaltener Sondenmoleküle wird ein Anstieg von  $R_n$  über dieses Basissignal hinaus sichtbar. Im weiteren Verlauf sind die exponentielle Phase und der Übergang in die Plateauphase zu erkennen.

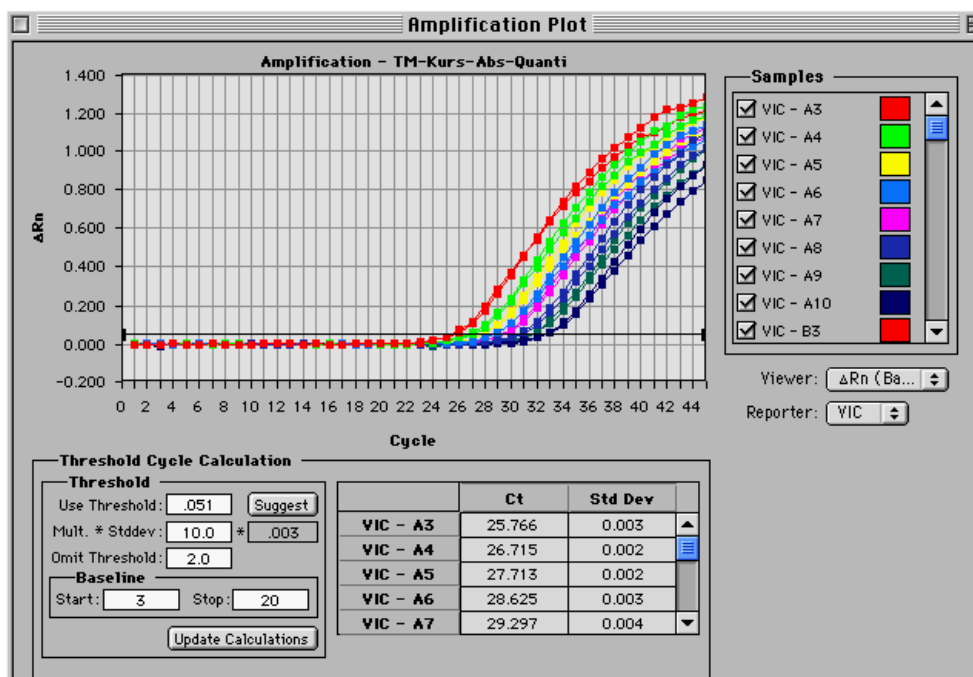


**Abbildung 10: Beispiel eines Amplifikation Plots, lineare Darstellung von  $R_n$**

Screenshot eines Versuchs. Dargestellt ist eine Standard-Kurve mit 7 1:2-Verdünnungsschritten.

Im Folgenden wird die so genannte Baseline berechnet. Durch Subtraktion der Baseline vom normierten Reporter-Signal ( $R_n$ ) erhält man  $\Delta R_n$ . Bei der Baseline handelt es sich um einen komplexen Algorithmus auf Basis eines gleitenden Mittelwertes, der die Aufgabe hat, die normierten Reporter-Signale aller Wells bis

zum ersten sichtbaren Anstieg über das Basissignal hinaus auf Werte nahe Null zu verschieben. Für jedes einzelne Well fließen hierfür die  $R_n$ -Werte bestimmter PCR-Zyklen ein, die vom Benutzer festgelegt werden. Ausgewählt werden vereinbarungsgemäß die Werte ab dem dritten Zyklus (Baseline Start) bis zu demjenigen Zyklus, in dem der erste Anstieg über das Basissignal hinaus sichtbar wird (Baseline Stop) (Abbildung 11). Durch diesen weiteren Normierungsschritt werden zum einen wiederum Well-to-Well Schwankungen der Fluoreszenz kompensiert, zum anderen kann ein so genannter Drift ausgeglichen werden, also ein langsames Ab- oder Zunehmen des normierten Reportersignals, das meist durch eine gewisse Instabilität der passiven Referenz ROX bedingt ist.

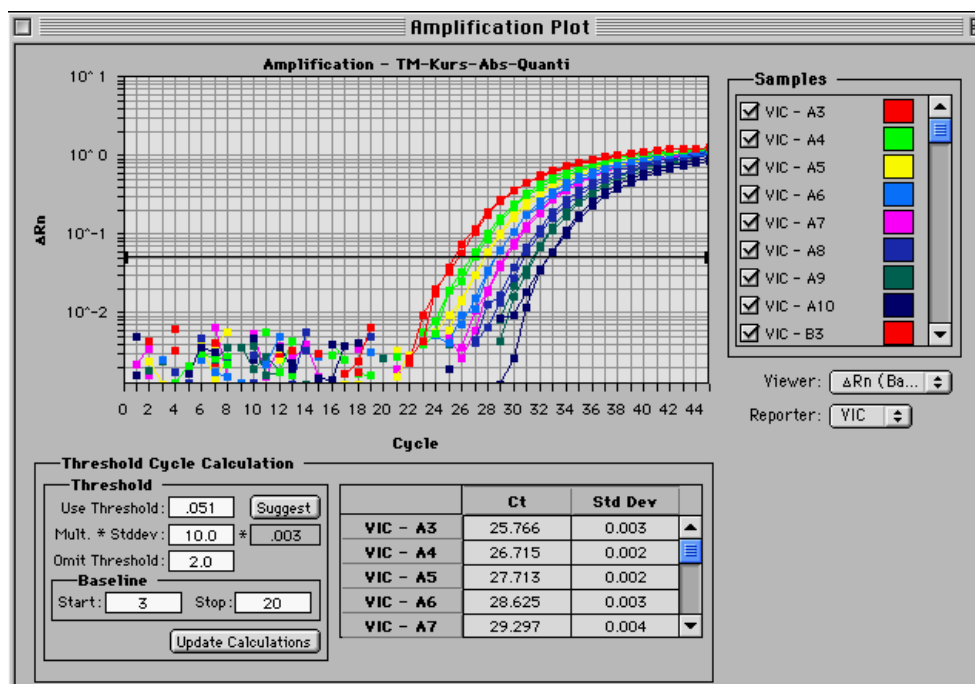


**Abbildung 11: Beispiel eines Amplification Plots, lineare Darstellung von  $\Delta R_n$**

Screenshot eines Versuchs. Dargestellt ist eine Standard-Kurve mit 7 1:2-Verdünnungsschritten.

Vom Benutzer wird nun (meist in der logarithmischen Darstellung) ein bestimmter Wert für  $\Delta R_n$  als so genannter Threshold festgelegt. Der Zeitpunkt, ausgedrückt in Zyklen, zu dem der Amplifikation Plot den Threshold überschreitet, wird als Threshold Cycle (Ct) bezeichnet. Der Ct ist die zentrale Größe in der Real-Time PCR. Er ist ein relatives Maß für die Anzahl der Startkopien in der entsprechenden Reaktion. Überschreitet beispielsweise der Amplifikation Plot in einem Well den Threshold einen Zyklus später als in einem anderen, ist also der Ct um 1 größer, so war die Startkopienzahl (unter Annahme einer PCR-Effizienz von 100%) in diesem

Well um die Hälfte niedriger (Abbildung 12). Ist der Ct um 2 größer, war die Startkopienzahl um den Faktor vier niedriger usw.



**Abbildung 12: Beispiel eines Amplification Plots, log. Darstellung von  $\Delta Rn$**

Screenshot eines Versuchs. Dargestellt ist eine Standard-Kurve mit 7 1:2-Verdünnungsschritten.

Wie die Festlegung von Baseline Start und Stop ist auch die Auswahl des Threshold grundsätzlich willkürlich, es gelten jedoch bestimmte Vorschriften. Der Threshold muss so gewählt werden, dass sich die Amplifikation Plots aller Wells, für die er Gültigkeit haben soll, in der exponentiellen Phase befinden. Dies wird am deutlichsten sichtbar bei Verwendung einer logarithmisch skalierten Abszisse, wodurch sich eine exponentielle Kurve als Gerade darstellt. Eine Verschiebung des Thresholds innerhalb der exponentiellen Phase, wie sie die Vorschrift zulässt, verändert zwar die absoluten Ct-Werte, hat aber – sofern die o.g. Bedingungen erfüllt sind - keinen Einfluss auf die Differenzen zwischen verschiedenen Cts.

Der willkürliche Charakter der Festlegung von Baseline und Threshold hat zur Folge, dass Ct-Werte nur dann Aussagekraft besitzen, wenn sie sich auf eine bestimmte Baseline und einen bestimmten Threshold beziehen. Die Parameter Baseline Start und Stop sowie der Threshold sind für alle Wells einer 96-Well-Plate, in denen die PCR mit demselben Set aus Primern und Sonde durchgeführt wird, gleich. Dementsprechend ist ein direkter Vergleich von Ct-Werten nur innerhalb dieser gleichartigen Reaktionen auf derselben 96-Well-Plate erlaubt.

Um die quantitative Aussage verschiedener Versuche miteinander vergleichen zu können, muss daher ein externer Standard verwendet werden. Im Rahmen der absoluten Quantifizierung (siehe unten) ist dies in der Regel ein synthetisch hergestellter Standard mit gleicher Sequenz wie das zu untersuchende Gen in bekannter Konzentration (Standardkurve). Bei der direkten relativen Quantifizierung ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, siehe unten) ist dies eine so genannte Kalibrator-Probe. Die Kalibrator-Probe stellt meist eine cDNA dar, die Ziel- und Housekeeping-Gen in konstanter, jedoch nicht notwendigerweise bekannter Konzentration enthält. Nicht zu verwechseln mit diesem externen Standard, der eine konstante Menge cDNA bzw. DNA darstellt, und mit dem verschiedene Versuche miteinander vergleichbar gemacht werden, ist das Housekeeping-Gen als endogener Standard, das ein in der jeweiligen Probe zu quantifizierendes Gen darstellt, das dem Ausgleich globaler Fehlerquellen in der Prä-PCR dient (siehe Abschnitt 2.3).

## Allgemeine mathematische Beschreibung der PCR

Der Fortschritt einer PCR in der exponentiellen Phase kann allgemein beschrieben werden mit Formel (1) (Reichl 1999).

$$(1) \quad N(c) = N(0) \cdot (1 + E)^c$$

$N(c)$  ist die Anzahl der Kopien eines Amplikons am Ende des  $c$ -ten Zyklus.

$N(0)$  ist die Anzahl der Kopien eines Amplikons zu Beginn der PCR.

$E$  ist die PCR-Effizienz des Amplikons.

Wird das entstehende Reporter-Signal betrachtet, ergibt sich:

$$(2) \quad R(c) = K \cdot N(0) \cdot (1 + E)^c$$

$R$  ist das Reporter-Signal (genauer:  $R_n$ , bzw.  $\Delta R_n$ , siehe oben) eines Amplikons am Ende des  $n$ -ten Zyklus.

$K$  ist eine Konstante.

Die Konstante  $K$  ist ein Maß für die Höhe des Reporter-Signals, das durch die Neusynthese einer bestimmten Anzahl von Kopien entsteht. Sie wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Die verschiedenen Reporter-Farbstoffe (z.B. FAM oder VIC) weisen nicht dieselbe Fluoreszenzintensität auf. Auch sind die Farbstoffe sehr lichtempfindlich, sodass sich zwei unterschiedlich gelagerte Aliquots der gleichen Sonde durch verschieden starke Degeneration der Farbstoffe unterscheiden können.  $K$  ist also lediglich für diejenigen Reaktionen konstant, die zeitgleich und mit demselben Gemisch der verschiedenen Reaktionsbestandteile außer dem Template (Mastermix) durchgeführt wurden.

Durch die Festlegung eines Thresholds erhält man:

$$(3) \quad T = K \cdot N(0) \cdot (1 + E)^{C_t}$$

$T$  ist der Threshold.

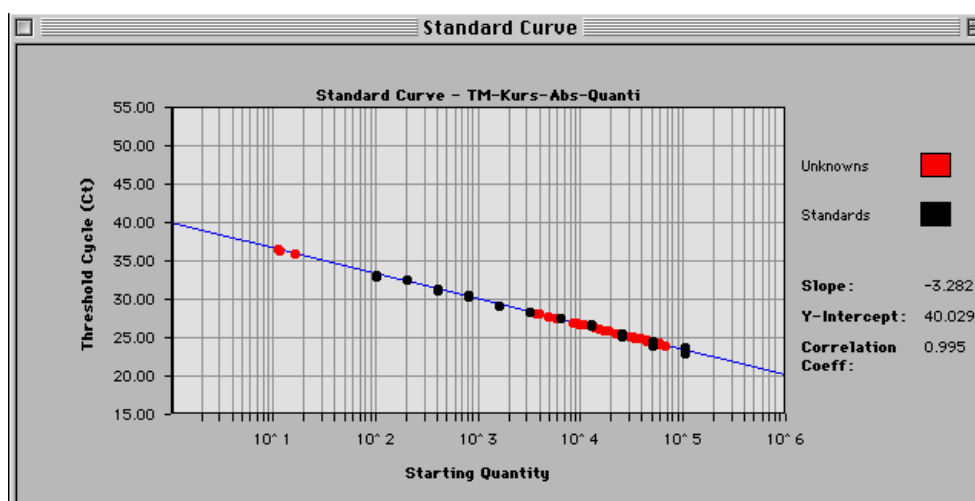
$C_t$  ist der Zyklus, an dem  $T$  erreicht wird.

Wie oben beschrieben sind neben  $K$  auch der Threshold und die  $\Delta R_n$  zugrunde liegende Parameter Baseline Start und Stop für alle Reaktionen konstant, die auf derselben 96-Well-Plate mit demselben Mastermix durchgeführt werden. Dieses System gleichartiger Reaktionen ist also zum einen bestimmt durch grundsätzlich willkürliche Festlegungen, die aber für das gesamte System gleich sind, zum anderen durch chemische Eigenschaften der Reaktion, für die eine Konstanz nur innerhalb des Systems angenommen werden kann. Dies ist die mathematische Entsprechung der am Ende des letzten Abschnittes erwähnten Notwendigkeit eines externen Standards, der verschiedene Versuche vergleichbar macht. Zwei Ansätze hierfür werden im Folgenden beschrieben.

### Absolute Quantifizierung mittels Standard-Kurve und optional nachfolgender relativer Quantifizierung

Ziel der absoluten Quantifizierung ist es, dem Ct-Wert eines Wells eine Startkopienzahl zuzuordnen.

Hierzu wird ein Standard verwendet, der die Sequenz des Amplikons enthält und dessen Startkopienzahl bekannt ist. Verschiedene Verdünnungsstufen des Standards werden in getrennte Reaktionen amplifiziert und die resultierenden Ct-Werte gegen den dekadischen Logarithmus Startkopienzahl aufgetragen (Abbildung 13). Man erhält so eine Standard-Kurve, die sich in der halblogarithmischen Darstellung als Gerade mit Hilfe der Formel (4), die sich aus Formel (3) ergibt, beschreiben lässt.



**Abbildung 13: Beispiel einer Standard-Kurve im Rahmen der absoluten Quantifizierung**

Screenshot eines Versuchs. Dargestellt ist eine Standard-Kurve mit 7 1:2-Verdünnungsschritten.

$$(4) \quad C_T = -\frac{1}{\log(1+E)} \cdot \log(N_0) + \frac{\log\left(\frac{T}{K}\right)}{\log(1+E)}$$

Mittels linearer Regression können aus den empirisch gewonnenen Werten die Steigung  $m$  und der Achsenabschnitt  $b$  bestimmt werden, wodurch man die vereinfachte Formel (5) erhält.

$$(5) \quad C_T = m \cdot \log(N_0) + b$$

Anhand dieser Formel können nun die unbekanntes Startkopienzahlen errechnet werden.

Der Standard dient also als Bezugspunkt im System gleichartiger Reaktionen.

Die Anforderungen an die PCR-Effizienz sind im Gegensatz zur unten beschriebenen  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode gering: E muss lediglich für alle betrachteten Reaktionen konstant sein. Der Wert von E kann im Übrigen aus der Steigung der Standard-Kurve berechnet werden:

$$(6) \quad m = -\frac{1}{\log(1 + E)}$$

ergibt

$$(7) \quad E = 10^{\frac{1}{-m}} - 1$$

Wird eine absolute Quantifizierung sowohl eines Ziel- als auch eines Housekeeping-Genes durchgeführt, so kann anschließend sehr einfach durch Bildung des Quotienten der beiden Startkopienzahlen eine relative Quantifizierung erfolgen.

### Relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Ziel der Relativen Quantifizierung mittels  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ist es, ohne Umweg über eine absolute Quantifizierung eine Aussage über das Verhältnis von Zielgen zu Housekeeping-Gen zu treffen. Wie oben bereits erwähnt wird dabei als externer Standard lediglich eine Kalibrator-Probe verwendet, also eine cDNA, die Ziel- und Housekeeping-Gen in konstanter, jedoch nicht notwendigerweise bekannter Konzentration enthält.

Formel (3) kann umgestellt werden zu:

$$(8) \quad N(0) = \frac{T}{K} \cdot \frac{1}{(1+E)^{Ct}}$$

Wird ausgehend von der gleichen cDNA sowohl ein Zielgen als auch eine Housekeeping-Gen amplifiziert, kann man folgenden Quotienten bilden:

$$(9) \quad \frac{N_Z(0)}{N_H(0)} = \frac{\frac{T_Z}{K_Z} \cdot \frac{1}{(1+E_Z)^{Ct_Z}}}{\frac{T_H}{K_H} \cdot \frac{1}{(1+E_H)^{Ct_H}}}$$

Index Z steht für Zielgen, Index H für Housekeeping-Gen

Gilt  $E_Z = E_H = E$ , so kann der Term vereinfacht werden zu:

$$(10) \quad N_{Z,H}(0) = \frac{N_Z(0)}{N_H(0)} = \frac{T_Z \cdot K_H}{K_Z \cdot T_H} \cdot (1+E)^{-\Delta\text{Ct}}$$

mit  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_Z - \text{Ct}_H$

Zielgen und Housekeeping-Gen werden natürlich mit verschiedenen Primern und Sonden amplifiziert, daher ist  $K_Z \neq K_H$  und  $T_Z \neq T_H$ . Als Bezugspunkt wird daher ein der Kalibrator eingeführt. Dabei handelt es sich wie erwähnt um eine beliebige

Lösung mit konstanter Startkopienzahl von Ziel- und Housekeeping-Gen. Oft wird ein großer Pool einer cDNA des entsprechenden Gewebes verwendet. Der Kalibrator muss in jedem System gleichartiger Reaktionen mitamplifiziert werden. Dies bedeutet, dass der Kalibrator neben zahlreichen zu untersuchenden Proben auf jeder 96-Well-Plate in getrennter Reaktion in die PCR für jedes auf dieser 96-Well-Plate untersuchte Gen eingebracht wird.

Es ergibt sich somit der Quotient

$$(11) \quad \frac{N_{Z,H_P}(0)}{N_{Z,H_K}(0)} = \frac{\frac{T_Z \cdot K_H}{K_Z \cdot T_H} \cdot (1+E)^{-\Delta Ct_P}}{\frac{T_Z \cdot K_H}{K_Z \cdot T_H} \cdot (1+E)^{-\Delta Ct_K}}$$

Index P steht für die untersuchte Probe, Index K für den Kalibrator.

Dieser kann vereinfacht werden zu

$$(12) \quad N_{Z,H,K}(0) = \frac{N_{Z,H_P}(0)}{N_{Z,H_K}(0)} = (1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$$

mit  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_P - \Delta Ct_K = (Ct_{Z,P} - Ct_{H,P}) - (Ct_{Z,K} - Ct_{H,K})$

Mit Formel (12) kann also unter der Voraussetzung gleicher PCR-Effizienzen von Ziel- und Housekeeping-Gen das Verhältnis der Startkopienzahlen von Ziel- und Housekeeping-Gen berechnet werden, wobei das Verhältnis der beiden im Kalibrator gleich 1 gesetzt wurde. Die Ergebnisse verschiedener Versuche werden durch diese Verwendung des Kalibrators als Bezugspunkt miteinander vergleichbar.

Anders als bei einer relativen Quantifizierung auf Basis einer absoluten Quantifizierung kann mit Hilfe der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode keine Aussage über die absolute Größe des Verhältnisses von Ziel- und Housekeeping-Gen gemacht werden, denn es wird ja auf das Verhältnis innerhalb des Kalibrators normiert. Möglich ist im Vergleich verschiedener Proben lediglich eine quantitative Angabe über Unterschiede der Verhältnisse zwischen den einzelnen Proben. Eine solche Angabe könnte lauten: „Das Verhältnis von Ziel- zu Housekeeping-Gen beträgt in Probe A das 2,6 fache des

Verhältnisses in Probe B. Die Expression des Zielgenes ist in Probe A ist also 2,6 mal so hoch wie in Probe B.“ Oft ist eine solche Aussage völlig ausreichend.

Die Validität der Aussage hängt jedoch von der tatsächlichen Übereinstimmung der PCR-Effizienzen der beiden Gene ab. Je größer die Unterschiede sind, umso größer ist der Fehler der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.

Die PCR-Effizienzen müssen also in Vorversuchen bestimmt werden. In der Regel geschieht dies mit Hilfe einer Standardkurve und Formel (7). Da in diesem Falle nicht absolut quantifiziert werden soll, kann ein beliebiger Standard mit unbekannter Startkopienzahl verwendet werden. Häufig wird eine cDNA gewählt, die aus dem zu untersuchenden Gewebe gewonnen wurde. Hierdurch können auch eventuell in den Proben vorhandene PCR-Hemmstoffe erfasst werden.

Der Vorteil der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode liegt zusammengefasst jedoch darin, dass auf das Mitführen von Standardkurven in jedem Versuch verzichtet werden kann.

### 2.3.3 Globale methodische Fehler: Strategien zur Evaluation von Housekeeping-Genen

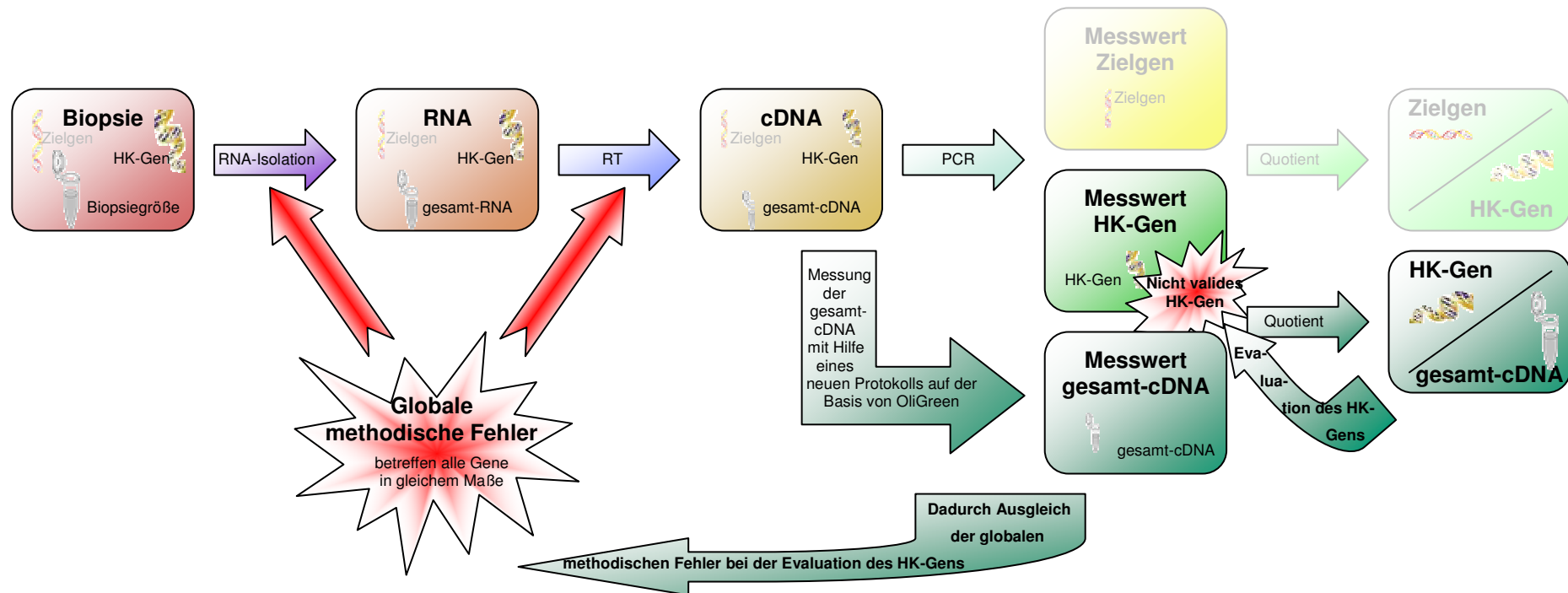
Um potentielle Housekeeping-Gene zu evaluieren, muss die Expression dieser Gene auf ihre möglichst geringe Schwankungsbreite hin untersucht werden, und zwar entweder in einer repräsentativen Gruppe von Proben oder im Idealfalle in allen Proben der Studie.

Das zentrale Hindernis bei dieser Evaluation sind genau diejenigen globalen methodischen Fehler in der Prä-PCR, die mit Hilfe des Housekeeping-Genes letzten Endes erfasst und ausgeglichen werden sollen. Es muss daher ein Weg gefunden werden, diese Störfaktoren auch im Rahmen der Evaluation der Housekeeping-Gene zu erfassen und zu quantifizieren. Gesucht wird hier ein Maß für die ursprünglich in der Biopsie vorhandene RNA, die nach Lagerung, Isolierung und RT schließlich in der PCR amplifiziert wird. Die potentiellen Housekeeping-Gene müssen dann absolut quantifiziert werden und anschließend (analog zum späteren Bezug des Zielgens auf das Housekeeping-Gen) auf diesen Messwert bezogen werden (Abbildung 14).

Verschiedene Ansätze für das gesuchte Maß wurden beschrieben:

Für komplexere Gewebe haben Fink et al die Verwendung eines Lasers-assistierte single-cell-picking beschrieben (Fink 1998). Dieses Vorgehen hat vor allem bei der Studie von Genexpressionen auf zellulärer Ebene große Vorteile. Bei der Evaluation von potentiellen Housekeeping-Genen werden diese in einer einzigen Zelle quantifiziert. Eine Quotientenbildung erübrigt sich hier also. So können globale Fehler durch verschieden große Gewebeproben ausgeglichen werden. Auch Fehler in der RNA-Isolierung werden minimiert, da diese bei einzelnen Zellen stark vereinfacht ist. Jedoch werden die methodischen Fehler der Isolierung nur teilweise, die der Reversen Transkription gar nicht erfasst.

Es besteht auch die Möglichkeit, der gerade isolierten RNA einen externen RNA-Standard hinzuzufügen (Razeghi 2001). Grundsätzlich können hierdurch zwar in der Isolierung keine Fehler erfasst werden, wohl aber in allen folgenden Schritten. Problematisch ist allerdings, dass RNA durch die ubiquitär vorhandenen RNasen sehr schnell degeneriert werden kann, was eine präzise quantitative Aussage über den RNA-Standard zum Zeitpunkt des Einsatzes erschwert.



**Abbildung 14: Evaluation von Housekeeping-Genen: Ausgleich der globalen methodischen Fehler durch Messung der Gesamt-RNA**

Bei der Evaluation eines Housekeeping (HK)-Gens müssen genau diejenigen globalen methodischen Fehler berücksichtigt werden, die später durch dessen Verwendung ausgeglichen werden sollen. Dies geschieht durch den Bezug auf einen alternativen Bezugspunkt. In dieser Arbeit wurde hierfür die Menge an Gesamt-RNA in jeder Probe verwendet, wie sie mit Hilfe des neuen Protokolls auf Basis von OliGreen gemessen wurde. Im dargestellten Beispiel reduziert sich durch die globalen methodischen Fehler die Anzahl der Moleküle des Housekeeping-Gens und die Menge an Gesamt-RNA (dargestellt als kleiner werdende Symbole). Durch Bildung eines Quotienten kann dieser Fehler bei der Evaluation des Housekeeping-Gens ausgeglichen werden (dargestellt als Symbole in der ursprünglichen Größe), um letztendlich ein valides Housekeeping-Gen zu finden.

Ein häufig verwendeter Ansatz besteht darin, die Konzentration der RNA direkt vor dem Einsatz in die RT im Spektralphotometer zu messen (Winer 1999, Moniotte 2001). Der Bezug der Expression des untersuchten Gens auf die RNA-Menge kann so Fehler vieler Schritte der Prä-PCR, nicht jedoch der Reversen Transkription ausgleichen.

Applied Biosystems empfiehlt für die Evaluation ihrer vorgefertigten Housekeeping-Gen-Reagenzien eine einfache Bestimmung der Expressionsschwankung, wobei lediglich ein Rahmen vorgegeben wird für die Menge an RNA, die in die RT eingesetzt werden soll (10-100ng pro Reaktion in der Real-Time PCR). Dieses unpräzise Vorgehen führt ohne Not neue Schwankungen in die Methode ein und ist auch nicht in der Lage, Fehler durch die RT zu erfassen.

Als idealer Bezugspunkt ist die Messung der cDNA direkt vor dem Einsetzen in die Real-Time PCR zu sehen. Eine solche Bestimmung ist jedoch beispielsweise im Spektralphotometer nicht ohne weiteres möglich, da das RT-Produkt neben der cDNA zahlreiche andere Bestandteile enthält (RNA und ihre Zerfallsprodukte, RNA-cDNA-Hybride, eventuell verunreinigende gDNA, Primer aus der RT, Nukleotide, Enzyme, Salze, organische Lösungsmittel). Außerdem liegt die cDNA in der Regel in einer Konzentration vor, die unterhalb des linearen Messbereiches der handelsüblichen Spektralphotometer liegt (Sambrook 2001).

Shimkets et al beschrieben die Verwendung von PicoGreen, einem hochsensitiven Fluoreszenzfarbstoff für Nukleinsäuren, zur Messung doppelsträngiger cDNA (ds cDNA) (Shimkets 1999, Rye 1993). PicoGreen wurde parallel zur Arbeit an dieser Studie bei der Evaluation von Housekeeping-Genen zur Messung von cDNA eingesetzt (Lossos 2003). Es wurde sogar vorgeschlagen, völlig auf den Einsatz von Housekeeping-Genen zu verzichten, und lediglich die cDNA-Menge einer Probe als Bezugspunkt bei der relativen Quantifizierung zu verwenden (Whelan 2003). Bei kritischer Hinterfragung dieser beiden Studien muss allerdings festgehalten werden, dass in beiden Fällen ungereinigte einzelsträngige cDNA (ss cDNA), die potentiell verschiedene doppelsträngige Nukleinsäuren enthielt, mit einem Farbstoff gemessen wurde, der um den Faktor 10 stärker auf doppelsträngige als auf einzelsträngige Nukleinsäuren reagiert (Rye 1993). Entsprechend konnten Lossos et al auch keinen Vorteil, sondern nur vermehrte methodische Fehler bei der Normierung der Genexpression auf cDNA gegenüber der auf RNA nachweisen.

Für die vorliegende Arbeit soll eine Synthese von einzelsträngiger cDNA (ss cDNA) durchgeführt werden, unter anderem vor dem Hintergrund, dass ein weiterer

---

Syntheseschritt zur ds cDNA weitere Fehlerquellen in das Verfahren einbringen würde.

Daher soll eine Methode entwickelt werden, um mit Hilfe von OliGreen, einer Variation von PicoGreen, die in Hinsicht auf ihren linearen Messbereich für einzelsträngige Nukleinsäuren optimiert ist, die ss cDNA direkt vor der Real-Time PCR zu messen. Hierzu muss zunächst ein Protokoll erstellt werden, mit dem möglichst reine ss cDNA möglichst verlustfrei aus dem RT-Produkt gewonnen werden kann. Durch die Bildung des Quotienten aus der Expression eines Housekeeping-Gens und des mittels OliGreen ermittelten Gesamt-cDNA-Gehalt der entsprechenden Probe sollen globale methodische Fehler der Prä-PCR bei der Evaluation von potentiellen Housekeeping-Genen ausgeglichen werden.

### **2.3.4 Genspezifische methodische Fehler: Aufdeckung in Vorversuchen und Ableitung einer Strategie zu deren Minimierung**

Wie in Abschnitt 2.3 bereits erwähnt wurde, stellen genspezifische methodische Fehler in der Prä-PCR ein großes Problem in der Genexpressionsanalyse mittels Real-Time PCR dar. Im Gegensatz zu globalen methodischen Fehlern können sie nicht kompensiert werden, indem sie erfasst und mathematisch ausgeglichen werden.

Zwar ist die Bedeutung der Prä-PCR als wichtigste nicht kompensierbare Fehlerquelle der Real-Time PCR bekannt, jedoch existieren keine umfassenden Studien zum Einfluss verschiedener Protokolle. Im Gegenteil, es findet ein weites Spektrum verschiedenster Prä-PCR-Protokolle Anwendung. Viele dieser Protokolle wurden für andere, weniger präzise Methoden als die Real-Time PCR entwickelt und werden seitdem teilweise unkritisch verwendet (Bustin 2000, Strachan 1999).

#### **Vorversuche**

Der Einfluss globaler und insbesondere auch genspezifischer methodischer Fehler zeigte sich in Vorversuchen zu dieser Studie. Zu Beginn dieser Arbeit waren für die Isolierung der RNA und die Reverse Transkription (RT) etablierte Protokolle ausgewählt worden, die sich in verschiedenen publizierten Arbeiten bewährt hatten. Es zeigten sich jedoch verblüffende Zwischenergebnisse, so dass eine tief greifende Reevaluation der verwendeten Methoden nötig wurde.

Im Folgenden sollen kurz die zunächst verwendeten Methoden begründet und skizziert werden. Anschließend werden die Zwischenergebnisse dargestellt, die sich nur durch grobe methodische Unzulänglichkeiten erklären ließen. Darauf aufbauend sollen die Überlegungen erläutert werden, die in einer umfangreichen Überprüfung verschiedener alternativer Protokolle mündeten.

Für die RNA-Isolierung wurde ein Protokoll auf Basis des RNeasy kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) gewählt. Hierbei wird die Biopsie in einem Puffer zerkleinert und homogenisiert, der die stark denaturierenden Reagenzien Guanidin-Isothiocyanat und  $\beta$ -Mercaptoethanol enthält. Diese deaktivieren die in aus dem Gewebe freigesetzten RNasen. In einer stark salzhaltigen Lösung kann anschließend die RNA an eine Kieselerdegel-Membran binden, die in vorgefertigten Säulchen integriert ist. Die so fixierte RNA kann gewaschen und anschließend eluiert werden (Bonham 1996). Dieses Verfahren erschien uns aufgrund der hohen Standardisierung

besonders für eine reproduzierbare Isolierung der RNA geeignet. Die Freisetzung der RNA aus Myokard ist aufgrund des festen und elastischen Gewebes anspruchsvoll. Daher erfolgte vor der RNA-Isolierung aufgrund von Empfehlungen des Herstellers und persönlicher Erfahrungen in kollaborierenden Laboren eine Aufspaltung der Biopsien mit Hilfe eines Rotor-Stator-Dispergierwerkzeugs (Ultra-Turrax T 25, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und eines Proteinase-K-Verdaus.

Die RT wurde nach einem Protokoll durchgeführt, dass sich in Arbeiten mit quantitativer kompetitiver PCR bewährt hatte (Borkhardt 1994, Repp 1995).

Nach diesen Protokollen wurde aus Aliquots der ersten 18 zur Verfügung stehenden Myokardproben von Patienten mit Fallotscher Tetralogie cDNA gewonnen und mittels Real-Time PCR auf einen Teil der potentiellen Housekeeping-Gene hin untersucht. Bezüglich Details der untersuchten Gene sei auf Abschnitt 4.2.1 verwiesen. Wie

Tabelle 1 zu entnehmen ist, ergaben sich zum Teil erhebliche Schwankungen der Expression zwischen den einzelnen Proben. Auf die Präsentation der detaillierten statistischen Auswertung soll an dieser Stelle verzichtet werden. Trotzdem fallen einige Aspekte besonders ins Auge:

Pat	PBGD Kopien/ $\mu$ l	HPRT Kopien/ $\mu$ l	GUSB Kopien/ $\mu$ l	B2M Kopien/ $\mu$ l	ABL Kopien/ $\mu$ l	RPLP0 Kopien/ $\mu$ l	CASQ Kopien/ $\mu$ l	GAPDH Kopien/ $\mu$ l	18S Kopien/ $\mu$ l
Patient 1	3.150	16.438	27.368	3.447.822	23.515	1.116.876	8.710.409	4.384.116	3.187.091.513
Patient 2	3.032	18.168	32.638	4.185.753	25.416	1.250.724	6.332.217	4.708.230	2.958.218.785
Patient 3	2.185	12.034	22.781	2.706.022	20.692	1.167.493	6.589.535	1.860.492	2.564.958.041
Patient 4	2.114	10.293	23.317	2.327.037	14.334	847.657	5.075.194	1.655.779	2.560.181.240
Patient 5	1.043	3.959	9.835	2.262.271	4.214	151.351	1.013.838	385.559	19.357.445
Patient 6	0	0	0	15	0	104.114	22.516	0	12.987.201
Patient 7	0	0	0	12	0	100.062	308	0	12.114.272
Patient 8	17	20	389	3.547	122	150.195	4.248	553	6.642.200
Patient 9	7	30	578	10.686	86	109.040	11.510	431	2.430.282
Patient 10	311	1.018	4.276	747.094	1.720	120.317	165.150	123.704	1.944.791
Patient 11	0	0	81	23	8	97.839	9	8	1.475.071
Patient 12	380	1.342	4.238	683.738	1.110	49.640	87.056	69.872	1.356.443
Patient 13	128	555	3.198	32.401	573	86.660	65.948	32.540	1.308.266
Patient 14	57	133	1.035	15.666	201	89.553	83.652	1.397	1.272.602
Patient 15	258	500	3.475	559.442	1.157	76.882	50.516	10.835	1.041.222
Patient 16	167	449	2.198	265.075	531	66.743	26.011	23.317	823.636
Patient 17	482	1.064	3.670	649.326	1.222	58.617	111.858	82.116	598.220
Patient 18	0	1	302	46	0	3.133	1.833	0	32.454

**Tabelle 1: Ergebnisse der Vorversuche zur Prä-PCR**

Dargestellt ist die Expression ausgesuchter Housekeeping-Gene in Aliquots von 18 der in diese Arbeit eingeschlossenen Myokardproben. Es erfolgte eine absolute Quantifizierung, die Ergebnisse liegen als Angabe „cDNA-Kopien des untersuchten Gens pro  $\mu$ l cDNA“ vor. Die Proben sind absteigend nach gemessener 18S-Expression sortiert, die Probenbezeichnung ist willkürlich gewählt.

Die Schwankungsbreite liegt für 18S bei einem Faktor von bis zu  $10^5$ . Bei anderen Genen kommen neben stark schwankenden Werten auch negativen Proben vor.

Die gemessene Expression der verschiedenen Gene korreliert innerhalb einzelner Proben. Bei hohen Werten für ein Gen findet sich meist auch bei anderen Genen eine starke Expression, ähnlich verhält es sich bei negativen Proben oder solchen mit niedriger Expression.

Eine Ausnahme dieser Regel scheint RPLP0 zu sein. Hier findet sich keine starke Korrelation mit anderen Genen. Lediglich 18S und RPLP0 weisen Gemeinsamkeiten auf.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde nun nach einer Erklärung für diese Phänomene gesucht. Eine Begründung durch biologische Vorgänge erscheint unplausibel. So müsste entweder ein Faktor vorliegen, der funktionell sehr verschiedene Gene in verblüffender Gleichförmigkeit reguliert, oder die Gene müssten sich untereinander in ihrer Expression gegenseitig dergestalt regulieren, dass eine Korrelation wie die beobachtete entstehen kann. Einfachere und plausiblere Erklärungsansätze könnten sich aus methodischen Überlegungen ergeben:

Eine variable Kontamination mit genomischer DNA (gDNA) könnte einen großen Teil der Werte erklären. Alle Proben wurden spektralphotometrisch auf ihren (vermeintlichen) RNA-Gehalt hin untersucht. Daraus folgend wurde die RNA-Konzentration im RT-Ansatz konstant eingestellt. Unter der Annahme einer stark schwankenden Kontamination der RNA mit gDNA wären diese Messwerte nicht korrekt, im RT-Ansatz kann teilweise fast reine gDNA gewesen sein. Da die Real-Time PCR im Regelfall Intron-überspannende Sonden verwendet und damit spezifisch auf mRNA reagiert (siehe Abschnitt 2.2.3), würde die kontaminierende gDNA sich nicht in erhöhten Messwerten niederschlagen. Neben der Schwankungsbreite wäre hiermit auch die Korrelation der einzelnen Gene erklärbar, da eine verminderte RNA-Konzentration bei starker Kontamination mit gDNA sich natürlich auf die RNA aller Gene auswirkt.

RPLP0 und in schwächerem Maße 18S zeigen weniger Korrelation mit den anderen Genen. Beiden Genen gemeinsam ist der Umstand, dass sie keine Introns besitzen, die gDNA-Sequenz also der RNA-Sequenz komplementär ist. Kontaminierende gDNA würde bei diesen Genen also mit gemessen werden. Bei RPLP0 könnte dies zu den relativ konstanten Ergebnissen führen. Im Falle von 18S ist zu bedenken, dass es sich um eine rRNA handelt, die als funktionelles Molekül in ungleich größerer

Kopienzahl transkribiert wird als die mRNA anderer Gene. Proportional gesehen würde der Effekt der fehlenden Introns also weniger ins Gewicht fallen als bei RPLP0. Desweiteren könnte der Umstand, dass vor allem bei 18S Schwankungen um einen Faktor von bis zu 100.000 zu beobachten waren, auch darin begründet sein, dass 18S als rRNA starke Sekundärstrukturen aufweist. Wenn aufgrund einer unzureichenden Denaturierung der RNA vor der RT eine Aufspaltung dieser Sekundärstrukturen nicht gewährleistet wäre, könnte nicht proportional cDNA synthetisiert werden.

### **Strategie zur Optimierung des Protokolls für die Prä-PCR**

Die beobachteten Effekte und die Hypothesen zu deren Entstehung hatten entscheidende Konsequenzen für diese Studie:

- 1) Eine möglicherweise starke Kontamination der isolierten RNA mit gDNA könnte für die meisten Gene zwar durch die Verwendung von Intron-überspannenden Sonden kompensiert werden, nicht jedoch im Falle von Intron-losen Genen wie 18S und RPLP0.
- 2) Eine Kontamination mit doppelsträngiger gDNA würde die in Abschnitt 2.3.3 beschriebene Strategie zur Quantifizierung der einzelsträngigen cDNA nahezu unmöglich machen, da der verwendete Fluoreszenzfarbstoff OliGreen überproportional auf doppelsträngige Nukleinsäuren reagiert.
- 3) Die postulierte Beeinträchtigung der RT durch Sekundärstrukturen stellt einen genspezifischen methodischen Fehler dar, denn natürlich hängt die Sekundärstruktur von der spezifischen Sequenz einer RNA ab. Der Effekt wurde anhand der Daten aus den Vorversuchen vor allem für 18S postuliert, es stellt sich jedoch die Frage, ob und wie sehr dieser Effekt auch die Messung anderer Gene beeinflusst. In der Literatur ist der Einfluss der Sekundärstrukturen grundsätzlich beschrieben (O'Driscoll 1993). Es fehlen jedoch systematische Arbeiten und allgemeingültige Empfehlungen zu den praktischen Konsequenzen bezüglich der Protokoll-Auswahl.

