

Bachelor-Thesis an der Hochschule Luzern - Technik & Architektur

Titel **Etablierung von genetischen Markern zur Diagnostik im Bandscheibenmodell**

Diplomandin/Diplomand **Andreska, Diego**

Bachelor-Studiengang **Bachelor Medizintechnik**

Semester **FS22**

Dozentin/Dozent **Ille, Fabian**

Expertin/Experte **Stämpfli, Philipp**

Abstract Deutsch

Zwischen den Wirbelkörpern der Hals-, Brust- und Lendenwirbelsäule sowie zwischen dem Lendenwirbelkörper 5 und dem Kreuzbein befinden sich Bandscheiben. Ihre Aufgabe besteht darin, Stösse abzdämpfen und die Spinalnerven zu schützen. Mit voranschreitendem Alter kommt es häufig zu Bandscheibendegenerationen, welche sich in Rücken- oder Nackenschmerzen äussern können. Um zukünftig die Auswirkungen verschiedener Belastungen auf die Zellpopulationen der Bandscheibe mittels qPCR untersuchen zu können, sollten für die Gene HSPH1, DNAJA4, ATF3, NR1D1 und FOSB, welche diagnostischen Wert besitzen, Primer etabliert werden. Um zu eruieren, ob bereits etablierte Primer vorhanden waren, wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, in welcher für vier der fünf Gene Primer gefunden werden konnten. Für das Gen DNAJA4 wurden zwei unterschiedliche Primer-Paare selbst erstellt. Zur Verifizierung der Primer diente eine qPCR mit anschliessender Gelelektrophorese. Dabei stellte sich heraus, dass die Primer für das FOSB-Gen aufgrund einer fehlenden Exon-Exon-Junction untauglich sind. Für die Validierung der Primer wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Dadurch konnten die Primer für die Gene HSPH1, ATF3 und NR1D1 validiert werden. Die beiden Primer für das DNAJA4-Gen konnten aufgrund von Unstimmigkeiten nicht abschliessend validiert werden. Die anschliessende Genexpressionsanalyse zwischen zwei Tieren zeigte auf, dass das Gen HSPH1, mit einem Verhältnis von 2, im Tier 1 stärker ausgeprägt ist und das Gen NR1D1, mit einem Verhältnis von 0.06, im Tier 1 schwächer ausgeprägt ist. Ebenfalls wurde bei einem der beiden Primer-Paare für das Gen DNAJA4 ein signifikant höheres Verhältnis von 5 angegeben. Das Fehlen dieser Ausprägung im anderen Primer-Paar legt nahe, dass mindestens eines der beiden Primer-Paare nicht geeignet ist.

Abstract Englisch

Intervertebral discs are located between the vertebrae of the cervical, thoracic and lumbar spine and between the lumbar vertebra 5 and the sacrum. Their function is to absorb shocks and protect the spinal nerves. With advancing age, intervertebral disc degeneration often occurs, which can manifest itself in back or neck pain. In order to be able to investigate the effects of different stresses on the cell populations of the intervertebral disc by qPCR, primers should be established for the genes HSPH1, DNAJA4, ATF3, NR1D1 and FOSB, which have diagnostic value. To determine whether established primers were already available, a literature search was conducted in which primers could be found for four of the five genes. For the DNAJA4 gene, two different primer pairs were designed. A qPCR followed by gel electrophoresis was used to verify the primers. It was found that the primers for the FOSB gene were unsuitable due to a missing exon-exon junction. A dilution series was performed to validate the primers. This allowed validation of the primers for the HSPH1, ATF3, and

NR1D1 genes. The two primers for the DNAJA4 gene could not be finally validated due to inconsistencies. Subsequent gene expression analysis between two animals indicated that the HSPH1 gene, with a ratio of 2, was more highly expressed in animal 1 and the NR1D1 gene, with a ratio of 0.06, was less highly expressed in animal 1. Furthermore, a significantly higher ratio of 5 was reported for the DNAJA4 gene in one of the two primer pairs. The absence of this expression in the other primer pair suggests that at least one of the two primer pairs is not suitable.

Ort, Datum

Zürich, 10.06.2022

© **Diego Andreska, Hochschule Luzern – Technik & Architektur**

Glossar

AF	Anulus fibrosus
cDNA	Complementary DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosid-Triphosphate
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
NFQ	Nonfluorescent-Quencher
NP	Nucleus pulposus
NTC	Non Template Control
qPCR	Real Time Quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure

Inhalt

Glossar.....	I
1. Einleitung	1
1.1 Thema.....	1
1.2 Erkenntnisinteresse.....	1
1.3 Ausgangslage.....	1
1.4 Fragestellung.....	2
1.5 Zielsetzung.....	2
1.6 Methodenwahl.....	3
2. Grundlagen der Biologie	3
2.1 Die Bandscheiben.....	3
2.1.1 Anatomie der Bandscheiben.....	4
2.1.2 Bandscheibendegeneration.....	5
2.2 DNA.....	6
3. Grundlagen der PCR	7
3.1 qPCR.....	8
3.2 Komponenten der PCR.....	9
3.3 Theorie Primer Design.....	9
4. Material und Methoden	10
4.1 Primer-Design.....	10
4.1.1 Literaturrecherche.....	10
4.1.2 Design mit Primer BLAST.....	10
4.1.3 Überprüfung der Parameter.....	11
4.2 cDNA Synthese.....	11
4.2.1 Messung RNA Konzentration.....	11
4.2.2 Durchführung der cDNA Synthese.....	12
4.3 Primer Verifizierung.....	13
4.3.1 Durchführung qPCR.....	15
4.3.2 Gelelektrophorese.....	15
4.4 Primer Validierung.....	16
4.4.1 Durchführung Verdünnungsreihe.....	18
4.4.2 Auswertung Verdünnungsreihe.....	19
4.5 Überprüfung unstimmgiger Ergebnisse.....	20
4.6 Genexpressionsanalyse.....	22
4.6.1 Durchführung qPCR.....	23

4.6.2	Durchführung Genexpressionsanalyse	23
5.	Resultate	24
5.1	Primer Design	24
5.2	Messung RNA-Konzentration	26
5.3	qPCR.....	27
5.4	Gelelektrophorese	27
5.5	Verdünnungsreihe.....	28
5.6	Genexpressionsanalyse	30
6.	Diskussion	31
6.1	Primer Design	31
6.2	Primer Verifizierung.....	31
6.3	Primer Validierung	32
6.4	Genexpressionsanalyse	33
7.	Fazit	33
	Abbildungsverzeichnis	35
	Tabellenverzeichnis.....	35
	Literatur- & Quellenverzeichnis.....	36

1. Einleitung

In der Einleitung werden das Thema, das Erkenntnisinteresse, die Ausgangslage, die Fragestellung und die Zielsetzung der vorliegenden Bachelor-Thesis vorgestellt. Ebenfalls wird kurz auf die Methodenwahl eingegangen.

1.1 Thema

Das Thema der vorliegenden Bachelor-Thesis ist die Etablierung von Genetischen Markern im Bandscheibenmodell.

1.2 Erkenntnisinteresse

Bandscheibendegeneration ist ein häufiges Problem bei älteren Menschen aber auch bei Astronauten nach einem Weltraumaufenthalt. Aufgrund der Komplexität und mangelndem Wissen über die zelluläre Zusammensetzung sind bei einer Erkrankung noch keine zufriedenstellenden Therapien verfügbar.

Um in Zukunft mit Hilfe der qPCR-Methode die Auswirkungen verschiedener mechanischer Belastungen auf die Zellpopulationen der Bandscheibe untersuchen zu können, sollen in dieser Arbeit Primer etabliert werden. Die Gene, für welche dies durchgeführt werden soll, sind gewebespezifisch für einen Zellcluster des Nucleus pulposus, den gelartigen Teil der Bandscheibe.

1.3 Ausgangslage

Bandscheiben befinden sich zwischen den Wirbelkörpern der Hals-, Brust- und Lendenwirbelsäule sowie zwischen dem Lendenwirbelkörper 5 und dem Kreuzbein. Sie setzen sich aus einer knorpeligen Endplatte, dem Anulus fibrosus und dem Nucleus pulposus zusammen. Die knorpelige Endplatte wird während der Entwicklung durch mikroskopisch kleine Gefäße vaskularisiert. Diese verschwinden jedoch, sobald die Bandscheibe ihre Reife erreicht hat. Der Anulus fibrosus ist ein Faserring, der aus kollagenen Fasern und Faserknorpel besteht und den Nucleus pulposus umschliesst. Der Nucleus pulposus besteht aus einem gallertartigen Material mit einem lockeren Netzwerk aus Kollagenfasern. Die Funktion der Bandscheiben besteht darin, die Beweglichkeit der Wirbelsäule zu ermöglichen und Belastungen der Wirbelsäule abzufedern.

In einer Vorstudie wurden mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung in Kombination mit Massen-RNA-Sequenzierung die Zellpopulationen von Anulus fibrosus und Nucleus pulposus in Rinderkalbsschwänzen untersucht. Dabei konnten 24 gewebespezifische Gene für den Anulus fibrosus und 27 gewebespezifische Gene für den Nucleus pulposus identifiziert werden. Um in einem späteren Projekt die Auswirkungen von gezielten mechanischen Belastungen auf die Zellpopulationen der Bandscheibe untersuchen zu können, ist es nötig die gewebespezifischen Gene zu vervielfältigen. Zur Vervielfältigung der Gene soll die Methode der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) verwendet werden.

Bei der PCR wird in einem ersten Schritt eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA, welche amplifiziert werden soll, durchgeführt. Dabei wird beim ersten Durchlauf die Temperatur für ca. 1-5 Minuten auf 95° Celsius erhöht, wodurch die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden DNA-Strängen gespaltet werden. Bei späteren Zyklen reichen

Denaturierungszeiten von wenigen Sekunden, um die wieder entstandenen Wasserstoffbrücken zu trennen. Nach der Denaturierung folgt das Annealing. Dabei bindet sich jeweils ein Oligonukleotid, welches spezifisch auf die zu amplifizierende DNA angepasst wurde, an das 3'-Ende des DNA-Stranges. Diese Oligonukleotide werden auch Primer genannt. Damit das Annealing korrekt abläuft, ist die richtige Temperatur entscheidend. Diese muss an den jeweiligen Primer angepasst werden und befindet sich normalerweise zwischen 55° und 65° Celsius. Bei einer zu hohen Temperatur findet kein Annealing statt und somit auch keine PCR. Bei einer zu tiefen Temperatur entstehen Fehlpaarungen und dadurch unerwünschte PCR-Produkte. Im Anschluss an das Annealing folgt die Elongation, welche meist bei 72° Celsius durchgeführt wird. Bei der Elongation werden die Primer durch eine DNA-Polymerase verlängert und dadurch die DNA-Stränge amplifiziert. Die DNA-Polymerase elongiert die Primer so lange bis der Ursprungs-DNA-Strang endet, oder die Reaktion unterbrochen wird. Damit die Elongation durchgeführt werden kann, sind neben der DNA-Polymerase und den Primern noch freie Desoxynukleosid-Triphosphate notwendig. Nach der Elongation ist ein Zyklus abgeschlossen und ein neuer kann mit der Denaturierung begonnen werden. In jedem Zyklus findet ein exponentielles Wachstum der DNA-Stränge statt, so dass nach 30 Zyklen 10^9 Kopien der Original-DNA vorhanden sind. Nach dem genügend Zyklen abgeschlossen wurden, wird noch ein zusätzlicher Extensionsschritt, von 5-10 Minuten Dauer, durchgeführt. Das Ziel dabei ist, dass Stränge, welche nur partiell verlängert wurden, vervollständigt werden. Diese können entstehen, da die DNA-Polymerasen mit steigender Zykluszahl immer langsamer werden.

Um in einer Zelle ein spezifisches Gen während eines bestimmten Zellzyklus identifizieren zu können, wird die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) verwendet. Diese Methode beruht auf der PCR, sie ermöglicht zusätzlich jedoch noch die Quantifizierung der gewonnenen PCR-Produkte und damit Erkenntnisse über das An- und Abschalten von Genen in spezifischen Situationen. Die Quantifizierung erfolgt dabei in der Regel durch fluoreszierende Moleküle, welche an sequenzspezifische Oligonukleotide gekoppelt sind. Die Detektion basiert auf der Anregung der Fluorophore und der darauffolgenden Emission von Fluoreszenzsignalen durch diese. Damit die fluoreszierenden Moleküle erst nach der Amplifikation Licht ausstrahlen, werden sogenannte Quencher eingesetzt, welche das Fluoreszieren unterdrücken. Durch die Amplifikation der Gensequenz werden Quencher und Fluorophor räumlich getrennt und es kommt zur Emission von Licht, welches detektiert werden kann. Diese Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu und kann in Echtzeit erfasst werden.

1.4 Fragestellung

Es stellt sich die Frage, ob bereits Primer für die Gene HSPH1, DNAJA4, ATF3, NR1D1 und FOSB entwickelt wurden. Bei bereits etablierten Primern als auch bei allfälligen, im Zuge dieser Arbeit entwickelten Primern, muss untersucht werden, wie effektiv diese Primer im Einsatz sind.

1.5 Zielsetzung

In dieser Bachelor-Thesis soll zu Beginn eine Literaturrecherche durchgeführt werden, um zu eruieren, ob bereits Primer für die fünf Gene, bzw. für einzelne Gene, entwickelt wurden. Bei jenen Genen, für die noch keine Primer etabliert wurden, sollen jeweils zwei Primer entwickelt werden. Sobald für alle Gene zwei Primer vorhanden sind, sollen diese auf ihre Effizienz getestet und validiert werden. Als Vorbereitung für das Testen und Validieren der

Primer soll eine Gewebeanalyse durchgeführt werden. Abschliessend soll eine Ergebnisanalyse realisiert werden.

1.6 Methodenwahl

Zu Beginn dieses Projektes muss eine Literaturrecherche über die Anatomie und Physiologie der Bandscheiben sowie über das Prinzip und den Ablauf der PCR durchgeführt werden, um so ein besseres Verständnis für die Materie zu erlangen. In einem nächsten Schritt muss eine weitere Literaturrecherche realisiert werden, damit untersucht werden kann, ob bereits Primer für die fünf bereitgestellten Gene etabliert wurden. Falls für eines oder mehrere dieser Gene noch keine Primer vorhanden sind, müssen für diese Gene noch jeweils zwei Primer entwickelt werden. Sobald für alle Gene jeweils zwei Primer vorhanden sind, müssen diese Primer getestet und validiert werden. Als Grundlage für die Validation und das Testen der Primer dient RNA, welche während einer Gewebeanalyse extrahiert werden muss. Im Anschluss muss eine Ergebnisanalyse durchgeführt werden. Alle Ergebnisse müssen in einem elektronischen Laborbuch festgehalten werden.

2. Grundlagen der Biologie

Die folgenden Unterkapitel befassen sich mit den biologischen Grundlagen, welche für das Verständnis dieser Arbeit essenziell sind.

2.1 Die Bandscheiben

Die Wirbelsäule (Columna vertebralis) bildet die zentrale Achse des menschlichen Skeletts. Sie setzt sich aus 24 Wirbeln (Vertebrae), welche sich auf die Hals- Brust- und Lendenwirbelsäule verteilen, sowie Kreuz- und Steissbein zusammen. Im Spinalkanal der Wirbelsäule verläuft das Rückenmark. Die gegeneinander beweglichen Wirbel ermöglichen Bewegungen um die Längsachse sowie nach vorne, hinten, links und rechts. Diese Beweglichkeit wird durch die Bandscheiben (Disci intervertebrales) unterstützt (Guzek et al., 2016).

2.1.1 Anatomie der Bandscheiben

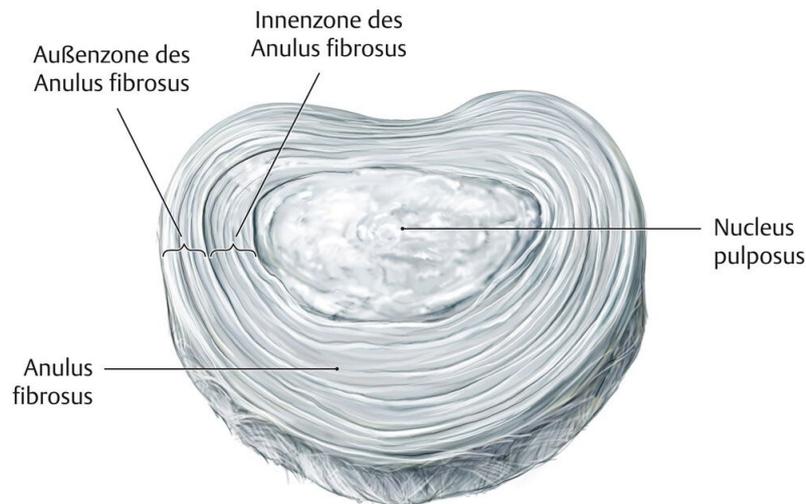


Abbildung 1: Anatomie der Bandscheibe, ohne knorpelige Endplatte (Thieme eRef, o. J.)