Diese Beobachten waren genau genommen überhaupt erst der Anlass gewesen, die Trennung in globale und genspezifische methodische Fehler vorzunehmen. Lediglich aus didaktischen Gründen ist sie bei der Niederschrift dieser Arbeit gleich zu Beginn eingeführt worden.

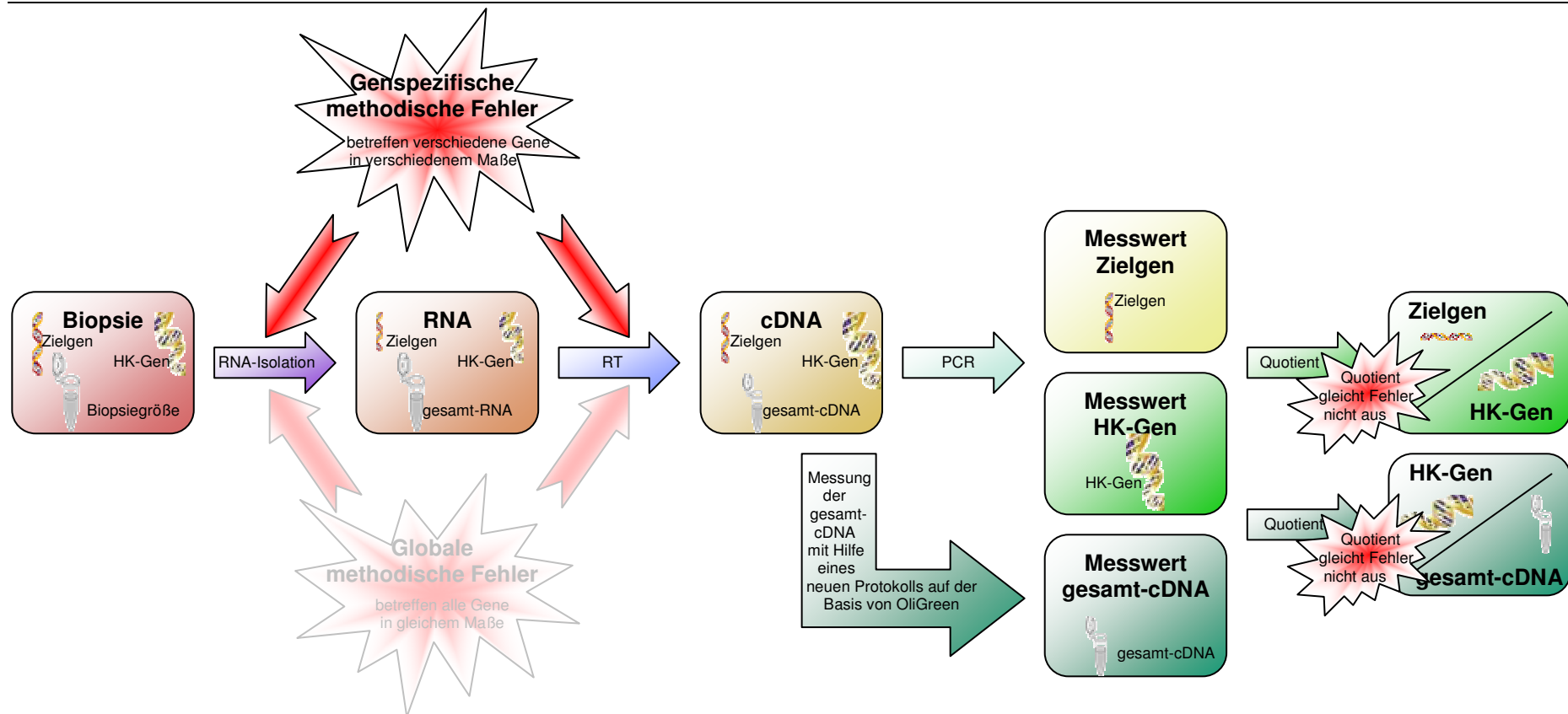
Abbildung 15 beschreibt die Konsequenzen von genspezifischen methodischen Fehlern. Sie betreffen die verschiedenen Gene in unterschiedlichem Maße. Auch die

Messung der Gesamt-RNA wird unabhängig von der einzelner Gene beeinflusst.

Diese Fehler können also nicht getrennt erfasst und für jedes gemessene Gen mathematisch ausgeglichen werden, wie dies bei den globalen methodischen Fehlern der Fall ist. Aber auch der Ausgleich der globalen Fehler durch die Bildung von Quotienten (aus Ziel- und Housekeeping-Gen oder aus potentiell Housekeeping-Gen und Gesamt-RNA) ist bei Vorliegen von relevanten genspezifischen Fehlern nicht möglich, denn der Fehler des einen Messwertes ist dann nicht mehr repräsentativ für den des anderen.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde eine Strategie entwickelt, um zum einen die Kontamination mit gDNA weitestgehend auszuschließen und zum anderen die Quellen genspezifischer Fehler aufzudecken und diese Fehler zu minimieren.

Hierzu wurden einige Elemente des Protokolls komplett umgestellt, andere wurden in zahlreichen Modifikationen getestet, um die optimale Variation zu ermitteln. Eine umfangreiche Qualitätskontrolle wurde implementiert, um den Erfolg der Maßnahmen zu überprüfen. Details der Optimierung und Evaluation der Prä-PCR sind in Abschnitt 4.4.1 beschrieben.



**Abbildung 15: Genspezifische methodische Fehler in der Prä-PCR müssen minimiert werden**

Genspezifische methodische Fehler beeinflussen verschiedene Gene einer Probe in verschiedenem Maße. Dadurch ändert sich die Anzahl der Moleküle eines jeden Gens sowie die Anzahl der Moleküle aller Gene zusammen in einer Weise, die nicht vorhersehbar oder nachträglich quantifizierbar ist. Dargestellt wird dies im abgebildeten Beispiel durch eine inhomogene Änderung der Symbolgröße für Zielgen, Housekeeping-Gen und die Gesamt-RNA. Die Bildung eines Quotienten aus Zielgen und Housekeeping-Gen oder aus Housekeeping-Gen und Gesamt-RNA kann daher nicht dazu dienen, um diese genspezifischen Fehler nachträglich zu eliminieren. Genspezifische Fehler können daher nur durch Optimierung der Protokolle minimiert werden.

### 3 FRAGESTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der natriuretischen Peptide und angiogenetischen Wachstumsfaktoren bei der Anpassung des Myokards auf die pathophysiologischen Umstände der Fallotschen Tetralogie untersucht. Im Einzelnen sollten die folgenden Fragen geklärt werden:

- 1) Ist die Expression von ANP und BNP im Myokard von Patienten mit Fallotscher Tetralogie im Sinne einer fetalen Reexpression erhöht? Besteht ein Zusammenhang mit dem rechtsventrikulären Druck oder der arteriellen Sauerstoffsättigung?
- 2) Lässt sich eine Expression von HIF1A, Gesamt-VEGF, VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189, VEGF-R1 und VEGF-R2 im nicht ischämischen Myokard von Patienten mit Fallotscher Tetralogie nachweisen? Ist die Expression im Sinne einer fetalen Reexpression erhöht? Besteht ein Zusammenhang mit dem rechtsventrikulären Druck oder der arteriellen Sauerstoffsättigung?

Aufgrund der beschriebenen methodischen Anforderungen mussten zunächst die folgenden Aufgaben erledigt werden:

- 1) Untersuchung verschiedener RT-Protokolle und der gesamten Prä-PCR auf genspezifische methodische Fehlerquellen und Entwicklung eines validen Protokolls
- 2) Etablierung eines Protokolls zur Quantifizierung einzelsträngiger cDNA mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes OliGreen zum Ausgleich globaler methodischer Fehler
- 3) Mit Hilfe dieses Protokolls: Evaluation von zehn potentiellen Housekeeping-Genen für die Anwendung im Rahmen der Genexpressionsanalyse an Myokardbiopsien von Patienten mit Fallot-Tetralogie

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 STUDIENKOLLEKTIV

#### 4.1.1 Kollektiv der Patienten mit Fallot-Tetralogie und Fallot-artigen Herzfehlern

Fünfundzwanzig Patienten wurden in die Studie eingeschlossen. Die zugrunde liegende klinisch-morphologische Diagnose war in dreiundzwanzig Fällen eine Fallotsche Tetralogie (TOF) sowie in jeweils einem Fall double-outlet right ventricle (DORV) vom Fallot-Typ und Pulmonalarterienatresie vom Fallot-Typ.

Rechtsventrikuläre Proben wurden im Rahmen der Korrekturoperationen aus dem resezierten subvalvulären Myokard entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei einundzwanzig Patienten wurde operativ eine primäre Korrektur des Vitiums durchgeführt, bei vier Patienten wurde im höheren Alter aufgrund von Restpulmonalstenosen und/ oder Pulmonalinsuffizienzen erneut operativ interveniert. Die Myokardproben entstammten einer Studie zum Effekt der perioperativen Carnitin-Supplementierung. Verwendet wurden nur Proben, die nach Abschluss dieser Studie als Placebo-Proben identifiziert worden waren. Die Ethik-Kommission der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie die Patienten bzw. deren Eltern hatten der Probenentnahme zugestimmt.

Die Gruppen werden im Folgenden als TOF, 1. OP und TOF, 2. OP bezeichnet.

Im Rahmen der präoperativen Herzkatheterdiagnostik wurden die arterielle Sauerstoffsättigung ( $Sa O_2$ ), der rechtsventrikuläre Spitzendruck (P RV peak), der rechtsventrikuläre enddiastolischer Druck (P RV ed), der rechtsatrielle Mitteldruck (P RA mean) und der Quotient aus pulmonalem und systemischem Fluss ( $Q_p/Q_s$ ) bestimmt. Tabelle 2 gibt eine Zusammenfassung der klinischen Parameter wider (die ausführliche Darstellung findet sich im Anhang).

Parameter	Patienten mit primärer Korrekturoperation (n=21)		Patienten mit Reoperation (n=4)	
	Median / Anzahl der Fälle	Spannweite	Median / Anzahl der Fälle	Spannweite
Alter	10 Monate	5 Monate – 8 Jahre	16 Jahre	14 - 25 Jahre
Geschlecht	13 männlich, 8 weiblich		3 männlich, 1 weiblich	
Präoperative Betablocker- Therapie	6		0	
Sa O <sub>2</sub>	91%	76 - 99 %	97%	84 - 99 %
P RV peak	87 mmHg	45 - 134 mmHg	61 mmHg	50 - 119 mmHg
P RV ed	9 mmHg	2 - 15 mmHg	9 mmHg	8 - 13 mmHg
P RA mean	4 mmHg	0 - 36 mmHg	6 mmHg	4 - 10 mmHg
Q <sub>p</sub> /Q <sub>s</sub>	1	0.36 - 2.19	1	0.59 - 1

**Tabelle 2: Ausgewählte klinische Parameter der Patienten**

Die arterielle Sauerstoffsättigung (Sa O<sub>2</sub>), der rechtsventrikuläre Spitzendruck (P RV peak), der rechtsventrikuläre enddiastolische Druck (P RV ed), der rechtsatrielle Mitteldruck (P RA mean) und der Quotient aus pulmonalem und systemischem Fluss (Q<sub>p</sub>/Q<sub>s</sub>) wurden im Rahmen von Herzkatheteruntersuchungen bestimmt.

### 4.1.2 Kontrollkollektiv

Zur Bildung der Kontrollgruppe wurden sechs rechtsventrikuläre (RV) und vier rechtsatriale (RA) Myokardproben aus zehn verschiedenen gesunden Spenderherzen entnommen, die aufgrund organisatorischer Schwierigkeiten nicht transplantiert werden konnten. Diese Proben wurden uns von Frau Dr. S. Sperling, Max-Planck-Institut für Molekulargenetik, Berlin zur Verfügung gestellt. Auch in diesem Falle hatten die Ethikkommission und die Spender bzw. deren Angehörige der Verwendung zugestimmt.

Im Folgenden werden die Gruppen als KO, RV und KO, RA bezeichnet.

Aufgrund des Alters der Spender (18 bis 59 Jahre) war eine Zuordnung von Studienpatienten und Kontrollproben im Sinne einer Fall-Kontroll-Studie nicht möglich. Allerdings stellten diese Spenderorgane die einzige Möglichkeit dar, Myokardproben Herzgesunder in die Studie einzuschließen. Die Ergebnisse sind jedoch vor diesem Hintergrund zu interpretieren.

Tabelle 3 gibt Alter und Geschlecht der Mitglieder des Kontrollkollektives wieder. Details finden sich im Anhang.

Parameter	Rechtsventrikuläre Kontrollen (n=6)		Rechtsatriale Kontrollen (n=4)	
	Median / Anzahl der Fälle	Spannweite	Median / Anzahl der Fälle	Spannweite
Alter	39 Jahre	18 - 57 Jahre	53 Jahre	37 - 59 Jahre
Geschlecht	3 männlich, 3 weiblich		4 weiblich	

**Tabelle 3: Kontrollkollektiv**

## 4.2 UNTERSUCHTE GENE

### 4.2.1 Housekeeping-Gene

Tabelle 4 zeigt die in dieser Studie evaluierten potentiellen Housekeeping-Gene. Auch ausgewählte Studien, die diese Gene als Housekeeping-Gene evaluiert oder verwendet haben, sind angegeben. Kursiv sind hierbei Studien am Myokard hervorgehoben.

Bedeutung als Housekeeping-Gen in der Real-Time PCR

Gen	Vollst. Bezeichnung, Synonyme	Biologische Funktion	Evaluiert	Anwendung ohne Evaluation	Bemerkungen
PBGD	Porphobilinogen deaminase; Hydroxymethylbilan synthase, HMBS	Hämsynthese, alternative Splicing-Variante mit Housekeeping-Eigenschaften	☉ humane Alveolarmakrophagen (Fink 1998) ☉ humane leukämische Zellen (Mensink 1998) ☉ Burkitt-Lymphom-Proben (Wilda 2004) ☉ maligne Leukozyten (Lupberger 2002)	☞ Häufig, v.a. im onkologischen Bereich	
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	Purinabbau	☉ <i>humanes transplantiertes Myokard und isolierte Cardiomyozyten (Moniotte 2001)</i> ☉ Burkitt-Lymphom-Proben (Wilda 2004)	☞ Tumorgewebe (Specht 2001)  ☞ Lungengewebe (von der Hardt 2002)	
GUSB	Beta-glucuronidase	Lysosomales Enzym	☉ humane Adipozyten (Gorzelnik 2001)	☞ Mamma-Ca (Egawa 2001)  ☞ chronisch myeloischer Leukämie (Stentoft 2001)	

## Bedeutung als Housekeeping-Gen in der Real-Time PCR

Gen	Vollst. Bezeichnung, Synonyme	Biologische Funktion	Evaluiert	Anwendung	Bemerkungen
B2M	Beta-2-microglobulin	Kleine Untereinheit des MHC Klasse I Moleküls	☉ Minimal Residual Disease (Pallisgaard 1999) ☉ Fibroblasten (Schmittgen 2000) ☉ maligne Leukozyten (Lupberger 2002) ☉ humane Adipozyten (Gorzelnik 2001) ☉ Burkitt-Lymphom-Proben (Wilda 2004)	☞ chronisch myeloischer Leukämie (Stentoft 2001) ☞ Häufig	
ABL	V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	Rezeptor-Tyrosine-Kinase, Proto-Onkogen	☉ <i>humanes transplantiertes Myokard und isolierte Cardiomyozyten (Moniotte 2001)</i> ☉ Burkitt-Lymphom-Proben (Wilda 2004)	☞ Häufig, v.a. im onkologischen Bereich ☞ Bei chronisch myeloischer Leukämie (Guo 2002)	
TNNI3	Troponin I, cardiac; cTnI	Bestandteil Troponin-Komplexes am dünnen Filament des gestreiften Muskels	☉ <i>humanes fetales und adultes versagendes Myokard (Razeghi 2001)</i>	☞ <i>in adultem versagendem Myokard (Razeghi 2002)</i>	Cardiomyozytenspezifisch  Konstante Expression nachgewiesen im fehlgebildeten Mäuseherz (Franco 2001), bei Hypertrophie und kardialer Dekompensation (Cumming 1995)
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	Bestandteil der 60S Untereinheit	☉ humane Adipozyten (Gorzelnik 2001)	☞ <i>In fetalem und adultem Rattenherz (Depre 1998, Depre 2000)</i>	Gen enthält keine Introns

## Bedeutung als Housekeeping-Gen in der Real-Time PCR

Gen	Vollst. Bezeichnung, Synonyme	Biologische Funktion	Evaluiert	Anwendung	Bemerkungen
CASQ2	Calsequestrin 2 (cardiac muscle)	Calcium-bindendes Protein im Sarkoplasmatischen Retikulum		☞ Bei der kompetitiven RT-PCR in humanem Myokard nach Herztransplantation (Hullin 1999)	Cardiomyozytenspezifisch  Konstante Expression nachgewiesen für Hypertrophie (DiPaola 2001), hypertrophe Cardiomyopathie (Somura 2001) und kardiale Dekompensation (Yoneda 2001)  Widersprüchliche Studien zur Expression beim "stunned myocardium": konstant (Luss 1998), erhöht (Frass 1993)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolyse	☺ <i>humanes transplantiertes Myokard und isolierte Cardiomyozyten (Moniotte 2001)</i> ☺ <i>mit Einschränkungen für Cardiomyozyten der Ratte (Winer 1999)</i> ☺ humane Adipozyten (Gorzelnik 2001) ☺ Fibroblasten (Schmittgen 2000)  ☺ wachsende Kollateralgefäße (Deindl 2002) ☺ viele Gewebe (Review: Bustin 2000)	☞ <i>In humanem Myokard von Patienten mit Aortenstenose (Fielitz 2002)</i> ☞ <i>In humanem Myokard bei Hypertropher Cardiomyopathie (Somura 2001)</i> ☞ <i>In volumenbelastetem Rattenherz (Kuwahara 2002)</i> ☞ <i>In neonatalem und adultem Myokard an der Maus (Schoenfeld 1998)</i>  ☞ Häufig, in vielen Geweben (Review: Bustin 2000)	Glukosestoffwechsel ist im Myokard vielfältig reguliert (Taegtmeier 2000)

## Bedeutung als Housekeeping-Gen in der Real-Time PCR

Gen	Vollst. Bezeichnung, Synonyme	Biologische Funktion	Evaluiert	Anwendung	Bemerkungen
18S	18S ribosomal protein	Bestandteil der 40S Untereinheit	☺ Fibroblasten (Schmittgen 2000)	☞ humane Myokardbiopsien bei koronarer Herzkrankheit (Wang 2004)	Gen enthält keine Introns
			☺ wachsende Kollateralgefäße (Deindl 2002)	☞ Rattenherz unter Hypoxie (Razeghi 2003)	rRNA
			☺ viele Gewebe (Review: Bustin 2000)	☞ Aortenmyozyten der Ratte (Mamic 2000)	starke Sekundärstrukturen
				☞ Häufig, in vielen Geweben (Review: Bustin 2000)	

**Tabelle 4: Die untersuchten potentiellen Housekeeping-Gene**

Dargestellt sind die Abkürzungen und vollständigen Bezeichnungen laut NCBI, eine kurze Beschreibung der biologischen Funktion sowie ausgewählte Quellenangaben zur Evaluation und Anwendung als Housekeeping-Gene in der Real-Time PCR. Die Bedeutung der Symbole: ☺ Housekeeping-Gen evaluiert und für valide befunden, ☹ Housekeeping-Gen evaluiert und für nicht valide befunden, ☞ Anwendung eines Housekeeping-Gens ohne vorherige Evaluation, *kursiv*: Evaluation/ Anwendung im Myokard.

#### 4.2.2 Zielgene

Die folgenden Zielgene wurden untersucht: ANP (atrial natriuretic peptide), BNP (brain-type natriuretic peptide), HIF1A (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ), VEGF (vascular endothelial growth factor A), VEGF-R1 (vascular endothelial growth factor receptor 1) und VEGF-R2 (vascular endothelial growth factor receptor 2). Für VEGF wurde zum einen mit einem unspezifischen Amplikon die Gesamtmenge quantifiziert, zum anderen wurden die drei Isoformen VEGF-121, VEGF-165 und VEGF-189 bestimmt.

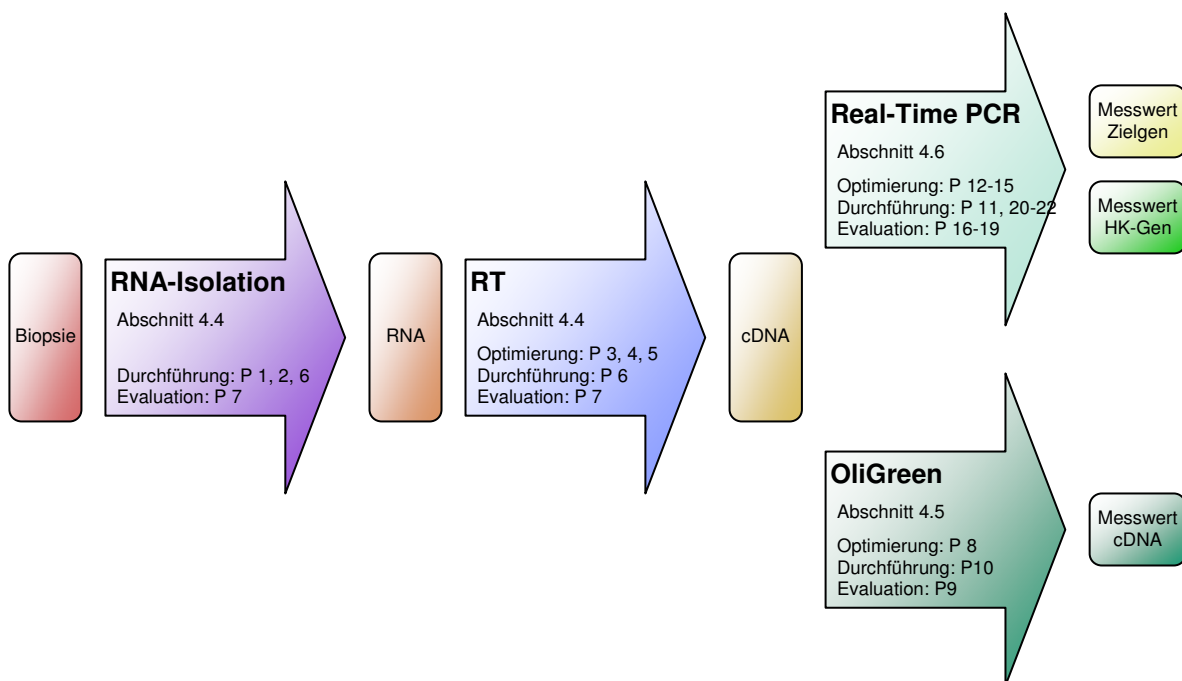
### 4.3 ÜBERSICHT DER METHODEN

Im Folgenden sollen die einzelnen methodischen Elemente der Genexpressionsanalyse dargestellt werden (siehe Abbildung 16).

Abschnitt 4.4 beschreibt die RNA-Isolierung und die Reverse Transkription (zusammen als Prä-PCR bezeichnet). Hierbei wird auch die Optimierung des Protokolls beschrieben, wie sie zur Minimierung der genspezifischen methodischen Fehler nötig war.

In Abschnitt 4.5 wird die Entwicklung eines neuen Protokolls zur Quantifizierung einzelsträngiger cDNA erläutert, wie sie zum Ausgleich der globalen methodischen Fehler im Rahmen der Evaluation von zehn potentiellen Housekeeping-Genen nötig war.

Abschnitt 4.6 schließlich beschreibt die Real-Time PCR selbst, mit der die Housekeeping- und die Zielgene quantifiziert wurden.



**Abbildung 16: Übersicht der Methoden**

Angegeben sind die Abschnitte, in denen die Methoden beschrieben werden, sowie die Protokolle (P) nach denen die Optimierung, Durchführung und Evaluation stattfand.

## 4.4 PRÄ-PCR

### 4.4.1 Optimierung und Evaluation der Prä-PCR

Aufgrund der in Abschnitt 2.3.4 dargestellten Vorversuche wurde eine Strategie entwickelt, um die Quellen der genspezifischen Fehler in der prä-PCR aufzudecken und diese Fehler zu minimieren. Außerdem sollte die Kontamination der RNA und der daraus synthetisierten cDNA mit gDNA weitestgehend ausgeschlossen werden.

Hierzu wurden die Protokolle für die RNA-Isolation komplett umgestellt (siehe Tabelle 5, Protokoll 1 und Protokoll 2), für die RT wurden zahlreiche Protokollmodifikationen getestet, um die optimale Variation zu ermitteln (siehe Tabelle 6, Protokoll 3, Protokoll 4 und Protokoll 5).

Die so entwickelten Protokolle für die Prä-PCR (zusammengefasst in Protokoll 6) wurden in verschiedenen Versuchen evaluiert (siehe Protokoll 7).

#### Isolierung der RNA: Auswahl neuer Protokolle

Im Folgenden soll die Auswahl der Protokolle für die RNA-Isolierung begründet und die Evaluation der einzelnen Schritte beschrieben werden. Tabelle 5 gibt die wesentlichen Unterschiede der neuen Protokolle (Protokoll 1 und Protokoll 2) gegenüber denen der Vorversuche wieder. Die so abgeleiteten Protokolle für RNA-Isolierung, DNase-Verdau und Überprüfung der gDNA-Freiheit wurden in Vorversuchen an Fragmenten eines humanen explantierten Herzens getestet.

	Protokolle der Vorversuche	Neu ausgewählte Protokolle
Aufspaltung und Homogenisierung der Biopsie	Rotor-Stator-Dispergierwerkzeug (in $\beta$ -Mercaptoethanol)	Mörsern auf Stickstoff, Mixer Mill MM 300 (in TRIzol)
RNA-Isolierung	Qiagen RNeasy	TRIzol
DNase-Verdau	–	DNAfree
Kontrolle auf gDNA-Freiheit	–	Real-Time PCR für eine Intron-Sequenz von cMYC

**Tabelle 5: Auswahl der neuen Protokolle für die RNA-Isolierung**

Die Aufspaltung der Myokardbiopsien ist aufgrund der Gewebeeigenschaften anspruchsvoll. Mit Hilfe des Rotor-Stator-Werkzeugs konnte die makroskopische Zerkleinerung der Proben zwar befriedigend erreicht werden, jedoch zeigte sich im Verlauf, dass eine Reinigung des Werkzeugs nach jeder Anwendung nicht nur

zeitaufwendig war, sondern dass sie bei Nachweis positiver Negativ-Kontrollen auch nicht effizient war. Nach weiteren Vorversuchen mit porkinen Myokardproben erfolgte daher die Umstellung auf ein zweistufiges Verfahren, in dem die Proben zunächst auf flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend mit Hilfe des Oszillationswerkzeuges Mixer Mill MM 300 weiter homogenisiert wurden.

Auch die Anwendung der RNeasy-kits wurde neu überdacht. Die Rücksprache mit dem Hersteller bestätigte den Verdacht, dass gDNA in hohem Maße mitextrahiert werden kann. Hinzu kommt die Eigenschaft von RNeasy, dass lediglich Nukleinsäuren größer als 200 Basenpaare isoliert werden können. Ein großer Vorteil der Real-Time PCR besteht darin, dass auch Fragmente unter 200 Basenpaaren erfasst werden können. Insbesondere bei klinischen Proben bedeutet dies, dass auch potentiell degenerierte RNA der Expressionsanalyse zur Verfügung steht. Daher kann ein Herausfiltern kleinerer Fragmente durchaus eine Verfälschung der Ergebnisse darstellen. Aus diesen beiden Gründen wurde daher die RNA-Isolierung im Folgenden mit Hilfe der Guanidinium-Thiozyanat-Phenol-Chloroform-Methode durchgeführt. Die Vorteile der fehlenden Größenselektion und der geringeren Kontamination mit gDNA wurden jedoch mit einem höheren Arbeitsaufwandes und einer geringeren Standardisierung erkauft. Umso wichtiger wurde damit die Kontrolle des methodischen Fehlers und der Cross-Kontamination.

Um eine vollständige Entfernung der gDNA zu erreichen, fügten wir einen weiteren Schritt zum Verdau der DNA ein. Hierbei wurde aufgrund der hohen Effizienz ein Verfahren auf Basis der DNase I gewählt (Eun 1996, Sutton 1997).

Um die Effizienz dieser DNase-Behandlung zu kontrollieren, entwickelten wir ein Verfahren zur genauen quantitativen Kontrolle der gDNA-Konzentration, um alle klinischen Proben nach der RNA-Isolierung zu überprüfen. Grundlage dieses Verfahrens ist die absolute Quantifizierung eines single-copy Gens, in diesem Fall cMYC. Die Sequenz eines pseudogenfreien single-copy Gens ist in einem diploiden Chromosomensatz genau zwei mal vorhanden, nämlich in jeweils einer Kopie pro homologem Chromosom. cMYC ist nach [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) pseudogenfrei. Ein humaner somatischer Zellkern enthält etwa 7 pg genomische DNA (Strachan 1999). Wird nun mittels Real-Time PCR eine intron-Sequenz von cMYC quantifiziert, so wird ausschließlich genomische DNA erfasst, und es ist ein Rückschluss auf die Menge der gDNA über die einfache Relation „2 Kopien cMYC pro 7 pg gDNA“ möglich. Die Validität dieser Methode wurde in Vorversuchen überprüft, indem aufgereinigte humane gDNA mittels des Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) quantifiziert und gleichzeitig die Kopienzahl von cMYC mittels Real-Time PCR quantifiziert wurde. Auf die Details der gDNA-

Messung mittels PicoGreen soll an dieser Stelle aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet werden. Das Protokoll stellt jedoch eine vereinfachte Version der in Protokoll 10, Abschnitt 4.5.3 beschriebenen Methode auf Grundlage von OliGreen dar. Die gemessene Relation von cMYC-Kopien und gDNA diene hierbei zum experimentellen Ausschluss von Pseudogenen.

Zur Vervollständigung der Methodenevaluation fand in Vorversuchen eine Kontrolle des linearen Messbereiches des zur Quantifizierung der RNA verwendeten Spektralphotometers statt.

### **Protokoll 1: Allgemeine Richtlinien beim Umgang mit RNA**

Abzug nur für RNA-Isolierung

Verschiedene Maßnahmen zur Minimierung der RNase-Aktivität

Bei der Handhabung von freier RNA stellen ubiquitär vorkommende RNasen ein großes Problem dar. Arbeitsflächen und -geräte werden schon durch einfaches Berühren mit RNasen kontaminiert. Es wurden daher strenge Richtlinien eingehalten, um einen Abbau der RNA zu minimieren (Sambrook 2001). Die Isolierung der RNA fand unter einem nur für diesen Zweck reservierten Abzug statt. Arbeitsflächen und -geräte wurden regelmäßig mit RNaseZap (Ambion, Austin, TX, USA) behandelt, einem starken Detergenz, das RNasen deaktivieren kann. Latexhandschuhe wurden getragen und jedes Mal dann gewechselt, wenn ein Gegenstand außerhalb des Abzuges berührt worden war. Mehrfach verwendete Glasgefäße wurden bei 150°C für vier Stunden ausgebacken, bei Einwegmaterial und Reagenzien wurde auf zertifizierte RNase-Freiheit Wert gelegt.

### **Protokoll 2: Probengewinnung, RNA-Isolierung und –Aufreinigung, Qualitätskontrolle**

Mörsern auf flüssigem Stickstoff

Homogenisierung mit der Mixer Mill MM 300

RNA-Isolation mit TRIzol

DNase-Verdau mit DNasefree

Qualitätskontrollen:

Agarosegel

spektralphotometrische Messung

Kontrolle der gDNA-Freiheit durch Real-Time PCR für Intron-Sequenz von cMYC

Im OP-Saal wurden die Myokardproben mit einem sterilen Skalpell in Fragmente von etwa 10 bis 20 mg zerteilt, einzeln in RNase-freie Kryo-Röhrchen verbracht und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C. Die Myokardproben wurden unter Verwendung autoklavierter Stößel in flüssigem Stickstoff gemörsert. Um Kontaminationen vorzubeugen verblieben hierbei die Proben in denselben Kryo-Röhrchen, in denen sie gelagert worden waren.

Eine weitere Aufspaltung des Myokardgewebes und die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe der Guanidinium-Thiozyanat-Phenol-Chloroform-Methode (Chomczynski 1987). Hierzu wurde die gemörserte Myokardprobe in 1000 µl des TRIzol (Gibco BRL Life Technologies, Merelbeke, Belgien) Guanidinium-Thiozyanat-Phenol-Gemisches verbracht, mit einer 3 mm durchmessenden Edelstahlkugel bestückt und in der Mixer Mill MM 300 (Qiagen, Hilden, Deutschland) durch viermaliges Oszillieren mit 20 Hz für jeweils 3 Minuten homogenisiert.

Nach Entnahme der Lösung aus dem Reaktionsgefäß mit der Edelstahlkugel und einem Zentrifugationsschritt (12.000 g, 10 min, 4°C) zum Entfernen des Zelldetritus wurde der Überstand in 200 µl Chloroform durch kräftiges Schütteln für 15-30 sec gelöst und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Phasenauftrennung erfolgte durch eine weitere Zentrifugation (12.000 g, 15 min, 4°C). Die obere, RNA enthaltende Phase wurde abpipettiert, mit 500 µl Isopropylalkohol versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Sedimentation der RNA als Pellet am Boden des Gefäßes wurde durch eine erneute Zentrifugation (12.000 g, 10 min, 4°C) erreicht. Der Überstand wurde verworfen und die RNA zum Waschen in 75%igem Ethanol resuspendiert und wiederum zentrifugiert (7.500 g, 5 min, 4°C). Nach Abnahme des Überstandes wurde die RNA für 5 min bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und anschließend in 50 µl hochreinem Wasser (LiChroSolv, Merck Life Science & Analytics, Darmstadt, Deutschland) durch eine Inkubation für 10 min bei 55°C gelöst.

Um die Freiheit der RNA von kontaminierender gDNA zu garantieren, wurde anschließend ein DNase-Verdau mit Hilfe des DNasefree-Kits (Ambion, Austin, TX, USA) durchgeführt. Die Inkubation der RNA mit 1 µl DNase I und 5 µl DNase I Pufferkonzentrat erfolgte für 30 min bei 37°C. Mit Hilfe von 5µl des DNase Inactivation Reagent wurde anschließend die DNase inaktiviert und ausgefällt (zweimaliges Vortexen und Inkubieren für 1 min bei Raumtemperatur und anschließendes Zentrifugieren mit 10.000 g für 1 min bei Raumtemperatur). Der Überstand mit der gereinigten RNA wurde anschließend in ein neues Gefäß überführt.

Zur Kontrolle der Qualität der RNA und einer eventuellen Fragmentierung wurden 5 µl RNA abgezweigt und eine Gelelektrophorese mit einem 1,5%igem Agarosegel (60V für 1,5 Stunden) und anschließender EtBr-Färbung durchgeführt (Sambrook 2001).

Eine spektralphotometrische Bestimmung der Konzentration der RNA (5 µl, 1:2 verdünnt) und die Abschätzung der Kontamination mit Proteinen anhand des Quotienten der optischen Dichte bei 260 und 280 nm (Sambrook 2001) diente der Einstellung der RNA-Konzentration für die anschließende RT und damit auch als alternativer Bezugspunkt für die Evaluation der Housekeeping-Gene im Sinne von Abschnitt 2.3.3.

Zur Kontrolle der DNA-Freiheit wurden desweiteren 2 µl der RNA (1:2 verdünnt auf 4 µl) verwendet, um eine Real-Time PCR für eine Intron-Sequenz des Single-Copy Gens cMYC durchzuführen (siehe Protokoll 11).

Nach Hinzufügen von 2 µl eines RNase-Inhibitors (RNaseOUT, Gibco) wurde die RNA bis zur Reversen Transkription bei -80 °C gelagert.

### Reverse Transkription: Evaluierung zahlreicher Protokollvariationen

Da aufgrund der in Abschnitt 2.3.4 beschriebenen Vorversuche und der in der Literatur beschriebenen Daten (O'Driscoll 1993) die Hypothese entwickelt worden war, dass die RT eine wichtige Quelle für genspezifische methodische Fehler darstellen kann, wurden eine Reihe von Protokollvariationen auf ihren Einfluss auf die genspezifische RT-Effizienz hin untersucht. Wir wählten zwei Basisprotokolle. Von diesen ausgehend variierten wir einzelne Bestandteile. Tabelle 6 fasst die wichtigsten Unterschiede der beiden Basisprotokolle (Protokoll 3 und Protokoll 4) zusammen. Protokoll 5 beschreibt die Evaluation verschiedener Protokoll-Variationen.

	RT I nach Borkhardt 1994	RT II nach Matathias 1999
Denaturierung der RNA	RNA alleine	RNA + Random Primer + dNTPs
Enzym, Inkubation	Superscript I, 37°C, 60 min	Superscript II, 42°C, 50 min
Konzentrationen		
RNA	5 ng/μl	5 ng/μl In weiteren Versuchen 1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 40 ng/μl
dNTPs	2 mM	0,5 mM

**Tabelle 6: Unterschiede der beiden Basisprotokolle für die Reverse Transkription**

Als Basisprotokoll I diente das in den Vorversuchen verwendete Protokoll (Borkhardt 1994, Protokoll 3). Als Basisprotokoll II wählten wir ein neueres Protokoll, das für die Verwendung mit dem weiterentwickelten Enzym Superscript II (Gibco) empfohlen wurde (Matathias 1999, Protokoll 4). Superscript II wurde entwickelt, um längere cDNA-Fragmente synthetisieren zu können als das Vorgänger-Enzym Superscript I, wie es in Basisprotokoll I Verwendung findet. An der Verwendung von Random Hexamer Primern wurde in beiden Protokollen festgehalten, da in der vorliegenden Studie auch 18S, also eine rRNA, untersucht werden sollte. Außerdem sollte im Verlauf auch die Gesamt-RNA quantifiziert werden. Da mRNA lediglich 2% der Gesamt-RNA einer Zelle ausmacht (Sambrook 2001), wäre auch aus diesem Grund eine Verwendung von Oligo(dT) Primern, die eine RT nur für mRNA, beginnend am Poly (A) Tail initiieren können, nicht möglich.

**Protokoll 3: Reverse Transkription, Basisprotokoll I nach Borkhardt 1994 (RT I)**

Denaturierung der RNA alleine  
Superscript I, 37°C, 60 min  
RNA-Konzentration 5 ng/μl  
dNTPs 2 mM

Zunächst erfolgte eine Denaturierung der RNA durch Erwärmung auf 65°C für 5 Minuten und anschließende rasche Abkühlung in Eiswasser. Die Reverse Transkription wurde in einem Volumen von 100 μl bei 37°C für 60 Minuten durchgeführt. Die hierbei verwendeten Reagenzien in ihrer Endkonzentration waren: 5 ng/μl RNA, 10 ng/μl Random Hexamer Primer (Boehringer, Mannheim, Deutschland), 10 U/μl Superscript I, 2 U/μl RNaseOUT, 2 mM aller vier Desoxyribonucleosid 5'-Triphosphate A, G, C und T (dNTPs) und 10mM DTT (allesamt von Gibco). RNaseOUT diente als RNase-Inhibitor hierbei zur Protektion der RNA während der Inkubation, DTT ist ein essentieller Cofaktor der Reversen Transkriptase. Anschließend wurde eine Deaktivierung der Reversen Transkriptase durch eine Inkubation bei 95°C für 5 Minuten durchgeführt.

**Protokoll 4: Reverse Transkription, Basisprotokoll II nach Matathias 1999 (RTII)**

Denaturierung der RNA mit Random-Primern und dNTPs  
Superscript II, 42°C, 50 min  
RNA-Konzentration 5 ng/μl  
dNTPs 0,5 mM

Im Gegensatz zu Protokoll 3 wurden der RNA gleich zu Beginn Random Hexamer Primer und dNTPs hinzugefügt, erst dann folgte die Denaturierung bei 65°C für 5 Minuten und rascher Abkühlung auf Eiswasser. Anschließend wurde die Reverse Transkription aufgrund der differierenden Herstellerempfehlungen bei 42°C für 50 Minuten durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien in ihrer Endkonzentration waren: 5 ng/μl RNA, 10 ng/μl Random Hexamer Primer, 0,5 mM aller vier dNTPs, 10 U/μL Superscript II, 2 U/μL RNaseOUT und 10mM DTT. Eine Enzymdeaktivierung bei 70°C für 15 Minuten schloss sich an.

**Protokoll 5: Evaluation verschiedener Variationen der RT-Protokolle**

RNA eingesetzt in verschiedene Protokoll-Varianten (3fach-Ansatz)

Quantifizierung von PBGD, HPRT, GAPDH und 18S mittels Real-Time PCR

RT I

RT II

RT II jedoch Denaturierung ohne Primer

jedoch Superscript I bei 37°C

jedoch dNTPs 2mM

RT II mit RNA-Konzentrationen von 1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 40 ng/μl

Aus Fragmenten eines explantierten humanen Herzens wurde nach Protokoll 2 RNA gewonnen. Aus diesem Pool wurde RNA entnommen und in jeweils drei Ansätzen von jeweils 20 μl nach den beiden Basisprotokollen revers transkribiert. Außerdem wurden auf Grundlage des Basisprotokolls II verschiedene Elemente durch die entsprechenden Vorschriften aus Basisprotokoll I ersetzt: Denaturierung der RNA alleine, d.h. ohne Random Primer und dNTPs; Verwendung von Superscript I mit den empfohlenen Inkubationszeiten und -temperaturen; dNTPs in einer Konzentration von 2 mM. Auch diese Protokollvariationen wurden im dreifachen Ansatz durchgeführt.

Des Weiteren wurde Basisprotokoll II dahingehend variiert, dass die RNA Konzentrationen 1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 40 ng/μl verwendet wurden. Auch diese Versuche erfolgten im dreifachen Ansatz.

Anschließend fand eine Quantifizierung von vier ausgewählten potentiellen Housekeeping-Genen statt, die das Panel der untersuchten Gene repräsentieren sollten: PBGD, HPRT, GAPDH und 18S. Die Real-Time PCR wurde nach Protokoll 11 durchgeführt.

Als Maß für den Einfluss der RT auf genspezifische methodische Fehler wurde die relative RT-Effizienz berechnet als Quotient der resultierenden Kopienzahl eines Gens bei Verwendung einer bestimmten Protokoll-Variation und der Kopienzahl auf Grundlage des Basisprotokolls II, bzw. des Basisprotokolls II mit einer RNA-Konzentration von 1,25 ng/μl.