Die durchschnittlich 5mm dicken Bandscheiben befinden sich zwischen den Wirbelkörpern der Hals-, Brust- und Lendenwirbelsäule sowie zwischen dem Lendenwirbelkörper 5 und dem Kreuzbein. Ihre Aufgabe ist es, Stöße abzdämpfen, die Spinalnerven zu schützen und die Beweglichkeit zu erhöhen. Sie sind nicht komprimierbar aber verformbar (Guzek et al., 2016, S. 91). Bandscheiben bestehen aus drei Hauptbereichen: der knorpeligen Endplatte, dem Anulus fibrosus (AF) und dem Nucleus pulposus (NP) (siehe Abbildung 1).

Die Endplatte bildet die Schnittstelle zu den Wirbeln und begrenzt die Bandscheiben cranial und caudal. Sie besteht aus hyalinem Knorpel. In ihre extrazelluläre Matrix, welche reich an Kollagen Typ II und Aggrecan, einem Proteoglykan, ist, sind Chondrozyten eingebettet (Calió et al., 2021).

Der Anulus fibrosus ist ein Ring aus Faserknorpel und kollagenen Fasern (Guzek et al., 2016, S. 91). Die Kollagenfasern sind schichtartig angeordnet und enthalten einzelne, eingelagerte Chondrozyten (Schürer, 2008). Der AF ist über die Lamellen aus Faserknorpel und Kollagenfasern mit der Endplatte verbunden. Diese konzentrischen Lamellen umschließen ebenfalls den Nucleus pulposus (Calió et al., 2021). Die Ausrichtung der Lamellen ist dabei nicht einheitlich, die Fasern besitzen eine Ausrichtung von ca. 30° zur Longitudinalachse der Wirbelsäule, wobei sich die Richtung mit jeder Schicht ändert. Dies führt zu einer optimalen Zugfestigkeit (Kepler et al., 2013). Die Kollagenfasern werden über zwei Mechanismen gespannt: einerseits durch direkten radialen Druck, welcher vom Nucleus pulposus stammt, andererseits durch eine caudal-craniale Dehnung, welche durch die Trennung der beiden Endplatten entsteht (Vergroesen et al., 2015). Der Gehalt an Kollagenen nimmt vom äusseren Ring des AF zum inneren NP kontinuierlich ab, der Gehalt an Wasser und Proteoglykanen steigt dagegen in derselben Richtung an (Schürer, 2008).

Der gallertartige Nucleus pulposus bildet den Kern der Bandscheibe. Er ist für die stossdämpfende Funktion zuständig. Durch seinen hohen osmotischen Druck zieht er im Ruhezustand, z.B. im Liegen, Wasser aus der Umgebung an, was zu einem Anschwellen führt. Dieses Anschwellen ist auch für den weiter oben erwähnten Druck auf den Anulus fibrosus verantwortlich. Bei Druckbelastungen kann sich der NP lediglich verformen, nicht komprimieren. Dies führt dazu, dass es zu einer seitlichen Verschiebung kommt, welche die

Fasern des Anulus fibrosus weiter dehnt und es zu einer Wölbung nach aussen kommt (Schwegler & Lucius, 2011). Der Nucleus Pulposus besteht, je nach Alter, zu 70-90% aus Wasser, die restlichen Bestandteile sind Proteoglykane und Kollagen des Typs II. Die Bestandteile sind damit denen der knorpeligen Endplatte sehr ähnlich. Der Unterschied liegt im Verhältnis von Proteoglykanen zu Kollagen. Dieses Verhältnis ist in der Endplatte ca. 2:1, im NP jedoch 27:1. Wie bei der Endplatte ist das Proteoglykan Aggrecan. Dieser hohe Anteil an Aggrecan ist für die guten wasserbindenden Eigenschaften und die starke Verformbarkeit des NP verantwortlich. Der Gehalt an Proteoglykanen, und damit auch die Fähigkeit Wasser zu binden, nimmt mit zunehmendem Alter stetig ab, was wiederum zu einer Abnahme des Drucks auf den Anulus Fibrosus zur Folge hat (Pattappa et al., 2012).

2.1.2 Bandscheibendegeneration

Schmerzen im unteren Rücken oder Nacken sind ein häufiges Leiden, welches ca. 70% aller Erwachsenen mindestens einmal in ihrem Leben betrifft. Schmerzen dieser Art werden häufig mit einer Degeneration der Bandscheiben in Verbindung gebracht (Ma et al., 2019).

Mit fortschreitendem Alter verändern sich die Bandscheiben und ihre Zusammensetzung. So nimmt der Gehalt an Wasser und Proteoglykanen stetig ab, während der Kollagengehalt zunimmt. Dies ist vor allem im Nucleus pulposus zu beobachten. Die Abnahme an Proteoglykanen ist ein schleichender Prozess, was der Einkapselung des Nucleus pulposus zwischen Anulus fibrosus und den knorpeligen Endplatten geschuldet ist. Gleichzeitig führt der verringerte Matrixumsatz zu Vernetzungen zwischen Kollagenmolekülen und Fibrillen. Diese verstärkte Quervernetzung hemmt den Matrixumsatz weiter und führt zur Beibehaltung von beschädigten Makromolekülen, was wiederum zu einer verminderten Festigkeit des Gewebes führt (Adams & Roughley, 2006).

Während der Entwicklung wird die Wirbelsäulenendplatte durch mikroskopische Gefässe vaskularisiert. Diese Gefässe verschwinden jedoch während des Reifungsprozesses der Bandscheibe (Calió et al., 2021). Während der Wachstumsphase nimmt die Zelldichte stetig ab und nach Erreichen der Skelettreife nehmen die Anzeichen struktureller Defekte, welche bis in den AF reichen, stetig zu. Grundsätzlich betreffen diese Veränderungen zuerst die Endplatte, dann den NP und schliesslich den AF, wobei verschiedene Ebenen der Wirbelsäule in ähnlichem Ausmass betroffen sind. Dies führt dazu, dass mikrostrukturelle Spalten und Risse, insbesondere im NP und der Endplatte, ab einem Alter von 15 Jahren häufig auftreten (Adams & Roughley, 2006). Zu den altersbedingten Veränderungen der Bandscheibe gehören ebenfalls das Vorhandensein von granularem Material, Zellproliferation, die Bildung von Clustern und ein erhöhtes Mass an Zelltod. Auch kommt es zunehmend zu einem Verlust der Abgrenzung zwischen AF und NP. Wahrscheinlich wird diese frühe Degeneration teilweise durch die rasche Verringerung der Nährstoffversorgung hervorgerufen (Roberts et al., 2006).

Die Degenerationen der Bandscheibe können zu verschiedenen strukturellen Versagensmechanismen führen. So können Risse im Anulus fibrosus entstehen, welche in drei Arten unterschieden werden: umlaufende Risse, periphere Risse der Ränder und radiale Fissuren. Die Häufigkeit dieser Risse nimmt ab dem Alter von 10 Jahren zu und erreicht ihren Höhepunkt im mittleren Alter, wobei meist die untere Lendenwirbelsäule betroffen ist. Auch die knorpeligen Endplatten können von Degenerationen betroffen sein. Schäden an der Endplatte führen dazu, dass der Nucleus pulposus entlastet und somit die Kraft auf den Anulus fibrosus übertragen wird. Dadurch wölbt dieser sich in die Kernhöhle vor. Bei einem Durchbruch des NP durch die beschädigte Endplatte kann es durch die folgende Kalzifikation

zu einem Schmorl-Knötchen kommen. Die bekannteste Degeneration der Bandscheibe ist vermutlich der Bandscheibenvorfall. Bei diesem Leiden kommt es durch radiale Fissuren im AF zu einer Migration des NP, wobei dieser aus dem AF austritt. Je nach Schweregrad spricht man dabei von einem Vorfall oder einem Prolaps (Adams & Roughley, 2006).

2.2 DNA

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) setzt sich aus zwei langen, zu einer Doppelhelix verdrillten Polynukleotidketten zusammen. Jeder dieser DNA-Stränge setzt sich wiederum aus Nukleotiden mit unterschiedlichen Basen zusammen. Die Basen sind Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) und besitzen ein Rückgrat aus Zucker- und Phosphatresten. Die Nukleotide sind über Phosphodiesterbindungen zwischen der 3'-Hydroxylgruppe des einen und dem 5'-Phosphat des anderen verbunden. Somit lassen sich auch die Enden eines Stranges unterscheiden, da am einen Ende eine 3'-Hydroxylgruppe und am anderen eine 5'-Phosphatgruppe sitzt. Die Enden werden basierend auf dieser Gegebenheit auch als 3'- und 5'-Ende bezeichnet. Dadurch, dass am 3'-Ende eine freie OH-Gruppe und am 5'-Ende eine freie Phosphatgruppe ist, erhält die Polynukleotidkette eine chemische Polarität (Wink, 2011).