#### 4.4.2 Endgültiges Protokoll für die Prä-PCR und dessen Evaluation

##### **Protokoll 6: Endgültiges Protokoll für die Prä-PCR**

RNA-Isolierung anhand von Protokoll 1 und Protokoll 2

RT anhand von Basisprotokoll II (Protokoll 4) mit 5 ng/ $\mu$ l RNA in 100  $\mu$ l

Negativ-Proben, jeweils 1 Leerwert für 8 Proben, bis zur Real-Time PCR mitgeführt, alle Housekeeping-Gene quantifiziert

RNA-Isolierung ohne Biopsie; RT ohne RNA; RT mit RNA, aber ohne Enzym

Aufgrund der in Abschnitt 5.1 dargestellten Daten zur Evaluation der Prä-PCR-Protokolle erfolgte für die in diese Studie eingeschlossenen Myokardbiopsien die RNA-Isolierung nach Protokoll 1 und Protokoll 2. Die RT wurde nach Basisprotokoll II mit einer RNA-Konzentration von 5 ng/ $\mu$ l durchgeführt (Protokoll 4). Um die methodischen Fehler weiter zu reduzieren, wurde die RT in einem Volumen von mindestens 100  $\mu$ l durchgeführt. Wurden von einer Myokardbiopsie mehrere Ansätze á 100  $\mu$ l revers transkribiert, wurden diese gepoolt. Schließlich wurde die cDNA in Aliquots von 20  $\mu$ l bei -20 °C gelagert.

Zur Kontrolle der Cross-Kontamination wurden Negativ-Proben bis zur Real-Time PCR mitgeführt. In allen Leerwerten wurden alle potentiellen Housekeeping-Gene quantifiziert. Für jeweils 8 Proben wurden folgende Leerwerte mitgeführt: RNA-Isolierung ohne Biopsie (ab dem Mörsern auf Stickstoff), RT ohne RNA und RT mit RNA, aber ohne Reverse Transkriptase.

##### **Protokoll 7: Evaluation der gesamten Prä-PCR**

Durchführung der gesamten prä-PCR, ausgehend von benachbarten Fragmenten eines explantierten Herzens, in 6fachem Ansatz

Quantifizierung von PBGD und 18S mittels Real-Time PCR

Anhand der in Protokoll 5 beschriebenen Variationen der RT konnte der Einfluss der RT auf mögliche genspezifische methodische Fehler untersucht werden. Um auch den Effekt der RNA-Isolierung miterfassen zu können, wurde zur Evaluation des gesamten Prä-PCR-Protokolls eine weitere Kontrolle durchgeführt.

Hierzu wurde in sechsfachem Ansatz aus benachbarten Fragmenten eines explantierten humanen Herzens nach Protokoll 2 RNA gewonnen und nach Protokoll 4 in einem Ansatz von 20  $\mu$ l revers transkribiert. Anschließend fand eine Quantifizierung von zwei der potentiellen Housekeeping-Genen statt, die das Panel der untersuchten Gene repräsentieren sollten: PBGD als Gen mit dem niedrigsten Expressionsniveau und 18S als Gen mit dem höchsten Expressionsniveau und als rRNA mit starken Sekundärstrukturen. Die Real-Time PCR wurde nach Protokoll 11 durchgeführt.

## 4.5 cDNA-QUANTIFIZIERUNG

### 4.5.1 Konzept des neuen Protokolls zur Quantifizierung einzelsträngiger cDNA

Zum Ausgleich globaler methodischer Fehler bei der Evaluation potentieller Housekeeping-Gene wurde ein Verfahren zur Quantifizierung einzelsträngiger cDNA (single-stranded cDNA, ss cDNA) auf Basis des Fluoreszenzfarbstoffes OliGreen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) entwickelt. Im Folgenden soll zunächst das Konzept des neuen Verfahrens erläutert werden. In Abschnitt 4.5.2 werden die Versuche zur Optimierung und Evaluation des Protokolls dargestellt, in Abschnitt 4.5.3 das endgültige Protokoll.

Wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben war hierbei zu beachten, dass das RT-Produkt neben der ss cDNA zahlreiche andere Bestandteile enthält: RNA und ihre Zerfallsprodukte, RNA-cDNA-Hybride, eventuell verunreinigende gDNA, Primer aus der RT, Nukleotide, Enzyme, Salze und organische Lösungsmittel. Der Fluoreszenzfarbstoff OliGreen ist zwar in Hinsicht auf den linearen Messbereich für einzelsträngige Nukleinsäuren optimiert, er reagiert jedoch auf doppelsträngige Nukleinsäuren um den Faktor 10 bis 20 stärker als auf einzelsträngige Nukleinsäuren. Desweiteren können vor allem Salze, organische Lösungsmittel und Proteine die Messergebnisse verfälschen (Rye 1993). Phenol und Chloroform sind Bestandteile des in dieser Arbeit verwendeten RNA-Isolierungsprotokolls und auch mit verschiedenen Salz- und Pufferlösungen sowie Enzymen wird im Rahmen der cDNA-Synthese gearbeitet. Es musste daher zunächst ein Protokoll entwickelt werden, mit dem möglichst reine ss cDNA möglichst verlustfrei und reproduzierbar aus dem RT-Produkt gewonnen werden kann.

Eine Kontamination der cDNA mit doppelsträngiger gDNA würde die Quantifizierung der cDNA mit OliGreen nahezu unmöglich machen. Daher wurde bei der Optimierung des Prä-PCR-Protokolls darauf geachtet, dass die gDNA-Freiheit der cDNA erreicht und kontrolliert werden kann (siehe Abschnitt 4.4 und 5.1).

Zur Entfernung der aus der RT verbliebenen RNA und der RNA-cDNA-Hybride mussten mehrere Schritte kombiniert werden. Hierbei ist zu beachten, dass RNA-cDNA-Hybride stabiler sind als einzelsträngige RNA, dass jedoch auch einzelsträngige RNA intra- oder intermolekulare Sekundärstrukturen bilden kann. Es erfolgte daher zunächst eine Denaturierung des RT-Produktes und anschließend ein Verdau mit Ribonuclease A (RNase A). Dieses Enzym spaltet selektiv einzelsträngige

RNA. Durch den vorgeschalteten Denaturierungsschritt sollten so also alle verbliebenen RNA-Moleküle abgebaut werden. Von einer Restaktivität des in der RT verwendeten RNase-Inhibitors RNaseOUT war hierbei nicht auszugehen, da am Ende des RT-Protokolls eine Enzymdeaktivierung stattfand. Um nach dem RNase-Verdau bis zur Aufreinigung der ss cDNA jedoch eine Kontamination des Labors mit RNase zu vermeiden, wurde eine Deaktivierung der RNase mittels RNaseOUT nachgeschaltet. Die Entfernung der nun in Oligonukleotide gespaltenen RNA erfolgte durch eine Reinigung des RT-Produkts mit Hilfe des Qiagen PCR Purification Kits. Dieses Kit basiert auf der selektiven Bindung von Nukleinsäuren an eine Kieselerdegel-Membran, die in vorgefertigten Säulchen integriert ist. Nukleinsäuren kürzer als 100 Basenpaare – und somit die abgebaute RNA des RT-Produkts – werden während eines Waschvorgangs verworfen, so dass die Nukleinsäuren in Wasser eluiert werden können. Bei diesem Vorgehen werden außerdem Proteine, organische Lösungsmittel und Salze entfernt, so dass am Ende dieses Prozesses eine aufgereinigte ss cDNA stehen konnte (Bonham 1996).

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes OliGreen können geringe Mengen Nukleinsäure mit Hilfe eines Spektrofluorometers bestimmt werden. Da ein solches Gerät in unserem Labor nicht vorhanden war, sollte als Alternative das ABI Prism Sequence Detection System 7700 (SDS 7700) verwendet werden, also dasjenige Gerät, in dem auch die Real-Time PCR durchgeführt wurde. Grundsätzlich stellt das SDS 7700 eine Kombination aus Thermocycler und Spektrofluorometer dar, jedoch sind die Volumina der Reaktionsgefäße um etwa den Faktor 10 kleiner als die handelsüblicher Spektrofluorometer (siehe Abschnitt 2.2.3). Außerdem ist die Streuung zwischen den einzelnen Reaktionsgefäßen einer 96-Well-Plate auf Ebene der Rohfluoreszenzspektren sehr hoch. Im Rahmen der Real-Time PCR findet daher eine interne Kalibrierung auf die passive Referenz ROX statt. ROX ist ein Gemisch aus verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen und Stabilisatoren, dessen genaue Zusammensetzung vom Hersteller nicht publiziert wird. Zur Anwendung von OliGreen im SDS 7700 wurde daher der Hauptbestandteil von ROX, 6-Carboxy-X-Rhodamin (RhoX6), als passive Referenz verwendet.

Als Bezugspunkt zur Erstellung einer Standardkurve diente ein kommerziell erworbener einzelsträngiger DNA-Plasmid mit einer Länge von 8.000 Basenpaaren (M13mp19, Gibco). In dieser Größenordnung liegen auch die Längen der meisten mRNAs und das gewählte RT-Protokoll ist nach Herstellerangaben dazu geeignet, cDNA dieser Länge zu synthetisieren.

#### 4.5.2 Optimierung und Evaluation des Protokolls

In Vorversuchen wurden die einzelnen Elemente des neuen Protokolls und das Gesamtprotokoll optimiert (Protokoll 8) und evaluiert (Protokoll 9). Die Ergebnisse dieser Evaluation sind in Abschnitt 5.2 dargestellt.

##### **Protokoll 8: Optimierung des Protokolls zur Quantifizierung von ss cDNA**

Überprüfung der Effizienz der RNase und der Fragmententfernung

Überprüfung der Recovery bei der Aufreinigung der ss cDNA

Wahl der Konzentrationen von OliGreen und RhoX6

Erstellung von Standardkurven mit dem 8kb-Standard M13mp19

Um die Effizienz der RNase und der Fragmententfernung zu überprüfen sowie die nötige Enzymkonzentration zu ermitteln, wurde humane RNA in einer Konzentration von 10 ng/μl (also in einer um den Faktor 2 höheren Konzentration als in der RT nach Protokoll 4) mit verschiedenen Konzentrationen RNase A (0,006 U/μl bis 0,8 U/μl) im dreifachen Ansatz verdaut. Nach Messung der RNA mit Hilfe von OliGreen nach dem unten beschriebenen Protokoll war ab einer RNase-Konzentration von 0,1 U/μl kein Signal mehr nachweisbar. Daher wurde für die weiteren Versuche sicherheitshalber eine Konzentration von 0,4 U/μl gewählt. In Hinsicht auf die Inkubationszeit wurde auf eine Versuchsreihe zur Ermittlung der kürzesten wirksamen Inkubationszeit verzichtet und konservativ eine Zeit von 2 Stunden gewählt. Die Konzentration des RNase-Inhibitors wurde gewählt, indem die nach Herstellerangaben empfohlene Konzentration für die verwendete Menge RNase verdoppelt wurde. Auch hier erfolgte die Wahl der Inkubationszeit konservativ unter Verzicht auf eine Optimierung.

Um zu überprüfen, welcher Anteil der Nukleinsäuren mit welcher Streuung bei der Reinigung mit Hilfe des PCR Purification Kits wiedergewonnen werden konnte (Recovery), wurde der verwendete 8kb-Standard M13mp19 in den Konzentrationen 2 ng/μl und 20 ng/μl im achtfachen Ansatz nach dem unten stehenden Protokoll gereinigt und mittels OliGreen quantifiziert.

Für OliGreen und RhoX6 wurden die Rohspektren in den SDS 7700 eingelesen. Die Konzentration von OliGreen im Protokoll entspricht den Herstellerangaben, die Konzentration von RhoX6 wurde so gewählt, dass die Fluoreszenz etwas über der von OliGreen liegt. RhoX6 ist instabil und verliert in einem Zeitraum von wenigen Stunden nach Auftauen und Verdünnen seine fluoreszierenden Eigenschaften. Daher stellt die im Vergleich zu OliGreen etwas zu hoch eingestellte Konzentration einen Sicherheitspuffer dar.

Anhand der mit dem 8kb-Standard M13mp19 erstellten Standardkurven konnte der lineare Messbereich bestimmt werden.

**Protokoll 9: Evaluation des Protokolls zur Quantifizierung von ss cDNA**

Intra-Assay-Variabilität der Messung am SDS 7700 im 3fach-Ansatz

Inter-Assay-Variabilität der Messung am SDS 7700 im 3fach-Ansatz

Variabilität der gesamten Methode im 8fach-Ansatz

Die intra-Assay-Variabilität der Quantifizierung mit OliGreen und dem SDS 7700 ohne die vorherige Aufreinigung der ss cDNA wurde sowohl in Vorversuchen als auch anhand der später gemessenen cDNAs als Variationskoeffizient von Dreifach-Messungen auf einer 96-Well-Plate bestimmt.

Die inter-Assay-Variabilität der Quantifizierung mit OliGreen ohne die vorherige Aufreinigung der ss cDNA wurde in Vorversuchen als Variationskoeffizient von dreimaligen Messungen derselben aufgereinigten cDNA auf drei verschiedenen 96-Well-Platen jeweils im dreifachen Ansatz bestimmt.

Die Variabilität der gesamten Quantifizierung einer ss cDNA inklusive des RNase-Verdau und der Aufreinigung wurde als Variationskoeffizient einer cDNA bestimmt, die im achtfachen Ansatz verdaut und gereinigt, sowie anschließend im jeweils dreifachen Ansatz mit OliGreen quantifiziert wurde.

### 4.5.3 Endgültiges Protokoll: Quantifizierung einzelsträngiger cDNA

Aufgrund der in den Abschnitten 4.5.2 und 5.2 dargestellten Vorversuche erfolgte die Quantifizierung der ss cDNA der in diese Arbeit eingeschlossenen Myokardbiopsien anhand von Protokoll 10.

#### Protokoll 10: Quantifizierung einzelsträngiger cDNA

DNase-Verdau der RNA noch vor der RT  
 RNase-Verdau der cDNA mit RNase A  
 Aufreinigung der ss cDNA mit dem PCR Purification Kit  
 Denaturierung zur Beseitigung eventueller Sekundärstrukturen  
 Messung nach Inkubation mit OliGreen am SDS 7700

Durch einen DNase-Verdau der RNA vor der RT und die Kontrolle durch die Quantifizierung von cMYC (siehe Abschnitt 4.4.1 und 4.4.2) konnte eine weitestgehende Freiheit der synthetisierten ss cDNA von gDNA erreicht werden. 50 µl des RT-Produktes wurden für die Quantifizierung der ss cDNA verwendet.

Zur Elimination verbleibender freier und in RNA-cDNA-Duplexen gebundener RNA erfolgte zunächst eine Denaturierung des RT-Produktes durch Inkubation bei 95 °C für 5 Minuten und rasche Abkühlung auf Eiswasser für weitere 5 Minuten. Es folgte der RNase-Verdau durch Zugabe von RNase A (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) in einer Endkonzentration von 0,4 U/µl und Inkubation bei 37 °C für 2 Stunden. Im Anschluss wurde die RNase durch Zugabe von RNaseOUT (Gibco, Endkonzentration 2,3 U/µl) und DTT (Gibco, 1,4 µM) sowie eine anschließende Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten deaktiviert.

Die Entfernung von gespaltener RNA sowie von Salzen, Proteinen, DTT und eventuell verbliebenen organischen Lösungsmitteln erfolgte mit Hilfe des PCR Purification Kits (Qiagen). Hierzu wurden 250 µl des salzhaltigen Puffers PB hinzugegeben und das Gemisch auf die vorgefertigten Säulen gegeben. Durch eine Zentrifugation (10.000g, 1 min, 20 °C) wurde die cDNA an die Kieselerde-Membranen gebunden. Eine Reinigung der gebundenen cDNA erfolgte durch Hinzugabe von 750 µl des Ethanol-haltigen Puffers PE und eine erneute Zentrifugation (10.000g, 1 min, 20 °C). Zur verbesserten Aufreinigung wurde dieser Schritt wiederholt. Eine weitere Zentrifugation (15.000g, 1 min, 20 °C) entfernte überschüssigen Puffer PE. Mit 50 µl hochreinem Wasser (LiChroSolv) wurde durch letztmaliges Zentrifugieren (10.000g, 1 min, 20 °C) die ss cDNA eluiert.

Um eventuelle cDNA-Sekundärstrukturen zu denaturieren, erfolgte eine Inkubation bei 95 °C für 5 Minuten und eine rasche Abkühlung auf Eiswasser.

In einem Gesamtvolumen von 100 µl fand nun im Dreifach-Ansatz die Quantifizierung der ss cDNA mittels OliGreen und dem SDS 7700 statt. Die Endkonzentration von OliGreen (Molecular Probes) wurde nach Herstellerempfehlungen eingestellt (eine absolute Konzentrationsangabe ist dem Produkt nicht zu entnehmen), RhoX6 (Molecular Probes) lag

in einer Endkonzentration von 2 ng/μl vor, die ss cDNA war 1:10 verdünnt und als Puffer diente nach Herstellerempfehlungen TE-Puffer (Endkonzentrationen: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5, Molecular Probes). Eine Standard-Kurve wurde gebildet, indem der 8kb-Standard M13mp19 (Gibco) im Zweifach-Ansatz in 7 Verdünnungsstufen zwischen 0,03 und 2 ng/μl gemessen wurde. Außerdem wurden pro 96-Well-Plate 2 Negativ-Kontrollen mitgeführt. Nach dem Pipettieren der Platte fand eine Inkubation im Dunklen für 5 Minuten bei Raumtemperatur statt.

Mit Hilfe der SDS Software wurden die Rohspektren der einzelnen Reaktionsgefäße aufgezeichnet und rechnerisch in die Bestandteile OliGreen und RhoX6 zerlegt. Aus diesen beiden Werten wurde zum Ausgleich der Well-to-Well Schwankungen ein Quotient gebildet. Aus den Quotienten der einzelnen Verdünnungsstufen des Standards wurde eine Standardkurve gebildet und die Rohwerte der zu messenden Proben wurden anhand dieser Kurve quantifiziert.

Anhand dieses Protokolls war es bei der Evaluation der potentiellen Housekeeping-Gene möglich, globale methodische Fehler auszugleichen, indem ein Quotient gebildet wurde aus der mittels Real-Time PCR gemessenen Genexpression und der mittels OliGreen ermittelten ss cDNA-Konzentration.

## 4.6 REAL-TIME PCR

### 4.6.1 Allgemeines Protokoll: Real-Time PCR

Die Real-Time PCR fand in verschiedenen Phasen dieser Studie Verwendung zur Quantifizierung von Nukleinsäuren: bei der Quantifizierung der cDNA bestimmter Gene im Rahmen der Optimierung der Prä-PCR (Abschnitt 4.4), zur Kontrolle auf Verunreinigungen der cDNA durch gDNA, wie sie im Rahmen der Quantifizierung der Gesamt-RNA mittels OliGreen (Abschnitt 4.5) notwendig war, und natürlich bei der Genexpressionsanalyse von potentiellen Housekeeping-Genen, natriuretischen Peptiden und angiogenetischen Wachstumsfaktoren (Abschnitt 4.6.3).

Das zugrunde liegende Protokoll war hierbei in allen Fällen identisch und wird im Folgenden als Protokoll 11 beschrieben. Bei den einzelnen Anwendungen unterscheidet sich lediglich die Aufteilung der 96-Well-Plates, das heißt, welche Proben an welchen Positionen auf welches Gen hin untersucht wurden, und ob dies in zwei-, drei-, oder achtfachem Ansatz geschah. Diese Angaben finden sich in den entsprechenden Abschnitten.

Das Protokoll basiert auf der Arbeit von Heid et al (Heid 1996) und wurde seitdem in meist unveränderter Form in zahlreichen Studien verwendet, die sich der Taqman-Sonden bedienen. Ein beispielhafter Auszug dieser Arbeiten ist Tabelle 4 in Abschnitt 4.2.1 zu entnehmen.

#### **Protokoll 11: Real-Time PCR, allgemeines Protokoll**

- Richtlinien zur Verhinderung von Cross-Kontaminationen
- Einheitliches Protokoll für alle untersuchten Gene
- Verwendung des Taqman Universal Mastermixes
- Primer und Sonden in für jedes Gen optimierten Konzentrationen
- Vorlegen der cDNA auf die 96-Well-Plates, Hinzugabe des Mastermixes
- Durchführung und Auswertung der PCR am SDS 7700

Aufgrund der Sensitivität der Methode wurden strenge Richtlinien eingehalten, um Cross-Kontaminationen auszuschließen. So wurden die verschiedenen Arbeitsschritte räumlich getrennt. Wie in Protokoll 1 beschrieben, fand die Isolierung der RNA und die RT in einem getrennten Raum und dort in einem nur hierfür vorgesehenen Abzug statt. Für alle PCR-Reaktionen auf einer 96-Well-Plate, die dieselbe Nukleinsäuresequenz quantifizieren sollten und damit dasselbe Set aus Primern und Sonde benötigten, wurde ein gemeinsamer Mastermix hergestellt, der alle Reagenzien für die PCR außer der cDNA enthielt. Dies fand wiederum in einem getrennten Raum statt, der nur für die Arbeit mit Primern und Sonden

reserviert war, jedoch nicht für die Arbeit mit DNA oder RNA. Hierdurch sollten Cross-Kontaminationen mit Template vermieden werden. Die Beschickung der 96-Well-Plates mit cDNA und Mastermix fand schließlich in einem dritten Raum statt. Neben dieser räumlichen Trennung galten allgemeine Hygienerichtlinien. Die Geräte und Materialien eines Raumes verblieben zu jeder Zeit im diesem Raum. Arbeitsflächen und Geräte wurden vor und nach jeder Anwendung mit 70%iger Ethanollösung gereinigt. Neben dem mechanischen Reinigungseffekt sollten hiermit auch eventuell vorhandene Fluoreszenzfarbstoffe entfernt werden. So stellen beispielsweise die Filzmarker, mit denen im allgemeinen Reaktionsgefäße markiert werden, Fluoreszenzfarbstoffe dar. Daher wurden solche Markierungen auf ein absolutes Minimum reduziert. Einweghandschuhe wurden getragen und gewechselt, wenn der Raum verlassen oder betreten wurde, vor und nach dem Reinigen der Arbeitsflächen, sowie jedes Mal, wenn nicht gereinigte Gegenstände berührt worden waren. Desweiteren wurden soweit möglich Einwegmaterialien verwendet.

Die Real-Time PCR selbst wurde für alle Gene nach dem gleichen, stark standardisierten Protokoll und unter einheitlichen Thermocycler-Bedingungen durchgeführt. Um diese Standardisierung zu ermöglichen, musste das Design der Primer und Sonden bestimmten Vorgaben folgen. Dies wird in Abschnitt 4.6.2 ebenso beschrieben wie die Optimierung der Primer- und Sondenkonzentrationen sowie die Evaluationsschritte, die für jedes Set aus Primern und Sonden durchgeführt wurden.

Zunächst erfolgte die Herstellung des Mastermixes, der alle Reagenzien für die PCR außer der cDNA enthielt. Dieser wurde in einem großen Reaktionsgefäß jeweils für alle Reaktionen einer Platte hergestellt, die dieselbe Sequenz nachweisen sollten. Hierdurch war davon auszugehen, dass die Konzentrationen der einzelnen Oligonukleotide und Farbstoffe in allen Reaktionen gleich war. Dies stellte eine wichtige Voraussetzung für die exakte Quantifizierung dar (siehe Abschnitt 2.3.2). In einem Volumen von 49  $\mu\text{l}$  pro Reaktion waren enthalten: 25  $\mu\text{l}$  Taqman Universal Mastermix (UMM, Applied Biosystems). Dieser enthielt in der endgültigen Verdünnung 300  $\mu\text{M}$  dATP, dCTP, dGTP, 600  $\mu\text{M}$  dUTP, ein Farbstoffgemisch namens ROX mit dem Hauptbestandteil 6-Carboxy-X-Rhodamin (siehe auch Abschnitt 4.5.1), 0,1 U/ $\mu\text{l}$  AmpliTaq-Gold, 0,01 U/ $\mu\text{l}$  AmpErase Uracill-N-Glycosylase (AmpErase UNG, siehe unten) sowie einen optimierten Puffer und optimierte Konzentrationen von Elektrolyten, die vom Hersteller nicht näher angegeben werden), Forward- und Reverse-Primer (Carl Roth) in Konzentrationen von jeweils 100, 300 oder 900 nM (siehe Tabelle 7), TAMRA-markierte Taqman-Sonde (Applied Biosystems) in Konzentrationen von 100, 150 oder 200 nM (siehe Tabelle 7) sowie hochreines Wasser (LiChroSolv) ad 49  $\mu\text{l}$ . In einigen Fällen wurden Predeveloped Assays (PDARs, Applied Biosystems) verwendet, also kommerziell erworbene vorgefertigte Lösungen, die von Applied Biosystems ausgewählte Primer und Sonden in optimierten Konzentrationen enthalten. Die Sequenzen werden vom Hersteller nicht angegeben.

Auf leere 96-Well-Plates (Applied Biosystems) wurde nun pro Well 1  $\mu\text{l}$  Template, also entweder cDNA, Standard oder als Leerwert hochreines Wasser (LiChroSolv, aus der gleichen Charge wie dasjenige Wasser, das für die RT verwendet wurde), vorgelegt. Für

einen Mehrfachansatz desselben Templates wurde dabei dieselbe Pipettenspitze für alle Wells verwendet, da Vorversuche gezeigt hatten, dass die Variabilität zwischen verschiedenen Einwegpipettenspitzen größer war als die durch an der Pipettenspitze verbleibende Reste von Template verursachte Variabilität. Anschließend wurde der Mastermix hinzugegeben und die 96-Well-Plates mit den dazugehörigen transparenten Deckeln verschlossen. Template und Mastermix wurden durch Vortexen vermischt und durch kurzes Zentrifugieren in den unteren Teil des jeweiligen Wells befördert.

Die Real-Time PCR wurde am ABI Prism Sequence Detection System 7700 (SDS 7700) von Applied Biosystems durchgeführt.

Den PCR-Zyklen vorgeschaltet war ein so genannter UNG (Uracil-N-Glykosylase)-Verdau (2 min bei 50 °C) sowie ein weiterer Schritt zum Aktivieren und Deaktivieren bestimmter Enzyme (10 min bei 95 °C). Der UNG-Verdau diente der Beseitigung eventueller PCR-Produkte alter Versuche, die in die Reaktion hätten gelangt sein können. Während der Taqman-PCR wurde neben dATP, dCTP und dGTP dUTP statt dTTP verwendet. Die PCR Produkte unterschieden sich dadurch von regelrechter DNA - und so auch von der verwendeten cDNA - durch das Vorhandensein der Base Uracil an Stelle der Base Thymin. Auf die PCR hatte dies keinen nennenswerten Einfluss. Es war nun aber dem Enzym AmpErase UNG möglich, selektiv kontaminierende Uracil-haltige PCR-Produkte zu verdauen. Die Thymin-haltige cDNA blieb davon unbeeinflusst. Im anschließenden Schritt wurde durch Erhitzen die AmpErase UNG deaktiviert. Gleichzeitig wurde die DNA-Polymerase AmpliTaq Gold aktiviert. Dies sorgte für einen gleichzeitigen Start in allen Reaktionsgefäßen.

Die PCR selbst bestand aus 45 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt (15 sec bei 95°C) und einem kombinierten Anlagerungs- und Verlängerungsschritt (1 min bei 60°C).

Die Steuerung des SDS 7700 und die Speicherung der Daten erfolgte über einen angeschlossenen Macintosh Computer mit Hilfe der Sequence Detection System Software 1.6.3, die auch den ersten Teil der Datenanalyse automatisch entsprechend der in Abschnitt 2.3.2 dargestellten Prinzipien durchführte. Für die weitere Auswertung wurde Microsoft Excel verwendet.

Gen	Accession Number		Sequenz	Optimierte Konzentration
PBGD	NM_00019	FP RP Sonde	CCC ACG CGA ATC ACT CTC AT TGT CTG GTA ACG GCA ATG CG VIC - CTG TTT TCT TCC GCC GTT GCA GC - TAMRA	300 nM 300 nM 150 nM
HPRT	NM_00019	FP RP Sonde	AGG AAA GCA AAG TCT GCA TTG TT GGT GGA GAT GAT CTC TCA ACT TTA A VIC - CCA GTG TCA ATT ATA TCT TCC ACA ATC AAG AC - TAMRA	300 nM 300 nM 200 nM
GUSB	NM_00018		PDAR: P/N 4310888E	
B2M	NM_00404		PDAR: P/N 4310886E	
ABL	NM_00515	FP RP Sonde	CAA CAC TGC TTC TGA TGG CAA CGG CCA CCG TTG AAT GAT VIC - CAA CAC CCT GGC CGA GTT GGT TCA T - TAMRA	300 nM 300 nM 200 nM
TNNI3	NT_00036	FP RP Sonde	AAC GGA GAT ACA GCA TAG AGA GAA GTA AAC TCC AGC GGC TGG CA VIC - CGG CAC AAG TCC TGC AGC TCC G - TAMRA	300 nM 300 nM 200 nM
RPLP0	NM_00100		PDAR: P/N 4310879E	
CASQ2	NM_00123	FP RP Sonde	TCC AGT TTG CTG CTG ATG ATC T GCG AGT TTG CAG CTG ATG TCT VIC - ACT GGG TCT TCA ATT AGA TCC AAG AGG AAC TCC AC - TAMRA	900 nM 900 nM 200 nM
GAPDH	NM_00204		PDAR: P/N 4310884E	
18S	M10098		PDAR: P/N 4310893E	
c-MYC	NT_00801	FP RP Sonde	GGT TTC ATC GTG TTG GCC A CAC ATC TAA GCC TGG TGC CC VIC - TCT CTC CTG ACC TCA CGA TCC GCC - TAMRA	300 nM 300 nM 150 nM
ANP	M30262	FP RP Sonde	CGA CCT CAT CTT CTA AAG GCA TCT CAT GTA CAA TGC CGT GTC CAA FAM - ATG GTC CAG CAA ATT CTT GAA ATC CAT CAG - TAMRA	300 nM 300 nM 200 nM
BNP	M31776	FP RP Sonde	CAC CTGCAG CTC CGA CAG T GTT CAG CCT CGG ACT TGG AA FAM - TTG CGC TGC TCC TGT AAC CCG G - TAMRA	300 nM 300 nM 200 nM
HIF1A	NM_00153	FP RP Sonde	CTA ACT AGC CGA GGA AGA ACT ATG AAC GGT TGG TTA CTG TTG GTA TCA TAT ACG T FAM - CTG CAA CAT GGA AGG TAT TGC ACT GCA C - TAMRA	300 nM 300 nM 200 nM
total VEGF	NM_00337	FP RP Sonde	ACG AGG GCC TGG AGT GTG T ACA TTT GTT GTG CTG TAG GAA GCT FAM - AAC ATC ACC ATG CAG ATT ATG CGG ATC AA - TAMRA	300 nM 300 nM 200 nM
VEGF-121	NM_00337	FP RP Sonde	AGA GAT CTG GTT CCC GAA ACC CAA CAA ATG TGA ATG CAG ACC AA FAM - CTC GGC TTG TCA CAT TTT TCT TGT CTT GCT - TAMRA	300 nM 300 nM 200 nM
VEGF-165	NM_00337	FP RP Sonde	TGT GAA TGC AGA CCA AAG AAA GAT TTG CAA CGC GAG TGT GTG TT FAM - AGC AAG ACA AGA AAA TCC CTG TGG GCC T - TAMRA	300 nM 300 nM 200 nM
VEGF-189	NM_00337	FP RP Sonde	GCG CAA GAA ATC CCG GTA TA TGCAACGCGAGTGTGTGTT FAM - CCT GGA GCG TTC CCT GTG GGC - TAMRA	300 nM 300 nM 200 nM
VEGF-R1	NM_00201	FP RP Sonde	GCA AAG CCA CCA ACC AGA AG AAG AGA GTC GCA GCC ACA CA FAM - ACC TCA CTG TTC AAG GAA CCT CGG ACA AGT - TAMRA	300 nM 300 nM 200 nM
VEGF-R2	NM_00225	FP RP Sonde	TCT CCA GGT TTC CTG TGA TCG T GCT CAA GAC AGG AAG ACC AAG AA FAM - GTG CCA CAC GCT CTA GGA CTG TGA GCT - TAMRA	300 nM 300 nM 200 nM

**Tabelle 7: Die verwendeten Primer und Sonden**

Dargestellt sind die Zugriffsnummern zu den Datenbankeinträgen (Accession Numbers) der Genbank des National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), die Primer und Sonden mit den optimierten Konzentrationen bzw. die Bestellnummern der verwendeten Predeveloped Assays.

#### 4.6.2 Optimierung und Evaluation der Real-Time PCR für die untersuchten Gene

Um die Real-Time PCR nach dem oben beschriebenen stark standardisierten Protokoll durchführen zu können, mussten bei der Etablierung einer Real-Time PCR für ein neues Amplikon bestimmte Vorgaben hinsichtlich des Designs der Primer und Sonden sowie der Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentrationen erfüllt werden (Protokoll 12). Desweiteren wurden verschiedene Kontrollversuche zur Evaluation der neu etablierten Real-Time PCRs angeschlossen (Protokoll 13, Protokoll 14, Protokoll 15, Protokoll 16, Protokoll 17, Protokoll 18 und Protokoll 19). Für GAPDH, 18S, RPLP0, B2M und GUSB wurden Predeveloped Assays verwendet. Die Etablierung fiel somit weg, nicht jedoch die Kontrollversuche zur Evaluation.

##### **Protokoll 12: Design der Primer und Sonden**

Mit Hilfe des Programms Primer Express

Einheitliche Vorgaben, um ein einheitliches PCR-Protokoll zu ermöglichen, u.a.:

Schmelztemperatur der Primer: 58-60 °C

Schmelztemperatur der Sonden: 68-70 °C

Das Design von Primern und Sonden erfolgte mit Hilfe des Programms Primer Express 1.6 von Applied Biosystems nach etablierten Richtlinien (Livak 1995, Oehlmann 1999).

Die wichtigste Richtlinie stellte die Vorgabe der Schmelztemperaturen für die Primer (58-60 °C) und für die Sonden (68-70 °C) dar (unter Schmelztemperatur ( $T_m$ ) wird diejenige Temperatur verstanden, bei der 50% einer doppelsträngigen DNA als Einzelstrang vorliegen; bei niedrigeren Temperaturen liegt ein Großteil der DNA als Doppelstrang vor, bei höheren als Einzelstrang; die  $T_m$  eines Primers oder einer Sonde stellt also ein Maß für die Stabilität der Hybridisierung an das Template dar). Im Unterschied zur konventionellen PCR wird bei der Real-Time PCR ein kombinierter Anlagerungs- und Verlängerungsschritt bei 60 °C durchgeführt. Durch die Wahl der  $T_m$  von 58-60 °C für die Primer ist die Stabilität des Primer-Template-Hybridides somit zwar relativ gering, die Spezifität ist jedoch höher als dies bei einer Anlagerungstemperatur unter der  $T_m$  der Primer der Fall wäre (Newton 1997). Im Falle der Sonde führt die relativ hohe  $T_m$  zu einer sehr stabilen Hybridisierung der Sonde an das Template. Diese ist für die effiziente Hydrolyse der Sonde wichtig.

Mit Hilfe der Programms wurde zunächst die Sonde entworfen. Wie in Abschnitt 2.2.3 dargestellt, wurde eine Spezifität für mRNA- bzw. cDNA-Sequenzen gegenüber gDNA-Sequenzen dadurch erreicht, dass die Sonde symmetrisch über die Grenze zweier Exons, also Intron-überspannend, platziert wurde. Das Programm errechnete die  $T_m$ -Werte verschiedener möglicher Sonden, aus denen dann eine geeignete ausgewählt werden

konnte. Weitere Vorgaben waren: möglichst kurze Sequenz der Sonde (maximal 30 Basen), kein Guanin am 5' Ende (dies hätte zu einem Autoquenching des Reporters durch Guanin führen können), Vermeidung von Guanin-Triplets oder vier oder mehr identische aufeinander folgende Basen A, T oder C (diese hätten zu einer zu starken Stabilisierung unspezifischer Hybridisierungen führen können), Anteil der Basen Cytosin und Guanin an der Sondensequenz zwischen 30% und 80%. Enthielt die potentielle Sonde mehr Guanin als Cytosin, so wurde die Sequenz des Gegenstranges verwendet (Livak 1995, Oehlmann 1999).

Es folgte die Auswahl der Primer. Das Programm schlug eine Vielzahl möglicher Primerpaare vor. Die Auswahl erfolgte nach folgenden Kriterien: T<sub>m</sub> der Primer zwischen 58°C und 60°C, Länge der Primer mindestens 18 Basen, Entfernung des Upstream-Primers von der Sonde maximal 50 Basen (um zu garantieren, dass dasselbe Molekül DNA-Polymerase, welches mit der Synthese des neuen Stranges beginnt, die Sonde erreicht und diese sicher hydrolysiert; bei größerem Abstand würde die Wahrscheinlichkeit ansteigen, dass die Polymerase die Synthese unterbricht; die weitere Synthese des Stranges durch ein zweites Molekül der Polymerase wäre zwar wahrscheinlich, die Effizienz der Hydrolyse der Sonde würde durch diesen Wechsel jedoch eingeschränkt), höchstens 3 C oder G am 3'-Ende des Primers (C-G Hybridisierungen sind aufgrund der drei Wasserstoffbrücken stabiler als A-T Hybridisierungen, ein zu hoher C/G-Anteil am 3'-Ende könnte daher zu relativ stabilen unspezifischen Hybridierungen auch an nur teilweise homologen Sequenzen führen), Vermeidung von Guanin-Triplets oder vier oder mehr identische aufeinander folgende Basen A, T oder C, Anteil der Basen Cytosin und Guanin an der Sondensequenz zwischen 30% und 80%. Insgesamt sollte das Amplikon möglichst kurz sein, um eine hohe PCR-Effizienz zu gewährleisten. Es konnten in allen Fällen Gesamtlängen unter 150 Basen realisiert werden. Die so ausgewählten Primer und Sonden wurden anschließend auf ihre intra- und intermolekularen Sekundärstrukturen hin untersucht. Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Vorgaben waren hierbei jedoch gewisse Sekundärstrukturen durchaus tolerabel (eine Amplifikation von Primer-Dimeren sorgt im Gegensatz zum SYBR-Green Assay nicht für einen Signalanstieg (siehe Abschnitt 2.2.3) und die Ausbildung einer mäßigen intramolekularen Sekundärstruktur der Sonde ist sogar vorteilhaft, da so der Abstand zwischen Reporter- und Quencherfarbstoff geringer wird und der FET ansteigt). Vermieden wurden, vor allem in Hinblick auf Primer-Dimere, komplementäre Sequenzen von mehr als vier aufeinander folgenden Basen Länge oder von mehreren komplementären Sequenzen von drei oder zwei aufeinander folgenden Basen Länge.

### Protokoll 13: Konventionelle PCR mit den Primern der Real-Time PCR

Konventionelle PCR mit Gelelektrophorese nach allgemeinen Empfehlungen

Mit den so entworfenen Primern wurden zunächst konventionelle PCRs mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt, um zu prüfen, ob sich als Zeichen einer ungewollten Amplifikation außer der erwarteten noch weitere Banden zeigen würden. Das Protokoll basiert auf allgemeinen Empfehlungen (Strachan 1999, Newton 1997) und Erfahrungen in unserem Labor. Auf eine darüber hinausgehende Optimierung der PCR-Bedingungen für jedes einzelne Amplikon wurde aufgrund der guten Ergebnisse dieser Kontrollversuche (siehe Abschnitt 5.3) verzichtet.

Die Reaktionen wurden im Dreifachansatz durchgeführt und enthielten in 50 µl: Forward-Primer 200 nM, Reverse Primer 200 nM, dNTPs 800 µM (Böhringer, Mannheim, Deutschland), AmpliTaq-Gold 0,05 U/µl (Gibco), PCR-Puffer 1fach (Gibco), 2 µl der Kalibrator-cDNA (siehe Abschnitt 4.6.3) sowie hochreines Wasser (LiChroSolv, Merck Life Science & Analytics) ad 50 µl. Der PCR vorgeschaltet war eine Aktivierung der AmpliTaq-Gold (10 min bei 95°C), es folgten 35 Zyklen: 30 sec bei 95°C, 60 sec bei 55°C, 90 sec (+ 3 sec pro Zyklus) bei 72°C. Anschließend wurden 5 µl des PCR-Produktes in eine Gelelektrophorese mit einem 1,5%igen Agarosegel (60V für 1,5 Stunden) und anschließender EtBr-Färbung eingebracht (Sambrook 2001).

Zur Bestimmung der optimalen Konzentrationen von Primern und Sonde wurden für jedes Amplikon zwei Versuche durchgeführt, in denen jeweils drei Konzentrationen für jedes Oligonukleotid getestet wurden. Diese Versuche werden als Primer- und Sondenmatrix bezeichnet (Schild 1999, siehe Protokoll 14 und Protokoll 15).

### Protokoll 14: Primermatrix

Forward- und Reverse-Primer in den Konzentrationen 100, 300 und 900 nM

Gemäß Protokoll 11 wurden im Dreifachansatz Real-Time PCRs in neun verschiedenen Ansätzen durchgeführt, um so alle Kombinationen der drei möglichen Konzentrationsstufen der Forward- und Reverse-Primer (100, 300 oder 900 nM) zu testen. Die Sonde wurde in einer Konzentration von 200 nM verwendet. Als Template diente hierbei 1 µl der Kalibrator-cDNA (siehe Abschnitt 4.6.3). Aus den neun Kombinationen von Primerkonzentrationen wurde diejenige ausgewählt, deren Ct-Wert minimal war, deren PCR-Effizienz also möglichst nahe am Optimum lag. In der Regel lieferten mehrere Konzentrationskombinationen denselben minimalen Ct-Wert, hier wurde dann diejenige bevorzugt, bei der der Materialaufwand am geringsten war.

**Protokoll 15: Sondenmatrix**

Sonden in den Konzentrationen 100, 150 und 200 nM

Nach Ermittlung der optimalen Primerkonzentrationen wurden nun ebenfalls nach Protokoll 11 im Dreifachansatz Real-Time PCRs in drei verschiedenen Ansätzen durchgeführt, um die drei möglichen Konzentrationsstufen der Sonde (100, 150 oder 200 nM) zu testen. Die Primer wurden dabei in den zuvor ermittelten optimalen Konzentrationen verwendet. Als Template diente wiederum 1  $\mu$ l der Kalibrator-cDNA. Ausgewählt wurde diejenige Konzentration, die den niedrigsten Ct-Wert bei höchstem Signal in der Plateauphase lieferte. Traf dies bei mehreren Konzentrationen zu, wurde die geringste bevorzugt.

Mit der Bestimmung der optimalen Primer- und Sondenkonzentrationen war die Etablierung der Primer und Sonden abgeschlossen. Es folgten zahlreiche Versuche zur Evaluation der neuen Real-Time PCRs. Diese Versuche wurden auch für diejenigen Amplikons durchgeführt, für die Predeveloped Assays verwendet wurden.