Die beiden DNA-Stränge sind über Wasserstoffbrücken zwischen den Basen der Polynukleotidketten verbunden. Es sind jeweils zwei Basen komplementär zueinander; so bindet sich immer Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin. Dabei binden sich Guanin und Cytosin über drei Wasserstoffbrücken aneinander, während Adenin und Thymin nur eine doppelte Verbindung aufbauen. Die Basen eines Paares passen zueinander, weil die Stränge jeweils in die entgegengesetzte Richtung verlaufen, folglich so, dass einer der Stränge das 3'-Ende am oberen Ende besitzt und der andere am unteren Ende. Die beiden Stränge winden sich dabei so umeinander, dass die charakteristische Doppelhelix entsteht. Das Umeinanderwinden erzeugt zwei unterschiedliche Furchen in der Doppelhelix, von denen die breitere als grosse Furche und die schmalere als kleine Furche bezeichnet wird (Wink, 2011). Der Aufbau der DNA ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

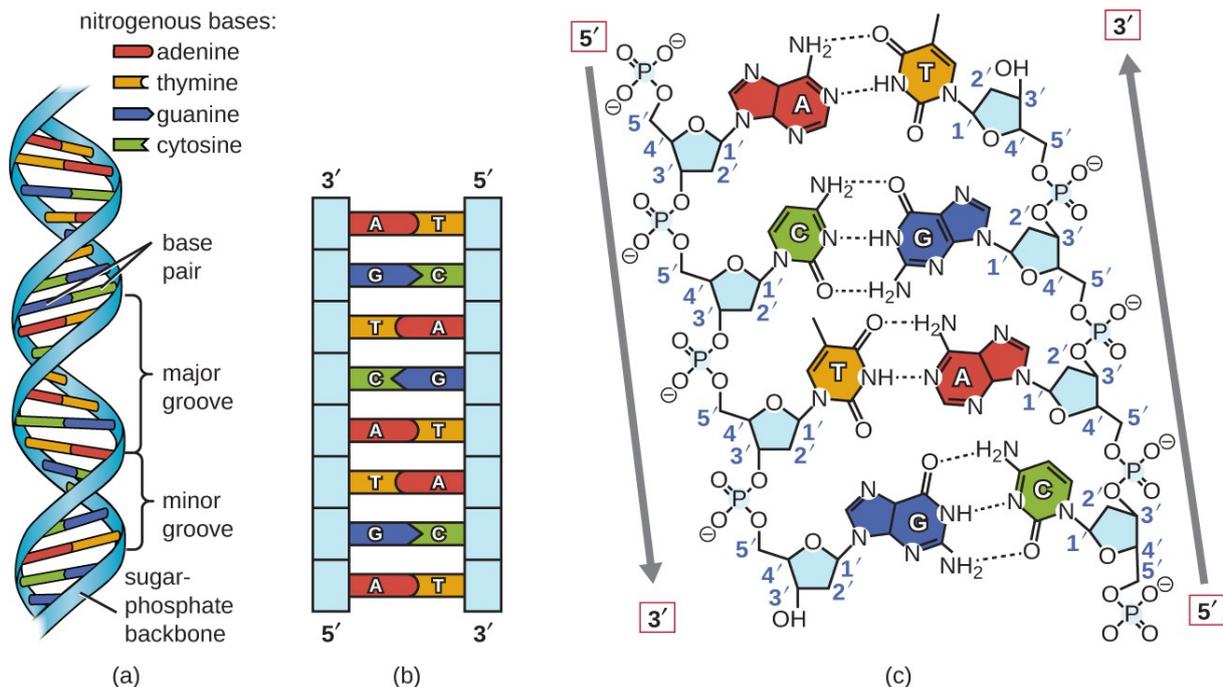


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der DNA (Quora, o. J.)

Die genetischen Informationen werden in der DNA durch die Reihenfolge der Nukleotide in beiden Strängen codiert. Drei aufeinanderfolgende Basen bilden ein Codon oder Basentriplett, welches jeweils für eine von 20 Aminosäuren steht. Durch die Reihenfolge der Basentriplets wird auch die Reihenfolge der Aminosäuren und dadurch das zu synthetisierende Protein codiert. Gewisse Proteine sind in allen Zellen eines Organismus vorhanden, diese werden Haushaltsproteine genannt. Jede Zellart produziert aber auch Proteine, welche für die spezifischen Eigenschaften dieser Zellart verantwortlich sind. Zellen können ebenfalls durch unterschiedliche Genexpressionen auf extrazelluläre Reize reagieren. Durch Erkenntnisse über die Genexpressionen bei unterschiedlichen Gegebenheiten können Rückschlüsse auf Behandlungsmethoden für Leiden, welche unter diesen Umständen auftreten, getroffen werden (Wink, 2011).

3. Grundlagen der PCR

Normalerweise ist die Ziel-DNA in einer Probe nur in geringen Mengen vorhanden. Dies führt dazu, dass Tests zum Nachweis dieser DNA ohne eine vorherige Amplifikation ineffektiv sind. Die Vervielfältigung der DNA erhöht die Sensitivität des Nachweises und gewährleistet gleichzeitig ein hohes Mass an Spezifität. Für die Vervielfältigung wird meist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Picó, 2007). Bei der PCR reichen schon geringe Mengen an DNA aus, um diese in vitro zu vervielfältigen. Das Prinzip der PCR basiert auf drei aufeinanderfolgenden Schritten, welche mehrmals wiederholt werden (Müller & Prange, 2016).

Der erste Schritt ist die Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Dabei wird die Temperatur auf 95° Celsius erhöht, was dazu führt, dass die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Strängen gespalten werden. Somit sind nach der Denaturierung zwei einzelne Stränge vorhanden. Bei der ersten Durchführung sollte die Denaturierungszeit ca. 1-5 Minuten betragen. So wird sichergestellt, dass die DNA komplett denaturiert wird. Während den darauffolgenden Zyklen ist eine Denaturierungszeit von wenigen Sekunden ausreichend. Als zweiter Schritt folgt das Annealing. Dabei lagert sich ein spezifisch auf den zu amplifizierenden Teil der DNA angepasster Oligonukleotid an das 3'-Ende der DNA an. Diese Oligonukleotide werden Primer genannt. Da DNA aus zwei Strängen besteht, welche in unterschiedliche Richtungen verlaufen, werden auch zwei Primer benötigt. Diese werden als Vorwärts- und Rückwärts-Primer bezeichnet. Während dem Annealing ist die richtige Temperatur ausschlaggebend. Diese sollte für jedes Primer-Paar angepasst werden. Bei einer zu hohen Temperatur während des Annealing-Prozesses erfolgt kein Annealing, weshalb keine Vervielfältigung der DNA stattfinden kann. Bei zu niedrigen Temperaturen findet unspezifisches Annealing statt und es entstehen Fehlpaarungen, welche zu unspezifischen PCR-Produkten führen. Die optimale Annealingtemperatur ist abhängig vom mittleren Schmelzwert der Primer. Auf das Annealing folgt die Elongation, die Verlängerung der Oligonukleotide. Diese findet meist bei 72° Celsius statt. Während der Elongation verlängert eine DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynukleosid-Triphosphate die Primer und amplifiziert dadurch die DNA-Stränge. Die DNA-Polymerase elongiert die entstehenden Stränge so lange, bis die Reaktion unterbrochen wird oder die Ursprungs-DNA endet. Als DNA-Polymerase wird meist die Taq-DNA-Polymerase verwendet. Diese wurde aus dem Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isoliert und ist thermostabil. Dies bietet den Vorteil, dass alle Komponenten in einem Reaktionsgefäß vereinigt werden können und die PCR vollautomatisch in einem Thermocycler durchgeführt werden kann. Nach der Elongation ist

ein Zyklus abgeschlossen und ein weiterer kann mit der Denaturierung gestartet werden. Üblicherweise werden 25-30 Zyklen durchgeführt, wobei sich die Anzahl an PCR-Produkten mit jedem Zyklus verdoppelt. Nach dem alle Zyklen abgeschlossen wurde, wird noch eine zusätzliche Elongation durchgeführt. Dieser Extensionsschritt sollte zwischen 5-15 Minuten dauern. Ziel dieses zusätzlichen Schrittes ist es, partiell verlängerte Produkte zu komplettieren. So kann verhindert werden, dass viele unspezifische Produkte das Ergebnis verfälschen (Müller & Prange, 2016). Abbildung 3 zeigt schematisch den Ablauf der PCR.