**Protokoll 16: Bestimmung der PCR-Effizienz anhand einer cDNA-Verdünnungsreihe**

Kalibrator-cDNA als Template

7stufige 1:2 Verdünnungsreihe im 2fach-Ansatz

Zunächst wurde anhand einer Verdünnungsreihe die PCR-Effizienz des Primer-Sonden-Sets bestimmt. Auch hier diente als Template die Kalibrator-cDNA, die aus einer klinischen Myokardprobe gewonnen worden war (siehe Abschnitt 4.6.3). Dadurch glichen die Versuchsbedingungen denen der späteren Versuche und es konnten so auch eventuelle Hemmstoffe der PCR, die aus der Probe in die cDNA hätten gelangt sein könnten, erfasst werden.

Es wurde eine siebenstufige Verdünnungsreihe hergestellt, wobei die Kalibrator-cDNA von einer Stufe zur nächsten im Verhältnis 1:2 verdünnt wurde. Die einzelnen Stufen wurden im Zweifachansatz in die Real-Time PCR eingebracht. Außerdem wurden zwei Wells als Non Template Control (NTC) mit hochreinem Wasser beschickt. Zur Herstellung des Mastermixes nach dem allgemeinen Taqman-Protokoll (Protokoll 11) wurden die zuvor ermittelten optimalen Primer- und Sondenkonzentrationen verwendet. Die Ct-Werte wurden gegen den dekadischen Logarithmus der Verdünnungsstufen aufgetragen und eine lineare Regressionsgerade bestimmt. Abbildung 13 (Abschnitt 2.3.2) zeigt beispielhaft eine solche Darstellung. Aus der Steigung dieser Geraden wurde mit Hilfe der Formel 7 (Abschnitt 2.3.2) die PCR-Effizienz errechnet.

Die Intra- und Inter-Assay-Variabilität der Housekeeping-Gene konnte methodisch genau geschätzt werden, da für diese Gene eine absolute Quantifizierung stattfand (siehe Abschnitt 4.6.4). Da für die Zielgene direkt mittels der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode relativ

quantifiziert wurde, konnten die Intra- und Inter-Assay-Variabilität hier nicht in gleicher Weise ermittelt werden.

#### **Protokoll 17: Bestimmung der Intra- und Inter-Assay-Variabilität der Real-Time PCR**

Kalibrator-cDNA im 8fach-Ansatz auf den regulären 96-Well-Plates

Zur Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität wurde die Kalibrator-cDNA auf 96-Well-Plates, auf denen auch klinische Proben gemessen wurden, in achtfachen statt in dreifachem Ansatz bestimmt und über die Plasmid-Standardkurven quantifiziert. Der Variationskoeffizient dieser Achtfachmessung diente als Schätzwert für die Intra-Assay-Variabilität.

Diese Achtfachmessung der Kalibrator-cDNA fand für jedes potentielle Housekeeping-Gen auf drei verschiedenen Platten statt. Der Variationskoeffizienten der Mittelwerte dieser drei Messungen diente als Schätzmaß für die Inter-Assay-Variabilität.

Wie in Abschnitt 2.2.3 dargestellt resultiert die Verwendung von Intron-überspannenden Taqman-Sonden in einer hohen Spezifität für mRNA- bzw. cDNA-Sequenzen gegenüber gDNA-Sequenzen. Um diese theoretische Überlegung zu verifizieren, wurden für jede Real-Time PCR ein Versuch zur Kontrolle der Spezifität durchgeführt (Protokoll 18).

#### **Protokoll 18: Überprüfung der Spezifität der Real-Time PCR auf cDNA-Sequenzen**

Real-Time PCR für jedes Gen mit cDNA, gDNA, RNA und Wasser

In Anlehnung an Protokoll 11 wurden im Dreifachansatz für jedes Amplikon Real-Time PCRs mit je vier verschiedenen Templates durchgeführt: mit Kalibrator-cDNA (5ng pro Reaktion, als Positiv-Kontrolle), mit hochreinem Wasser (NTC, Negativ-Kontrolle), mit einer humanen gDNA, die zuvor mit Hilfe des DNeasy-Kits (Qiagen) aus Leukozyten des Doktoranden isoliert worden war (100 ng pro Reaktion) sowie mit einer myokardialen RNA-Probe, die vom Herstellungs-Prozess der Kalibrator-cDNA abgezweigt worden war (100 ng pro Reaktion). Für das gDNA-Template wurde dabei (zumindest für die Messung von nicht Intron-losen Genen) natürlich kein Signal erwartet. Wenn das gDNA-Template ein Signal ungleich null lieferte, sollte als Schätzmaß für die Verfälschung der Messergebnisse für cDNA durch gDNA der Quotient

$$\frac{\text{Signal}(cDNA)}{\text{Signal}(gDNA)} = 2^{Ct(gDNA) - Ct(cDNA)}$$

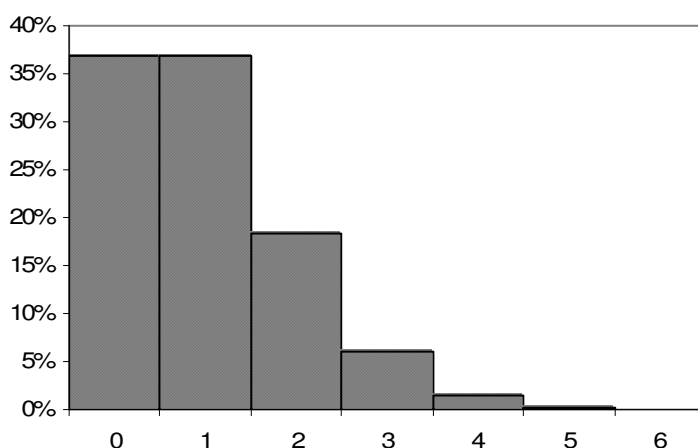
dienen (siehe auch Abschnitt 2.3.2). Das RNA-Template stellte eine redundante Kontrolle dar. Ein Signal war nur zu erwarten, wenn trotz der in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Vorkehrungen eine relevante Menge gDNA in die cDNA hätte gelangen können, und wenn gleichzeitig die Real-Time PCR ein Signal für diese gDNA hätte liefern können.

Die Sensitivität der Real-Time PCR wurde im Rahmen einer Kooperation unserer Abteilung mit der pädiatrischen Onkologie überprüft. Im Rahmen der Diagnostik der Minimal Residual Disease ging es um die Frage, ob eine Real-Time PCR für Detektion eines Rearrangements des MLL-Gens besser geeignet wäre als eine Nested PCR (Rawer 2003).

Grundlegend muss beachtet werden, dass bei der Detektion einer sehr geringen Anzahl Moleküle, egal mit welcher Methode, stochastische Effekte an Bedeutung gewinnen. Da RNA-Moleküle diskrete Einheiten darstellen, wird die Streuung der tatsächlichen Werte einer Stichprobe durch eine spezielle binomische Verteilung, die Poisson'sche Verteilung, beschrieben (Siméon Denis Poisson, 1781–1840). Wenn beispielsweise für eine PCR-Reaktion in einem Reaktionsgefäß erwartet wird, dass 1 RNA-Molekül vorhanden ist, so wird in diesem Gefäß mit 36,8%iger Wahrscheinlichkeit kein Molekül vorhanden sein, mit 36,8%iger Wahrscheinlichkeit 1 Molekül, mit 18,4%iger Wahrscheinlichkeit 2 Moleküle und so weiter (siehe Abbildung 17). Betont sei hierbei, dass diese Streuung nicht etwa den Messfehler irgendeiner Methode widerspiegelt, sondern die Verteilung von tatsächlich vorhandenen Molekülen in einer Stichprobe bei niedrigen erwarteten Werten.

Allgemein ist die Wahrscheinlichkeit  $P$ , dass eine Stichprobe von  $n=1$  aus einer Grundgesamtheit mit dem Erwartungswert  $\lambda$  eine Anzahl von  $x=1, 2, 3$  usw. Molekülen enthält, gegeben durch:

$$P(x) = e^{-\lambda} \cdot \frac{\lambda^x}{x!}$$



**Abbildung 17: Beispiel einer Poisson'schen Verteilung**

Dargestellt ist die Wahrscheinlichkeitsverteilung der tatsächlich vorhandenen Moleküle für einen erwarteten Wert ( $\lambda$ ) von 1.

Aufgrund dieser Überlegungen kamen wir zu dem Schluss, dass eine Methode, die zum einen eine optimale Sensitivität (mit dem Wert 1), zum anderen eine optimale Präzision aufweisen würde, genau die Poisson'sche Verteilung nachvollziehen müsste. Wir stellten die Hypothese auf, dass die Real-Time PCR eine extrem sensitive und gleichzeitig präzise Methode darstellt und diesem Ideal hinreichend nahe kommt. Die Überprüfung dieser Hypothese erfolgte anhand von Protokoll 19 (Rawer 2003).

#### **Protokoll 19: Überprüfung der Sensitivität und Präzision der Real-Time PCR**

Die Poisson'sche Verteilung gibt vor, mit welchen Wahrscheinlichkeiten 0, 1, 2, 3, usw. Moleküle in einer Stichprobe mit einem sehr niedrigen Erwartungswert *tatsächlich vorhanden sind*

Hypothese: Die Real-Time PCR ist so sensitiv (und präzise), dass sie für niedrige Konzentrationen Werte *messen* kann, die die Vorgaben der Poisson'schen Verteilung nachvollziehen

Anders ausgedrückt: Eine optimal sensitive Methode *misst*, was nach Poisson *vorhanden* ist. Die Hypothese lautet, dass die Real-Time PCR dieses Ziel erreicht

Als Template diente ein Plasmid, das analog Protokoll 20, Abschnitt 4.6.2, synthetisiert wurde, jedoch ein 2000 Basenpaare langes Insert einer genomischen DNA mit einem Rearrangement des MLL-Genes enthielt. Die Primer und Sonden für die Real-Time PCR wurden durch unsere onkologischen Kollegen etabliert. Die Sequenzen waren: atgaattgaacaactaggtgagcct (Forward Primer), attctcctgggccacctt (Reverse Primer) und tagtccgtgtctgggcaggacctgg (Sonde). Der Plasmid-Standard wurde nun in einem großen Volumen von 1 ml in 50 mg/ml E. coli t-RNA (Roche, Mannheim, Deutschland, siehe hierzu auch Abschnitt 4.6.3) verdünnt, um Konzentrationen vom 1, 2, 4, usw. bis 256 Kopien/ $\mu$ l zu erhalten. Jeweils 1  $\mu$ l dieser neun Verdünnungsstufen sowie von hochreinem Wasser als Leerwert wurden jeweils im achtfachen Ansatz mittels Real-Time PCR in Anlehnung an Protokoll 11 gemessen. Die höchsten fünf Verdünnungsstufen wurden als Standardkurve verwendet, die Stufen 1, 2, 4 und 8 Kopien/ $\mu$ l (entsprechend Kopien/Reaktion) wurden anhand dieser Standardkurve absolut quantifiziert und auf ihre Verteilung hin untersucht.

### 4.6.3 Synthese der Plasmid-Standards und des Kalibrators

Wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, war es im Rahmen der Evaluation der potentiellen Housekeeping-Gene nötig, deren Expression zunächst absolut zu quantifizieren, und sie dann im zweiten Schritt auf die Menge der Gesamt-RNA zu beziehen, um so globale methodische Fehler in der Prä-PCR auszugleichen. Für eine solche Quantifizierung wurde ein externer Standard benötigt, der die Zielsequenz enthalten und eine bekannte Kopienzahl aufweisen musste.

Die Herstellung dieses Standards für die potentiellen Housekeeping-Gene erfolgte durch Einbringen der Amplikon-Sequenz in ein Plasmid und in vivo Amplifikation in *E. coli* (Protokoll 20). Alternativ hätte beispielsweise auch ein einfaches PCR-Produkt verwendet werden können, das mit den Primern der Real-Time PCR hätte hergestellt werden können. Gegenüber diesem Vorgehen bietet die in vivo Amplifikation jedoch zwei Vorteile. Zum einen sind Plasmide auch bei längerer Lagerung stabiler. Zum anderen werden die komplexen Proofreading-Fähigkeiten einer lebenden Zelle genutzt, d.h. die Fähigkeit zur Korrektur von Fehlern, die bei der Amplifikation entstehen. In der PCR fehlt diese Kontrolle, deswegen weist ein hoher Anteil der PCR-Produkte von der Ursprungssequenz abweichende einzelne Basen auf. Da die Real-Time PCR bereits auf solche geringen Abweichungen reagiert, können fehlerhafte Kopien eines Standards das Ergebnis verfälschen (Strachan 1999, Smith 2002).

#### Protokoll 20: Synthese der Plasmid-Standards

In vitro-Amplifikation durch PCR

In vivo-Amplifikation durch T-A-Cloning in *E. coli*

Sequenzierung mehrerer synthetisierter Plasmide pro Gen, Auswahl eines fehlerfreien Plasmids

Verdünnung und Konzentrationskontrolle mittels PicoGreen (analog OliGreen)

Für jedes Amplikon wurde zunächst eine konventionelle PCR mit anschließender Kontrolle durch eine Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Protokoll 13). Hierbei wurden dieselben Primer verwendet wie in der Real-Time PCR. Als Template diente Kalibrator-cDNA (siehe Protokoll 21).

Mit Hilfe des so genannten T-A-Clonings konnte nun das PCR-Produkt in ein Plasmid eingefügt werden. Dieses Vorgehen macht sich zu Nutze, dass PCR-Produkte an ihren 3' Enden häufig ein überhängendes Adenosin aufweisen, wodurch es möglich wird, sie in ein Plasmid einzufügen, dessen zirkuläre Struktur aufgebrochen ist, und dessen 3' Enden jeweils einen Thymidin-Überhang aufweisen (Strachan 1999). Es wurden das TOPO TA Cloning Kit und TOP 10F *E. coli* (beide Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) entsprechend den

Empfehlungen des Herstellers verwendet. Nach Transformation des Plasmids in die *E. coli* und Anzucht auf einer Agar-Platte wurden jeweils fünf IPTG/X-Gal-markierte Kolonien pro Klonierungs-Ansatz selektiert und für einen Tag weiter gezüchtet. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des PeqLab Miniprep Kits I (PeqLab, Erlangen). Die Plasmide wurden mit dem Enzym Not I (Gibco) linearisiert (Inkubation für 3h bei 37°C, Konzentrationen und Puffer nach Herstellerangaben) und mittels der alkalischen Phosphatase CIP (ebenfalls Gibco) dephosphoryliert (1h bei 37°C). Es folgte eine erneute Aufreinigung mit Hilfe des PCR Purification Kits (Qiagen) und die anschließende spektralphotometrische Quantifizierung. Pro Amplikon wurden so fünf verschiedene Klonierungen durchgeführt. Diese wurden anschließend mit Hilfe des BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits am ABI Prism 310 Genetic Analyzer (beide Applied Biosystems) nach Herstellerangaben sequenziert. Das Ergebnis wurde mit den Referenzsequenzen der Genbank verglichen. Pro Amplikon wurde ein Klon ausgewählt, der keine Fehler in der Basensequenz enthielt, wie sie durch den oben beschriebenen Effekt bei der primären Amplifikation mittels PCR hätten entstehen können. Die so ausgewählten Plasmide wurden in einer Real-Time PCR getestet. Anschließend wurden die Plasmide bis in eine Größenordnung von 0,1 bis 1 ng/µl verdünnt und mit Hilfe von PicoGreen (Molekular Probes) anhand eines Protokoll 10 (Abschnitt 4.5.3) analogen Protokolls erneut quantifiziert. Anhand der Länge der Plasmide, des mittleren Gewichts pro Nukleotid (Strachan 1999) und der mittels PicoGreen bestimmten Konzentration (in Gewicht/Volumen) konnte nun die Konzentration des Plasmid-Standards in Kopien/Volumen errechnet werden.

Bei der weiteren Verdünnung der Standards war folgendes zu beachten: Nukleinsäuren können sich in geringem Maße an die Wände der Plastikgefäße, wie sie in molekulargenetischen Laboren üblicherweise verwendet werden, anlagern und werden so der Lösung entzogen. Bei heterogenen Nukleinsäuregemischen wie einer cDNA oder einer gDNA führt dies kaum zur Beeinträchtigung der Quantifizierung einer bestimmten Nukleinsäuresequenz, da insgesamt sehr viele Nukleinsäuren vorliegen und die Bindungsplätze an der Gefäßwand schnell besetzt sind. Im Falle der Plasmid-Standards liegt jedoch nur eine Spezies Nukleinsäure vor. Diese muss extrem stark verdünnt werden, um eine Kopienzahl für diese Sequenz zu erreichen, wie sie in cDNAs üblich ist, denn nur so kann eine sinnvolle Standard-Kurve generiert werden. In diesem Fall werden die Bindungsplätze daher nicht durch andere Nukleinsäuren besetzt, es werden also proportional deutlich mehr Zielmoleküle der Lösung entzogen. Dieses Problem kann umgangen werden, indem die Plasmide in anderen Nukleinsäuren verdünnt werden, die die Messung der Zielsequenzen nicht stören (M. Wilda, persönliche Mitteilung). Die Plasmid-Standards wurden daher in 50 mg/ml *E. coli* t-RNA (Roche) weiterverdünnt und in verschiedenen Konzentrationen bei -80°C gelagert.

Neben den Plasmid-Standardkurven für die absolute Quantifizierung wurde ein Kalibrator als Bezugspunkt für die relative Quantifizierung mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode benötigt (siehe Abschnitt 2.3.2). Diese Methode sollte ja nach Abschluss der

Evaluation der Housekeeping-Gene angewandt werden, um die natriuretischen Peptide und die angiogenetischen Wachstumsfaktoren zu quantifizieren. Beim Kalibrator handelt es grundsätzlich um eine beliebige Lösung mit konstanter Startkopienzahl aller untersuchter Gene.

**Protokoll 21: Synthese der Kalibrator-cDNA**

Pool, gewonnen aus 5 Proben des Patientenkollektivs

Bei dieser Studie wurde der Kalibrator als großer Pool verschiedener cDNAs generiert. Hierzu wurden Fragmente von fünf besonders großen Myokardbiopsien des Patientenkollektivs verwendet. Anhand von Protokoll 6 wurde RNA isoliert und revers transkribiert. Die gewonnene cDNA aller fünf Biopsien wurde in einem großen Gefäß gepoolt und anschließend in Aliquots von 20 µl bei -20°C gelagert.

#### 4.6.4 Endgültiges Protokoll: Real-Time PCR der klinischen Proben

##### Protokoll 22: Real-Time PCR der klinischen Proben

Alle Studienproben im 3fach-Ansatz  
 Leerwerte auf jeder Platte im 3fach-Ansatz  
 Kalibrator-cDNA für jedes Gen auf jeder Platte im 8fach- (Housekeeping-Gene) bzw. 3fach-Ansatz (Zielgene)  
 Für Housekeeping-Gene absolute Quantifizierung mittels einer 11stufigen 1:2 Verdünnungsreihe des entsprechenden Plasmids im 2fach-Ansatz  
 Relative Quantifizierung der Zielgene über die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Die Real-Time PCR für alle untersuchten Gene fand nach Protokoll 11 statt. Alle Studienproben wurden im Dreifachansatz bestimmt.

Auf jeder 96-Well-Plate wurden für jedes untersuchte Gen sowohl ein Leerwert (Non Template Control, NTC) als auch die Kalibrator-cDNA im Dreifachansatz mitbestimmt (im Falle der Housekeeping-Gene wurde die Kalibrator-cDNA im Achtfachansatz bestimmt, um die Intra- und Inter-Assay-Variabilität zu bestimmen, siehe Abschnitt 4.6.2). Der Kalibrator diente im zweiten Teil der Studie als Bezugspunkt für die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode und ermöglichte die direkte relative Quantifizierung der Zielgene anhand der in Abschnitt 2.3.2 dargestellten Strategien.

Für die vorgeschaltete Evaluation der potentiellen Housekeeping-Gene wurden diese jedoch zunächst absolut quantifiziert und diese Werte dann auf die Menge der Gesamt-RNA bezogen (siehe Abschnitte 2.3.2 und 2.3.3). Hierzu wurde aus den Plasmid-Standards jeweils am Versuchstag eine frische 11stufige 1:2-Verdünnungsreihe in 50 mg/ml E. coli t-RNA (Roche) hergestellt und im Zweifachansatz auf jeder 96-Well-Plate für jedes untersuchte Gen als Standard-Kurve mitbestimmt. Die Verdünnungsstufen wurden hierbei so gewählt, dass die mittleren Stufen dem Expressionsniveau der entsprechenden Gene aus Vorversuchen entsprachen. Die absolute Quantifizierung erfolgte anhand der Gleichungen aus Abschnitt 2.3.2. Um Material zu sparen wurden im Allgemeinen pro 96-Well-Plate ein oder höchstens zwei Gene untersucht.

An die absolute bzw. relative Quantifizierung schloss sich die statistische Untersuchung an. Zur Testung auf Gruppenunterschiede (TOF vs. Kontrolle, RV vs. RA, männlich vs. weiblich, Betablocker-Therapie vs. keine Betablocker-Therapie) in der Expression eines Genes wurde der Mann-Whitney-U-Test (zweiseitig) verwendet. Die Korrelation zwischen den Expressionen zweier Gene oder der Expression eines Genes und der Ausprägung eines klinischen Merkmales wurde mit Hilfe des Spearman-Rang-Korrelations-Tests überprüft (Motulsky 1995, Sachs 1984).

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 OPTIMIERUNG UND EVALUATION DER PRÄ-PCR

#### 5.1.1 Optimierung der RNA-Isolierung

RNA-Isolierung, DNase-Verdau und die Überprüfung der gDNA-Freiheit wurden in Vorversuchen an Fragmenten eines humanen explantierten Herzens getestet. Eine makroskopische Zerkleinerung der Proben konnte gut erreicht werden, allerdings zeigte sich, dass durch die Oszillation nur Proben kleiner als etwa 100mg homogenisiert werden konnten. Bei größeren Proben blieben auch nach vorherigem Mörsern sichtbare Gewebefragmente übrig. Es wurden im Folgenden daher nur Fragmente zwischen 10 und 20mg Größe verwendet. Außerdem wurden die in Protokoll 2 beschriebenen großzügigen Oszillationszeiten gewählt. Durchschnittlich konnten in den Vorversuchen etwa 0.8 µg RNA pro mg Biopsie gewonnen werden (bei den Studienproben wurde auf das Wiegen der Proben verzichtet, um die Proben zu schonen). Der Gehalt an gDNA lag in den Vorversuchen vor dem DNase-Verdau bei etwa 10%, nach Verdau war er nicht nachweisbar.

Die Evaluierung der Methode zum Nachweis von gDNA durch Quantifizierung der Kopienzahl von cMYC bestätigte die Annahme von 7,0 pg gDNA pro 2 Kopien cMYC (siehe Abschnitt 4.4.1). Dieser Wert lag im 95%-Konfidenzintervall der Messwerte, so dass sich auch experimentell kein Hinweis auf das Vorhandensein von Pseudogenen, die diese Messung stören könnten, ergab.

Bei der RNA-Isolierung aus den in diese Studie eingeschlossenen Proben lag der gDNA-Gehalt nach dem DNase-Verdau in 12 Fällen unter 0,02%, in allen anderen Fällen war er nicht nachweisbar.

Kontrollversuche bestätigten den linearen Messbereich des Spektralphotometers mit einem Optimum bei Endkonzentrationen zwischen 2,5 ng/µl und  $2,5 \cdot 10^2$  ng/µl. Die RNA wurde für die spektralphotometrischen Messungen so verdünnt, dass die Konzentrationen in diesem Bereich lagen. Die Quotienten der optischen Dichte bei 260 und 280 nm wurden für alle Proben mit Werten über 1,8 errechnet. Dies spiegelte eine hohe Reinheit und eine geringen Verunreinigung mit Proteinen wieder. Anhand vorbeschriebener Korrekturfaktoren (Sambrook 2001) konnte die RNA-Konzentration um den Anteil kontaminierender Proteine korrigiert werden. Die Gelelektrophorese zeigte bei allen Proben starke Banden für 18S und 28S rRNA als

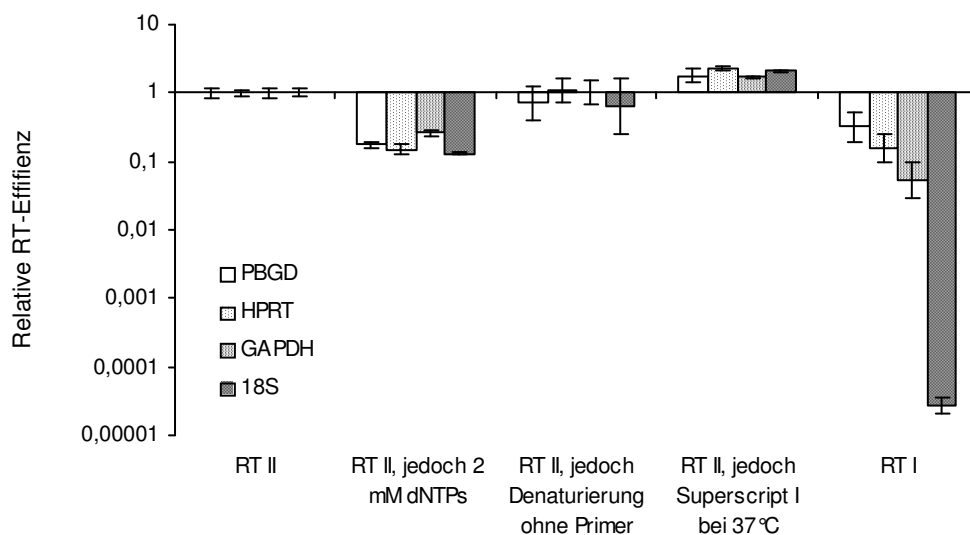
Zeichen einer erfolgreichen RNA-Isolierung, in 6 Fällen zeigten sich jedoch verschmierte Banden als Ausdruck einer beginnenden RNA-Fragmentierung (Sambrook 2001).

Die jeweils pro acht isolierten Myokardbiopsien mitgeführten Negativ-Kontrollen für das Mörsern der Proben und die Guanidinium-Thiozyanat-Phenol-Chloroform-Methode blieben für nahezu alle untersuchten Gene negativ, im Falle von 18S blieben die gemessenen Werte um mehr als den Faktor  $10^6$  unter denen der untersuchten Biopsien.

### 5.1.2 Optimierung der Reversen Transkription

Als Maß für den Einfluss der RT auf genspezifische methodische Fehler wurde die relative RT-Effizienz berechnet als Quotient der resultierenden Kopienzahl eines Gens bei Verwendung einer bestimmten Protokoll-Variation und der Kopienzahl auf Grundlage des Basisprotokolls II. Da die Daten nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test eine geometrische Verteilung aufwiesen, erfolgte die deskriptive statistische Auswertung durch Berechnung des geometrischen Mittelwertes und des Streufaktors, also der logarithmischen Standardabweichung.

Abbildung 18 zeigt den Einfluss verschiedener Protokollvariationen auf die relative Effizienz der Reversen Transkription.



**Abbildung 18: Einfluss verschiedener Protokollvariationen auf die relative Effizienz der Reversen Transkription.**

Dargestellt ist die relative RT-Effizienz als Quotient der resultierenden Kopienzahl eines Gens bei Verwendung einer bestimmten Protokoll-Variation und der Kopienzahl auf Grundlage des Basisprotokolls II. Darstellung des geometrischen Mittelwertes und des Streufaktors.

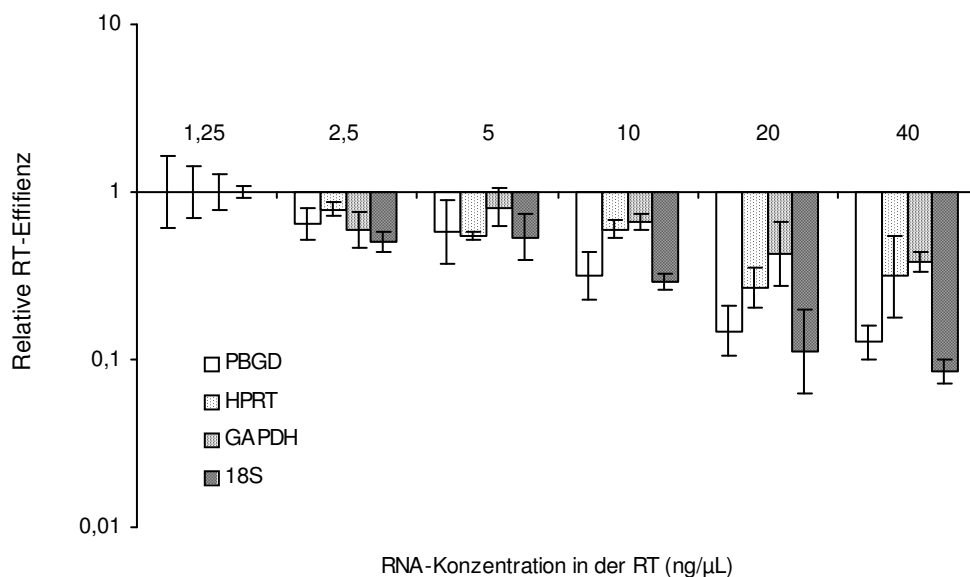
Eine erhöhte Konzentration der dNTPs von 2mM verminderte die relative RT-Effizienz, ohne dass die Streuung zunahm. Der Effekt wirkte sich schwächer auf GAPDH aus als auf die anderen Gene.

Eine Denaturierung ohne Primer und dNTPs hatte keinen Einfluss auf die mittlere RT-Effizienz, jedoch erhöhte sich die Streuung beträchtlich. Dieser Effekt war am stärksten für 18S.

Die Verwendung von Superscript I bei 37°C erhöhte die RT-Effizienz gegenüber Superscript II bei 42°C, jedoch ist aus den vorliegenden Daten nicht ersichtlich, ob dieser Effekt dem Wechsel des Enzyms oder der nach Herstellerempfehlungen angepassten Inkubationstemperatur zuzuordnen ist.

Die Kombination aller drei Änderungen, aus der Basisprotokoll I (RT I) resultiert, verringerte die RT-Effizienz und erhöhte die Streuung in starkem, überadditivem Maße. Hierbei ist auffällig, dass dieser Effekt genspezifisch war. In absteigender Reihenfolge waren 18S, GAPDH, HPRT und PBGD betroffen. Im Falle von 18S resultierte eine Reduktion der RT-Effizienz um einen Faktor größer als  $3,5 \cdot 10^4$ .

Der Einfluss verschiedener RNA-Konzentrationen auf die relative Effizienz der Reversen Transkription ist in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19: Einfluss der RNA-Konzentration auf die relative Effizienz der Reversen Transkription.**

Dargestellt ist die relative RT-Effizienz als Quotient der resultierenden Kopienzahl eines Gens bei Verwendung einer bestimmten Protokoll-Variation und der Kopienzahl auf Grundlage des Basisprotokolls II mit einer RNA-Konzentration von 1,25 ng/μl. Darstellung des geometrischen Mittelwertes und des Streufaktors.

---

Höhere RNA-Konzentrationen bedingten allgemein niedrigere RT-Effizienzen. Der Effekt nahm ab einer Konzentration von über 5 ng/ $\mu$ l RNA überproportional zu. Auch hier zeigten sich genspezifische Effekte, PBGD und 18S sind stärker betroffen als HPRT und GAPDH.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die in diese Studie eingeschlossenen Myokardbiopsien das RT-Basisprotokoll II mit einer RNA-Konzentration von 5 ng/ $\mu$ l gewählt.

Für jeweils acht Myokardbiopsien wurden auch bei der RT Negativ-Kontrollen mitgeführt, und zwar jeweils ein Ansatz ohne RNA und ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase. Für nahezu alle untersuchten Gene blieben die Kontrollen negativ, im Falle von 18S blieben die gemessenen Werte um mehr als den Faktor  $10^6$  unter denen der untersuchten Biopsien.

Anhand der in Abschnitt 4.5 beschriebenen Methode zur Quantifizierung der cDNA nach RT konnte die absolute RT-Effizienz für die in diese Studie eingeschlossenen Biopsien berechnet werden. Sie lag bei  $70,3\% \pm 31,1\%$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

### 5.1.3 Evaluation der gesamten Prä-PCR

Der Effekt der gesamten Prä-PCR auf mögliche genspezifische methodische Fehler wurde quantitativ erfasst, indem in sechsfachem Ansatz aus benachbarten Fragmenten eines explantierten humanen Herzens cDNA nach Protokoll 2 und Protokoll 4 gewonnen wurde. Anschließend fand eine Quantifizierung von PBGD und 18S statt. Diese beiden Gene sollten das Panel der untersuchten Gene repräsentieren.

Da die Daten nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test eine Normalverteilung aufwiesen, erfolgte die deskriptive statistische Auswertung durch Berechnung des Variationskoeffizienten der gemessenen Genexpression von PBGD bzw. 18S. Für die gesamte Methode ergaben sich Variationskoeffizienten von 19,3% für PBGD und 20,3% für 18S.

## 5.2 OPTIMIERUNG UND EVALUATION DER cDNA-QUANTIFIZIERUNG

Die einzelnen Elemente des neuen Protokolls zur Quantifizierung einzelsträngiger cDNA sowie das Gesamtprotokoll selbst wurden in zahlreichen Vorversuchen optimiert und evaluiert.

Wie in Abschnitt 4.5 dargelegt, erfolgte die Einstellung der RNase-Konzentration bei 0,4 U/ $\mu$ l und damit um den Faktor 4 höher als nach den Vorversuchen nötig gewesen wäre. Auch die Konzentration des RNase-Inhibitors und die Zeiten für die Inkubation beider Enzyme wurden sehr konservativ gewählt.

Der Verlust bei der Reinigung der ss cDNA mit Hilfe des PCR Purification Kits wurde anhand des 8kb-Standards M13mp19 in den Konzentrationen 2 ng/ $\mu$ l und 20 ng/ $\mu$ l im achtfachen Ansatz getestet. Es wurden 73,2% bzw. 67,9% der Nukleinsäure eluiert. Die Standardabweichung lag bei 5,3% bzw. 10,8%. Es wurde daher bei allen Quantifizierungen von cDNA ein Faktor von 0,7 eingerechnet.

Anhand der mit dem 8kb-Standard M13mp19 erstellten Standardkurven konnte der lineare Messbereich bestimmt werden. Bei Endkonzentrationen der ss cDNA von 0,03 - 2 ng/ $\mu$ l zeigte sich ein lineares Verhältnis zwischen auf RhoX6 normierter OliGreen-Fluoreszenz und den eingesetzten Ausgangskonzentrationen ( $R^2 = 0,9771$ ,  $m=1,0119$ ).

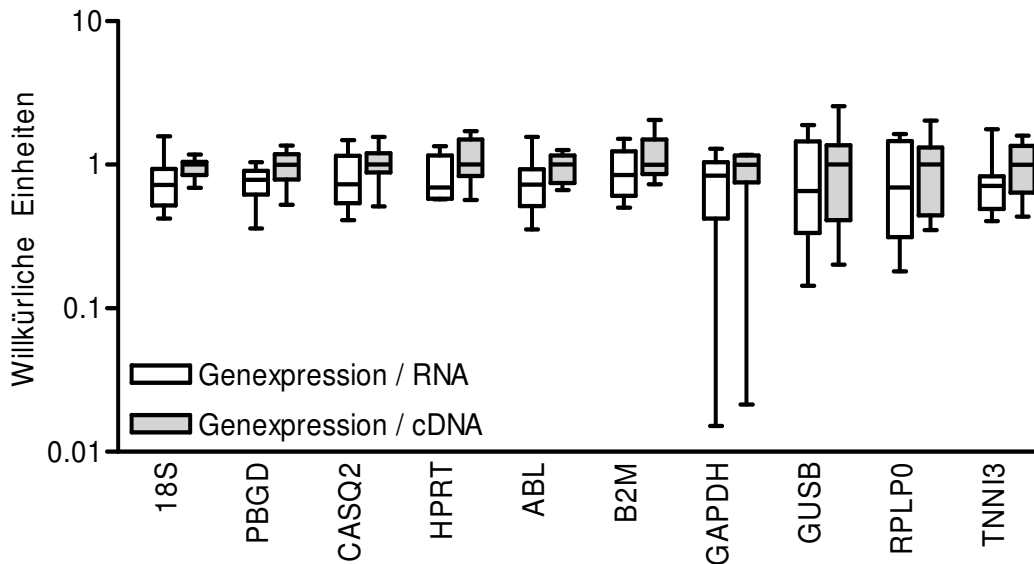
Die intra-Assay-Variabilität der Quantifizierung mit OliGreen und dem SDS 7700 ohne die vorherige Aufreinigung der ss cDNA lag in den Vorversuchen und bei den später gemessenen cDNAs bei  $2,9\% \pm 0,6\%$  (Mittelwert der einzelnen Variationskoeffizienten  $\pm$  Standardabweichung der Variationskoeffizienten).

Die inter-Assay-Variabilität der Quantifizierung mit OliGreen und dem SDS 7700 ohne die vorherige Aufreinigung lag im Vorversuch bei 3,8%.

Die Variabilität der gesamten Quantifizierung einer ss cDNA inklusive des RNase-Verdau und der Aufreinigung lag im Vorversuch bei 4,7%.

Der Effekt der Messung der Gesamt-RNA bei der Evaluation von potentiellen Housekeeping-Genen im Sinne von Abschnitt 2.3.3 und 4.5 ist in Abbildung 20 dargestellt. Im Vorausgriff auf die in Abschnitt 5.4 näher dargestellten Ergebnisse ist hier die Expression der potentiellen Housekeeping-Gene in den Kontrollproben dargestellt. Als Bezugspunkt diente entweder die Gesamt-RNA (gemessen am Spektralphotometer) oder die Gesamt-RNA einer Probe, wie sie mit dem neu

etablierten Protokoll gemessen wurde. Um die verschiedenen Gene mit ihren stark unterschiedlichen Expressionsniveaus in einer Abbildung vergleichbar machen zu können, wurden die Werte jeweils auf den Median der Quotienten Genexpression / cDNA bezogen.



**Abbildung 20: Effekt der Messung der Gesamt-RNA als Bezugspunkt bei der Evaluation von potentiellen Housekeeping-Genen im Vergleich zur Messung von Gesamt-RNA**

Die Expression der einzelnen Gene in den 10 Kontrollproben wurde mittels Real-Time PCR absolut quantifiziert und auf die Gesamtmenge der RNA (gemessen mittels Spektralphotometer) bzw. auf die Gesamtmenge der cDNA (gemessen mittels OliGreen) bezogen. Diese Quotienten wurden ihrerseits auf den Median der Quotienten (Genexpression / cDNA) in den 10 Kontrollproben bezogen. Dadurch wurden die einzelnen Gene vergleichbar bezüglich ihrer Schwankungsbreite. Dargestellt sind als Boxplot jeweils Median, 25%- und 75%-Quantil sowie Minimal- und Maximalwert.

Maßzahlen wie die Standardabweichung oder der Streufaktor konnten nicht verwendet werden, da nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test weder eine Normalverteilung noch eine geometrische Verteilung vorlag. Es lag jedoch eine Tendenz zur geometrischen Verteilung vor. Als Maß für die Variationsbreite der gemessenen Genexpression dienten daher die Quotienten aus Maximal- und Minimalwert (geometrische Spannweite). Wie auch Tabelle 8 zu entnehmen ist, wurde die Spannweite der Genexpression in fast allen Fällen kleiner, wenn auf cDNA statt auf RNA normiert wurde. In wenigen Fällen blieb die Spannweite in der gleichen Größenordnung. Für 18S beispielsweise sank die geometrische Spannweite von 3,8 auf 1,7.

	<b>Expression /</b>	<b>18S</b>	<b>PBGD</b>	<b>CASQ2</b>	<b>HPRT</b>	<b>ABL</b>
Geometrische Spannweite	RNA	3,77	2,89	3,60	2,35	4,43
(Maximal- / Minimalwert)	cDNA	1,71	2,59	3,07	3,01	1,90

	<b>Expression /</b>	<b>B2M</b>	<b>GAPDH</b>	<b>GUSB</b>	<b>RPLP0</b>	<b>TNNI3</b>
Geometrische Spannweite	RNA	2,99	85,24	13,17	9,04	4,37
(Maximal- / Minimalwert)	cDNA	2,82	55,15	12,65	5,78	3,64

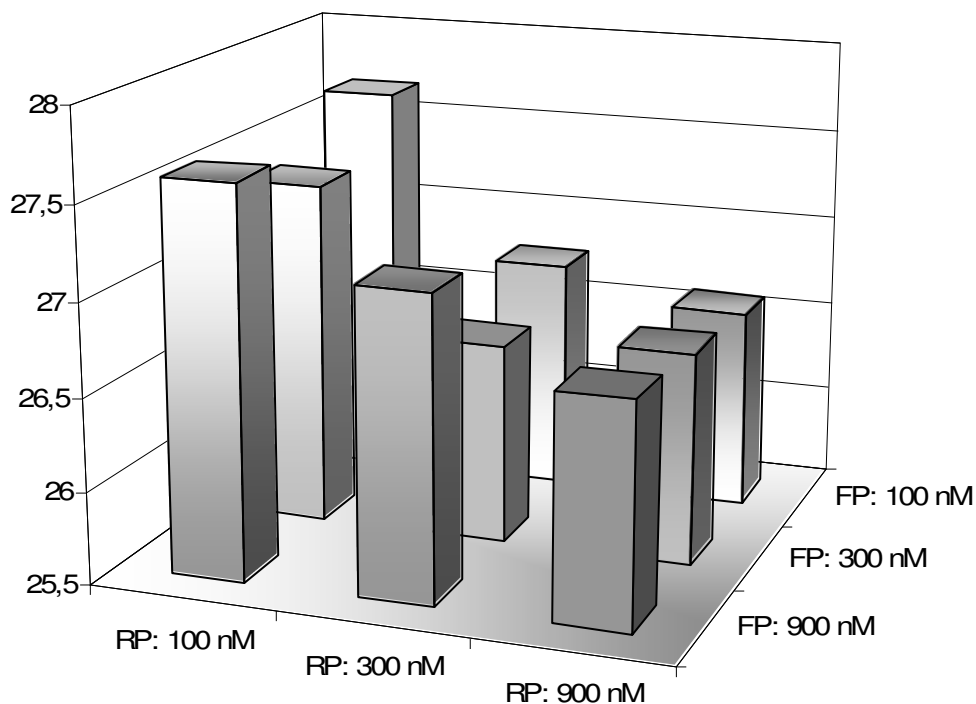
**Tabelle 8: Effekt der Messung der Gesamt-RNA als Bezugspunkt bei der Evaluation von potentiellen Housekeeping-Genen im Vergleich zur Messung von Gesamt-RNA**

Auf der gleichen Datenbasis wie in Abbildung 20 sind die Quotienten aus Maximal- und Minimalwert (geometrische Spannweite) dargestellt. Diese Werte dienen als Maß für die Variationsbreite der gemessenen Genexpression. Sie können daher Anhalt sein für das Ausmaß, in dem die Quantifizierung der Gesamt-RNA oder Gesamt-RNA globale methodische Fehler in der Prä-PCR ausgleichen kann.

### 5.3 OPTIMIERUNG UND EVALUATION DER REAL-TIME PCR FÜR DIE UNTERSUCHTEN GENE

Die konventionellen PCRs unter Verwendung der für die Real-Time PCR entworfenen Primer zeigte in allen Fällen deutliche Banden in den erwarteten Amplikon-Längen. Weitere Banden, und damit Hinweise auf bedeutsame unspezifische Amplifikationen, ergaben sich nicht.

Die optimierten Konzentrationen der Primer und Sonden sind in Tabelle 7, Abschnitt 4.6.1, dargestellt. Abbildung 21 zeigt das Beispiel einer Primermatrix anhand von HPRT.



**Abbildung 21: Beispiel einer Primermatrix von HPRT**

Dargestellt sind die mittleren Ct-Werte für die jeweiligen Kombinationen der Konzentrationen für Forward- und Reverse-Primer (FP, RP). Ausgewählt wurde diejenige Kombination, mit der die mit dem geringsten Materialaufwand die niedrigsten Ct-Werte erreicht werden konnte. In diesem Falle jeweils 300 nM für den FP und den RP.

Anhand von 7stufigen 1:2-Verdünnungsreihe der Kalibrator-cDNA wurden die PCR-Effizienzen der einzelnen Gene bestimmt. Da die Kalibrator-cDNA dieselben Aufarbeitungsschritte durchlaufen hatte wie die klinischen Proben, waren diese Werte repräsentativ für die später untersuchten Proben. Zum Vergleich sind Werte

angegeben, die im Rahmen der absoluten Quantifizierung aus den Plasmid-Standardkurven ermittelt wurden. Wie Tabelle 9 zeigt, liegen die Korrelationskoeffizienten alle über 0,95 und die errechneten PCR-Effizienzen zwischen 91,6% und 104,4%.

	cDNA-Standard-Kurve		Plasmid-Standard-Kurve	
	R <sup>2</sup>	PCR-Effizienz	R <sup>2</sup>	PCR-Effizienz
c-MYC			0,967	96,2%
PBGD	0,995	99,8%	0,948	97,4%
HPRT	0,995	94,8%	0,994	101,8%
GUSB	0,956	92,1%	0,964	94,5%
B2M	0,950	103,4%	0,974	93,9%
ABL	0,976	99,5%	0,982	97,5%
TNNI3	0,981	93,5%	0,995	95,1%
RPLP0	0,998	95,2%	0,988	100,2%
CASQ2	0,989	104,4%	0,957	93,2%
GAPDH	0,986	95,8%	0,993	95,9%
18S	0,980	98,8%	0,981	98,7%
ANP	0,977	97,9%		
BNP	0,965	99,1%		
HIF1A	0,987	91,6%		
total VEGF	0,978	97,4%		
VEGF-121	0,958	101,7%		
VEGF-165	0,941	96,3%		
VEGF-189	0,950	98,2%		
VEGF-R1	0,994	95,9%		
VEGF-R2	0,990	96,3%		

**Tabelle 9: PCR-Effizienzen, bestimmt anhand von cDNA- und Plasmid-Verdünnungsreihen**

Dargestellt sind die nach Formel 7 (Abschnitt 2.3.2) errechneten PCR-Effizienzen sowie der Korrelationskoeffizient nach Pearson (R<sup>2</sup>). Durchgeführt wurden die Versuche an einer 7stufigen 1:2-Verdünnungsreihe der Kalibrator-cDNA bzw. an einer 11stufigen 1:2-Verdünnungsreihe des Plasmidstandards.

Im Rahmen der Untersuchung der klinischen Proben wurden Non Template Controls (NTCs) für alle Gene, die auf jeweils einer 96-Well-Plate untersucht wurden, mitbestimmt. Diese blieben in nahezu allen Fällen negativ. Lediglich für 18S ergab sich ein schwaches Signal, dass jedoch stets um einen Faktor von mindestens 10<sup>6</sup> niedriger als das der schwächsten klinischen Probe war.

Tabelle 10 zeigt die Intra- und Inter-Assay-Variabilitäten der Real-Time PCRs für die potentiellen Housekeeping-Gene. Die Intra-Assay-Variabilität lag zwischen 5,0% und 10,6%, die Inter-Assay-Variabilität zwischen 4,9% und 14,7%. Für die Zielgene konnten die Werte nicht analog bestimmt werden, da hier keine absolute

Quantifizierung vorgenommen worden war. Überführte man die Ct-Werte der analogen Messungen für die Zielgene in Ermangelung einer Standard-Kurve mit Hilfe der Formel  $N=2^{Ct}$  in Schätzwerte für die Kopienzahl, so ergaben sich aber vergleichbare Ergebnisse.

	<b>Intra-Assay-Variabilität</b>	<b>Inter-Assay-Variabilität</b>
	<b>Variationskoeffizient</b>	<b>Variationskoeffizient</b>
c-MYC	6,2%	5,8%
PBGD	10,7%	6,7%
HPRT	10,6%	5,2%
GUSB	9,3%	7,4%
B2M	5,3%	11,7%
ABL	5,0%	6,3%
TNNI3	10,0%	14,7%
RPLP0	6,7%	4,9%
CASQ2	5,4%	9,1%
GAPDH	8,5%	6,3%
18S	11,2%	9,5%

**Tabelle 10: Intra- und Inter-Assay-Variabilitäten der Real-Time PCR**

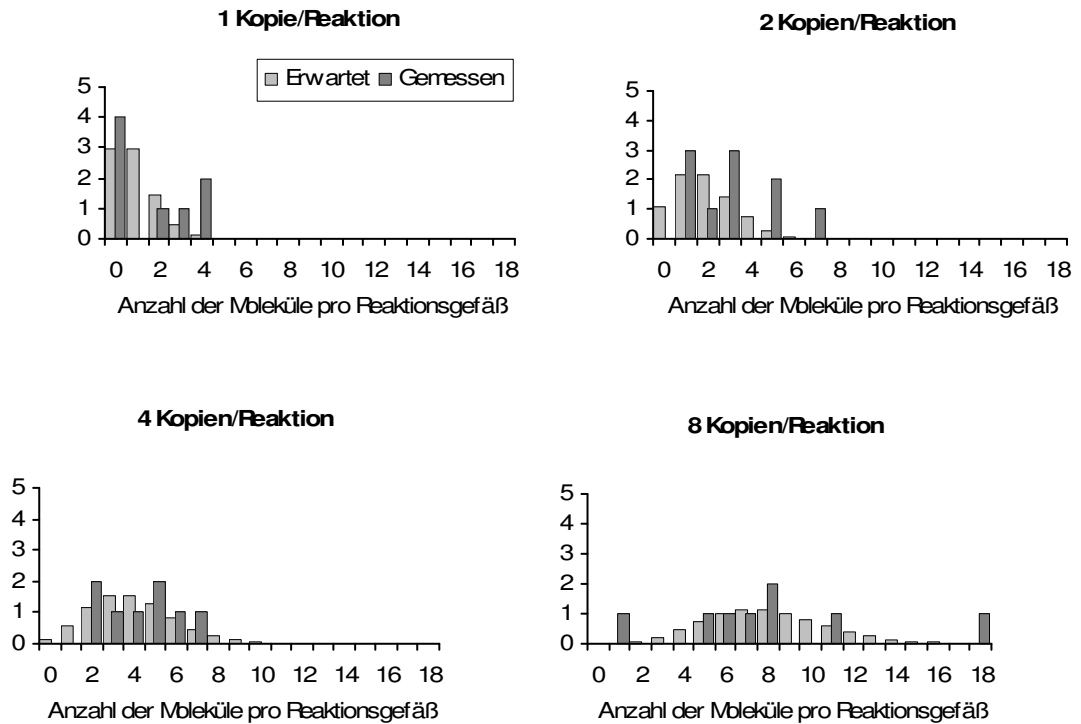
Dargestellt sind die als Schätzmaß für die Intra-Assay-Variabilität die Variationskoeffizienten jeweils einer Achtfachmessung der Kalibrator-cDNA, sowie als Schätzmaß für die Inter-Assay-Variabilität die Variationskoeffizienten jeweils aus drei Mittelwerten solcher Achtfachmessungen der Kalibrator-cDNA.

Die Überprüfung der Spezifität der Real-Time PCR auf mRNA- bzw. cDNA-Sequenzen lieferte für nahezu alle Gene negative Ergebnisse für die gDNA-Kontrollen. Lediglich bei den beiden Intron-losen Genen 18S und RPLP0 waren Signale für gDNA nachzuweisen. Entsprechend der in Protokoll 18 beschriebenen Formel wurde der Quotient aus cDNA-Signal (bei 5 ng cDNA pro Reaktion) und gDNA-Signal (bei 100 ng gDNA pro Reaktion) berechnet. Für 18S lag er bei  $8,6 \cdot 10^4$ , für RPLP0 bei  $3,6 \cdot 10^2$ . Berücksichtigt man den Umstand, dass im Kontrollversuch 20fach mehr gDNA als cDNA verwendet wurde, hätte das Signal der gDNA selbst bei einer Kontamination der cDNA mit 50% gDNA in jedem Falle weniger als 0,1% des Gesamt-Signals ausgemacht. Die RNA-Kontrollen und die NTCs blieben in allen Fällen negativ.

### 5.3.1 Überprüfung der Sensitivität der Real-Time PCR

Die Überprüfung der Sensitivität der Real-Time PCR erfolgte anhand von Protokoll 19. Die zu überprüfende Hypothese lautete, dass die Real-Time PCR bei einer niedrigen erwarteten Anzahl von cDNA-Molekülen so sensitiv und präzise messen könne, dass sie die Vorhersagen für die tatsächliche Verteilung der Moleküle, wie sie durch die Poisson'schen Verteilung gegeben werden, exakt abbilden werde. Präziser formuliert: die Real-Time PCR könne bei einer niedrigen erwarteten Anzahl von cDNA-Molekülen (Erwartungswerte 1, 2, 4 und 8 Kopien/Reaktionsgefäß) *hinreichend sensitiv und präzise messen, um* in einer Stichprobe mit  $n=8$  eine Häufigkeitsverteilung von Messwerten (1, 2, 3, usw. Kopien/Reaktionsgefäß) zu generieren, die *die Vorhersagen der Poisson'schen Verteilung nachvollziehen* (jener Verteilung also, die mathematisch beschreibt, mit welchen Wahrscheinlichkeiten bei niedrigen Erwartungswerten *tatsächlich* 1, 2, 3 usw. Kopien in einem Reaktionsgefäß *vorhanden sein werden*).

Abbildung 22 verdeutlicht dieses Experiment. Von den Verdünnungsstufen des MLL-Plasmids mit den Konzentrationen 1, 2, 4 und 8 Kopien/ $\mu\text{l}$  wurde jeweils acht mal 1  $\mu\text{l}$  in die Real-Time PCR eingebracht, es fand also die Messung einer Stichprobe mit  $n=8$  für die Erwartungswerte 1, 2, 4 und 8 Kopien/Reaktionsgefäß statt. In hellgrau dargestellt ist jeweils die Vorhersage durch die Poisson'sche Verteilung und in dunkelgrau der Messwert. Die Balken geben dabei die erwartete bzw. gemessene Häufigkeit der Ergebnisse „1 Kopie pro Real-Time PCR – Reaktionsgefäß“, „2 Kopien“, „3 Kopien“, usw. bei einer Mehrfachmessung mit  $n=8$  wieder.



**Abbildung 22: Überprüfung der Sensitivität der Real-Time PCR: Erwartete und Gemessene Verteilung der Kopien pro Reaktionsgefäß bei niedriger Kopienzahl**

Dargestellt sind die Messungen des MLL-Plasmids mittels Real-Time PCR in Verdünnungsstufen mit den Erwartungswerten 1, 2, 4 und 8 Kopien/Reaktionsgefäß. In Hellgrau abgebildet ist die bei diesen Erwartungswerten durch die Poisson'sche Verteilung vorausgesagte Häufigkeit des Vorhandenseins von 1, 2, 3, usw. Kopien pro Reaktionsgefäß bei einer Mehrfachmessung mit  $n=8$  (so entspricht also beispielsweise der hellgraue Teil der Abbildung „1 Kopie/Reaktion“ genau der Abbildung 17 in Abschnitt 4.6.2, wobei die Wahrscheinlichkeiten mit  $n=8$  multipliziert wurden). Dunkelgrau dargestellt sind die Häufigkeiten für 1, 2, 3, usw. Kopien pro Reaktionsgefäß, wie sie beim Versuch im Achtfachansatz tatsächlich gemessen wurden.

Eine qualitative Analyse von Abbildung 22 zeigt, dass die gemessene Häufigkeitsverteilung große Ähnlichkeit mit der erwarteten Verteilung nach Poisson hatte. Die statistische Überprüfung dieser Beobachtung gibt Tabelle 11 wieder.

Erwartungswert  (Kopien pro Reaktion)	Beobachteter Wert als arithm. Mittelwert bei n=8  (Kopien pro Reaktion)	95% Konfidenz- intervall  (Kopien pro Reaktion)	Varianz	Dispersions- index R(t)
1,00	1,64	0,75–2,53	3,22	1,97
2,00	3,09	1,87–4,31	5,26	1,70
4,00	3,96	2,58–5,34	3,71	0,94
8,00	8,13	6,15–10,11	25,30	3,11

**Tabelle 11: Überprüfung der Sensitivität der Real-Time PCR: Vergleich der Erwartungswerte und der beobachteten Mittelwerte**

Dargestellt sind neben den Erwartungswerten 1, 2, 4 und 8 Kopien/Reaktionsgefäß die arithmetischen Mittelwerte und das 95%-Konfidenzintervall der in Abbildung 22 dunkelgrau dargestellten Achtfachmessungen des MLL-Plasmids mittels Real-Time PCR. Die Varianz einer optimalen Poisson'schen Verteilung entspricht dem arithmetischen Mittelwert. Der Dispersionsindex R(t) ist der Quotient aus Varianz und Mittelwert und sollte somit bei einer optimalen Poisson'schen Verteilung gleich 1 sein.

Zuerst sei auf die Varianz und den Dispersionsindex R(t) hingewiesen. Mit diesen Parametern kann überprüft werden, ob eine gemessene Verteilung die Form einer Poisson'schen Verteilung hat (zunächst unabhängig davon, ob der Mittelwert dieser Verteilung dem Erwartungswert entspricht). Die Varianz einer optimalen Poisson'schen Verteilung entspricht ihrem Mittelwert. Der Dispersionsindex R(t) ist der Quotient aus Varianz und Mittelwert und sollte somit bei einer optimalen Poisson'schen Verteilung gleich 1 sein. Für die Verteilungen mit den Erwartungswerten 1, 2 und 4 Kopien/Reaktionsgefäß lagen die beiden Parameter nahe an diesen Vorgaben, im Falle der Verteilung mit dem Erwartungswert 8 Kopien/Reaktionsgefäß waren die Abweichungen durch die beiden Ausreißer bei 1 und 18 Kopien (siehe Abbildung 22) zu erklären. Vor dem Hintergrund der relativ geringen Stichprobengröße von n=8 kann insgesamt jedoch festgehalten werden, dass die gemessenen Werte die Poisson'sche Verteilung nachvollzogen (Ross 1993, Nielsen 1997).

Zur Überprüfung der Frage, ob die gemessenen Werte nicht nur die Poisson'sche Verteilung nachvollziehen, sondern auch noch genau jene mit den Erwartungswerten 1, 2, 4 und 8 Kopien/Reaktionsgefäß, wurde auf Grundlage der Poisson-Verteilung das 95%-Konfidenzintervall berechnet (Motulsky 1995). Die erwarteten Werte 1, 2, 4 und 8 Kopien/Reaktionsgefäß lagen jeweils im 95%-Konfidenzintervall der Messungen. In keiner der vier Serien konnte mittels  $\chi^2$ -Test (mit  $u = [\text{Mittelwert-erwarteter Wert}] / \sqrt{\text{Mittelwert}/n}$ ,  $u^2 = \chi^2$  und einem Freiheitsgrad von 1, nach Sachs

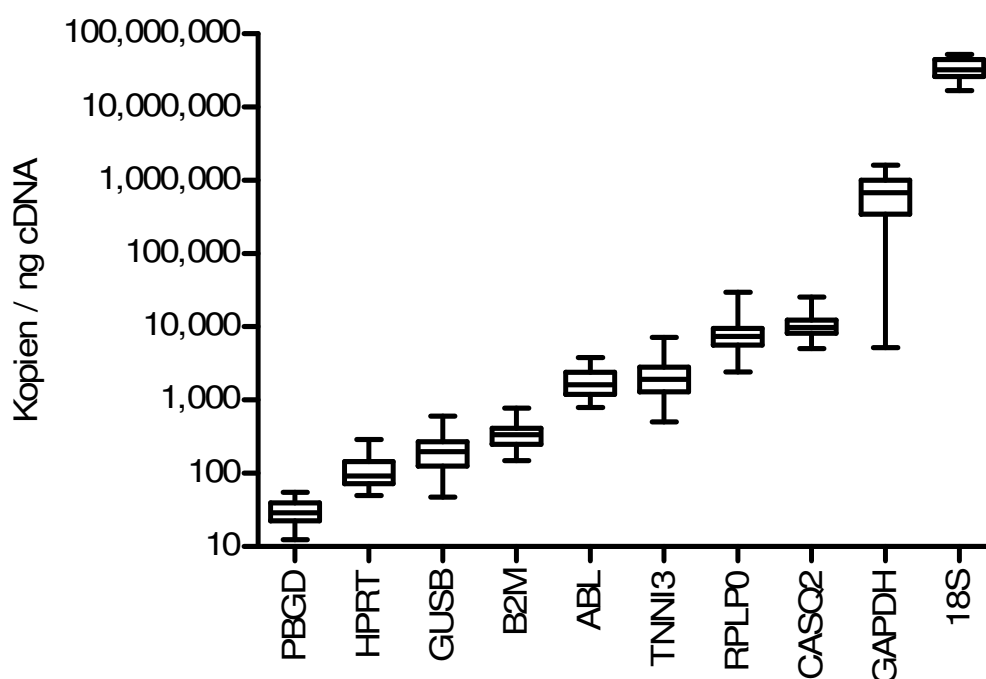
1984) ein signifikanter Unterschied zwischen den erwarteten und gemessenen Werten festgestellt werden.

Zusammengefasst kann also gesagt werden, dass die gemessenen Werte statistisch nachprüfbar diejenigen Poisson'schen Verteilungen nachvollzogen, die für die entsprechenden Erwartungswerte vorgegeben waren.

## 5.4 EVALUATION DER POTENTIELLEN HOUSEKEEPING-GENE

Die Expression der zehn potentiellen Housekeeping-Gene wurde mittels Real-Time PCR in den 25 TOF- und 10 Kontrollproben absolut quantifiziert. Die ermittelte Kopienzahl wurde auf die Gesamtmenge der cDNA bezogen, wie sie anhand von Protokoll 10 mittels OliGreen gemessen wurde.

Abbildung 23 zeigt die Expression der Gene in Kopien pro ng Gesamt-cDNA. Eine Unterscheidung in die verschiedenen Gruppen (TOF, 1. OP, TOF, 2. OP, rechtsventrikuläre Kontrollen, rechtsatriale Kontrollen) findet zunächst nicht statt. Die Boxplots geben daher alle untersuchten Proben wieder.



**Abbildung 23: Expression der zehn potentiellen Housekeeping-Gene in allen untersuchten Proben**

Die Expression der einzelnen Gene wurde mittels Real-Time PCR absolut quantifiziert und auf die Gesamtmenge der cDNA, gemessen mittels OliGreen, bezogen. Dargestellt sind als Boxplot jeweils Median, 25%- und 75%-Quantil sowie Minimal- und Maximalwert.

Führt man sich vor Augen, dass pro PCR etwa 3,5 ng cDNA eingesetzt wurden (1  $\mu$ l RT-Produkt mit 5ng/ $\mu$ l eingesetzter RNA und einer mittleren RT-Effizienz von etwa 70%), so wird deutlich, dass die potentiellen Housekeeping-Gene einen sehr breiten Bereich von Expressionsniveaus abdeckten.

Maßzahlen wie die Standardabweichung oder der Streufaktor konnten nicht verwendet werden, da nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test weder eine

Normalverteilung noch eine geometrische Verteilung vorlag. Es lag jedoch eine Tendenz zur geometrischen Verteilung vor. Als Maß für die Variationsbreite der Genexpression dienten daher die Quotienten aus Maximal- und Minimalwert (geometrische Spannweite). Wie aus Tabelle 12 zu entnehmen ist, zeigten die sechs Gene PBGD, HPRT, B2M, ABL, CASQ2 und 18S eine deutlich geringere geometrische Spannweite (mit Werten um 5) als die Gene GUSB, TNNI3, CASQ2 und GAPDH.

	<b>PBGD</b>	<b>HPRT</b>	<b>GUSB</b>	<b>B2M</b>	<b>ABL</b>
Geometrische Spannweite	4,44	5,82	12,65	5,24	4,85

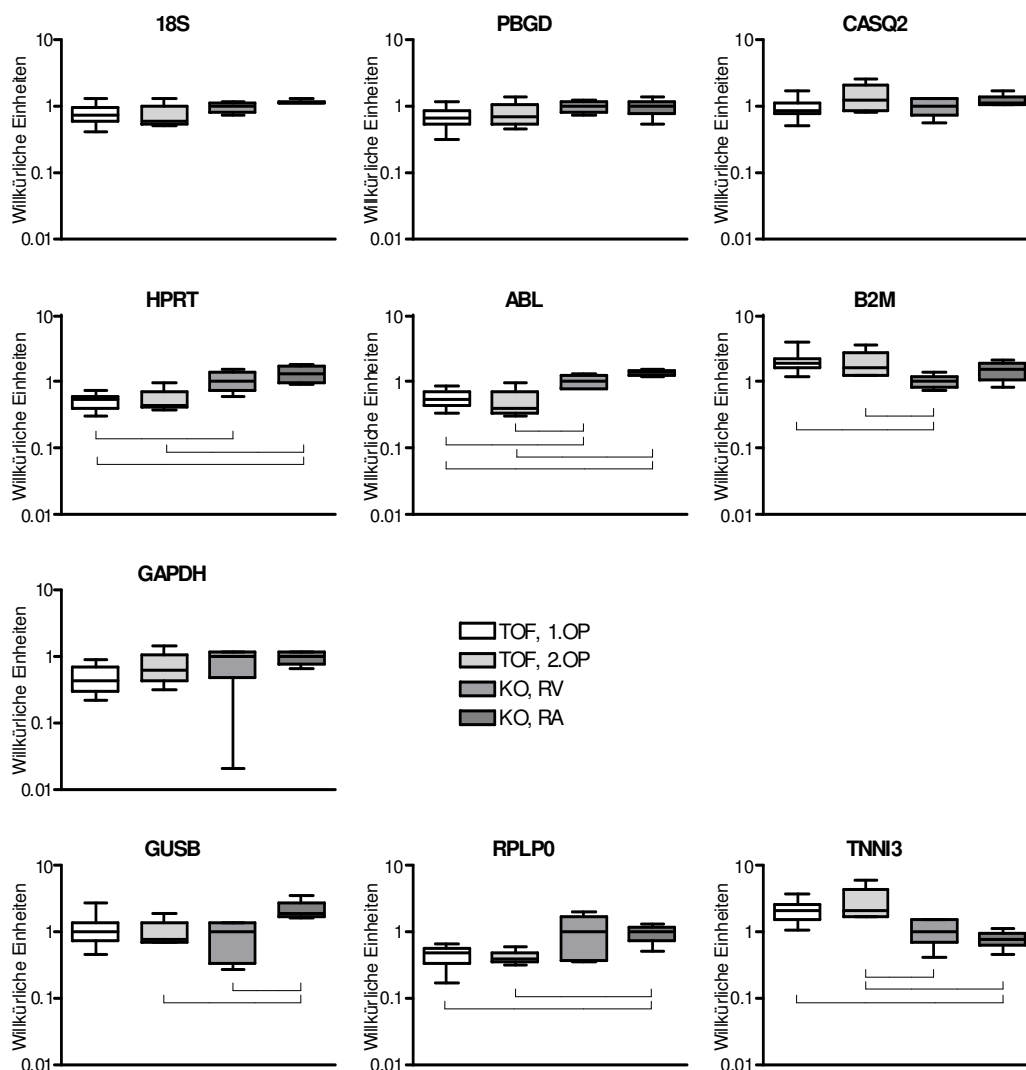
  

	<b>TNNI3</b>	<b>RPLP0</b>	<b>CASQ2</b>	<b>GAPDH</b>	<b>18S</b>
Geometrische Spannweite	14,29	12,27	5,05	308,51	3,13

**Tabelle 12: Variationsbreite der Expression der zehn potentiellen Housekeeping-Gene in allen untersuchten Proben**

Auf der gleichen Datenbasis wie in Abbildung 23 sind die Quotienten aus Maximal- und Minimalwert (geometrische Spannweite) dargestellt.

Abbildung 24 gibt ebenfalls die Expression der potentiellen Housekeeping-Gene wieder. Die verschiedenen Versuchsgruppen (TOF, 1. OP, TOF, 2. OP, rechtsventrikuläre Kontrollen, rechtsatriale Kontrollen) sind nun getrennt dargestellt. Um die verschiedenen Gene mit ihren stark differierenden Expressionsniveaus besser vergleichbar zu machen, wurde für jedes Gen der Median der rechtsventrikulären Kontrollproben auf 1 gesetzt. Die Variationsbreite oder eventuelle Gruppenunterschiede innerhalb eines Gens gingen durch diese Darstellung nicht verloren.



**Abbildung 24: Expression der zehn potentiellen Housekeeping-Gene, Unterscheidung zwischen den Gruppen**

Die Expression der einzelnen Gene wurde mittels Real-Time PCR absolut quantifiziert und auf die Gesamtmenge der cDNA (gemessen mittels OliGreen) bezogen. Diese Quotienten wurden ihrerseits auf den Median der Quotienten (Genexpression / cDNA) in den rechtsventrikulären Kontrollproben bezogen. Dadurch wurden die einzelnen Gene vergleichbar bezüglich ihrer Variationsbreite und eventuell vorhandener Gruppenunterschiede. Dargestellt sind als Boxplot jeweils Median, 25%- und 75%-Quantil sowie Minimal- und Maximalwert. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen geprüft. Signifikante Unterschiede mit einem  $p < 0,01$  sind mit eckigen Klammern angezeigt.

Wie oben bereits dargestellt, fanden sich Gene mit kleiner und Gene mit großer Variationsbreite. Es zeigte sich nun aber auch, dass sich bei einigen Genen signifikante Unterschiede der Expression zwischen den einzelnen Gruppen feststellen

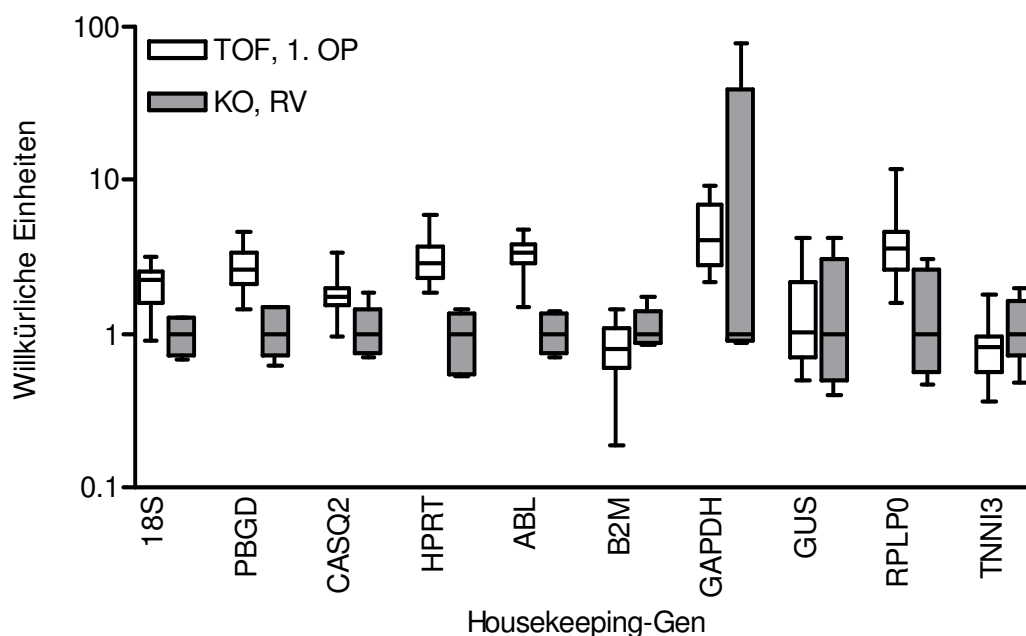
ließen (Mann-Whitney-U-Test). Zusammenfassend konnte man die potentiellen Housekeeping-Gene in vier Kategorien einteilen:

1. Kategorie: geringe Variationsbreite, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen: 18S, PBGD, CASQ2.
2. Kategorie: geringe Variationsbreite, jedoch signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen: HPRT, ABL, B2M
3. Kategorie: große Variationsbreite, jedoch keine signifikanten Gruppenunterschiede: GAPDH
4. Kategorie: große Variationsbreite und signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen: GUSB, RPLP0 und TNNI3

Signifikante Korrelationen zwischen der Expressionshöhe der Housekeeping-Gene und klinischen Parametern wie dem Alter, den rechtsatrialen bzw. rechtsventrikulären Drücken oder der arteriellen Sauerstoffsättigung fanden sich nicht (Verwendung des Mann-Whitney-U-Test bzw. des Spearman-Rang-Korrelations-Tests).

Für die Analyse der Zielgene in den folgenden Abschnitten wurden zunächst alle Housekeeping-Gene der Kategorie 1 (18S, PBGD und CASQ2) verwendet.

Zunächst soll jedoch der Effekt gezeigt werden, der sich bei der Verwendung eines nicht validen Housekeeping-Gens ergibt. Beispielhaft für die Ergebnisse, die im Abschnitt 5.5 dargestellt werden, zeigt Abbildung 25 den Unterschied der Expression von VEGF-R1 zwischen den beiden Gruppen TOF, 1. OP und rechtsventrikuläre Kontrollen. Wiederum ist der Median der rechtsventrikulären Kontrollproben auf 1 gesetzt, um die Werte mit den verschiedenen Housekeeping-Genen besser vergleichbar zu machen.



**Abbildung 25: Effekt der Verwendung eines nicht validen Housekeeping-Gens**

Die Expression von VEGF-R1 wurde mittels der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode quantifiziert und dabei jeweils auf alle zehn potentiellen Housekeeping-Gene bezogen. Dargestellt sind die beiden Gruppen TOF, 1. OP und die rechtsventrikulären Kontrollen. Um die Daten für die einzelnen Housekeeping-Gene vergleichbar zu machen, wurde der Median in den rechtsventrikulären Kontrollen auf 1 gesetzt. Dargestellt sind als Boxplot jeweils Median, 25%- und 75%-Quantil sowie Minimal- und Maximalwert.

Bei Verwendung der Housekeeping-Gene 18S, PBGD oder CASQ2 zeigte sich ein deutlicher Gruppenunterschied für die Expression von VEGF-R1 zwischen den beiden Gruppen. Bei allen drei Housekeeping-Genen war dieser in vergleichbarem Maße nachweisbar, was die Eignung dieser beiden Gene widerspiegelte. Wurden Housekeeping-Gene verwendet, die nach den oben beschriebenen Kriterien als nicht valide eingestuft worden waren, so ergaben sich verschiedene Effekte: der Gruppenunterschied war vermeintlich deutlicher nachweisbar (HPRT), der Gruppenunterschied war nicht mehr nachweisbar, wobei sich oft deutlich größere Variationsbreiten in den einzelnen Gruppen zeigten (GUSB oder besonders GAPDH) oder der Gruppenunterschied drehte sich sogar um, die Gruppe der erstoperierten TOF-Proben zeigte nun also eine vermeintlich niedrigere Expression von VEGF-R1 als die Kontrolle (bei Verwendung von B2M oder besonders TNNI3).

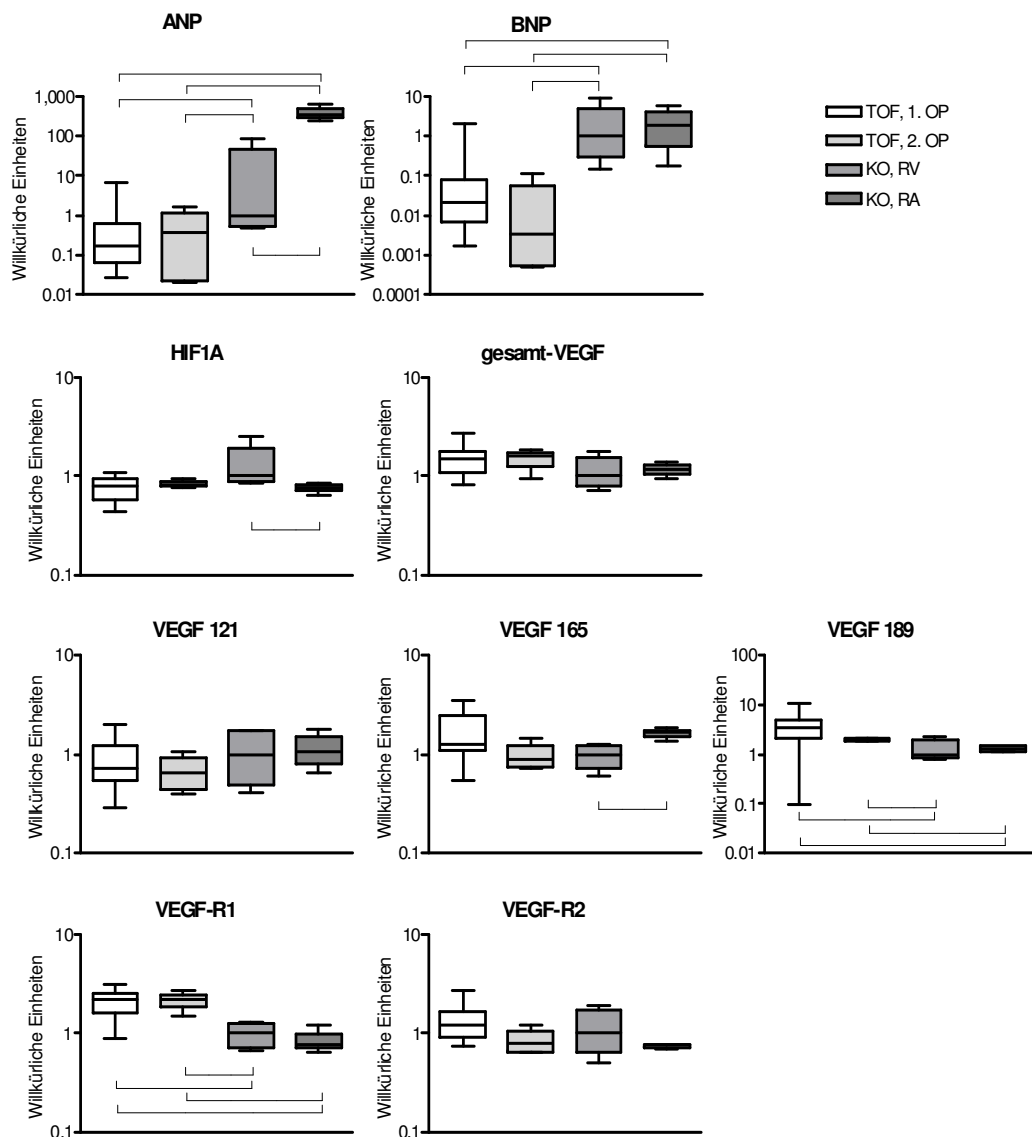
## 5.5 NATRIURETISCHE PEPTIDE UND ANGIOGENETISCHE WACHSTUMSFAKTOREN

### 5.5.1 Expression in den verschiedenen Patientengruppen

Die natriuretischen Peptide und die angiogenetischen Wachstumsfaktoren wurden mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode relativ quantifiziert. Hierbei wurden zunächst alle drei als valide eingestuft Housekeeping-Gene 18S, PBGD und CASQ2 verwendet. Die Ergebnisse der statistischen Analysen unterschieden sich hierbei nicht. Es werden daher im Folgenden nur die Daten für die Normierung auf 18S dargestellt. Mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests wurden Unterschiede zwischen den Patientengruppen (TOF, 1. OP; TOF, 2. OP; KO, RV; KO, RA) geprüft. Ein  $p < 0,01$  wurde als signifikant betrachtet. Abbildung 26 zeigt die Expression der Gene innerhalb der untersuchten Gruppen.

Bei den natriuretischen Peptiden zeigten sich deutliche Gruppenunterschiede. ANP war in den rechtsatrialen Kontrollen gegenüber den rechtsventrikulären Kontrollen um einen Faktor von 350 höher exprimiert. Keine signifikanten Unterschiede für ANP und BNP fanden sich zwischen den Gruppen der erstoperierten und der reoperierten TOF-Proben sowie für BNP zwischen den rechtsventrikulären und rechtsatrialen Kontrollen. Sowohl ANP als auch BNP zeigten in beiden TOF-Gruppen eine signifikant erniedrigte Expression gegenüber beiden Kontrollgruppen. Fasste man jeweils alle TOF- und alle Kontrollproben zusammen, so ergab sich eine verminderte Expression in den TOF-Proben gegenüber den Kontrollproben um einen Faktor von 270 für ANP und 100 für BNP, gemessen an den Medianen.

Für die angiogenetischen Wachstumsfaktoren konnten ebenfalls Gruppenunterschiede nachgewiesen werden, die allerdings weniger deutlich ausfielen als bei ANP und BNP. VEGF-189 und VEGF-R1 zeigten eine höhere Expression in den beiden TOF-Gruppen gegenüber den Kontrollgruppen. Die Mediane aller TOF- bzw. Kontrollproben zusammengenommen unterschieden sich um einen Faktor von 2,7 für VEGF-189 und um 2,6 für VEGF-R1. Für HIF1A konnte eine höhere Expression in den rechtsventrikulären Kontrollen gegenüber den rechtsatrialen Kontrollen festgestellt werden, für VEGF-165 eine niedrigere. Die Mediane der Gruppen unterschieden sich jedoch nur um Faktoren von 1,3 bzw. 1,2. Bei  $n=4$  in der Gruppe der rechtsatrialen Kontrollen muss dieses Ergebnis kritisch hinterfragt werden.



**Abbildung 26: Expression der natriuretischen Peptide und angiogenetischen Wachstumsfaktoren in den untersuchten Gruppen**

Die Expression der Gene wurde mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode quantifiziert und auf das Housekeeping-Gen 18S normiert. Aufgrund der direkten relativen Quantifizierung ist eine Aussage über das absolute Expressionsniveau nicht möglich. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Median der RV Kontrollen willkürlich gleich eins gesetzt. Die Variationsbreite oder eventuell vorhandene Gruppenunterschiede gehen dadurch nicht verloren. Dargestellt sind als Boxplot jeweils Median, 25%- und 75%-Quantil sowie Minimal- und Maximalwert. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen (TOF, 1. OP; TOF, 2. OP; KO, RV; KO, RA) geprüft. Signifikante Unterschiede mit einem  $p < 0,01$  sind durch eckige Klammern angezeigt.

### **5.5.2 Zusammenhänge der Genexpressionen untereinander und mit den klinischen Merkmalen**

Tabelle 13 gibt die Zusammenhänge der Expressionen der einzelnen Gene untereinander und mit den klinischen Parametern wieder.

Der Zusammenhang der Expression ausgewählter Gene mit dem Alter der Patienten bzw. Organspender ist in Abbildung 27 dargestellt. Für ANP und BNP zeigte sich ein Abfall der Expression vor allem im ersten Lebensjahr. Ein erneuter Anstieg fand sich in den adulten Kontrollproben sowie in zwei (für ANP) bzw. in einer (BNP) TOF-Probe. Wie Tabelle 13 zu entnehmen ist, war der Abfall von ANP und BNP über das Alter selbst bei Betrachtung aller Proben signifikant.

Eine signifikante Korrelation der Expression der untersuchten VEGF-Isoformen mit dem Alter fand sich nicht. Es zeigte sich jedoch ein Muster mit einem Abfallen der Expression über die ersten Lebensmonate und -jahre (am deutlichsten für VEGF-189) und einem Wiederanstieg in den adulten Proben (am deutlichsten für VEGF-121). Für VEGF-165 und Gesamt-VEGF zeigten sich Mischformen dieser Muster. Bei HIF1A, VEGF-R1 und VEGF-R2 fand sich keine Altersabhängigkeit.

Der signifikante Gruppenunterschied von ANP zwischen den Geschlechtern erklärt sich dadurch, dass alle vier rechtsatrialen Kontrollproben von weiblichen Organspendern stammten. Da ANP im Atrium deutlich höher exprimiert war (siehe oben), musste sich dies auch in der Betrachtung der geschlechtsspezifischen Unterschiede zeigen.

Für VEGF-121 und den rechtsventrikulären Spitzendruck konnte ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Bei der Plausibilitätskontrolle fielen jedoch zwei Ausreißer aus der Gruppe der reoperierten Patienten mit TOF auf, die sehr hohe Drücke, jedoch durchschnittliche VEGF-121-Expressionen aufwiesen. Wurden diese beiden Proben aus der Auswertung genommen, so wurde keine Signifikanz mehr erreicht.

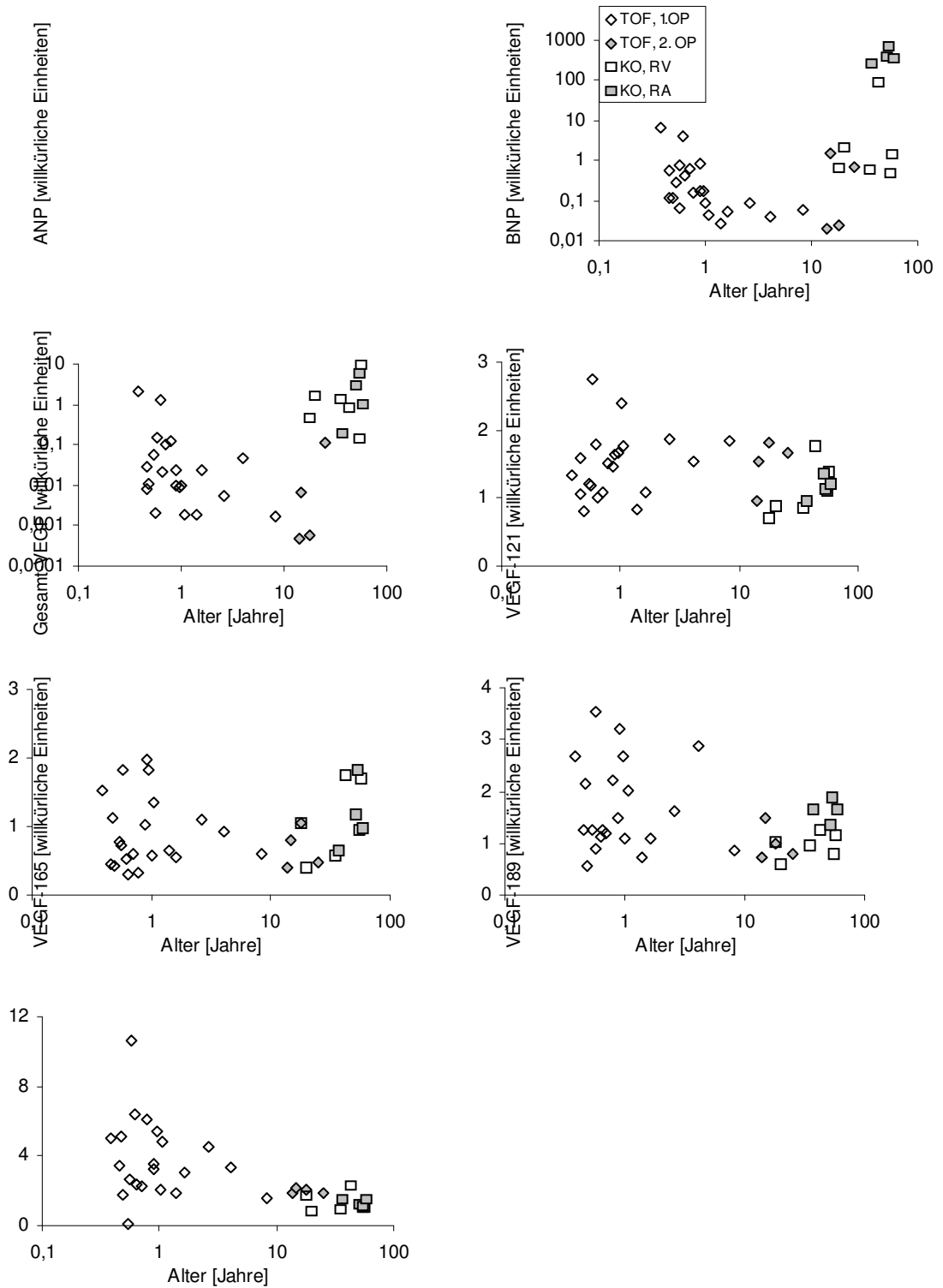
Weitere Korrelationen zwischen der Expression einzelner Gene und klinischen Parametern fanden sich nicht. Insbesondere waren keine weiteren Zusammenhänge von ANP oder BNP mit den Drücken oder von HIF1A, VEGF, den VEGF-Isoformen oder den Rezeptoren mit der arteriellen Sauerstoffsättigung nachweisbar.