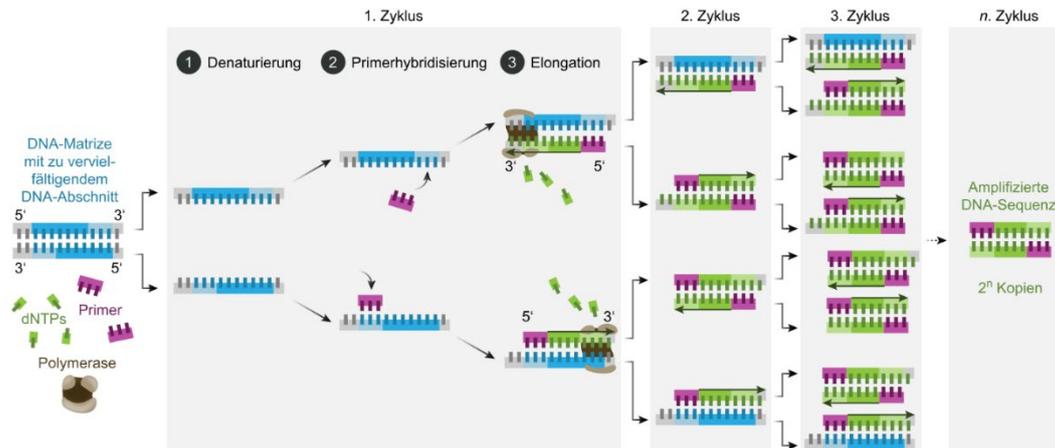


Abbildung 3: Schematische Darstellung der PCR (Wikimedia, 2020)

3.1 qPCR

Mit der PCR sind nur qualitative Aussagen nach Ablauf des gesamten Prozesses möglich. Um quantitative Aussagen in Echtzeit liefern zu können wird die quantitative Real-Time-PCR (qPCR) verwendet. Die qPCR basiert auf der herkömmlichen PCR in Kombination mit Fluoreszenz-Messungen, wobei die Fluoreszenz proportional mit der Menge an PCR-Produkten zunimmt (Holzapfel & Wickert, 2007).

Es existieren verschiedene Formate für die Fluoreszenzdetektion. Eines davon ist die TaqMan-Sonde. Diese Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, ähnlich wie ein Primer. Im Unterschied zu einem Primer ist die Sonde aber mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und am 3'-Ende mit einem Nonfluorescent-Quencher (NFQ) ausgestattet. Die Licht-Emission des Reporters wird durch die Nähe zum NFQ unterdrückt, da dieser die Fluoreszenz-Energie des Reporters aufnimmt. Die TaqMan-Sonde bindet sich wie ein Primer an den zu vervielfältigenden DNA-Strang. Im Gegensatz zu einem Primer kann sie aber nicht verlängert werden und bindet innerhalb der zu verlängernden Sequenz an den DNA-Strang. Wird nun der Primer während der Elongation verlängert, wird die TaqMan-Sonde aufgelöst und der Reporter und der NFQ werden räumlich getrennt. Dies führt zu einer Emission durch den Reporter, welche gemessen werden kann (*How TaqMan Assays Work*, o. J.). Auf einem ähnlichen Prinzip basieren Molecular Beacon. Dies sind fluoreszierende Sonden aus Oligonukleotiden, welche durch komplementäre Stammsequenzen an beiden Enden in eine Haarnadelform gebracht werden. Wie bei einer TaqMan-Sonde befindet sich auch bei einem Molecular Beacon am 5'-Ende ein Reporter und am 3'-Ende ein Quencher, wobei der Quencher durch die räumliche Nähe die Emissionen des Reporters unterdrückt. Die Haarnadelschleife ist ein zur Zielsequenz komplementäres Oligonukleotid, welches sich nach der Elongation mit dieser hybridisiert. Dadurch öffnet sich die Schleife und Reporter und

Quencher werden auseinandergezogen. Dies führt zu einer Fluoreszenzemission, welche gemessen werden kann (Holzapfel & Wickert, 2007).

Auf einem anderen Prinzip basiert SYBR Green I. Dies ist ein Farbstoff, welcher sich an die kleine Furche in doppelsträngiger DNA bindet. Da die Furche nur durch die Verdrillung zweier Stränge entstehen kann, bindet der Farbstoff sich nur an doppelsträngige und nicht an einzelsträngige DNA. Nach der Verbindung mit der DNA erhöht sich die Fluoreszenz des Farbstoffes um das bis zu 100-fache. Während der Amplifikation der DNA durch die qPCR bindet sich SYBR Green I an jede neue doppelsträngige Kopie und erhöht dadurch die Gesamtfluoreszenz. Beim Einsatz von SYBR Green I muss beachtet werden, dass die Bindung unspezifisch ist, wodurch falsch positive Ergebnisse erzielt werden können (Picó, 2007).

3.2 Komponenten der PCR

Damit eine PCR korrekt ablaufen kann, müssen die verschiedenen Komponenten korrekt aufeinander abgestimmt werden. Wie bereits in Kapitel 3 erwähnt, wird als Polymerase meist Taq-DNA-Polymerase verwendet. Die Vorteile bei dieser DNA-Polymerase liegen im geringen Preis sowie der hohen Robustheit und Prozessivität. Es gibt jedoch noch weitere DNA-Polymerasen, welche spezielle Fähigkeiten besitzen und eine höhere Prozessivität sowie grössere Toleranzen gegenüber Pufferschwankungen oder geringere Fehlerhäufigkeiten aufweisen (Müller & Prange, 2016).

Essenziell für eine effektive PCR sind auch PCR-Puffer. Diese sorgen für ein (annähernd) optimales Milieu für die Polymerase. Die korrekte Zusammensetzung des Puffers ist ausschlaggebend für das Resultat der PCR, wobei die Variabilität praktisch endlos ist. Drei Komponenten sind jedoch in allen Puffer vorhanden: Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs), Cl⁻Ionen und Mg²⁺Ionen. Die Desoxynukleosid-Triphosphate bilden mit den Mg²⁺Ionen einen Komplex und werden von der DNA-Polymerase in Abhängigkeit der Basenpaarungsregel an das freistehende 3'-Ende des zu synthetisierenden Stranges gekoppelt. Dabei werden Wasser und Pyrophosphat abgespalten. Um grosse DNA-Fragmente erfolgreich zu amplifizieren, sollten dNTPs mit möglichst wenigen Modifizierungen verwendet werden (Müller & Prange, 2016).

3.3 Theorie Primer Design

Gemäss Bustin und Hugget (2017) sind Primer die wichtigsten Komponenten eines PCR-Tests. Die Spezifität und Sensitivität der gesamten PCR wird massgeblich durch die Qualität der Primer beeinflusst. Schlechtes Design und nicht optimierte Reaktionsbedingungen können zu falsch positiven oder falsch negativen Resultaten führen.

Um ein optimales Primer Design zu ermöglichen haben sich Regeln etabliert, welche eingehalten werden sollten. So sollte die Länge der Primer zwischen 18 und 21 Basen betragen, wobei das Optimum 20 Basen sind. Ebenfalls muss der Gehalt an Guanin und Cytosin beachtet werden. Dieser befindet sich optimalerweise zwischen 40-60 %, wobei auch 20-80% noch vertretbar sind. Die Schmelztemperatur der Primer ist bei 62°C optimal, darf aber zwischen 59-65°C liegen. Beim Designen der Primer sollte darauf geachtet werden, dass sich Basen nicht mehr als dreimal hintereinander wiederholen. So sollten beispielsweise nicht vier Adenin-Basen direkt aufeinander folgen. Auch sollten Sekundärstrukturen an der Bindungsstelle vermieden werden und darauf geachtet werden, dass sich keine sogenannten

Primer-Dimer bilden. Primer-Dimer entstehen, wenn die Primer zueinander oder zu ihren Gegenstücken komplementär sind und sich so unerwünschte Hybridisierungen bilden. Andere mögliche Fehlhybridisierungen sind die Haarnadelstrukturen, welche sich bilden, wenn das 3'- und 5'-Ende eines Primers komplementär zueinander sind. Zuletzt sollte auch auf die Spezifität der Primer geachtet werden. So sollten bei möglichen unerwünschten Hybridisierungen mit anderen Sequenzen als der Zielsequenz darauf geachtet werden, dass im Minimum drei Fehlpaarungen zwischen den Basen des Primers und der Sequenz vorhanden sind (Tanner, 2021).

4. Material und Methoden

Die folgenden Unterkapitel beschreiben die Materialien sowie die Konzeption und Realisierung der nächsten Schritte dieser Projektarbeit.