	Alter	Ge- schlecht	Beta- blocker	Sa O2	P RV peak	P RV ed	P RA mean	Qp/Qs	ANP	BNP	HIF1A	ges. VEGF	VEGF- 121	VEGF- 165	VEGF- 189	VEGF- R1	VEGF- R2	
Alter		0,106	0,571**	0,173	-0,046	0,428*	0,415	-0,302	-0,457*	-0,473*	0,191	0,261	-0,025	-0,257	-0,355	0,310	-0,331	Alter
Geschlecht			-	0,933	0,982	1,286	1,000	1,000	0,404*	0,474	0,994	1,011	0,579	0,668	0,740	0,939	1,134	Geschlecht
Betablocker				0,922	1,106	0,667	0,875	1,000	2,450	0,411	0,979	0,958	1,437	1,338	1,241	1,098	1,437	Betablocker
Sa O2					-0,341	0,071	0,213	0,567**	0,099	-0,034	0,215	-0,007	0,122	0,181	-0,180	-0,063	-0,171	Sa O2
P RV peak						0,452*	0,021	-0,045	-0,114	0,013	0,011	0,129	0,435*	0,180	0,124	0,175	0,247	P RV peak
P RV ed							0,537*	0,176	-0,094	-0,036	0,041	0,012	0,206	-0,101	-0,176	0,176	0,184	P RV ed
P RA mean								-0,188	-0,079	0,002	0,065	0,030	0,306	0,164	0,112	0,239	0,038	P RA mean
Qp/Qs									0,122	0,027	-0,111	-0,476	-0,092	-0,056	-0,293	-0,341	-0,055	Qp/Qs
ANP										0,701**	0,301	0,152	0,195	0,432*	0,360	-0,093	0,445*	ANP
BNP											-0,021	0,013	-0,080	0,408*	0,388	-0,277	0,532*	BNP
HIF1A												0,733***	0,472*	0,274	0,095	0,643**	0,529*	HIF1A
ges. VEGF													0,508**	0,387	0,345	0,608***	0,371*	ges. VEGF
VEGF-121														0,651***	0,415*	0,130	0,274	VEGF-121
VEGF-165															0,755***	0,299	0,391	VEGF-165
VEGF-189																0,520**	0,424*	VEGF-189
VEGF-R1																	0,313	VEGF-R1
VEGF-R2																		VEGF-R2

\* p<0,05  
 \*\* p<0,01  
 \*\*\* p<0,001

**Tabelle 13: Zusammenhänge der natriuretischen Peptide und der angiogenetischen Wachstumsfaktoren untereinander und mit den klinischen Parametern**

Datengrundlage sind die Genexpressionen, wie sie für alle Proben, unabhängig von deren Gruppenzugehörigkeit gemessen wurden. Für jeweils zwei stetige Merkmale wurde der Spearman-Rang-Korrelations-Test verwendet. Angegeben sind die Korrelationskoeffizienten, die Signifikanzen sind über Sternchen kodiert (Beispiel: Gesamt-VEGF korrelierte mit HIF1A mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,733 und einem  $p < 0,001$ ). Zur Überprüfung des Zusammenhanges eines stetigen Merkmals mit einem nicht stetigen Merkmal (Geschlecht und präoperative Betablocker-Therapie) wurde der Mann-Whitney-U-Test (zweiseitig) verwendet. Aus den Medianen der Merkmalsausprägungen für die Proben von männlichen und weiblichen Patienten (bzw. mit und ohne Betablocker-Therapie) wurden die Quotienten gebildet. Diese sind in der Tabelle in den Zeilen Geschlecht und Betablocker angegeben (Beispiel: ANP war bei männlichen Patienten mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  um den Faktor 0,404 niedriger exprimiert).



**Abbildung 27: Zusammenhang der Expression der natriuretischen Peptide und angiogenetischen Wachstumsfaktoren mit dem Alter**

Die Expression der Gene wurde mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode quantifiziert und auf das Housekeeping-Gen 18S normiert. Aufgrund der direkten relativen Quantifizierung ist eine Aussage über das absolute Expressionsniveau nicht möglich. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Median der RV Kontrollen willkürlich gleich eins gesetzt. Dargestellt ist die Expression der Gene gegen das Alter der Patienten bzw. Organspender. Die einzelnen

---

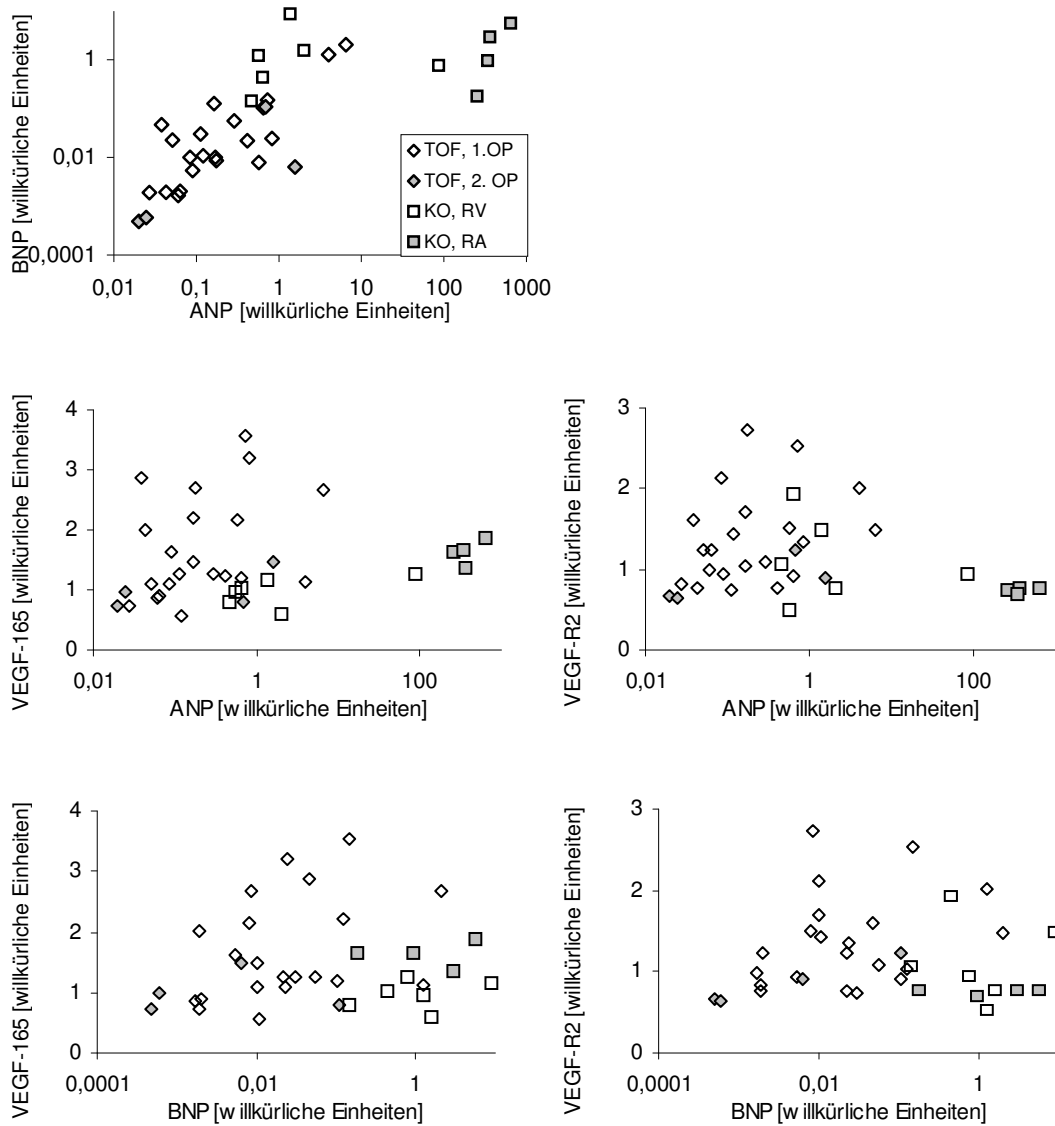
Gruppen (TOF, 1. OP; TOF, 2. OP; KO, RV; KO, RA) sind durch verschiedene Symbole kodiert.

Betrachtet man die Zusammenhänge der Genexpressionen untereinander, fallen einige Korrelationen auf.

ANP und BNP korrelierten stark positiv miteinander, wobei die rechtsatrialen Kontrollproben ein eigenes Cluster mit überproportional höherem ANP-Expressionsniveau bildeten (Abbildung 28).

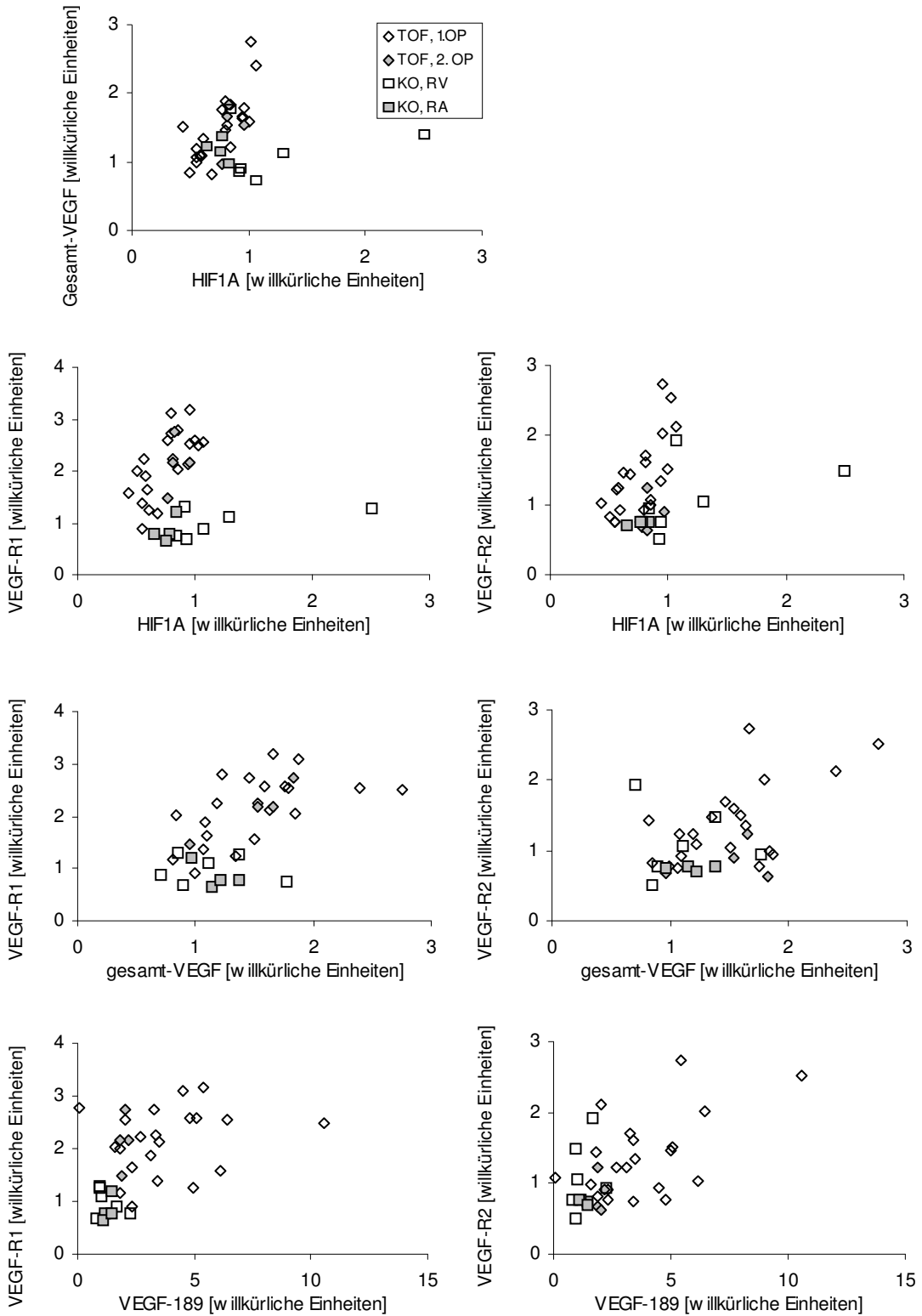
Weitere positive Korrelationen zwischen ANP bzw. BNP und VEGF-165 bzw. VEGF-R2 konnten nachgewiesen werden. Wieder bildeten die hohen ANP-Werte ein eigenes Cluster, aber auch bei Analyse lediglich der TOF-Proben ergaben sich Signifikanzniveaus mit  $p < 0,05$  (Abbildung 28).

Starke positive Korrelationen fanden sich zwischen HIF1A und Gesamt-VEGF, VEGF-R1 bzw. VEGF-R2 (Abbildung 29). Diese fielen bei Auswertung ohne den Ausreißer zwar geringer, jedoch immer noch signifikant aus. Weitere Korrelationen fanden sich zwischen Gesamt-VEGF und VEGF-121, VEGF-R1 bzw. VEGF-R2, sowie zwischen allen möglichen Kombinationen der VEGF-Isoformen 121, 165 und 189 (nicht abgebildet). Es fiel auf, dass VEGF-R1 und -R2 mit Gesamt-VEGF und VEGF-189 korrelierten, nicht jedoch mit den Isoformen 121 und 165 (Abbildung 29). HIF1A korrelierte mit beiden Rezeptoren, wobei die Kontrollen eigene Cluster bildeten (Abbildung 29). Auch bei getrennter Betrachtung der TOF- und der Kontroll-Proben blieb die Korrelation bestehen. Die beiden VEGF-Rezeptoren untereinander korrelierten nicht.



**Abbildung 28: Zusammenhänge der Expressionen der natriuretischen Peptide untereinander und mit den angiogenetischen Wachstumsfaktoren**

Darstellung wie oben



**Abbildung 29: Zusammenhänge der Expressionen der angiogenetischen Wachstumsfaktoren untereinander**

Darstellung wie oben.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 METHODE

#### 6.1.1 Prä-PCR

Das Hauptziel der Optimierung und Evaluation der Prä-PCR-Protokolle war vor dem Hintergrund der Vorversuche neben dem Erreichen einer gDNA-Freiheit der isolierten RNA vor allem die Minimierung genspezifischer methodischer Fehler, da sich diese im Gegensatz zu globalen Fehlern nicht kompensieren lassen, indem man sie erfasst und mathematisch ausgleicht.

Durch Umstellung des Protokolls für die RNA-Isolierung und Einfügen eines DNase-Verdau konnte eine nahezu vollständige Freiheit der RNA von gDNA erreicht werden. Die Kontrolle erfolgte durch eine neu etablierte Methode zur Messung der gDNA durch Quantifizierung des single-copy Gens cMYC mittels Real-Time PCR. Durch die hohe Reinheit der RNA wurde neben der genauen Messung der Intronlosen Gene 18S und RPLP0 auch die Bestimmung der Gesamt-cDNA-Konzentration erst möglich.

Es konnte belegt werden, dass die Reverse Transkription die entscheidende Quelle für globale und vor allem genspezifische methodische Fehler bei der Genexpressionsanalyse mittels Real-Time PCR darstellt. Eine Denaturierung ohne Primer und dNTPs erhöhte die Streuung der RT, eine zu hohe Konzentration der dNTPs verringerte die RT-Effizienz, die Kombination verschiedener Protokolländerungen führte zu einem überadditivem Effekt. Hierbei kam es zu einem von Gen zu Gen unterschiedlich stark ausgeprägtem Abfall der RT-Effizienz um einen Faktor von bis zu 35.000 für 18S. Bei höheren RNA-Konzentrationen sank die RT-Effizienz, auch hier waren verschiedene Gene verschieden stark betroffen. Die RT kann also Quelle zahlreicher nicht kompensierbarer, genspezifischer methodischer Fehler sein.

Die Bedeutung der RT ist zwar in verschiedenen Studien betrachtet worden (O'Driscoll 1993, Deprez 2002, Stahlberg 2004), jedoch fehlen standardisierte Empfehlungen zur Wahl eines Protokolls. So finden sich Arbeiten, die auf den Denaturierungsschritt komplett verzichten (Oleksiewicz 2001, Lossos 2003), diesen ohne Primer durchführen (Faneyte 2001, Stahlberg 2004) oder auf die Angabe dieser Details verzichten (Moniotte 2001).

Die Tatsache, dass vor allem bei 18S Schwankungen der RT-Effizienz um einen Faktor bis 35.000 auftreten, deckt sich mit unseren Hypothesen zum Einfluss der Sekundärstruktur auf die RT-Effizienz. Dies ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass 18S aus zytobiologischer Sicht als der Goldstandard unter den Housekeeping-Genen angesehen wird (Bustin 2000).

Der Einfluss verschiedener Priming-Strategien wurde in dieser Studie nicht untersucht. Die Verwendung von Random Hexamer Primern stellte den einzigen Weg dar, 18S in die Studie einzuschließen und eine Messung der Gesamt-RNA zu ermöglichen. Bei Verwendung von Oligo(dT) Primern oder genspezifischen Primern hätte lediglich mRNA, entsprechend etwa 2% der Gesamt-RNA, bzw. nur ein spezifisches Gen transkribiert werden können. Der Effekt verschiedener Priming-Strategien wurde in mehreren Studien untersucht (Lekanne Deprez 2002, Stahlberg 2004). Diese zeigten einen genspezifischen Einfluss der Primer-Wahl auf die absolute Höhe und die Streuung der RT-Effizienz. Dies bestätigt nochmals unsere Annahme, dass die RT der entscheidende Faktor für genspezifische methodische Fehler darstellt. Stahlberg et al konnten keine allgemeingültige Empfehlung zur Wahl der Primer geben, der optimale Weg war von Gen zu Gen verschieden. Lekanne Deprez et al erzielten die besten Ergebnisse mit spezifischen oder Oligo(dT) Primern. Es ist jedoch festzuhalten, dass in dieser Studie wie bei zahlreichen anderen 1µg RNA in einem Ansatz von 25 µl revers transkribiert wurde, die RNA-Konzentration also bei 40 ng/µl liegt, ein Bereich in dem nach unseren Daten die RT-Effizienz bereits deutlich abfällt. Aufgrund der Quantifizierung der Gesamt-RNA war es möglich, die absolute RT-Effizienz zu berechnen. Diese lag im Mittel bei 70,3%. Das vorliegende Protokoll mit der gewählten RNA-Konzentration von 5 ng/µl liegt also nahe am Optimum der RT. Es kann daher angenommen werden, dass eine Verwendung von Random Hexamer Primern mit diesem Protokoll nicht mit großen Nachteilen behaftet sein kann.

Insgesamt führte die Optimierung und Evaluation der Prä-PCR zu einem Protokoll, dass genspezifische methodische Fehler stark minimieren kann.

Durch Hinzugabe der Primer und der dNTPs zur Denaturierung sowie eine im Vergleich zu anderen Studien niedrige RNA-Konzentration von 5 ng/µl konnte eine hocheffiziente RT mit geringer Streuung erreicht werden. Für die RT der klinischen Biopsien wurde im Vergleich zu den Versuchen zur Protokolloptimierung das Volumen des Ansatzes von 20 µl auf 100 µl erhöht. Theoretisch wird die Standardabweichung der RT dadurch um einen Faktor von  $\sqrt{5}$ , also etwa 2,2 erniedrigt. Manche Autoren empfehlen zur Verringerung der Streuung einen 3- oder

5-fachen RT-Ansatz (Stahlberg 2004), durch die Erhöhung des Volumens wird jedoch den gleichen Effekt bei weniger Aufwand und Kontaminationsgefahr erzielt. Zahlreiche Qualitätskontrollen wurden implementiert: Negativ-Kontrollen konnten Cross-Kontaminationen ausschließen, die spektralphotometrische Analyse zeigte eine nur geringe Kontamination der RNA mit Proteinen, die Gelelektrophorese zeigte allenfalls eine leichte Degradation der RNA, die durch die geringe Länge der Amplikons in der Real-Time PCR für die weitere Analyse jedoch keine Rolle spielte.

Der Effekt der gesamten Prä-PCR auf mögliche genspezifische methodische Fehler wurde quantitativ erfasst, indem in sechsfachem Ansatz aus benachbarten Fragmenten eines explantierten humanen Herzens cDNA hergestellt wurde und anschließend PBGD und 18S quantifiziert wurden. Der Variationskoeffizient lag für PBGD bei 19,3%, für 18S bei 20,3%. Hierbei ist zu beachten, dass diese Werte eine mögliche biologische Variation der benachbarten Myokardfragmente mit einschließen. Im Vergleich zu den in dieser Studie gezeigten Fehlern durch die Wahl eines falschen Prä-PCR-Protokolls bis zu einem Faktor von 35.000 konnte mit dem gewählten Protokoll also eine sehr zufriedenstellende Streuung erreicht werden. Diese unterschied sich bei PBGD und 18S nicht, obwohl diese in Hinsicht auf ihr Expressionsniveau und die Sekundärstrukturen von 18S zwei Extreme im Panel der untersuchten Gene darstellen. Hinweise auf verbleibende starke genspezifische methodische Fehler ergeben sich nach Optimierung des Protokolls also nicht. Betrachtet man die Streuung der gesamten Prä-PCR und die in Abschnitt 5.3 dargestellten Inter- und Intra-Assay-Variabilität der Real-Time PCR, so ist festzuhalten, dass sich diese nunmehr in der gleichen Größenordnung befinden. Der Prä-PCR nach dem hier entwickelten Protokoll fällt also nicht mehr die Rolle der Hauptfehlerquelle bei der Real-Time PCR zu.

Die so optimierten Protokolle fanden bereits Eingang in verschiedene Studien (Wilda 2004, Hilgendorff 2003).

### 6.1.2 cDNA-Quantifizierung

Zur Evaluation potentieller Housekeeping-Gene für die Real-Time PCR sollte ein Protokoll entwickelt werden, das durch die Quantifizierung einzelsträngiger cDNA (ss cDNA) den Ausgleich globaler methodischer Fehler während des Evaluationsprozesses ermöglicht.

Die größte Schwierigkeit beim Erstellen eines solchen Protokolls stellte die Heterogenität des RT-Produktes dar, das neben der ss cDNA zahlreiche andere Bestandteile enthielt, die die Messung hätten verfälschen können. Durch die Optimierung der RNA-Isolierung war es bereits im Vorfeld möglich, die Kontamination mit gDNA bis auf minimale Reste (kleiner als 0,02%) auszuschließen. Zur Entfernung der verbliebenen RNA, die in cDNA-RNA-Hybriden als doppelsträngige Nukleinsäure einen starken Einfluss auf das OliGreen-Signal hätte haben können, wurden Denaturierungsschritte, ein RNase-Verdau und eine Aufreinigung in das Protokoll aufgenommen. Die Effizienz des RNase-Verdau konnte in Vorversuchen gezeigt werden, die Aufreinigung mit Hilfe des PCR Purification Kits erwies sich auch für die verwendeten niedrigen Nukleinsäure-Konzentrationen als eine Methode, mit der reproduzierbar 70% der cDNA wiedergewonnen werden konnte.

Die Quantifizierung der ss cDNA mit Hilfe von OliGreen und dem SDS 7700 war linear über einen Bereich von zwei Zehnerpotenzen. Dies ist sicherlich ein deutlich schmalere Messbereich als beispielsweise der der Real-Time PCR. Da jedoch die cDNA-Menge im RT-Produkt aufgrund des optimierten Prä-PCR-Protokolls nur innerhalb einer Zehnerpotenz schwankt (siehe Abschnitt 5.1.2), schränkt dieser Umstand die Bedeutung der Methode für die hier beschriebene Anwendung nicht ein. Anhand der Analyse der Rohspektren kann als Grund für den geringen linearen Messbereich eine Hypothese generiert werden: Der Messbereich liegt zwischen dem Punkt, an dem die Fluoreszenz von OliGreen sich aus dem Hintergrundrauschen abhebt, und dem Punkt, an dem die maximale Fluoreszenz von OliGreen in Anwesenheit von Nukleinsäuren erreicht ist. Der letzte Punkt ist festgelegt durch die Eigenschaften von OliGreen, der erste Punkt ist vor allem vom verwendeten Gerät abhängig. Im Gegensatz zu einem reinen Spektrofluorometer ist die Messung im SDS 7700 durch Umleitung der Signale über Glasfaserkabel in kurzen zeitlichen Abständen in 96 Reaktionsgefäßen möglich. Das Gerät stellt daher einen Kompromiss aus Miniaturisierung und Güte der gemessenen Rohspektren dar. Ein

vollwertiges Spektrofluorometer würde also sicherlich eine niedrigere signal-to-noise-ratio und damit ein breiteres Messspektrum ermöglichen. Das in dieser Arbeit etablierte Protokoll kommt jedoch mit genau dem Gerät aus, das für die Real-Time PCR ohnehin zur Verfügung steht. Aufgrund dieses Vorteils wurde auf eine Optimierung des Messbereichs durch Anschaffung eines Spektrofluorometers verzichtet.

Die intra- und inter-Assay Variabilitäten der Quantifizierung mit OliGreen und dem SDS 7700 ohne die vorherige Aufreinigung der ss cDNA sowie die Variabilität der gesamten Quantifizierung lagen allesamt unter 5%. Die Methode ist somit in hohem Maße stabil.

Parallel zum Fortschritt dieser Studie wurden zwei Arbeiten publiziert, in denen mit Hilfe von PicoGreen, einem mit OliGreen eng verwandten Fluoreszenzfarbstoff, ebenfalls ss cDNA bei der Evaluation von Housekeeping-Genen quantifiziert wurde. Whelan et al verzichteten auf die Verwendung von Housekeeping-Genen und empfehlen als Bezugspunkt bei der relativen Quantifizierung die Menge der in die Real-Time PCR eingesetzten cDNA, die mit Hilfe von PicoGreen und dem SDS 7700 quantifiziert werden soll (Whelan 2003). Bei genauerer Betrachtung fallen jedoch einige Aspekte auf, die hinterfragt werden sollten: Zum einen fand auf dem SDS 7700 keine interne Kalibrierung mittels einer passiven Referenz wie RhoX6 statt, hier stellt sich also die Frage, ob ein vermeidbarer Fehler in die Methode eingebracht wurde. Der zweite Kritikpunkt liegt darin, dass Whelan et al einzelsträngige cDNA gemessen haben, hierfür jedoch mit PicoGreen nicht nur einen für doppelsträngige DNA optimierten Fluoreszenzfarbstoff verwendet haben, sondern auch darauf verzichtet haben, verbleibende RNA, Salze oder organische Lösungsmittel zu entfernen. Obwohl die Kontamination mit gDNA durch einen DNase-Verdau der RNA kontrolliert wurde, konnten somit zahlreiche Bestandteile des RT-Produktes die Quantifizierung mittels PicoGreen verfälschen. Insbesondere doppelsträngige Nukleinsäuren wie RNA-cDNA-Hybride sind hier zu beachten, da PicoGreen wie OliGreen um den Faktor 10 bis 20 stärker auf doppelsträngige als auf einzelsträngige Nukleinsäuren reagiert.

Lossos et al führten ähnlich wie in dieser Arbeit eine Evaluation verschiedener potentieller Housekeeping-Gene durch. Dabei bezogen sie die Expression der verschiedenen Gene jeweils entweder auf die Konzentration der RNA vor der RT (gemessen mittels eines Spektralphotometers) oder auf die Konzentration der cDNA nach RT (gemessen mit Hilfe eines Protokolls auf der Basis von PicoGreen). Die

Schwankungsbreite der so gebildeten Quotienten diene zur Auswahl des besten Housekeeping-Gens. Die Arbeitsgruppe stellt nun fest, dass die Schwankungen bei Bezug auf die RNA allgemein geringer sind als beim Bezug auf die cDNA. Sie führt dies auf methodische Unzulänglichkeiten der cDNA-Quantifizierung zurück und empfiehlt daher diese Methode nicht (Lossos 2003). Bei genauer Betrachtung des Protokolle fällt jedoch auf, dass auch diese Arbeitsgruppe einzelsträngige ss cDNA quantifizierte, ohne die Kontamination des RT-Produktes mit doppelsträngigen Nukleinsäuren oder anderen Bestandteilen zu berücksichtigen, die die Messung mit PicoGreen verfälschen könnten. Insbesondere wurde die RNA mit RNeasy isoliert, also jenem Protokoll also, das in unseren Vorversuchen RNA mit große Mengen kontaminierender gDNA isoliert hat. Auf einen DNase-Verdau verzichteten Lossos et al ebenso wie auf eine Strategie zur Beseitigung von RNA-cDNA-Hybriden oder anderer Störfaktoren. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Arbeit zu dem Ergebnis kommt, dass die Quantifizierung der ss cDNA nach dem dort beschriebenen Protokoll nicht zu befriedigenden Ergebnissen führt.

Im Gegensatz zu Lossos et al konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Bestimmung einzelsträngiger cDNA im heterogenen RT-Produkt möglich ist. Dies spiegelt sich auch beim Vergleich der Normierung der Housekeeping-Gen-Expression auf die RNA-Konzentration vor RT oder auf die ss cDNA-Konzentration nach RT wieder. Im zweiten Fall fiel die Streuung geringer aus als im ersten (siehe Abbildung 20 und Tabelle 8).

Mit Hilfe des neu etablierten Protokolls war es möglich, verschiedener potentielle Housekeeping-Gene zu evaluieren und dabei globale methodische Fehler in allen Schritten der Prä-PCR auszugleichen. Dieses Vorgehen auf Basis des neuen Protokolls wurde bereits in verschiedenen Arbeiten angewendet (Wilda 2002, Wilda 2004, Hilgendorff 2003).

Im Rahmen von Studien mit einer kleinen Anzahl von Proben wäre es durchaus denkbar, auf die Verwendung eines Housekeeping-Gens ganz zu verzichten und die relative Quantifizierung der Zielgen-Expression auf Basis der cDNA-Konzentration durchzuführen, wie sie mit Hilfe von OliGreen bestimmt werden kann. Es muss jedoch beachtet werden, dass das neu etablierte Protokoll arbeitsintensiv ist. Daher erscheint es bei größeren Studien nach wie vor gerechtfertigt, mit Hilfe von OliGreen zunächst Housekeeping-Gene anhand einer Auswahl von Proben zu evaluieren und im Anschluss dann wie gewohnt auf Basis der Housekeeping-Gen-Expression relativ zu quantifizieren.

### 6.1.3 Real-Time PCR

Für die Mehrzahl der in dieser Studie unersuchten Gene wurden gemäß den Richtlinien neue Primer und Sonden für die Real-Time PCR entworfen und die optimalen Konzentrationen ermittelt. Für die Gene GAPDH, 18S, RPLP0, B2M und GUSB wurden Predeveloped Assays verwendet. Die neu etablierten Primer zeigten in der konventionellen PCR keine unspezifische Amplifikation.

Die PCR-Effizienz wurde für alle Sets von Primern und Sonden bestimmt, und zwar sowohl anhand der mit den klinischen Proben vergleichbaren Kalibrator-cDNA als auch, soweit verwendet, anhand der Plasmid-Standardkurven. Die PCR-Effizienzen errechneten sich zwischen 91,6% und 104,4%, in den meisten Fällen jedoch zwischen 95% und 100%. Werte über 100% sind natürlich nicht möglich und stellen somit einen Messfehler dar. Es sei jedoch auf Folgendes hingewiesen: Die in Abschnitt 2.3.2 erläuterte Wahl der Baseline- und Threshold-Parameter durch den Benutzer hat in gewissen Grenzen Folgen für die Ct-Werte und somit auch für die Steigung von Standardkurven und die sich daraus ergebende PCR-Effizienz. Auf die durchaus nicht unübliche Praxis, Baseline und Threshold gezielt so zu wählen, dass sich lediglich Effizienzen knapp unter 100% ergeben, wurde bewusst verzichtet. Um die Ergebnisse nicht zu verfälschen, wurden die oben beschriebenen Regeln in Unkenntnis der sich daraus ergebenden Effizienzen befolgt.

Die Intra- und Inter-Assay-Variabilitäten der Real-Time PCRs für die potentiellen Housekeeping-Gene lagen zwischen 5,0% und 10,6% bzw. 4,9% und 14,7%. Schätzungen für die Zielgene, bei denen in Ermangelung einer absoluten Quantifizierung keine präzisen Werte ermittelt werden konnten, ergaben Schätzungen vergleichbare Werte. Es ist auffällig, dass die Werte für die Inter-Assay-Variabilität stärker schwankten und tendenziell niedriger lagen als die der Intra-Assay-Variabilität. Eine Erklärung für die erste Beobachtung könnte die kleinere Anzahl an Wiederholungen (drei versus acht) sein. Bezüglich der Inter-Assay-Variabilität ist zu beachten, dass bei dieser Schätzung drei Mittelwerte jeweils einer Achtfachmessung auf einer 96-Well-Plate verwendet wurden. Hierdurch kann ein Teil der Intra-Assay-Variabilität bei der Schätzung der Inter-Assay-Variabilität ausgeglichen werden (genau genommen wird der Anteil theoretisch um den Faktor  $\sqrt{8}$  reduziert). Festzuhalten bleibt also, dass die Inter-Assay-Variabilität niedriger ist als die Intra-Assay-Variabilität. Die Schwankung von Well zu Well ist also die größte Fehlerquelle der Real-Time PCR. Als Kandidat für einen Verursacher dieser Fehler ist

am ehesten das Vorlegen einer definierten Menge cDNA (in der Regel 1  $\mu$ l) auf die 96-Well-Plate zu sehen. Im Gegensatz zu allen anderen Einflussfaktoren gibt es hierbei nämlich keinerlei Kompensation, wie sie beispielsweise beim Mastermix durch Bildung des Quotienten der einzelnen Farbstoffe gegeben ist. Das Vorlegen der cDNA auf die Platte ist somit wahrscheinlich die entscheidende Fehlerquelle der Real-Time PCR selbst.

Wie in Abschnitt 5.1 diskutiert, liegt die Variabilität der Prä-PCR in der vorliegenden optimierten Form zwar noch leicht über der Real-Time PCR selbst, sie befindet sich nunmehr jedoch in der gleichen Größenordnung. Die Prä-PCR konnte also durch Optimierung in ihrer Rolle als größte potentielle Fehlerquelle der Genexpressionsanalyse mittels Real-Time PCR zurückgedrängt werden.

Die Überprüfung der Spezifität der Real-Time PCR auf mRNA- bzw. cDNA-Sequenzen lieferte für nahezu alle Gene negative Ergebnisse für die gDNA-Kontrollen. Lediglich bei den beiden Intron-losen Genen 18S und RPLP0 waren Signale für gDNA nachzuweisen, die jedoch konservativ geschätzt weniger als 0,1% des zu erwartenden Signals für cDNA ausmachten. Diese vermeintliche Spezifität der Intron-losen Gene 18S und RPLP0 für RNA-Sequenzen (d.h. die geringe Verfälschung des mRNA-Signals durch gDNA) kann jedoch nicht in der Wahl der Sonden begründet sein. Vielmehr ist zu beachten, dass in einer Zelle, in der ein Gen transkribiert wird, diese Transkripte natürlich in viel höherer Zahl vorliegen als die genomische Sequenz, die bei Single-Copy Genen ja genau zweimal pro Chromosomensatz vorzufinden ist. Somit ist selbst ein mögliches falsch positives Signal für gDNA meist deutlich kleiner als das richtig positive Signal für cDNA. Lediglich eine größere Anzahl Pseudogene, die ausreichend homolog sein müssten, könnten diese günstige Relation stören (Bustin 2000). Bei 18S und RPLP0 war dies nicht der Fall.

#### 6.1.4 Die Sensitivität der Real-Time PCR und ihre diagnostische Bedeutung

Zur Sensitivität und in zweiter Linie zur Präzision der Real-Time PCR hatten wir die Hypothese aufgestellt, dass die Real-Time PCR bei einer niedrigen erwarteten Anzahl von cDNA-Molekülen so sensitiv und präzise messen könne, dass sie die Vorhersagen für die tatsächliche Verteilung der Moleküle, wie sie durch die Poisson'schen Verteilung gegeben werden, exakt abbilden werde. Für die Erwartungswerte 1, 2, 4 und 8 Kopien einer MLL-Plasmids pro PCR-Reaktion konnten die Vorhersagen dieser Hypothese bestätigt werden.

Die Messung einer niedrigen erwarteten Anzahl von cDNA-Molekülen, egal mit welcher Methode, stellt die Messung einer diskreten Größe dar. Ein erwartetes Molekül ist entweder in einem Versuchsansatz vorhanden (und somit prinzipiell einer Messung zugänglich) oder nicht. Die Wahrscheinlichkeiten für das tatsächliche Vorhandensein eines Moleküls in einer Stichprobe wird durch die Poisson'sche Verteilung beschrieben. Diese stochastischen Effekte sind nicht abhängig von der Sensitivität oder Präzision einer Messmethode, sondern stellen sozusagen eine intrinsische Ungenauigkeit von Stichproben bei niedrigen erwarteten Werten dar. Keine Methode, sei sie auch noch so gut, kann besser messen, als durch diese „Untergrenze“ vorgegeben.

Vor diesem Hintergrund ist umso beeindruckender, dass gezeigt werden konnte, dass die Real-Time PCR im Bereich dieser Untergrenze so sensitiv und präzise messen kann, dass sie selbst keinen größeren zusätzlichen Fehler einbringt (sprich: die Poisson'sche Verteilung nachvollzieht). Bisherige Arbeiten hatten präzise Messungen im Bereich von 10 Kopien/Reaktion sowie die grundlegende Möglichkeit von Messungen im Bereich von 1 Kopie/Reaktion nachgewiesen (Lockey 1998). Wir konnten nun zeigen, dass bei 1 bis 8 Kopien/Reaktion nicht nur die Sensitivität, sondern auch die Präzision gegeben ist, um die durch die Stochastik vorgegebene Ungenauigkeit bei Messungen in dieser Größenordnung nachvollziehen zu können. Angemerkt sei hierbei, dass anhand der Poisson'schen Verteilung auch Rückschlüsse möglich sind über die Stichprobengröße, die mindestens nötig ist, um bestimmte Konzentrationen mit einer bestimmten Sicherheit voneinander unterscheiden zu können. Um beispielsweise 1 von 2 Kopien/Reaktion, 1 von 4 Kopien bzw. 1 von 10 Kopien mit einem Typ I Fehler von  $\alpha=0,05$  unterscheiden zu können, muss die Stichprobengröße mindestens 19,7 bzw. 3 betragen (Rasch 1996).

Unsere Ergebnisse haben direkte klinische Relevanz für alle Felder, in denen die Real-Time PCR in solch niedrigen Konzentrationsbereichen zur Diagnostik eingesetzt wird.

Als Beispiel sei die Auswahl der Methoden zum Nachweis einer Minimal Residual Disease (MRD) in der Onkologie erwähnt. So haben beispielsweise Guo et al klinische Proben, die mit der Real-Time PCR negativ auf ein bestimmtes Onkogen getestet worden waren, mit Hilfe einer Nested PCR erneut getestet und hier positive Ergebnisse erhalten. Bei einer solchen Konstellation stellt sich natürlich die Frage, ob die Real-Time PCR tatsächlich falsch negative Ergebnisse geliefert hatte, wie von den Autoren postuliert, oder ob die Nested PCR falsch positive Ergebnisse ergeben hatte. Es muss zwar angemerkt werden, dass in der Studie von Guo et al ein anderes Onkogen untersucht wurde als in dieser Arbeit, und unsere Ergebnisse nicht unbedingt auf ein anderes Gen bzw. Amplikon übertragbar sein müssen. Unsere Ergebnisse legen jedoch nahe, dass die Real-Time PCR allgemein so sensitiv ist, dass ihre Ungenauigkeit zum überwiegenden Teil durch die Stochastik und nicht durch die Messung selbst bedingt ist. Es erscheint daher zumindest fraglich, ob eine andere Methode eine wesentlich höhere Sensitivität erreichen kann. Auf der anderen Seite stellt die Nested PCR eine arbeitsintensive Methode dar, bei zahlreiche Möglichkeiten zur Cross-Kontamination existieren, so dass falsch positive Ergebnisse denkbar erscheinen.

Für die klinische Diagnostik geringer Konzentrationen spezifischer Nukleinsäuren schlagen wir daher vor, für alle relevanten Amplikons die Verwendung der Real-Time PCR zu erwägen und bei Vorhandensein mehrerer alternativer Methoden diese sorgfältig gegeneinander abzuwägen. Hierbei ist besondere Sorgfalt angebracht, da beispielsweise die Diagnostik der MRD direkte therapeutische Konsequenzen hat. Experimente analog Protokoll 19 sind für diese Überprüfung geeignet (Rawer 2003).

### 6.1.5 Housekeeping-Gene

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der drei Housekeeping-Gene 18S, PBGD und CASQ2 sowohl eine geringe Variationsbreite als auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (TOF, 1. OP, TOF, 2. OP, rechtsventrikuläre Kontrollen, rechtsatriale Kontrollen) aufwies. Beziehungen zu den untersuchten klinischen Parametern ergaben sich nicht. Für die Genexpressionsanalyse am Myokard von Patienten mit TOF kann daher gesagt werden, dass diese Gene valide Housekeeping-Gene darstellen.