4.1 Primer-Design

Das Ziel des Primer-Designs war es, für fünf bovine Markergene von diagnostischem Wert jeweils einen Vorwärts- und einen Rückwärtsprimer zu etablieren. Die Markergene, für welche dies durchgeführt werden sollte, sind:

- HSPH1
- DNAJA4
- ATF3
- NR1D1
- FOSB

4.1.1 Literaturrecherche

Als erster Schritt des Primer-Designs wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. Dabei sollte eruiert werden, ob bereits in vorhergehenden Studien Primer für die gesuchten Gene bei Rindern verwendet wurden. Für die Durchführung der Recherche wurde die Webseite Google Scholar (<https://scholar.google.ch/>) verwendet, wobei nach den Namen der Gene in Kombination mit *Bos taurus* und qPCR gesucht wurde. Die Stichworte *Bos taurus* und qPCR waren entscheidend um sicherzustellen, dass wirklich Primer, welche für die qPCR bei Rindern eingesetzt wurden, gefunden werden konnten.

4.1.2 Design mit Primer BLAST

Für Gene, bei denen es nicht möglich war, eine Studie ausfindig zu machen, in welcher Primer für die Anwendung an boviner DNA verwendet wurden, wurden Primer mit Hilfe des Tools Primer BLAST entwickelt. Dafür wurde auf der Webseite des U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) nach linearer mRNA des gesuchten Gens bei Hausrindern gesucht. Nach dem Auffinden dieser, wurde über den Link «Pick Primers» das Tool Primer BLAST geöffnet. Im Primer BLAST wurden einige Anpassungen an den Voreinstellungen getroffen. So wurde die Länge des PCR-Produktes auf 80-150 Basenpaare begrenzt. Ebenfalls wurde die Schmelztemperatur so angepasst, dass das Minimum bei 59°, das Optimum bei 62° und das Maximum bei 65° Celsius liegt. Weiter wurde spezifiziert, dass mindestens ein Intron in der genomischen DNA das Primer-Paar

trennen muss. Um die Spezifität zu gewährleisten, wurde die Anzahl der Fehlpaarungen bei unerwünschten Hybridisierungen auf drei erhöht.

4.1.3 Überprüfung der Parameter

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, müssen Primer für eine optimale Durchführung der qPCR bestimmte Parameter erfüllen. Zur Überprüfung dieser Parameter wurden zwei unterschiedliche Tools verwendet. Diese waren:

- AmplifX
- OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>)

Falls bei Primern in der Literatur keine Angaben zur Länge des Amplicons vorhanden waren, wurde das Programm AmplifX verwendet, um diese zu berechnen. In diesem Programm wurden die Sequenzen der Primer sowie jene des Genes eingetragen, woraufhin eine digitale PCR durch das Programm ausgeführt wurde. Falls bei Genen in der Literatur die Accession Number für die Datenbank auf der NCBI-Webseite angegeben wurde, konnte die korrelierende Gen-Sequenz eindeutig identifiziert werden. Falls diese Nummer nicht angegeben wurde, musste manuell nach der passenden Sequenz gesucht werden.

Für die Überprüfung auf Primer-Dimer wurde der OligoAnalyzer verwendet. In diesem Tool konnte die freie Enthalpie bei Self-Dimern, Hetero-Dimern und Hairpin-Strukturen berechnet werden. Ebenfalls konnte die Schmelztemperatur für Primer aus der Literaturrecherche berechnet werden.

4.2 cDNA Synthese

Der nächste Schritt zur Vorbereitung der Primer-Verifizierung wäre eine Gewebeanalyse gewesen. Dabei wären Gewebeproben aus dem Nucleus Pulposus kaudaler Rinderbandscheiben entnommen worden. Aus diesen Gewebeproben hätte anschliessend RNA (ribonucleic acid) extrahiert und aufgereinigt werden müssen. Auf die Gewebeanalyse konnte jedoch verzichtet werden, da noch isolierte RNA aus dem Nucleus Pulposus von einer vorhergehenden Arbeit vorhanden war.

Vor dem Testen der Primer musste aus der vorhandenen RNA, cDNA (complementary DNA) synthetisiert werden. cDNA ist ein einzelsträngiges DNA-Molekül, welches komplementär zur RNA-Sequenz ist. Die Synthetisierung der cDNA ist aus mehreren Gründen nötig. So kann die verwendete DNA-Polymerase nur DNA-Synthesen katalysieren und keine RNA-Synthesen. Ebenfalls ist RNA weniger stabil als cDNA. Ein weiterer Vorteil der cDNA ist, dass diese im Gegensatz zu genomischer DNA keine Introns enthält, da sie komplementär zur RNA ist. Dadurch werden unnötig lange PCR-Produkte vermieden.

4.2.1 Messung RNA Konzentration

Bevor die Synthese der cDNA durchgeführt werden konnte, musste die Konzentration der vorhandenen RNA bestimmt werden. Dafür wurde das Spektralphotometer NanoDrop 2000 verwendet, wobei nach dem Protokoll «Nanodrop_Procedure», welches sich im Anhang, im Ordner Protokolle befindet, vorgegangen wurde.

Die Materialien, welche bei der Messung der RNA Konzentration verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Materialien für die Messung der RNA Konzentration

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer.
NanoDrop 2000 Spektralphotometer	Thermo Scientific	n/a
Reinstwasser (ultrapure water)	n/a	n/a
Kimtech-Tücher	Kimtech	n/a
RNA-Probe (auf Eis)	n/a	n/a

Nachfolgend wird das Vorgehen für die Messung der RNA Konzentration beschrieben:

1. Programm «NanoDrop2000» auf PC starten
2. «Nucleic Acid» anklicken
3. «type» auf «RNA» einstellen
4. Reinigung des Sockels: Den Hebelarm anheben, anschliessend 2µl Reinstwasser auf den Sockel pipettieren und den Hebelarm wieder senken. Danach den Hebelarm anheben und den Sockel mit einem Kimtech-Tuch abwischen.
5. Nochmals 2µl Reinstwasser auf den Sockel pipettieren und anschliessend den Hebelarm senken. Den Knopf «blank» im Programm anklicken und warten, bis die Leermessung abgeschlossen ist.
6. Den Hebelarm anheben und das Wasser mit einem Kimtech-Tuch abwischen. Anschliessend 2µl der zu messenden RNA-Probe auf den Sockel pipettieren. Danach im Programm auf «measure» klicken.
7. Den Speicherort für die Datei auswählen.
8. Resultat erscheint. Die Spitze der Kurve sollte sich bei einer Wellenlänge von 260nm befinden und das 260/280 Verhältnis sollte nahe bei 2 sein.
9. Probe mit Kimtech-Tuch abwischen und Schritt 4 nochmals durchführen.
10. Hebelarm senken und Programm auf dem Computer beenden.

4.2.2 Durchführung der cDNA Synthese

Die Synthetisierung der cDNA erfolgte nach dem Protokoll «Reverse Transcription cDNA synthesis protocol», welches sich im Anhang, im Ordner Protokolle befindet. Die Materialien, welche für die Synthese der cDNA verwendet wurden, sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Materialien für cDNA Synthese

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
RNA-Lösung	n/a	n/a
ddH ₂ O	n/a	n/a
Hexanucleotide Primers (random Primers)	Sigma	SLB8586
dNTP Mix (10mM)	Thermo Scientific	R0192
5X First Strand Buffer	Invitrogen	2170739
0.1 M DTT	Invitrogen	2124338
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µ, 2500 U)	Fermentas	00035612
Superscript III Reverse Transcriptase (200 U/µl, 10'000 U)	Invitrogen	2278962
Veriti Thermal Cycler, 96-Well	Applied Biosystems	n/a

Der Ablauf der cDNA Synthese wird nachfolgend beschrieben. Dabei war zu beachten, dass die Flüssigkeiten auf Eis gehalten werden sollten, um einen Zerfall zu vermeiden.

1. Berechnung benötigtes Volumen für 500 ng RNA.
 - $\frac{500 \text{ ng}}{270 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}} = 1,85 \mu\text{l} \rightarrow 1.9 \mu\text{l}$
2. Berechnung benötigtes Volumen ddH₂O für 11 μl Lösung aus RNA und ddH₂O
 - $11 \mu\text{l} - 1,85 \mu\text{l} = 9,15 \mu\text{l} \rightarrow 9.1 \mu\text{l}$
3. Herstellung von Lösung (total 13 μl):
 - 1.9 μl RNA-Lösung
 - 9.1 μl ddH₂O
 - 1 μl Random Primers
 - 1 μl dNTP Mix
4. In Thermocycler inkubieren: Programm «reverse T_start»
5. Für mindestens 1 Min. auf Eis inkubieren
6. Zentrifugieren
7. Zur Lösung hinzufügen (total 20 μl):
 - 4 μl First Strand Buffer
 - 1 μl 0.1 M DTT
 - 1 μl RiboLock RNase Inhibitor
 - 1 μl SuperScript III Reverse Transcriptase (nicht bei Negativkontrolle)
 - 1 μl ddH₂O (nur bei Negativkontrolle)
8. In Thermocycler inkubieren: Programm «reverseT_cDNA»
9. cDNA 1:5 verdünnen
 - 20 μl cDNA
 - 380 μl ddH₂O
10. Auf Eis oder bei -20°C im Tiefkühler lagern

Bei der Berechnung des benötigten Volumens für 500 ng RNA, in Schritt 1, wurde ein Ergebnis von 1.85 μl berechnet. Dies wurde auf 1.9 μl gerundet, da manuelles Pipettieren auf zwei Nachkommastellen sehr diffizil ist. Dies führte ebenfalls dazu, dass das benötigte Volumen an ddH₂O von 9.15 μl auf 9.1 μl abgerundet wurde.

Während der Vorbereitung für die cDNA Synthese wurden zwei Eppendorf-Tubes präpariert. Diese unterschieden sich darin, dass in der einen anstatt der SuperScript II Reverse Transcriptase ddH₂O hinzugefügt wurde. Diese noRTC-Lösung sollte während der Primer-Verifikation als Negativprobe dienen.

4.3 Primer-Verifizierung

Nach der erfolgreichen Synthetisierung der cDNA folgte das Testen und Verifizieren der Primer. Der erste Test für die Verifikation war die Durchführung einer qPCR, inklusive zwei unterschiedlichen Negativkontrollen pro Primer. Anschliessend wurde eine Gelelektrophorese mit den Produkten der qPCR durchgeführt, um dadurch die Länge der Amplicon qualitativ abzuschätzen. Bevor jedoch mit den Tests begonnen werden konnte, mussten erst die benötigten Dokumente erstellt werden.

Als erstes wurden das Layout der Wells und der Mastermix für die qPCR mit SYBR-Green erstellt. Beides wurde im Excel-File «IVD_qPCR_pipettingprotocolDiego.xlsx», welches sich im Anhang, im Ordner Primer Verifizierung befindet, abgespeichert. Beim Zusammenstellen des Mastermix wurde beachtet, dass es beim Pipettieren zu Verlusten kommen kann. Aus diesem Grund wurde der Mastermix für 10 anstatt für 8 Wells pro Primer-Paar berechnet.

Die Zusammensetzung des Mastermix und das Volumen der benötigten cDNA ist in Tabelle 3 ersichtlich.

Tabelle 3: Mastermix und cDNA für qPCR

Mastermix			1x	10x
SYBRmix	µl		10.0	100.0
Vorwärts-Primer	µl		0.5	5.0
Rückwärts-Primer	µl		0.5	5.0
ddH ₂ O	µl		5.0	50.0
Total MM	µl		16.0	160.0
cDNA	µl		4.0	36.0
Total Volumen	µl		20.0	196.0

Beim Layout der 96 Well-Platte wurde so vorgegangen, dass pro zu überprüfendem Primer-Paar jeweils drei Wells mit dem Mastermix und cDNA sowie drei Wells mit dem Mastermix und der noRTC-Lösung vorgesehen wurden. Ebenfalls wurde jeweils ein vierter Well, welcher mit dem Mastermix und ddH₂O befüllt werden sollte, eingeplant. Die Wells ohne cDNA oder noRTC-Lösung wurden mit NTC (non template control) bezeichnet und dienten zusammen mit den noRTC-Wells als Negativkontrolle. Die Gene 18S und B2M wurden als Referenzgene verwendet, da diese bereits in mehreren qPCR-Durchführungen verwendet wurden und sich als Referenzen etablieren konnten.

Tabelle 4: Layout qPCR

	NP 1	noRTC 2	NP 3	noRTC 4	NP 5	noRTC 6	NP 7	noRTC 8	NP 9	noRTC 10	NP 11	noRTC 12
A	18S	18S	B2M	B2M	HSPH1	HSPH1	ATF3	ATF3	NR1D1	NR1D1	FOSB	FOSB
B	18S	18S	B2M	B2M	HSPH1	HSPH1	ATF3	ATF3	NR1D1	NR1D1	FOSB	FOSB
C	18S	18S	B2M	B2M	HSPH1	HSPH1	ATF3	ATF3	NR1D1	NR1D1	FOSB	FOSB
D	NTC	NTC	NTC	NTC								
E	DNAJA1	DNAJA1	DNAJA2	DNAJA2								
F	DNAJA1	DNAJA1	DNAJA2	DNAJA2								
G	DNAJA1	DNAJA1	DNAJA2	DNAJA2								
H	NTC	NTC	NTC	NTC								

Basierend auf dem Dokument «IVD_qPCR_pipettingprotocolDiego.xlsx», wurde der Well Sample Identifier erstellt. Dieses Excel-Dokument besitzt Makros, durch welche das ebenfalls benötigte csv-File automatisch erstellt werden konnte. Für die Durchführung der qPCR werden weiter ein pts- und ein tmo-File benötigt. Diese beiden Files waren bereits vorhanden und konnten unverändert von vorherigen qPCR-Durchführungen übernommen werden. Alle benötigten Dokumente befinden sich im Anhang, im Ordner Primer Verifizierung.

4.3.1 Durchführung qPCR

Nach der Erstellung der benötigten Dokumente wurde eine qPCR durchgeführt, um erste Aussagen über die Güte der Primer treffen zu können. Bei der Vorbereitung der 96-Well-Platte musste beachtet werden, dass sowohl die Platte als auch die Reagenzien auf Eis zu halten sind. Weiter musste der SYBRmix stets mit Alufolie bedeckt werden, da dieser lichtempfindlich ist und sonst möglicherweise unbrauchbar geworden wäre. Der Ablauf der qPCR inklusive der Vorbereitung des Mastermix und der 96-Well-Platte sind untenstehend beschrieben. Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Materialien für qPCR

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
SYBRmix	Applied Biosystems	2201621
Vorwärts-Primer	n/a	n/a
Rückwärts-Primer	n/a	n/a
ddH ₂ O	n/a	n/a
cDNA	n/a	n/a
noRTC-Lösung	n/a	n/a
Thermocycler iQ5	Bio-Rad	n/a

1. Vorbereiten und beschriften einer Eppendorf-Tube pro Primer-Paar.
2. 50 µl ddH₂O in jede Eppendorf-Tube pipettieren.
3. 5 µl des jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-Primers in die entsprechende Eppendorf-Tube pipettieren.
4. 100 µl SYBRmix in jede Eppendorf-Tube pipettieren und die Lösung mischen.
5. Die Tubes zentrifugieren.
6. Gemäss dem Layout aus Tabelle 4, aus den entsprechenden Eppendorf-Tubes jeweils 16 µl Mastermix in die Wells pipettieren.
7. Zu den mit «NP» bezeichneten Wells jeweils 4 µl cDNA pipettieren.
8. Zu den mit «noRTC» bezeichneten Wells jeweils 4 µl der noRTC-Lösung pipettieren
9. Zu den mit «NTC» bezeichneten Wells jeweils 4 µl ddH₂O pipettieren.
10. Die Well-Platte zentrifugieren und anschliessend sorgfältig mit Folie bedecken.
11. Thermocycler und PC nach Reihenfolge der aufgeklebten Etiketten einschalten
12. Programm «Bio-Rad iQ5» starten.
13. csv- und tmo-File in Programm «Bio-Rad iQ5» importieren
14. Layout der Platte im Programm gemäss Tabelle 4 anpassen.
15. 96-Well-Platte in Thermocycler platzieren und Deckel schliessen.
16. Mit «Run» die qPCR starten.

4.3.2 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der ungefähren Länge der erhaltenen Amplicon wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Durch dieses Verfahren kann nebst der Länge auch überprüft werden, ob unterschiedliche Amplicon während der qPCR entstanden sind. Die für die Gelelektrophorese verwendeten Materialien sind in Tabelle 6 aufgelistet. Unterhalb der Tabelle ist das Vorgehen beschrieben.