Andere potentielle Housekeeping-Gene wiesen entweder signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (HPRT, ABL, B2M), eine große Variationsbreite (GAPDH) oder beides (GUSB, RPLP0, TNNI3) auf. Von der Verwendung dieser Gene als Housekeeping-Gene muss zumindest für Studien an Patienten mit TOF abgeraten werden.

Die Anwendung dieser Gene für verschiedene Studien an humanem Myokard bei anderen Erkrankungen als der TOF muss vor dem Hintergrund der vorliegenden Daten kritisch betrachtet werden. Hierbei ist zu beachten, dass Ergebnisse der Evaluation von Housekeeping-Genen für eine bestimmte Gruppe von Proben nicht ohne weiteres auf ähnliche Proben übertragbar sind. Grundsätzlich müssen für jede Studie, die sich das erste Mal mit einem bestimmten Typ von Gewebeproben beschäftigt, potentielle Housekeeping-Gene evaluiert werden. Beziehen sich Folgestudien auf ein vergleichbares Patienten- oder Proben-Kollektiv, so kann und sollte jedoch auf diese Ergebnisse zurückgegriffen werden.

HPRT, ABL und GAPDH wurden für humanes transplantiertes Myokard und isolierte Cardiomyozyten evaluiert und für valide befunden (Moniotte 2001). In dieser Studie wurden die Housekeeping-Gene während der Evaluation auf die Gesamt-RNA und nicht auf die Gesamt-RNA nach RT bezogen. Es könnte daher interessant sein, für vergleichbare Proben eine Evaluation der Housekeeping-Gene mit Hilfe des nun etablierten Protokolls zur Messung von ss cDNA zu wiederholen.

Die Anwendung von Housekeeping-Genen ohne vorherige Evaluation ist auf jeden Fall abzulehnen. Obwohl die nun vorliegenden Ergebnisse nicht ohne weiteres übertragbar sind, sollten verschiedene Studien kritisch betrachtet werden: TNNI3 wurde beispielsweise ohne vorherige Evaluation in humanem adultem versagendem Myokard verwendet (Razeghi 2002). In der vorliegenden Arbeit erwies sich TNNI3 als ein nicht valides Housekeeping-Gen mit starker Variationsbreite, Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen und einem verfälschenden Effekt auf die Ergebnisse

für die Zielgene, der so weit gehen konnte, dass sich für VEGF-R1 mit TNNI3 als Housekeeping-Gen die Ergebnisse sogar umkehrten (siehe Abbildung 25). GAPDH wurde ohne Evaluation in zahlreichen Studien verwendet: in humanem Myokard von Patienten mit Aortenstenose (Fielitz 2002), in humanem Myokard bei Hypertropher Cardiomyopathie (Somura 2001), in volumenbelastetem Rattenherz (Kuwahara 2002) oder in neonatalem und adultem Myokard der Maus (Schoenfeld 1998). Für die untersuchten Proben der Patienten mit TOF und den Kontrollen erwies sich GAPDH als ein nicht valides Housekeeping-Gen mit starker Variationsbreite, welches die Ergebnisse für Zielgene so stark verfälschen kann, dass Gruppenunterschiede nicht mehr nachweisbar waren (siehe Abbildung 25).

Für die vorliegende Arbeit wurden 18S, PBGD und CASQ2 als alternative Housekeeping-Gene verwendet. Die Ergebnisse der Zielgene unterschieden sich dabei nicht, so dass für die Zielgene nur die Ergebnisse für 18S als Housekeeping-Gen dargestellt wurden.

Die Frage, ob es für humanes Myokard Housekeeping-Gene gibt, die unter verschiedensten pathophysiologischen Bedingungen bzw. bei verschiedensten Erkrankungen stabile und valide Housekeeping-Gene darstellen, muss in zukünftigen Studien geklärt werden. Für andere Gewebetypen haben Studien jüngerer Zeit jedoch die Annahme bestätigt, dass es schwierig ist, Housekeeping-Gene zu finden, die unter verschiedensten Bedingungen konstant exprimiert sind (Haller 2004, Tricarico 2002, Radonic 2004). Dies unterstreicht die Bedeutung der fallweisen Evaluation.

Verschiedene Situationen sind denkbar, unter denen eines von mehreren etablierten Housekeeping-Gene vorteilhafter sein könnte:

Sollen in einem Reaktionsgefäß der Real-Time PCR gleichzeitig ein Ziel- und ein Housekeeping-Gen quantifiziert werden (so genanntes Multiplexing), so ist es aus Gründen der PCR-Kinetik sinnvoll, dass beide Gene ein vergleichbares Expressionsniveau haben. Hierbei stellen PBGD, CASQ2 und 18S drei Gene dar, die einen sehr breiten Bereich von Expressionsniveaus abdecken. Je nach Zielgen könnte daher eines der drei Housekeeping-Gene ausgewählt werden.

CASQ2 wird in relevantem Maß nur in Cardiomyozyten exprimiert (Somura 2001). Ein solches Zelltyp-spezifisches Housekeeping-Gen kann bei heterogenen Geweben von Vorteil sein, wenn das zu untersuchende Zielgen spezifisch im selben Zelltyp exprimiert wird. Fehler durch verschiedene Anteile verschiedener Zellen, wie sie sich beispielsweise durch nicht genau steuerbare Probenentnahme ergeben könnte, würden so nicht erfasst (Zu bedenken ist dabei jedoch auch, dass genau dieser Fehler

bei der Etablierung des Zelltyp-spezifischen Housekeeping-Genes ausgeglichen werden muss). Myokard stellt ein recht homogenes Gewebe dar, das zum überwiegenden Teil aus Cardiomyozyten besteht. Für die vorliegende Arbeit ergibt sich also kein relevanter Vorteil von CASQ2. Wenn jedoch beispielsweise Proben aus vernarbtem Myokard nach einem Myokardinfarkt oder kleine subendokardiale Myokardbiopsien mit einem relevanten Anteil an Endokard untersucht werden sollten, so könnte CASQ2 ein 18S oder PBGD überlegendes Housekeeping-Gen sein.

Stehen mehr als ein valides Housekeeping-Gen zur Verfügung, so kann man, wie in dieser Arbeit geschehen, die Zielgene nacheinander auf die verschiedenen Housekeeping-Gene beziehen. Sind tatsächlich alle Housekeeping-Gene valide, so werden sich die Ergebnisse für die Zielgene nicht unterscheiden.

Eine Alternative könnte darin bestehen, mehrere Housekeeping-Gene gleichzeitig zu verwenden. Dies könnte bei der absoluten Quantifizierung geschehen, indem zunächst Mittelwerte (besser: geometrische Mittelwerte) der Expression der Housekeeping-Gene gebildet werden, und die Expression des Zielgens dann auf diesen Mittelwert bezogen wird. Bei der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wäre ein analoges Vorgehen möglich. Diese Strategie könnte beispielsweise von Vorteil sein, wenn sich die Suche nach einem validen Housekeeping-Gen als schwierig erweist und keines den Idealvorstellungen nahe genug kommt, um eine ausreichende Genauigkeit bei der Analyse der Zielgene zu erreichen.

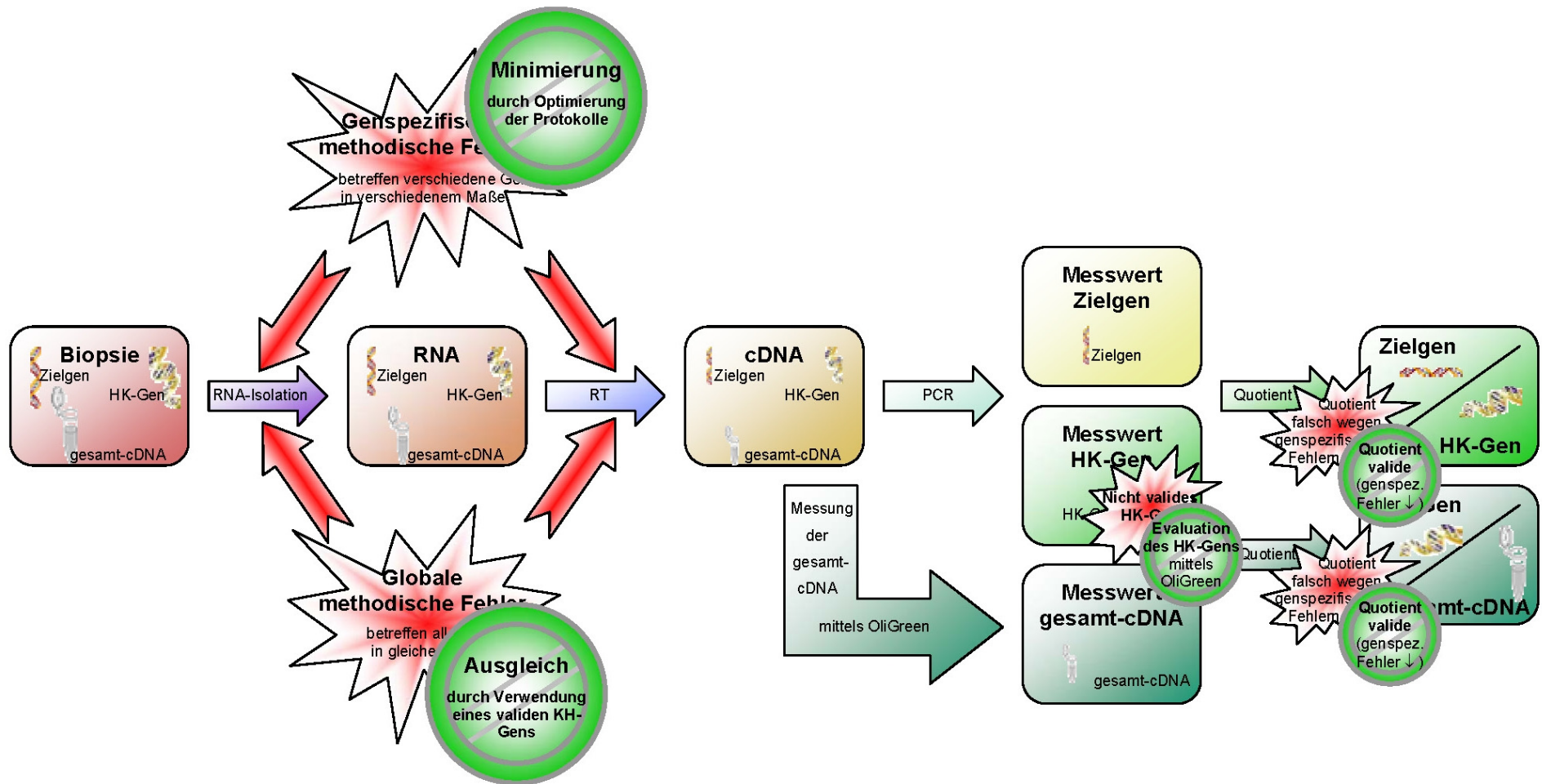
### 6.1.6 Zusammenfassung der methodischen Fortschritte

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die methodischen Fehler in der Real-Time PCR weitgehend zurückgedrängt werden (siehe Abbildung 30).

Globale methodische Fehler in der Prä-PCR können durch die Verwendung eines validen Housekeeping-Gens zurückgedrängt werden. Bei der Evaluation der potentiellen Housekeeping-Gene konnten durch die Entwicklung des neuen Protokolls zur Quantifizierung einzelsträngiger cDNA eben diese globalen methodischen Fehler kompensiert werden, so dass PBGD, CASQ2 und 18S als valide Housekeeping-Gene gefunden werden konnten.

Genspezifische methodische Fehler in der Prä-PCR können nicht durch die Verwendung eines Housekeeping-Gens ausgeglichen werden. Durch die Evaluation und Optimierung der Prä-PCR-Protokolle konnten diese genspezifischen Fehler jedoch um mehrere Größenordnungen minimiert werden. Hierdurch war auch der Ausgleich der globalen methodischen Fehler – entweder durch Bezug des Zielgens auf das Housekeeping-Gen oder des Housekeeping-Gens auf die Gesamt-cDNA-Menge – überhaupt erst mit hinreichender Präzision möglich.

Desweiteren wurden zahlreiche Qualitätskontrollen der einzelnen methodischen Elemente durchgeführt. Wegen des direkten klinischen Bezugs beispielsweise bei der Diagnose und Verlaufskontrolle der MRD ist hierbei der Nachweis der großen Sensitivität der Real-Time PCR von besonderer Bedeutung.



**Abbildung 30: Zusammenfassung der methodischen Fortschritte**

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die methodischen Fehler bei der Real-Time PCR weitgehende zurückgedrängt werden.

## 6.2 EXPRESSIONSANALYSE BEI FALLOTSCHER TETRALOGIE

### 6.2.1 Plausibilität der klinischen Daten

Als Plausibilitätskontrolle für die Güte der erhobenen klinischen Daten konnte zunächst die Betrachtung der Korrelationen dieser Parameter untereinander dienen. Der rechtsventrikuläre enddiastolische Druck korrelierte positiv mit dem rechtsventrikulären Spitzendruck und dem rechtsatrialen Druck. Die arterielle Sauerstoffsättigung korrelierte positiv mit dem Quotienten aus pulmonalem und systemischem Fluss. Dies war auch zu erwarten, denn bei Vorliegen eines rechts-links-Shunts auf Ventrikel Ebene, wie er für TOF typisch ist, fließt Blut vom rechten in den linken Ventrikel. Dadurch fällt der pulmonale Fluss gegenüber dem systemischen Fluss und gleichzeitig fällt natürlich auch die arterielle Sättigung. Der signifikante Altersunterschied der beiden Gruppen mit und ohne Betablocker-Therapie erklärte sich durch den Umstand, dass alle Kontrollproben von älteren Spendern stammten, die nicht mit Betablockern behandelt wurden. Der zunächst signifikante Zusammenhang zwischen dem Alter und dem enddiastolischen rechtsventrikulären Druck hielt einer genaueren Betrachtung allerdings nicht stand. Die Korrelation war nicht mehr nachweisbar, nachdem zwei Ausreißer aus der Auswertung genommen worden waren.

### 6.2.2 Expression der natriuretischen Peptide

Im Rahmen dieser Studie sollte überprüft werden, ob die Expression von ANP und BNP im Myokard von Patienten mit Fallotscher Tetralogie im Sinne einer fetalen Reexpression erhöht ist und ob ein Zusammenhang mit dem rechtsventrikulären Druck oder der arteriellen Sauerstoffsättigung besteht.

Eine höhere Expression von ANP und BNP in den TOF-Proben konnte nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich im Gegenteil eine signifikant niedrigere Expression. Eine Korrelation der Expression von ANP oder BNP mit den rechtsventrikulären und rechtsatrialen Drücken oder der arteriellen Sauerstoffsättigung fand sich nicht.

ANP und BNP vollzogen in den untersuchten TOF- und Kontrollproben grundsätzlich den in der Literatur beschriebenen Verlauf nach. Zunächst fand sich ein Abfall, der sich allerdings bis zum Ende des ersten Lebensjahres erstreckte. Ein erneuter Anstieg zeigte sich in den adulten Kontrollproben sowie in zwei (für ANP) bzw. in einer (BNP) TOF-Probe. Diese beiden Patienten zeigten jedoch keine auffälligen klinischen Parameter. Zusammenfassend konnte also kein signifikanter Wiederanstieg im Sinne einer fetalen Reexpression innerhalb der TOF-Proben festgestellt werden.

ANP und BNP korrelierten sowohl in den TOF- als auch in den Kontrollproben. Dies kann darauf hindeuten, dass sie im Wesentlichen nicht differentiell, sondern co-reguliert sind.

ANP war in den rechtsatrialen Kontrollen gegenüber den rechtsventrikulären Kontrollen deutlich niedriger exprimiert. Dies entsprach den Erwartungen und bestätigt damit die Plausibilität der Genexpressionsanalyse, auch wenn die oben beschriebenen Ergebnisse teilweise nicht den Erwartungen entsprachen.

Es stellt sich nun die Frage, wie die beobachtete erniedrigte Expression von ANP und BNP bei Patienten mit TOF und der nicht nachgewiesene Zusammenhang der Expressionen mit den rechtsventrikulären und rechtsatrialen Drücken sowie der Sauerstoffsättigung einzuordnen ist.

Zunächst muss beim Vergleich der TOF- und der Kontrollproben beachtet werden, dass das Kontrollkollektiv deutlich älter ist als das Kollektiv der Patienten mit Fallotscher Tetralogie. Es können daher nur eingeschränkte Schlussfolgerungen gezogen werden, sichere Aussagen zu Gruppenunterschieden können nicht gemacht werden. Vor dem Hintergrund des physiologischen Verlaufes des ANP- und BNP-

Plasmaspiegels (im Säuglingsalter zunächst abfallend, im Alter wieder zunehmend) hätte eine stark erhöhte Expression von ANP und BNP die Alterseffekte vielleicht überkompensieren können und dadurch auch sichtbar werden können in der altersheterogenen Gruppe der TOF-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen, die von wesentlich älteren Spendern stammten. Dies war jedoch nicht der Fall. Eine tatsächlich erhöhte Expression ist somit unwahrscheinlich. Die Frage, ob es sich bei der nachgewiesenen verminderten Expression lediglich um einen Alterseffekt oder einen Effekt der Fallotschen Tetralogie handelt, kann aber nicht sicher beantwortet werden.

Auch stellt sich die Frage, inwieweit das Myokard der „Normalpersonen“ im Rahmen der zum Tode führenden Erkrankung alteriert wurde. Während die Expression von ANP den erwarteten atrial-ventrikulären Gradienten zeigt, liegt die Expression von BNP auf nahezu identischem Niveau. Unter Berücksichtigung der Literatur könnte dieser fehlende atrio-ventrikuläre Gradient auf eine signifikante Alteration des „Normal“-Myokards hinweisen. Dieses Phänomen ist deshalb beim Vergleich der TOF-Proben mit dem Vergleichskollektiv zu beachten.

Eine weitere systematische Fehlerquelle könnte in der vorliegenden Arbeit als Ursache für die beobachtete erniedrigte Expression vermutet werden, wenn die postulierte erhöhte Expression von ANP und BNP kausal auf einen erhöhten intrakardialen Druck und eine somit erhöhte Wandspannung zurückgeführt wird. Nach Bernoulli ist nämlich der Druck in einer Engstelle immer niedriger als vor der Engstelle. Da die in dieser Arbeit untersuchten Myokardbiopsien den im Rahmen der Korrekturoperationen resezierten infundibulär stenosierenden hypertrophierten Muskelbündeln entsprechen, kann davon ausgegangen werden, dass lokal in dieser Engstelle tatsächlich ein erniedrigter Druck geherrscht hatte. Wenn man nun postuliert, dass die Expression von ANP und BNP zumindest zum größten Teil streng lokal und nicht humoral reguliert ist, könnte eine verminderte Expression in den untersuchten Proben erklärt werden. Untermuert wird dieses Postulat durch Studien, die entweder bereits in Gewebepräparationen oder Zellkulturen durch Dehnung einen Anstieg provozieren konnten, bzw. solche, die lediglich eine untergeordnete humorale Steuerung oder sogar einen transmuralen Expressionsgradienten feststellen konnten (Yoshimura 2001, Iso 1997, Prestle 1999, Sharma 2003).

Diese potentielle Störgröße muss auch bei der Betrachtung der Zusammenhänge zwischen der Expression von ANP und BNP mit dem RV Druck bedacht werden. Obwohl keine Korrelationen mit dem RV Spitzendruck oder anderen klinischen Parametern gefunden werden konnten, kann zunächst nicht gesagt werden, ob dies

durch den Bernoulli-Effekt verursacht ist oder tatsächlich bedeutet, dass das RV Myokard von Patienten mit Fallotscher Tetralogie nicht mit einem ANP- oder BNP-Anstieg auf Druckbelastung reagiert.

Die Frage nach der Bedeutung der beobachteten erniedrigten Expression von ANP und BNP bei der Fallotschen Tetralogie und des nicht nachgewiesenen Zusammenhanges mit dem RV Druck steht vor dem Hintergrund sich widersprechender Studien.

Während einige eine Erhöhung des Plasmaspiegels und anhand von Konzentrationsunterschieden verschiedener Blutentnahmestellen indirekt eine kardiale Herkunft nachweisen konnten (Oberhansli 1990, Hayabuchi 1999), zeigten andere nicht erhöhte Plasmaspiegel von ANP und BNP bei Fallotscher Tetralogie oder eine im Vergleich zu anderen Herzfehlern erniedrigte Expression im rechten Atrium (Matsuoka 1988, Kikuchi 1987, Iascone 1999). Es wurde andererseits eine Induktion von ANP und BNP bei rechtsventrikulärer Druckbelastung nachgewiesen (Carroll 1995, Bauer 1998). Auch für andere kardiale Erkrankungen (Ventrikelseptumdefekt, Myokardhypertrophie bei arteriellem Hochdruck, Herzversagen verschiedenen Grunderkrankungen) wurde ein Anstieg von ANP und/oder BNP beschrieben (Suda 2003, de Bold 2001, Lowes 1997).

Mittlerweile vorliegende Gen-Expressionsanalysen bei TOF-Patienten ergeben ebenfalls kein eindeutiges Bild. Kaynak et al fanden keine vermehrte Expression von ANP oder BNP im rechtsventrikulären Myokard bei TOF-Patienten und Patienten mit anderweitig bedingter rechtsventrikulärer Hypertrophie (Kaynak 2003). Konstantinov et. beschreiben eine vermehrte ANP-Expression im RV-Myokard bei TOF-Patienten jünger als 67 Tage im direkten Vergleich zu älteren TOF-Patienten (4 Monate – 12,5 Jahre); allerdings könnte hierbei das unterschiedliche Alter der allein ausschlaggebende Faktor sein (Konstantinov 2004).

Auch ist zu beachten, dass der in Studien beschriebene Anstieg von Plasma-ANP und -BNP Patienten in aller Regel TOF-Patienten mit einer RV-Dysfunktion auf dem Boden einer Pulmonalklappenstenose und/oder Residualstenose betraf. Lediglich ein Patient des hier untersuchten Kollektiv zeigte hämodynamische Anhaltspunkte für eine RV-Dysfunktion in Form eines erhöhten enddiastolischen Drucks im rechten Ventrikel und erhöhten rechtsatrialen Mitteldruck (Pat. 25).

Eine tatsächlich erniedrigte Expression und ein fehlender Zusammenhang mit dem RV Druck bei Fallotscher Tetralogie erscheint in diesem Kontext unplausibel. Eine Überprüfung der potentiellen Störgrößen Alter, Vorerkrankungen in der Kontrollgruppe und Bernoulli-Effekt erscheint daher erstrebenswert.

Am ischämischen Myokard bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit ist in jüngeren Studien ein Anstieg der Expression von ANP und BNP nachgewiesen worden (Goetze 2004, Rück 2004). Der bei vielen Patienten vorhandene Rechts-Links-Shunt bei der TOF führt zu einer erniedrigten arteriellen Sauerstoffsättigung. Dies ist allerdings in der Regel nicht mit einer myokardialen Ischämie, die der koronaren Herzkrankheit ähnlich wäre, verbunden. Der nicht nachgewiesene Zusammenhang von ANP und BNP mit der arteriellen Sauerstoffsättigung erscheint daher plausibel.

### 6.2.3 Expression der angiogenetischen Wachstumsfaktoren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob sich eine Expression von HIF1A, Gesamt-VEGF, VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189, VEGF-R1 und VEGF-R2 im nicht ischämischen Myokard von Patienten mit Fallotscher Tetralogie nachweisen lässt, ob die Expressionen im Sinne einer fetalen Reexpression erhöht sind und ob ein Zusammenhang mit dem RV Druck oder der arteriellen Sauerstoffsättigung besteht.

Für HIF1A, alle VEGF-Isoformen sowie die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 konnte in allen rechtsventrikulären Proben und allen rechtsventrikulären und rechtsatrialen Kontrollen mRNA nachgewiesen werden.

Es konnte eine im Patientenkollektiv signifikant erhöhte Expression von VEGF-189 und VEGF-R1 nachgewiesen werden. HIF1A, VEGF-R2 und die anderen VEGF-Isoformen zeigten keine erhöhte Expression im Patientenkollektiv.

Alle untersuchten VEGF-Isoformen zeigten innerhalb der TOF-Proben eine nicht signifikante Tendenz zur niedrigeren Expression im Alter zwischen einem und zehn Jahren. In den adulten Kontrollproben war für VEGF-121 und weniger stark auch für VEGF-165 eine wieder ansteigende Expression zu erkennen. Gesamt-VEGF zeigte ein Mischbild der drei Isoformen, während sich bei HIF1A keine Altersabhängigkeit fand. Es konnte kein signifikanter Wiederanstieg im Sinne einer fetalen Reexpression innerhalb der TOF-Proben festgestellt werden.

Eine Korrelation von HIF1A, VEGF oder dessen Rezeptoren mit der arteriellen Sauerstoffsättigung konnte nicht nachgewiesen werden. Offensichtlich findet im Myokard von Patienten mit Fallotscher Tetralogie keine ischämieabhängige Induktion dieser Gene statt. Auch ein Zusammenhang mit den rechtsventrikulären und rechtsatrialen Drücken konnte nicht nachgewiesen werden.

Betrachtete man die Korrelationen der Genexpressionen untereinander, so fanden sich Zusammenhänge zwischen HIF1A und Gesamt-VEGF, zwischen Gesamt-VEGF und VEGF-121 und VEGF-R1, sowie zwischen allen möglichen Kombinationen der VEGF-Isoformen 121, 165 und 189. Dies entsprach den Erwartungen und bestätigt damit die Plausibilität der Genexpressionsanalyse.

Es fiel auf, dass VEGF-R1 und -R2 mit Gesamt-VEGF und VEGF-189 korrelierten, nicht jedoch mit den Isoformen 121 und 165. HIF1A korrelierte mit beiden Rezeptoren. Die beiden VEGF-Rezeptoren untereinander korrelierten nicht.

Weitere positive Korrelationen konnten zwischen ANP bzw. BNP und VEGF-165 bzw. VEGF-R2 nachgewiesen werden.

Zunächst ist festzuhalten, dass vor dem Hintergrund sich widersprechender Studien zur Expression von HIF1A und VEGF in nicht-ischämischem Myokard (Li 1996, Lee 2000) mRNA beider Gene sowie der VEGF-Rezeptoren 1 und 2 im rechten Ventrikel von Patienten mit Fallotscher Tetralogie nachgewiesen werden konnten.

Die nicht konstante Expression von HIF1A und der Umstand, dass HIF1A und VEGF korrelieren, sprechen dafür, dass zum einen HIF1A im Myokard von Patienten mit TOF bereits auf Ebene der mRNA reguliert sein könnte, und dass diese Regulation eng mit der von VEGF verknüpft zu sein scheint. Dies steht im Einklang mit jüngeren Berichten zur Regulation von HIF1A auf mRNA-Ebene (Catron 2001).

Die nicht signifikante Tendenz von VEGF zur niedrigeren Expression im Alter zwischen einem und zehn Jahren mit einem Wiederanstieg in den adulten Kontrollproben ist vereinbar mit Studien zum VEGF-Plasmaspiegel (Himeno 2003).

Beim Vergleich der TOF- mit den Kontrollproben und bei der Betrachtung der fehlenden Zusammenhänge der Expressionen mit der arteriellen Sauerstoffsättigung oder den rechtsventrikulären und rechtsatrialen Drücken ergibt sich das bereits im vorangehenden Abschnitt beschriebene Problem der nicht vergleichbaren Alterstruktur beider Kollektive.

Es konnten zwar eine im Patientenkollektiv signifikant erhöhte Expression von VEGF-189 und VEGF-R1 nachgewiesen werden, es stellt sich jedoch die Frage, ob diese Unterschiede auf die Altersstruktur der beiden Gruppen zurückzuführen ist oder auf die Veränderungen im Rahmen der Fallotschen Tetralogie. Ein Anhalt hierfür kann sein, dass im Falle von VEGF-189 die älteren Patienten ein Cluster mit den Kontrollen bilden, im Falle von VEGF-R1 jedoch nicht. Dies kann darauf hindeuten, dass es sich bei der erhöhten Expression von VEGF-R1 tatsächlich um etwas anderes als einen Alterseffekt handeln könnte. Ein Zusammenhang mit der Anpassung des Myokards auf die hämodynamische Situation ist denkbar. Eine sichere Klärung dieser Frage ist jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht möglich.

Eine Isoformen-differente Expression von VEGF-188 mRNA (entspricht humanem VEGF-189) im RV wurde bei der Ratte unter hypobarer Hypoxie nachgewiesen, während die VEGF-164 mRNA (entspricht VEGF-165) unverändert blieb (Biro 2004). Dieses Muster der VEGF-Isoformen entspricht den hier gefundenen Ergebnissen.

Auch in diesem Fall muss jedoch auf den Bernoulli-Effekt hingewiesen werden. Allerdings ist die Regulation von VEGF nicht auf intrazelluläre oder räumlich stark

begrenzte parakrine Effekte beschränkt, sondern auch auf humorale Faktoren zurückzuführen (Robinson 2001, Kim CH 2002, Li 1997), so dass der Einfluss des Bernoulli-Effekts auf die Expression der angiogenetischen Wachstumsfaktoren allenfalls eine untergeordnete Rolle spielen kann.

In der Zusammenschau der nicht nachweisbaren Gruppenunterschieden für HIF und VEGF sowie des nicht nachweisbaren Zusammenhanges mit der arteriellen Sauerstoffsättigung und des rechtsventrikulären oder rechtsatrialen Drucks ist es nicht möglich, die bei zyanotischen Herzfehlern erhöhten Plasmaspiegel von VEGF (Starnes 200, Ootaki 2003, Himeno 2003) auf einen myokardialen Ursprung im Zusammenhang mit myokardialer Ischämie oder Druckbelastung zurückzuführen. Eine andere Quelle erscheint wahrscheinlich.

Wenn beachtet wird, dass der Nachweis von Korrelationen in keiner Weise einen kausalen Zusammenhang nachweist, so kann es dennoch möglich sein, anhand auffälliger Zusammenhänge Hypothesen zu generieren, um diese später zu überprüfen.

Die Tatsache, dass die beiden VEGF-Rezeptoren mit HIF1A und VEGF-189, nicht jedoch mit den anderen Isoformen korrelierten, könnte darauf hinweisen, dass die HIF1A und VEGF-189 bei der Regulation der VEGF-Rezeptoren eine stärkere Rolle spielen als VEGF-121 oder VEGF-165. Die Überprüfung dieser Hypothese könnte bestehende Studien, die eine Induktion von VEGF-R1 durch HIF1A und VEGF-R2 durch VEGF nachgewiesen haben (Gerber 1997, Shen 1998) ergänzen.

Die Korrelation von ANP und BNP mit VEGF-165 und VEGF-R2 ist vor dem Hintergrund jüngerer Arbeiten zu sehen, die einen Zusammenhang von BNP und VEGF unter Hypoxiebedingungen nachgewiesen haben (Goetze 2004). Die eingehende Untersuchung dieser Zusammenhänge erscheint wünschenswert.

Jenseits dieser mehr adaptiv orientierten Konzepte zeigen neueste tierexperimentelle Untersuchungen die Bedeutung des Hypoxie-responsiven Signalwegs von HIF1A, VEGF und VEGF-Rezeptoren in der Remodellierung des rechtsventrikulären Ausflusstraktes im Rahmen der kardialen Morphogenese. VEGF-R2 besitzt eine anti-apoptische Potenz in Kardiomyozyten dieses spezifischen kardialen Kompartimentes (Sugishita 2004). Die adenoviral-induzierte Überexpression von VEGF-165 führt beim Huhn zu schweren Entwicklungsstörungen des Ausflußtraktes mit conotruncalen Malformationen, insbesondere unter dem Erscheinungsbild eines DORV, der die Maximalvariante einer Fallot'schen Tetralogie darstellt (Sugishita

2004). Vergleichbare Malformationen fanden sich bei VEGF-Überexpression in der Maus (Stalmans 2003).

Der in der kardiale Entwicklung essentielle Transkriptionsfaktor Cited-2 ist ein negativer Regulator von HIF-1A und VEGF. Mäuse mit homozygoter Cited2-Defizienz zeigen TOF-ähnliche kardiale Malformationen (Yin 2002). Zudem wurden kürzlich Mutationen des Cited-2-Gens bei einzelnen Patienten mit TOF nachgewiesen (Sperling 2005).

### 6.3 AUSBLICK

Zur präzisen Klärung der Frage, welchen Einfluss das Alter und welchen Einfluss die Pathophysiologie auf die Expression von natriuretischen Peptiden und angiogenetischen Wachstumsfaktoren bei Patienten mit Fallotscher Tetralogie haben, wären Myokardbiopsien gesunder Probanden aus einem dem Patientenkollektiv entsprechenden Altersspektrum wünschenswert. Naturgemäß ist es nahezu unmöglich, solche Biopsien zu erhalten.

Eine Alternative besteht darin, Biopsien anderer Herzfehlbildungen heranzuziehen, die sich pathophysiologisch von der TOF unterscheiden. Insbesondere bei der Betrachtung einer größeren Anzahl von Genen (beispielsweise auch in Form von cDNA-Array-Studien) ist es hierbei möglich, Expressionsmuster für verschiedene Aspekte eines Phänotyps herauszufiltern (Kaynak 2003).

Tiermodelle der Fallotschen Tetralogie unterliegen starken Einschränkungen: entweder handelt es sich um operative Eingriffe, die die Pathophysiologie der TOF nur bedingt nachahmen können wie das pulmonale Banding, oder es handelt sich um Knockout-Tiere, bei denen die Deaktivierung eines einzelnen Genes wie FOG-2, Cited-2 oder Neurotrophin-3 einen TOF-ähnlichen Phänotyp bedingt (Tevosian 2000, Donovan 1996). Derart einfache mechanische oder genetische Grundlagen finden sich bei den meisten TOF-Patienten nicht, so dass vollkommen unklar ist, inwieweit die molekularen Mechanismen dieser Modelle mit denen am Patienten vergleichbar sind.

Die Überprüfung des potentiellen Störfaktors Bernoulli-Effekt könnte möglich sein, wenn RV Myokardbiopsien von Patienten mit Fallotscher Tetralogie zur Verfügung stünden, die nicht aus dem infundibulär stenosierenden Bereich stammen. Auch dies ist kaum praktikabel.

Eine Plausibilitätskontrolle zum Bernoulli-Effekt könnte jedoch stattfinden, indem in den vorhandenen Myokardbiopsien Regulatoren für ANP und BNP (GATA4, Nkx2-5, Tbx5 oder Irx4, Bruneau 2002, Charron 1999, Bruneau 2001) oder von diesen gesteuerte myokardiale Gene (Downstream Targets, beispielsweise Aldosteron) untersucht werden. Wenn die Annahmen zum Bernoulli-Effekt stimmen, müssten die Regulatoren ebenfalls lokal niedriger exprimiert sein. Andererseits müsste beispielsweise myokardiales Aldosteron supprimiert sein, wenn ANP und BNP im übrigen Myokard erhöht sind und damit vermehrt sezerniert werden. Sind die natriuretischen Peptide jedoch tatsächlich niedriger exprimiert, so dürfte auch Aldosteron nicht supprimiert sein.

Für eine Überprüfung der generierten Hypothesen zur Regulation der VEGF-Rezeptoren durch HIF1A und VEGF-189 sowie engeren Verknüpfungen der natriuretischen Peptide und die angiogenetischen Wachstumsfaktoren wären sicherlich funktionelle Untersuchungen an der Zellkultur oder im Tierexperiment nötig. Es könnte beispielsweise das Expressionsverhalten der VEGF-Isoformen und -Rezeptoren unter Gabe oder Ausschaltung von HIF1A oder ANP bzw. BNP, bzw. unter in vitro oder in vivo Reizen wie Hypoxie oder myokardialer Dehnung untersucht werden.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Die quantitative Real-Time PCR hat sich als eine etablierte, präzise und sensitive Methode zur Genexpressionsanalyse erwiesen. Alle Schritte der Probenaufbereitung von der Probengewinnung bis zur Real-Time PCR stellen jedoch potentielle Quellen methodischer Fehler dar.

Die RNA-Isolierung und insbesondere die Reverse Transkription konnten in dieser Arbeit als Hauptverursacher der methodischen Fehler identifiziert werden. Die Protokolle wurden optimiert, um solche methodischen Fehler zu minimieren, die sich auf verschiedene Gene in verschiedenem Maße auswirken (genspezifische methodische Fehler). Die Anwendung eines validen Protokolls ist essentiell, da diese genspezifischen Fehler im weiteren Verlauf der Genexpressionsanalyse nicht mehr ausgeglichen werden können.

Die Verwendung eines Housekeeping-Gens als Referenz für die Expression des zu untersuchenden Zielgens stellt eine Möglichkeit dar, solche methodische Fehler zu kompensieren, die auf alle Gene gleich wirken (globale methodische Fehler). Die Validität dieses Vorgehens steht und fällt jedoch mit der Validität der Housekeeping-Gens, das in allen untersuchten Proben möglichst konstant exprimiert sein muss. Bei der Evaluation von potentiellen Housekeeping-Genen müssen jedoch genau diejenigen globalen methodischen Fehler berücksichtigt werden, die das Housekeeping-Gen später kompensieren soll. Es wurde daher ein neues Protokoll etabliert, um einzelsträngige cDNA präzise zu quantifizieren. Der Gesamt-cDNA-Gehalt der einzelnen Proben diente bei der Evaluation von zehn potentiellen Housekeeping-Genen als Bezugspunkt, um globale methodische Fehler auszugleichen. 18S, PBGD und CASQ2 konnten für die untersuchten Myokardproben von Patienten mit Fallotscher Tetralogie (TOF) als valide Housekeeping-Gene identifiziert werden.

Für die Real-Time PCR selbst konnte die Sensitivität und Präzision der Methode auch für extrem niedrige Konzentrationen von bis zu einem Molekül Nukleinsäure pro Reaktion nachgewiesen werden. Dies hat direkte klinische Konsequenzen, beispielsweise bei der Diagnostik und Verlaufskontrolle der Minimal Residual Disease.

Im nicht-ischämischen RV Myokard von Patienten mit Fallotscher Tetralogie konnte entgegen anders lautender Voruntersuchungen die Expression von HIF1A, VEGF und dessen Rezeptoren nachgewiesen werden. HIF1A scheint dabei auch auf mRNA-Ebene reguliert zu sein. Für die natriuretischen Peptide ANP und BNP sowie für

HIF1A, VEGF und dessen Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2 konnte der in der Literatur beschriebene Altersverlauf nachvollzogen werden, wobei ein Wiederanstieg von VEGF-121 in den adulten Kontrollproben auffällig war. Vor dem Hintergrund der differentiellen Altersstruktur der Kontrollgruppe und der Gruppe der Patienten mit Fallotscher Tetralogie konnte die erwartete gesteigerte Expression der untersuchten Gene in den TOF-Proben nur für VEGF-R1 gezeigt werden. Für ANP und BNP zeigte sich sogar eine verminderte Expression in den TOF-Proben. Diese könnte auf den lokalen Unterdruck am Ort der Biopsieentnahme im Sinne des Bernoulli-Effekts zurückzuführen sein. Eine Abhängigkeit von klinischen Parametern wie dem rechtsventrikulären Druck oder der arteriellen Sauerstoffsättigung zeigte sich nicht. Die Korrelationen der Gene untereinander können Anlass zu Hypothesen bezüglich der Regulation dieser Gene sein. HIF1A und VEGF-189 könnten bei der Regulation der VEGF-Rezeptoren eine stärkere Rolle spielen als VEGF-121 oder VEGF-165. Außerdem könnten die natriuretischen Peptide und die angiogenetischen Wachstumsfaktoren enger miteinander verknüpft sein als bisher angenommen. Weiterführende Studien müssen die so generierten Hypothesen überprüfen.

## 8 SUMMARY

Quantitative real-time PCR is an established, precise and sensitive method for gene expression analysis. However, all steps of sample preparation from sample salvage to the final PCR reaction, are potential sources of methodical errors.

RNA isolation and most importantly reverse transcription could be identified as the main reasons for methodical errors in this study. Protocols were optimized to minimize methodical errors that effect different genes to a different extend (gene-specific methodical errors). The use of a valid protocol is essential, as these gene-specific errors cannot be compensated for during further steps of the gene expression analysis.

The use of a housekeeping-gene as a reference for the expression of the gene of interest represents a way to compensate for methodical errors that affect every gene to the same extend (global methodical errors). The validity of this procedure, however, depends strongly on the validity of the housekeeping-gene that has to be expressed constantly within all the samples studied. In the process of evaluating potential housekeeping-genes one has to regard exactly the same global methodical errors that are to be compensated by the housekeeping-gene later on. Therefore, a new protocol was established to precisely quantify single-stranded cDNA. The overall content of cDNA within a given sample was then used as a reference to compensate for global errors during the evaluation of ten potential housekeeping-genes. 18S, PBGD and CASQ2 could be identified as valid housekeeping-genes for the set of myocardial samples obtained from patients with Tetralogy of Fallot (TOF).

Sensitivity and precision of the real-time PCR itself could be shown even for extremely low concentrations of down to one molecule of nucleic acid per reaction. This has direct clinical implications, for example during the diagnosis and monitoring of minimal residual disease.

In non-ischemic right ventricular myocardium of patients with Tetralogy of Fallot, the expression of HIF1A, VEGF and its receptors could be shown in the face of contradicting studies. HIF1A appears to be regulated on the level of mRNA. For the natriuretic peptides ANP and BNP as well as for HIF1A, VEGF and its receptors VEGF-R1 und VEGF-R2 the previously described dependency of patient age could be confirmed. An increase of VEGF-121 expression in adult control samples was apparent. With the differences in the age of patients and control sample donors to regard, the expected elevated expression of the studied genes within the TOF-samples could be shown only for VEGF-R1. In the case of ANP and BNP even a significantly

reduced expression could be shown within the TOF-samples. This lower expression could be caused by the locally reduced pressure at the place of sample excision according to Bernoulli. A correlation between the expression of the studied genes and clinical parameters like right ventricular pressure or arterial oxygen saturation could not be found. The correlation between the expressions of several genes with that of other genes could lead to hypotheses regarding the regulation of these genes. HIF1A and VEGF-189 could play a more important role in the regulation of VEGF receptors than VEGF-121 or VEGF-165. Also, natriuretic peptides and vascular growth factors could be more closely coregulated than previously assumed. Further studies are needed to verify or falsify these hypotheses.

## ANHANG

## DETAILS DES STUDIEN- UND KONTROLLKOLLEKTIVES

Patient	Diagnose	Operation	Alter	Geschlecht	Präoperative Betablocker- Therapie	Sa O <sub>2</sub> [%]	P RV peak [mmHg]	P RV ed [mmHg]	P RA mean [mmHg]	Q <sub>p</sub> /Q <sub>s</sub>
Pat. 1	TOF	primär	5 Monate	weiblich	ja	81	112	6	3	0,73
Pat. 2	TOF	primär	5 Monate	männlich	nein	96	64	4	2	2,19
Pat. 3	TOF	primär	6 Monate	männlich	ja	86	96	6	4	1
Pat. 4	DORV, Fallot-Typ	primär	6 Monate	männlich	nein	84	75	5	1	1
Pat. 5	TOF	primär	6 Monate	weiblich	nein	96				1
Pat. 6	TOF	primär	7 Monate	männlich	ja	91	87	12	4	1,29
Pat. 7	TOF	primär	7 Monate	männlich	nein	98	101	9	2	1
Pat. 8	TOF	primär	7 Monate	männlich	nein	82	80	9	5	0,6
Pat. 9	TOF	primär	8 Monate	weiblich	ja	97	85	5	1	1
Pat. 10	TOF	primär	8 Monate	männlich	nein	98	80	9		1
Pat. 11	P. atresie, Fallot-Typ	primär	9 Monate	männlich	nein	80	79	7	4	0,63
Pat. 12	TOF	primär	11 Monate	weiblich	nein	96				
Pat. 13	TOF	primär	11 Monate	weiblich	nein	99	83	10	36	1,77
Pat. 14	TOF	primär	12 Monate	männlich	ja	83	90	11	6	0,67
Pat. 15	TOF	primär	12 Monate	männlich	ja	94	73	4	0	
Pat. 16	TOF	primär	13 Monate	weiblich	nein	98	45	2	7	0,36
Pat. 17	TOF	primär	17 Monate	männlich	nein	91	134	15	4	1,56
Pat. 18	TOF	primär	19 Monate	männlich	nein	76	96	10	6	0,51
Pat. 19	TOF	primär	2,5 Jahre	weiblich	nein	78	89	7	0	0,54
Pat. 20	TOF	primär	4 Jahre	weiblich	nein	98	103	13	7	1

Patient	Diagnose	Operation	Alter	Geschlecht	Präoperative Betablocker- Therapie	Sa O <sub>2</sub>	P RV peak	P RV ed	P RA mean	Q <sub>p</sub> /Q <sub>s</sub>
						[%]	[mmHg]	[mmHg]	[mmHg]	
Pat. 21	TOF	primär	8 Jahre	männlich	nein	90	100	10	3	0,77
Pat. 22	TOF	Reoperation	14 Jahre	männlich	nein	97	50	8		1
Pat. 23	TOF	Reoperation	15 Jahre	weiblich	nein	99	52	9	4	1
Pat. 24	TOF	Reoperation	18 Jahre	männlich	nein	84	119	9	6	0,59
Pat. 25	TOF	Reoperation	25 Jahre	männlich	nein	97	69	13	10	
RV Ko. 1			18 Jahre	weiblich	nein					
RV Ko. 2			20 Jahre	männlich	nein					
RV Ko. 3			35 Jahre	weiblich	nein					
RV Ko. 4			43 Jahre	männlich	nein					
RV Ko. 5			55 Jahre	männlich	nein					
RV Ko. 6			57 Jahre	weiblich	nein					
RA Ko. 1			37 Jahre	weiblich	nein					
RA Ko. 2			51 Jahre	weiblich	nein					
RA Ko. 3			54 Jahre	weiblich	nein					
RA Ko. 4			59 Jahre	weiblich	nein					

**Tabelle 14: Klinische Parameter des Studien- und Kontrollkollektives**

Die arterielle Sauerstoffsättigung (Sa O<sub>2</sub>), der rechtsventrikuläre Spitzendruck (P RV peak), der rechtsventrikuläre enddiastolischer Druck (P RV ed), der rechtsatrielle Mitteldruck (P RA mean) und der Quotient aus pulmonalem und systemischem Fluss (Q<sub>p</sub>/Q<sub>s</sub>) wurden im Rahmen von Herzkatheteruntersuchungen bestimmt.

---

## LITERATURVERZEICHNIS

Apitz J (2002) Pädiatrische Kardiologie. Erkrankungen des Herzens bei Neugeborenen, Säuglingen, Kindern und Heranwachsenden. Steinkopff-Verlag Darmstadt.

Bacic M, Edwards NA, Merrill MJ (1995) Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) forms in rat tissues. *Growth Factors*, 12(1): 11-5

Bauer EP, Kuki S, Zimmermann R, Schaper W (1998) Upregulated and downregulated transcription of myocardial genes after pulmonary artery banding in pigs. *Ann Thorac Surg*, 66(2): 527-31

Birot OJG, Peinnequin A, Simler N, van Cuyck-Gandre H, Hamel R, Bigard XA (2004) Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Heart of Rats Exposed to Hypobaric Hypoxia: Differential Response Between mRNA and Protein. *J Cell Physiol*, 200: 107-115

Bonham MJ, Danielpour D (1996) Improved Purification and Yields of RNA by RNeasy . *BioTechniques*, 21: 57-60

Borkhardt A, Repp R, Haupt E, Brettreich S, Buchen U, Gossen R, Lampert F (1994) Molecular Analysis of MLL-1/AF4 Recombinant in Infant Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia*, 8: 549-553

Broggi E, Schatteman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, Isner JM (1996) Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest*, 97(2): 469-76

Bruneau BG (2002) Transcriptional Regulation of Vertebrate Cardiac Morphogenesis. *Circ Res*, 90: 509-19

Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time Reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25: 169-193

Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT (1999) Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med*, 5(5): 495-502

Carrol SM, Nommi LE, Knoepfler PS, White FC, Bloor CM (1995) Gene Expression in a Swine Model of Right Ventricular Hypertrophy: Intercellular Adhesion Molecule, Vascular Endothelial Growth Factor and Plasminogen Activators are Upregulated during Pressure Overload. *J Mol Cell Cardiol*, 27: 1427-1441

Catron T, Mendiola MA, Smith SM, Born J, Walker MK (2001) Hypoxia regulates avian cardiac Arnt and HIF-1alpha mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 282(2): 602-7

- Charron F, Nemer M (1999) GATA transcription factors and cardiac development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 10: 85-91
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1): 156-9
- Clerico A, Emdin M (2004) Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. *Clin Chem*, 50(1): 33-50
- Cumming DVE, Seymour AML, Rix LK, Keilett R, Dhoot GK, Yacoub MH, Barton PJR (1995) Troponin I and T Protein Expression in Experimental Cardiac Hypertrophy. *Cardioscience*, 6(1): 65-70
- De Bold A, Ma KKY, Zhang Y, Kuroski de Bold ML, Bensimon M, Khoshbaten (2001) The physiological and pathophysiological modulation of the endocrine function of the heart. *Can J Physiol Pharmacol*, 79: 705-714
- Deindl E, Boengler K, van Royen N, Schaper W (2002) Differential expression of GAPDH and  $\beta$ -actin in growing collateral arteries. *Mol Cell Biochem*, 236: 139–146
- Depre C, Chipley GL, Chen W, Han Q, Doenst T, Moore ML, Stepkowski S, Davies PJ, Taegtmeyer H (1998) Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 4(11): 1269-1275
- Depre C, Young ME, Ying J, Singh Ahuja H, Han Q, Garza N, Davies PJA, Taegtmeyer H (2000) Streptozotocin-induced Changes in Cardiac Gene Expression in the Absence of Severe Contractile Dysfunction. *J Mol Cell Cardiol*, 32: 985-996
- DiPaola NR, Sweet WE, Stull LB, Francis GS, Moravec CS (2001) Beta-adrenergic Receptors and Calcium Cycling Proteins in Non-failing, Hypertrophied and Failing Human Hearts: Transition from Hypertrophy to Failure. *J Mol Cell Cardio*, 33: 1283–1295
- Donovan MJ, Hahn R, Tessarollo L, Hempstead BL (1996) Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nature Genetics*, 14: 210-213
- Dzimiri N, Moorji A, Afrane B, Al-Halees Z (2002) Differential regulation of atrial and brain natriuretic peptides and its implications for the management of left ventricular volume overload. *Eur J Clin Invest*, 32(8): 563-9
- Egawa C, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S (2001) Quantitative analysis of BRCA1 and BRCA2 mRNA expression in sporadic breast carcinomas and its relationship with clinicopathological characteristics. *Jpn J Cancer Res*, 92(6): 624-630

- Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Breant C, Le Douarin NM (1997) Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10): 5141-6
- Eun HM (1996) *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*, Academic Press, Inc., San Diego, CA
- Faneyte IF, Kristel PMP, van de Vuver MJ (2001) Determining MDR1/Glycoprotein expression in Breast Cancer. *Int J Cancer*, 93: 114-122
- Ferrara N, Gerber HP, LeCoutre J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9(6): 669-676
- Fielitz J, Dendorfer A, Pregla R, Ehler E, Zurbrügg HR, Bartunek J, Hetzer R., Regitz-Zagrosek V (2002) Neutral Endopeptidase Is Activated in Cardiomyocytes in Human Aortic Valve Stenosis and Heart Failure. *Circulation*, 105: 286-289
- Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM (1998) Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med*, 4(11): 1329-1333
- Finke J, Fritzen R, Ternes P, Lange W, Dolken G (1993) An improved strategy and a useful housekeeping gene for RNA analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by PCR. *Biotechniques*, 14(3): 448-453
- Förster VT (1948) Zwischenmolekulare Energie-wanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics*, 2: 55-75.
- Franco D, Icardo JM (2001) Molecular characterization of the ventricular conduction system in the developing mouse heart: topographical correlation in normal and congenitally malformed hearts. *Cardiovasc Res*, 49: 417-429
- Frass O, Sharma HS, Knoll R, Duncker DJ, McFalls EO, Verdouw PD, Schaper W. (1993) Enhanced gene expression of calcium regulatory proteins in stunned porcine myocardium. *Cardiovasc Res*, 27(11): 2037-43
- Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N (1997) Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*, 272(38): 23659-67
- Goetze JP, Gore A, Moller CH, Steinbrüchel DA, Rehfeld JF, Nielsen LB (2004) Acute myocardial hypoxia increases BNP gene expression. *FASEB J*, 18(15): 1928-30
- Goetze JP (2004) Biochemistry of pro-B-type natriuretic peptide-derived peptides: the endocrine heart revisited. *Clin Chem*, 50(9):1503-10

Gorzelnik K, Janke J, Engeli S, Sharma AM (2001) Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res*, 33(10): 625-627

Guo JQ, Lin H, Kantarjian H, Talpaz M, Champlin R, Andreeff M, Glassman A, Arlinghaus RB (2002) Comparison of competitive-nested PCR and real-time PCR in detecting BCR-ABL fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia*, 16: 2447-2453

Haller F, Kulle B, Schwager S, Gunawan B, von Heydebreck A, Sülthmann H, Füzési L (2004) Equivalence test in quantitative Reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization. *Anal Biochem*, 335: 1-9

Hayabuchi Y, Matsuoka S, Kuroda Y (1999) Plasma Concentrations of Atrial and Brain Natriuretic Peptides and Cyclic Guanosine Monophosphate in Response to Dobutamine Infusion in Patients with Surgically Repaired Tetralogy of Fallot. *Pediatr Cardiol*, 20:343-350

Heid AC, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10): 986-994

Higushi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10(4): 413-417

Hilgendorff A, Rawer D, Doerner M, Tutdibi E, Ebsen M, Schmidt R, Guenther A, Gortner L, Reiss I (2003) Synthetic and natural surfactant differentially modulate inflammation after meconium aspiration. *Intensive Care Med*, 29: 2247-2254

Himeno W, Akagi T, Furui J, Maeno Y, Ishii M, Kosai K, Murohara T, Kato H (2003) Increased angiogenic growth factor in cyanotic congenital heart disease. *Pediatr Cardiol*, 24(2): 127-32

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(19): 7276-7280

Holodniy M (1999) Effects of Collection, Processing, and Storage on RNA Detection and Quantification. In: Kochanowski B, Reischl U (ed) *Quantitative PCR Protocols*. Humana Press, Totowa

Hoshijima M, Chien KR (2002) Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin Invest*, 109:849-55

Hullin R, Asmus F, Ludwig A, Hersel J, Boekstegers P (1999) Subunit expression of cardiac L-type calcium channel is differentially regulated in diastolic heart failure of cardiac allograft. *Circulation*, 100(2): 155-163

Iascone MR, Vittorini S, Collavoli A, Cupelli A, Kraft G, Biagini A, Clerico A (1999) A rapid procedure for the quantitation of natriuretic peptide RNAs by competitive RT-PCR in congenital heart defects. *J Endocrinol Invest*, 22(11): 835-42

- Iso T, Arai M, Wada A, Kogure K, Suzuki T, Nagai R (1997) Humoral factor(s) produced by pressure overload enhance cardiac hypertrophy and natriuretic peptide expression. *Am J Physiol*, 273: H113-8
- Jung F, Haendeler J, Hoffmann J, Reissner A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler A (2002) Hypoxic Induction of the Hypoxia-Inducible Factor Is Mediated via the Adaptor Protein Shc in Endothelial Cells. *Circ Res*, 91: 38-45
- Kato J, Kitamura K, Uemura T, Kuwasako K, Kita T, Kangawa K, Eto T (2002) Plasma levels of adrenomedullin and atrial and brain natriuretic peptides in the general population: their relations to age and pulse pressure. *Hypertens Res*, 25(6): 887-92
- Kaynak B, von Heydebreck A, Mebus S, Seelow D, Hennig S, Vogel J, Sperling HP, Pregla R, Alexi-Meskishvili V, Hetzer R, Lange PE, Vingron M, Lehrach H, Sperling S (2003) Genome-Wide Array Analysis of Normal and Malformed Human Hearts. *Circulation*, 107:2467-2474
- Kikuchi K, Nishioka K, Ueda T, Shiomi M, Takahashi Y, Sugawara A, Nakao K, Imura H, Mori C, Mikawa H (1987) Relationship between plasma atrial natriuretic polypeptide concentration and hemodynamic measurements in children with congenital heart diseases. *J Pediatr*, 111(3): 335-42
- Kim CH, Cho YS, Chun YS, Park JW, Kim MS (2002) Early Expression of Myocardial HIF-1<sub>α</sub> in Response to Mechanical Stresses. *Circ Res*, 90: e25-e33
- Konstantinov IE, Coles JG, Boscarino C, Takahashi M, Goncalves J, Ritter J, Van Arsdell GS (2004) Gene expression profiles in children undergoing cardiac surgery for right heart obstructive lesions. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 127: 746-54
- Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T (2002) Transforming Growth Factor- $\beta$  Function Blocking Prevents Myocardial Fibrosis and Diastolic Dysfunction in Pressure-Overloaded Rats. *Circulation*, 106: 130-135
- Lee AH, Wolf PL, Excudero R, Deutsch R, Lamieson SW, Thistlethwaite PA (2000) Early Expression of Angiogenesis Factors in Acute Myocardial Ischemia and Infarction. *N Engl J Med*, 342: 626-33
- Lekanne Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, Moorman AFM (2002) Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry*, 307: 63-9
- Li J, Hampton T, Morgan JP, Simons M (1997) Stretch-induced VEGF Expression in the Heart. *J Clin Invest*, 100(1): 18-24
- Livak K, Marmaro J, Flood S. (1995) Guidelines for designing TaqMan<sup>TM</sup> fluorogenic probes for 5' nuclease assays. PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

- Lockey C, Otto E, Long Z (1998) Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. *Biotechniques*, 24(5): 744-746
- Lossos IS, Czerwinski DK, Wechsler MA, Levy R (2003) Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. *Leukemia*, 17: 789-795
- Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeier TJ, Quaife RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF, Badesch DB, Groves BM, Gilbert AM, Bristow MR (1997) Changes in Gene Expression in the Intact Human Heart. *J Clin Invest*, 100: 2315–2324
- Lupberger J, Kreuzer KA, Baskaynak G, Peters UR, le Coutre P, Schmidt CA (2002) Quantitative analysis of beta-actin, beta-2-microglobulin and porphobilinogen deaminase mRNA and their comparison as control transcripts for RT-PCR. *Mol Cell Probes*, 16: 25–30
- Luss H, Boknik P, Heusch G, Muller FU, Neumann J, Schmitz W, Schulz R (1998) Expression of calcium regulatory proteins in short-term hibernation and stunning in the in situ porcine heart. *Cardiovasc Res*, 37(3): 606-17
- Mair J, Hammerer-Lercher A, Puschendorf B (2001) The Impact of Cardiac Natriuretic Peptide Determination on the Diagnosis and Management of Heart Failure. *Clin Chem Lab Med*, 39(7):571–588
- Mallet F (1999) Comparison of Competitive PCR and Positive Control-Based PCR. In: Kochanowski B, Reischl U (ed) *Quantitative PCR Protocols*. Humana Press, Totowa
- Mamic TM, Holman NA, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR (2000) PMCA1 mRNA expression in rat aortic myocytes: a real-time RT-PCR study. *Biochem Biophys Res Commun*, 276(3): 1024-1027
- Matathias A, Fox D, Crouse J (1999) SuperScript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase. Gibco BRL Life Technologies, Merelbeke, Belgium
- Matsuoka S, Kurahashi Y, Miki Y, Miyao M, Yamazaki Y, Nishiuchi T, Saito S (1988) Plasma atrial natriuretic peptide in patients with congenital heart diseases. *Pediatrics*, 82(4): 639-43
- Mensink E, van de Locht A, Schattenberg A, Linders E, Schaap N, Geurts van Kessel A, de Witte T (1998) Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Haematol*, 102: 768-774
- Mir TS, Marohn S, Laer S, Eiselt M, Grollmus O, Weil J (2002) Plasma concentrations of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in control children from the neonatal to adolescent period and in children with congestive heart failure. *Pediatrics*, 110(6): e76
- Mir TS, Laux R, Hellwege HH, Liedke B, Heinze C, von Buelow H, Laer S, Weil J (2003) Plasma concentrations of aminoterminal pro atrial natriuretic peptide and aminoterminal pro brain natriuretic peptide in healthy neonates: marked and rapid increase after birth. *Pediatrics*, 112(4): 896-9

- Moniotte S, Vaerman JL, Kockx MM, Larrouy D, Langin D, Noirhomme P, Balligand JL (2001) Real-time RT-PCR for the Detection of Beta-adrenoceptor Messenger RNAs in Small Human Endomyocardial Biopsies. *J Mol Cell Cardiol*, 33(12): 2121-2133
- Motulsky H (1995) *Intuitive Biostatistics*. New York, Oxford University Press
- Murphy JG, Gersh BJ, Mair DD, Fuster V, McGoon MD, Ilstrup DM, McGoon DC, Kirklin JW, Danielson GK (1993) Long-term outcome in patients undergoing surgical repair of tetralogy of Fallot. *N Engl J Med*, 329(9):593-9
- Nedelman J, Heagerty P, Lawrence C (1992) Quantitative PCR with internal controls. *Comput Appl Biosci*, 8(1):65-70
- Newton CR, Graham A (1997) *PCR*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford
- Ng YS, Rohan R, Sunday MA, Demello DE, D'Amore PA (2001) Differential Expression of VEGF Isoforms in Mouse During Development and in the Adult. *Dev Dynamics*, 220:112-121
- Nielsen R (1997) Robustness of the estimator of the index of dispersion for DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 7: 346-351
- Nollert G, Fischlein T, Bouterwek S, Bohmer C, Klinner W, Reichart B (1997) Long-term survival in patients with repair of tetralogy of Fallot: 36-year follow-up of 490 survivors of the first year after surgical repair. *J Am Coll Cardiol*, 30: 1374-8.
- Norozi K, Buchhorn R, Kaiser C, Hess G, Grunewald RW, Binder L, Wessel A (2005) Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide as a marker of right ventricular dysfunction in patients with tetralogy of fallot after surgical repair. *Chest*, 128(4):2563-70
- O'Driscoll L, Daly A, Saleh M, Clynes M (1993) The use of Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) to investigate specific gene expression in multidrug-resistant cells. *Cytotechnology*, 12: 289-314
- Oberhansli I, Mermillod B, Favre H, Friedli B, Girardin E, Paunier L (1990) Atrial natriuretic factor in patients with congenital heart disease: correlation with hemodynamic variables. *J Am Coll Cardiol*, 15(6): 1438-45
- Oechslin EN, Harrison DA, Harris L, Downar E, Webb GD, Siu SS, Williams WG (1999) Reoperation in adults with repair of tetralogy of fallot: indications and outcomes. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 118(2):245-51
- Oehlmann R (1999) *Basic Primer Express Search*. Applied Biosystems, Weiterstadt.

- Oleksiewicz MB, Donaldson AI, Alexandersen S (2001) Development of a novel real-time RT PCR assay for quantitation of foot-and-mouth disease virus in diverse porcine tissues. *J Virol Meth*, 92: 23–35
- Ootaki Y, Yamaguchi M, Yoshimura N, Oka S, Yoshida M, Hasegawa T (2003) Vascular endothelial growth factor in children with congenital heart disease. *Ann Thorac Surg*, 75(5): 1523-6
- Pallisgaard N, Clausen N, Schroder H, Hokland P (1999) Rapid and sensitive minimal residual disease detection in acute leukemia by quantitative real-time RT-PCR exemplified by t(12;21) TEL-AML1 fusion transcript. *Genes Chromosomes Cancer*, 26(4): 355-365
- Prestle J, Dieterich S, Preuss M, Bieligk U, Hasenfuss G (1999) Heterogeneous transmural gene expression of calcium-handling proteins and natriuretic peptides in the failing human heart. *Cardiovasc Res*, 43(2): 323-31
- Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT (1993) Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(16): 7533-7
- Radonic A, Thulke S, Mackay IA, Landt O, Siebert W, Nitsche A (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Comm*, 313: 856-62
- Rawer D, Borkhardt A, Wilda M, Kropf S, Kreuder J (2003) Influence of stochastics on quantitative PCR in the detection of minimal residual disease. *Leukemia*, 17: 2527-2531
- Razeghi P, Essop F, Huss JM, Abbasi S, Manga N, Taegtmeier H (2003) Hypoxia-induced switches of myosin heavy chain iso-gene expression in rat heart. *Biochem Biophys Res Com*, 303: 1024–1027
- Razeghi P, Young ME, Alcorn JL, Moravec CS, Frazier OH, Taegtmeier H (2001) Metabolic Gene Expression in Fetal and Failing Human Heart. *Circulation*, 104: 2923-2931
- Razeghi P, Young, ME, Cockrill TC, Frazier OH, Taegtmeier H (2002) Downregulation of Myocardial Myocyte Enhancer Factor 2C and Myocardial Myocyte Enhancer Factor 2C-Regulated Gene Expression in Diabetic Patients With Nonischemic Heart Failure. *Circulation*, 106: 407-411
- Reaymaekers L (1999) General Principles of Quantitative PCR. In: Kochanowski B, Reischl U (ed) *Quantitative PCR Protocols*. Humana Press, Totowa
- Reichl U, Kochanowski B (1999) Quantitative PCR: A Survey of the Present Technology. In: Kochanowski B, Reischl U (ed) *Quantitative PCR Protocols*. Humana Press, Totowa
- Repp R, Borkhardt A, Gossen R, Kreuder J, Hammermann J, Lampert F (1995) Construction of RNA standards for high-resolution automatic product analysis in quantitative competitive RT-PCR. *Biotechniques*, 19(1): 86-8

Robinson CJ, Stringer SE (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*, 114: 853-865

Ross SM (1993) *Introduction to Probability Models*. San Diego: Academic Press

Rück A, Gustafsson T, Norrbom J, Nowak J, Källner G, Söderberg M, Sylven C, Drvota V (2004) ANP and BNP but not VEGF are regionally overexpressed in ischemic human myocardium. *Biochem Biophys Res Com*, 322: 287-291

Rye HS, Dabora JM, Quesada MA, Mathies RA, Glazer AN (1993) Fluorometric assay using dimeric dyes for double- and single-stranded DNA and RNA with picogram sensitivity. *Anal Biochem*, 208(1):144-50

Sachs L (1984) *Applied Statistics. A Handbook of Techniques*, 2nd edn. New York: Springer

Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350-4

Sambrook J, Russel DW (2001) *Molekular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press, New York

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470

Schild T (1999) *Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie*. Applied Biosystems, Weiterstadt.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods*, 46(1-2): 69-81

Schoenfeld JR, Vasser M, Jhurani P, Ng P, Hunter JJ, Ross J, Chien KR, Lowe DG (1998) Distinct Molecular Phenotype in Murine Cardiac Muscle Development, Growth, and Hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 30: 2269-2280

Schumacher G, Hess J, Bühlmeier K (2001) *Klinische Kinderkardiologie*. Spinger Verlag, Berlin.

Semenza L (1999) Regulation of mammalian O<sub>2</sub> Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Annu. Rev Cell Dev Biol*, 15: 551-78

Semenza L (2001) Hypoxia-Inducible Factor 1: Control of Oxygen Homeostasis in Health and Disease. *Pediatr Res*, 49: 614-617

Sharma S, Razeghi P, Shakir A, Keneson 2<sup>nd</sup> BJ, Clubb F, Taegtmeier H (2003) Regional Heterogeneity in Gene Expression Profiles: A Transcript Analysis in Human and Rat Heart. *Cardiology* 100: 73-79

Shen BQ, Lee DY, Gerber HP, Keyt BA, Ferrara N, Zioncheck TF (1998) Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J Biol Chem*, 273(45): 29979-85

Shimkets RA, Lowe DGm Tai JTN, Sehl P, Jin H, Yang R, Predki PF, Rothberg BEG, Murtha MT, Roth ME, Suresh GS, Windermuth A, Simpson JW, Simons JF, Daley MP, Gold SA, McKenna MP, Hilan K, Went GT, Rothberg JM (1999) Gene expression analysis by transcript profiling coupled to a gene database query. *Nature Biotechnol*, 17: 796-803

Smith S, Vigilant L, Morin PA (2002) The effects of sequence length and oligonucleotide mismatches on 5' exonuclease assay efficiency. *Nucleic Acids Research*, 30(20): e111

Somura F, Izawa H, Iwase M, Takeichi Y, Ishiki R Nishizawa T, Noda A, Nagata K, Yamada Y, Yokata M (2001) Reduced myocardial sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase mRNA expression and biphasic force-frequency relations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 104(6): 658-663

Specht K, Richter T, Muller U, Walch A, Werner M, Hofler H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue (2001) *Am J Pathol*, 158(2): 419-429

Sperling S, Grimm CH, Dunkel I, Mebus S, Sperling HP, Ebner A, Galli R, Lehrach H, Fusch C, Berger F, Hammer S (2005) Identification and functional analysis of CITED2 mutations in patients with congenital heart defects. *Hum Mutat*, 26(6): 575-82

Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M (2004) Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA Quantification. *Clin Chem*, 50(3): 509-15

Stalmans I, Lambrechts D, De Smet F, Jansen S, Wang J, Maity S, Kneer P, von der Ohe M, Swillen A, Maes C, Gewillig M, Molin DG, Hellings P, Boetel T, Haardt M, Compernelle V, Dewerchin M, Plaisance S, Vlietinck R, Emanuel B, Gittenberger-de Groot AC, Scambler P, Morrow B, Driscoll DA, Moons L, Esguerra CV, Carmeliet G, Behn-Krappa A, Devriendt K, Collen D, Conway SJ, Carmeliet P (2003) VEGF: a modifier of the del22q11 (DiGeorge) syndrome? *Nat Med*, 9(2): 173-82

Starnes SL, Duncan BW, Kneebone JM, Rosenthal GL, Jones TK, Grifka RG, Cecchin F, Owens DJ, Fearneyhough C, Lupinetti FM (2000) Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in children with cyanotic congenital heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000 Mar; 119(3): 534-9

Stentoft J, Pallisgaard N, Kjeldsen E, Holm MS, Nielsen JL, Hokland P (2001) Kinetics of BCR-ABL fusion transcript levels in chronic myeloid leukemia patients treated with STI571 measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Eur J Haematol*, 67(5-6): 302-8

Strachan T, Read A P (1999) *Human Molecular Genetics 2*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford

Su X, Brower G, Janicki JS, Chen YF, Oparil S, Dell'Italia LJ (1999) Differential expression of natriuretic peptides and their receptors in volume overload cardiac hypertrophy in the rat. *J Mol Cell Cardiol*, 31(10): 1927-36

Suda K, Matsumura M, Matsumoto M (2003) Clinical implication of plasma natriuretic peptides in children with ventricular septal defect. *Pediatr Int*, 45(3): 249-54

Sugishita Y, Leifer DW, Agani F, Watanabe M, Fisher SA (2004) Hypoxia-responsive signaling regulates the apoptosis-dependent remodeling of the embryonic avian cardiac outflow tract. *Dev Biol*, 273(2): 285-96

Sutton DH, Conn GL, Brown T, Lane AN (1997) The dependence of DNase I activity on the conformation of oligodeoxynucleotides. *Biochem J*, 321 (Pt 2): 481-486

Taegtmeier H (2000) Genetics of Energetics: Transcriptional Responses in Cardiac Metabolism. *Ann Biomed Eng*, 28(8): 871-6

Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsuura G, Mukoyama M, Itoh H, Saito Y, Tanaka I, Otani H, Katsuki M (2000) Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8): 4239-44

Tevosian SG, Deconinck AE, Tanaka M, Schinke M, Litovsky SH, Izumo S, Fujiwara Y, Orkin SH (2000) FOG-2, a Cofactor for GATA Transcription Factors, Is Essential for Heart Morphogenesis and Development of Coronary Vessels from Epicardium. *Cell*, 101: 729-739

Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C (2002) Quantitative real-time Reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem*, 309: 293-300

Tulevski II, Groenik M, van der Wall EE, van Veldhuisen DJ, Moomsma F, Stoker J, Hirsch A, Lemkes JS, Mulder BJ (2001) Increased brain and atrial natriuretic peptides in patients with chronic right ventricular pressure overload: correlation between plasma neurohormones and right ventricular dysfunction. *Heart*. 2001, 86(1):27-30

Von der Hardt K, Schoof E, Kandler MA, Dötsch J, Rascher W (2002) Aerosolized Perfluorocarbon Suppresses Early Pulmonary Inflammatory Response in a Surfactant-Depleted Piglet Model. *Pediatric Res*, 51 (2): 177-82

Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V (1996) Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation*, 94(7): 1647-54

Wang D, Oparil S, Feng JA, Li P, Perry G, Chen LB, Dai M, John SW, Chen YF (2003) Effects of pressure overload on extracellular matrix expression in the heart of the atrial natriuretic peptide-null mouse. *Hypertension*, 42(1): 88-95

Wang T, Brown MJ (2004) Differential expression of adenylyl cyclase subtypes in human cardiovascular system. *Mol Cell Endocrinol*, 223: 55-62

Whelan JA, Russel NB, Whelan MA (2003) A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Meth*, 278: 261-269

Wilda M, Bruch J, Harder L, Rawer D, Reiter A, Borkhardt A, Woessmann W (2004) Inactivation of the ARF-MDM-2-p53 pathway in sporadic Burkitt's lymphoma in children. *Leukemia*, 18(3):584-8

Wilda M, Fuchs U, Wössmann W, Borkhardt A (2002) Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene*, 21: 5716-24

Winer J, Jung CKS, Shackel I, Williams PM (1999) Development and validation of Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Monitoring Gene Expression in Cardiac Myocytes in Vitro. *Anal Biochem*, 270: 41-49.

Yin Z, Haynie J, Jang X, Han B, Kiatchooskun S, Restiva J, Yuan S, Prabhakar NR, Herrup K, Conlon RA, Hoit BD, Watanabe M, Yang YC (2002) The essential role of Cited2, a negative regulator for HIF-1 $\alpha$ , in heart development and neurulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(16): 10488-93

Yoneda T, Kihara Y, Ohkusa T, Iwanga Y, Inagaki K, Takeuchi Y, Hayashida W, Ueyama T, Hisamatsu Y, Fujita M, Hata S, Matsuzaki M, Sasayama S (2001) Calcium handling and sarcoplasmic-reticular protein functions during heart-failure transition in ventricular myocardium from rats with hypertension. *Life Sci*, 70: 143-157

Yoshiyoshi M, Kamiya T, Saito Y, Nakao K, Nishioka K, Temma S, Itoh H, Shirakami G, Matsuo H (1995) Plasma brain natriuretic peptide concentrations in healthy children from birth to adolescence: marked and rapid increase after birth. *Eur J Endocrinol*, 133(2): 207-9

Yoshimura M, Yasue H, Ogawa H (2001) Pathophysiological significance and clinical application of ANP and BNP in patients with heart failure. *Can J Pharmacol*, 79: 730-35

## MATERIALIEN

### Spezialgeräte

ABI PRISM Cap Installing Tool	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI PRISM Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI PRISM SDS 7700	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Eppendorf-Referenz Pipette, var. 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Referenz Pipette, variable 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Referenz Pipette, variable 10-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mettler PJ800 Waage	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Mixer Mill MM 300	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pipetman® P10	Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipetman® P100	Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipetman® P1000	Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipetman® P2	Gilson, Inc., Middleton, USA
Thermal Cycler PTC-200	MJ Research Inc., Waltham, MA, USA
Ultra-Turrax T 25	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ultrospec™ 1000 UV/Vis Spectrophotometer	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemie, NY, USA
Zentrifuge Hettich EREBA 12	A. Hettich GmbH&Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Hettich Universal 30 RF	A. Hettich GmbH&Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

### Reagenzien und Verbrauchsmaterial

1st. Strand Buffer	Gibco BRL Life Technologies, Merelbeke, Belgien
2-Propanol	JT-Baker, Phillipsburg, NJ, USA
ABI PRISM Optical Caps, (8 Caps/Strip)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Agarosegel (1,5 g Agarose, 100 ml TAE Puffer)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
alkalischen Phosphatase CIP	Gibco BRL Life Technologies, Merelbeke, Belgien
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Chloroform	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DNAfree	Ambion, Austin, TX, USA
dNTP mix 10M	Gibco BRL Life Technologies, Merelbeke, Belgien
DTT 0,1M	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
E. coli t-RNA	Roche, Mannheim, Deutschland
Ethanol absolut	Riedel-de-Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kryotubes 1,5 ml, 39 x 10,8 mm	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Latexhandschuhe, puderfrei	Ansell GmbH, München, Deutschland
LiChrosolv HPLC Wasser	Merck Life Sci. & Analytics, Darmstadt, Deutschland
M13mp19(+)-Strand DNA	Gibco BRL Life Technologies, Merelbeke, Belgien
Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Not I	Gibco BRL Life Technologies, Merelbeke, Belgien
OliGreen Fluorescent Dye	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Parafilm 10 cm	Pechiney Plastic Packaging, Inc., Chicago, ILL, USA

PeqLab Miniprep Kit I	PeqLab, Erlangen, Deutschland
PicoGreen Fluorescent Dye	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Pipettenspitzen mit PE-Filter	Nerbe Plus GmbH, Winsen, Luhe, Deutschland
Predeveloped Taqman Assays	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Primer, custom made	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Random Primer p(dN) <sub>6</sub>	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Reaction-Tubes 0,5, 1,5 und 2,0 ml, RNasefrei	Ambion, Austin, TX, USA
RhoX6	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
RNase A	Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden
RNase OUT	Gibco BRL Life Technologies, Merelbeke, Belgien
RNase OUT	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RNaseZap	Ambion, Austin, TX, USA
RNeasy Protect	Qiagen, Hilden, Deutschland
Safe-Lock-Tubes 0,2, 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Superscript I	Gibco BRL Life Technologies, Merelbeke, Belgien
Superscript II	Gibco BRL Life Technologies, Merelbeke, Belgien
Taqman Probes, custom made	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Taqman Universal Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TE-Puffer	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) Molekular Probes)	
TOP 10F E. coli	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tris-HCl	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
TRIzol	Gibco BRL Life Technologies, Merelbeke, Belgien

**ERKLÄRUNG**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name	Rawer
Vorname	Daniel
Geburtsdatum	20. 05. 1976
Geburtsort	Gießen
Familienstand	verheiratet

### Schulbildung

08/1982 bis 08/1986	Goetheschule Gießen (Grundschule)
08/1986 bis 08/1992	Gesamtschule Schwingbach
08/1992 bis 1995	Goetheschule Wetzlar (Gymnasiale Oberstufe)
9. 6. 1995	Allgemeine Hochschulreife, Durchschnittsnote 1,2

### Zivildienst

1995 bis 1996	In der Medizinischen Klinik II der JLU Gießen
---------------	---

### Beruflicher Werdegang

10/1996 bis 10/2004	<b>Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen</b>
08.09.1998	Ärztliche Vorprüfung, Note 2,0
23.03.2000	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 2,0
09.09.2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 2,0
11.11.2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 2,0
Seit 01/2005	<b>Assistenzarzt</b> am Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Gießen-Marburg, Standort Gießen, Medizinische Klinik II

---

**Wissenschaftliche Arbeit**

- 2000 bis 2005                    **Promotionsarbeit** in der Arbeitsgruppe Prof. Schranz, Abteilung Kinderkardiologie, Zentrum für Kinderheilkunde, Universitätsklinikum Gießen-Marburg, betreut durch Prof. Kreuder
- 02/2002                            **Gastaufenthalt am Max-Planck-Institut** für Molekulargenetik in Berlin, Arbeitsgruppe Prof. Lehrach
- 2002 bis 2004                    Als **wissenschaftliche Hilfskraft** Mitarbeit bei der Betreuung von verschiedenen Projekten in den Arbeitsgruppen Prof. Kreuder, Prof. Gortner und Prof. Reiter am Zentrum für Kinderheilkunde, Universitätsklinikum Gießen-Marburg

**Publikationen - Originalarbeiten**

**Rawer D**, Borkhardt A, Wilda M, Kropf S, Kreuder J (2003) Influence of stochastics on quantitative PCR in the detection of minimal residual disease. *Leukemia*, 17(12):2527-8

Hilgendorff A, **Rawer D**, Doerner M, Tutdibi E, Ebsen M, Schmidt R, Guenther A, Gortner L, Reiss I. (2003) Synthetic and natural surfactant differentially modulate inflammation after meconium aspiration. *Intensive Care Med*, 29(12):2247-54

Wilda M, Bruch J, Harder L, **Rawer D**, Reiter A, Borkhardt A, Woessmann W. Inactivation of the ARF-MDM-2-p53 pathway in sporadic Burkitt's lymphoma in children. *Leukemia*. 2004;18(3):584-8

Hilgendorff A, **Rawer D**, Leick J, Doerner M, Trotter A, Ebsen M, Ruppert C, Günther A, Gortner L, Reiss I (2005) Effects of a recombinant SP-C based surfactant on lung function and surfactant metabolism in a model of meconium aspiration syndrome. *Critical Care Medicine*. In Press.

### Publikationen - Kongressbeiträge

**Rawer D**, Akintürk H, Borkhardt A, Schranz D, Kreuder J. Myocardial gene expression analysis using real-time RT-PCR in paediatric patients - methodological considerations and validation of potential reference genes. European Society of Cardiology(ESC) Annual Congress, Berlin, 2002.

Hilgendorff A, **Rawer D**, Dörner M, Kreuder J, Ebsen M, Gortner L, Reiss. Zytokinexpression nach Gabe von rekombinantem Surfactant beim experimentellen Mekoniumaspirationssyndrom. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, München, 2003.

**Rawer D**, Akintürk H, Borkhardt A, Schranz D, Kreuder J. Expression of ten potential housekeeping genes and marker genes for cardiac stress in patients with Tetralogy of Fallot. Pediatric Academic Societies' (PAS) Annual Meeting, Seattle, 2003

Hilgendorff A, **Rawer D**, Doerner M, Kreuder J, Ebsen M, Gortner L, Reiss I. Cytokineexpression After Application of Recombinant SP-C Surfactant in a Model of Meconium Aspiration Syndrom. PAS Annual Meeting, Seattle, 2003.

**Rawer D**, Hilgendorff A, Hanfstingl T, Doerner M, Reiss I, Gortner L. Surfactant metabolism after treatment with natural and synthetic surfactant preparations in a piglet model of meconium aspiration syndrome. PAS Annual Meeting, San Francisco, 2004.

Hilgendorff A, Hanfstingl T, **Rawer D**, Doerner M, Gortner L, Reiss I. Vascular endothelial growth factor in an animal model of inflammatory-induced lung-injury in the neonate. PAS Annual Meeting, San Francisco, 2004.

Hilgendorff A, Leick J, Hanfstingl T, **Rawer D**, Seeliger AS, Reiss I, Gortner L. Natural bovine and recombinant SP-C surfactant in an animal model of RDS: effects on lung function and surfactant metabolism. PAS Annual Meeting, San Francisco, 2004.

**Rawer D**, Hilgendorff A, Dörner M, Trotter A, Leick J, Hanfstingl T, Reiss I, Gortner L. Genexpressionsanalyse an Tiermodellen des akuten neonatalen Lungenversagens: Evaluation dreier potentieller Housekeeping-Gene für die Real-Time PCR.

---

Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI), Ulm, 2004.

Hilgendorff A, **Rawer D**, Dörner M, Trotter A, Leick J, Hanfstingl T, Gortner L, Reiss I. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) in Modell des experimentellen Mekoniumaspirationssyndroms nach Behandlung mit natürlichen und synthetischen Surfactantpräparaten. Jahrestagung der GNPI, Ulm, 2004.

Leick J, Hilgendorff A, **Rawer D**, Hanfstingl T, Dörner M, Trotter A, Gortner L, Reiss I. Surfactantmetabolismus im Model des experimentellen Mekoniumaspirationssyndroms nach Behandlung mit natürlichen und synthetischen Surfactantpräparaten. Jahrestagung der GNPI, Ulm, 2004.

Hanfstingl T, **Rawer D**, Hilgendorff A, Leick J, Ruppert C, Dörner M, Trotter A, Gortner L, Reiss I. Beeinflussung der Expression surfactant-assoziiierter Proteine durch re-kombinantes SP-C Surfactant in einem Tiermodell für RDS. Jahrestagung der GNPI, Ulm, 2004.

Bähner T, Hilgendorff A, **Rawer D**, Rudloff S, Gortner L. Influence of intrauterine growth restriction on gene expression of surfactant associated proteins in preterm mice. European Society for Peadiatric Research (ESPR), Stockholm, 2004.

## DANKSAGUNGEN

Jochen Kreuder,

für die Aufgabenstellung sowie für die Ressourcen, die Freiheiten und das Vertrauen, um diese Aufgabe selbstständig lösen zu können.

Dietmar Schranz,

für den klinischen Rahmen, ohne den diese Arbeit nicht hätte stattfinden können.

Anne Hilgendorff,

für eine Zusammenarbeit, die es so schnell nicht wieder geben wird.

Arndt Borkhardt,

für die Poisson-Wette, sowie die unverzichtbaren Anregungen und die hilfreiche Kritik.

Monika Wilda,

für die Zusammenarbeit in Sachen Molekulargenetik, die Treffen in den Zügen und auch ihr für die Anregungen und die Kritik.

Kirstin Salser,

für die kurzweiligen gemeinsamen Tage und Wochen an der Pipette.

Den Patienten,

für die Teilnahme an der Studie und die besonderen menschlichen Begegnungen.

Marc Rawer,

für die schnellsten und biochemisch fundiertesten Kommentare.

Tobias Raabe,

für spannende Diskussionsbeiträge aus Garching, Bremerhaven und Auckland über unser beider Doktorarbeiten, das Leben und den ganzen Rest.

Lukas, Svenja und Adrian Nagel, Carina und Isabella Kleinschmitt,

für das Kickerspielen und die Schwimmbadbesuche, für die Geschichten mit der Fledermaus und die trockenen Kommentare, kurz, für genau die richtige Abwechslung zu genau der richtigen Zeit.

Heidi und Peter Rawer,  
für die Doppelkopfabende und vieles mehr.

Janet Rawer,  
für alles.