Tabelle 6: Materialien für Gelelektrophorese

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
3% agarose electrophoresis precast Gel (8-Well)	Bio-Rad	L004220 B
1x TAE Buffer	n/a	n/a
6x Dye	Thermo Scientific	#R0611
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Fermentas	SM0321
qPCR-Produkte	n/a	n/a
100x Fast Blast DNA stain	Bio-Rad	L005021 A

1. Gel mit den Kammern zum negativen Ende in Gelelektrophoresekammer legen und mit 1x TAE Buffer bedecken.
2. Pro zu überprüfendem Primer-Paar jeweils aus den Wells 5 µl Primer-Produkt entnehmen und in Eppendorf-Tube pipettieren (insgesamt 15 µl, da in dreifacher Ausführung).
3. Jeweils 3 µl 6x Dye in Eppendorf-Tubes pipettieren.
4. 6 µl GeneRuler 100bp DNA Ladder in die erste Tasche pipettieren.
5. Jeweils 15 µl der vorbereiteten Produkt-Dye-Lösung in die nachfolgenden Taschen pipettieren.
6. Konstanten Strom von 65 mA für ca. 1 Stunde anlegen, bis die Proben $\frac{3}{4}$ des Gels passiert haben.
7. Strom abschalten.
8. 100x Stain in Färbebehälter füllen.
9. Gel aus Gelelektrophoresekammer entnehmen und in Färbebehälter legen.
10. Gel für 2-3 Minuten färben.
11. 100x Stain mit Trichter in Behälter zurückfüllen
12. Gel in grossen Behälter mit sauberem 40-55° warmem Wasser legen.
13. Für ca. 10 Sek. Behälter sanft bewegen.
14. Gel in grossen Behälter mit sauberem 40-55° warmem Wasser legen.
15. Für ca. 5 Min. Behälter auf Rocking-Plattform bei Stufe 17 legen.
16. Schritte 14 und 15 wiederholen.
17. Gel auf Leuchtplattform untersuchen.

Anmerkung: Beim Befüllen der Tasche 4 mit den Produkten der Primer für das Gen-NR1D1 wurde das Gel penetriert, wodurch nur wenig der Probe in die Tasche gelangte.

4.4 Primer-Validierung

Auf die erfolgreiche Verifizierung der Primer folgte die Validierung. Dafür wurde in einem ersten Schritt eine Verdünnungsreihe durchgeführt, um so die Effizienz der Primer zu untersuchen. Auf die Verdünnungsreihe folgte eine weitere qPCR, welche mit cDNA durchgeführt wurde, die aus anderer RNA als die in Kapitel 4.2 beschriebene cDNA gewonnen wurde.

Für die Durchführung der Verdünnungsreihe musste neue cDNA synthetisiert werden, da die in Kapitel 4.2 beschriebene cDNA bereits 20-fach verdünnt war. Das Vorgehen bei der Synthese der cDNA war, bis auf die Verdünnung in Schritt 9, dasselbe wie in Kapitel 4.2.2 und ist nachfolgend beschrieben. Die verwendeten Materialien entsprechen jenen in Tabelle 2.

1. Berechnung benötigtes Volumen für 500 ng RNA.
 - $\frac{500 \text{ ng}}{270 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}} = 1,85 \mu\text{l} \rightarrow 1.9 \mu\text{l}$
2. Berechnung benötigtes Volumen ddH₂O für 11 μl Lösung aus RNA und ddH₂O
 - $11 \mu\text{l} - 1,85 \mu\text{l} = 9,15 \mu\text{l} \rightarrow 9.1 \mu\text{l}$
3. Herstellung von Lösung (total 13 μl):
 - 1.9 μl RNA-Lösung
 - 9.1 μl ddH₂O
 - 1 μl Random Primers
 - 1 μl dNTP Mix
4. In Thermocycler inkubieren: Programm «reverse T_start»
5. Für mindestens 1 Min. auf Eis inkubieren
6. Zentrifugieren
7. Zur Lösung hinzufügen (total 20 μl):
 - 4 μl First Strand Buffer
 - 1 μl 0.1 M DTT
 - 1 μl RiboLock RNase Inhibitor
 - 1 μl SuperScript III Reverse Transcriptase (nicht bei Negativkontrolle)
 - 1 μl ddH₂O (nur bei Negativkontrolle)
8. In Thermocycler inkubieren: Programm «reverseT_cDNA»
9. cDNA 1:5 verdünnen
 - 20 μl cDNA
 - 80 μl ddH₂O
10. Auf Eis oder bei -20°C im Tiefkühler lagern

Nach der Synthese der cDNA mussten dieselben Dokumente wie in Kapitel 4.3 erstellt werden. Es wurde eine 5-fache Verdünnung der cDNA mit jeweils 5 Verdünnungsschritten geplant. Als Anfangskonzentration wurden 20% vorgesehen. Bei der Zusammensetzung des Mastermix, welche in Tabelle 7 ersichtlich ist, wurde jeweils mit 25 Wells anstatt 20 gerechnet, um damit Pipettierverluste auszugleichen.

Tabelle 7: Mastermix und cDNA für Verdünnungsreihe

Mastermix			1x	25x
SYBRmix	μl		10.0	250.0
Primer F	μl		0.5	12.5
Primer R	μl		0.5	12.5
ddH ₂ O	μl		5.0	125.0
Total MM	μl		16.0	400.0
cDNA	μl		4.0	100.0
Total Volumen	μl		20.0	500.0

Um eine statistische Relevanz zu gewährleisten und eventuelle Pipettierfehler abzumildern, wurde jede Verdünnung der Primer-Paare jeweils in dreifacher Ausführung angefertigt. Weiter wurde pro Verdünnung und Primer-Paar eine NTC-Kontrolle vorgesehen.

Da es insgesamt 100 Proben waren, mussten zwei Platten für die Durchführung verwendet werden. Das Layout der Platten ist in Tabelle 8 bzw. Tabelle 9 ersichtlich.

Tabelle 8: Layout Verdünnungsreihe Platte 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HSPH1	HSPH1	HSPH1	HSPH1	HSPH1	ATF3	ATF3	ATF3	ATF3	ATF3		
B	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125		
C	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125		
D	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC		
E	NR1D1	NR1D1	NR1D1	NR1D1	NR1D1							
F	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125							
G	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125							
H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC							

Tabelle 9: Layout Verdünnungsreihe Platte 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DNAJA 1	DNAJA 1	DNAJA 1	DNAJA 1	DNAJA 1	DNAJA 2	DNAJA 2	DNAJA 2	DNAJA 2	DNAJA 2		
B	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125		
C	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125		
D	NTC											
E												
F												
G												
H												

Basierend auf diesen Layouts wurde pro Platte ein Well Sample Identifier erstellt, welcher über Makros jeweils ein csv-File generierte. Die benötigten pts- und tmo-Files konnten wie in Kapitel 4.3 von vorherigen Durchführungen übernommen werden. Alle für die Durchführung der Verdünnungsreihe benötigten Dokumente befinden sich im Anhang, im Ordner Primer Validierung.

4.4.1 Durchführung Verdünnungsreihe

Bei der Verdünnungsreihe wurde eine jeweils fünffache Verdünnung angestrebt. Somit befanden sich im ersten Tube 20%, im zweiten 4%, im dritten 0.8%, im vierten 0.16% und im fünften 0.032% cDNA. Der Ablauf der Verdünnung ist nachfolgend geschildert. Da die cDNA bereits bei der Synthese auf 20% verdünnt wurde, mussten lediglich vier Tubes vorbereitet werden.

1. 4 Tubes vorbereiten und mit jeweils 80 µl ddH₂O befüllen.
2. 20 µl der 20%igen cDNA in erste Tube pipettieren und gründlich mischen.
3. Von erster Tube 20 µl in zweite Tube pipettieren und gründlich mischen.
4. Von zweiter Tube 20 µl in dritte Tube pipettieren und gründlich mischen.
5. Von dritter Tube 20 µl in vierte Tube pipettieren und gründlich mischen.

Im Anschluss an die Verdünnung der cDNA wurden die zwei 96-Well-Platten vorbereitet. Dabei wurde wieder auf Eis gearbeitet und der SYBRmix mit Alufolie vor Licht geschützt. Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 10 aufgelistet, die Vorbereitung des Mastermix sowie der Ablauf der Verdünnungsreihe ist der Tabelle folgend beschrieben.

Tabelle 10: Materialien für Verdünnungsreihe

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
SYBRmix	Applied Biosystems	2201621
Vorwärts-Primer	n/a	n/a
Rückwärts-Primer	n/a	n/a
ddH ₂ O	n/a	n/a
cDNA (in unterschiedlichen Verdünnungen)	n/a	n/a
noRTC-Lösung	n/a	n/a
Thermocycler iQ5	Bio-Rad	n/a

1. Vorbereiten und beschriften einer Eppendorf-Tube pro Primer-Paar.
2. 125 µl ddH₂O in jede Eppendorf-Tube pipettieren.
3. 12.5 µl des jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-Primers in die entsprechende Eppendorf-Tube pipettieren.
4. 250 µl SYBRmix in jede Eppendorf-Tube pipettieren und die Lösung mischen.
5. Die Tubes zentrifugieren.
6. Gemäss dem Layout aus Tabelle 8 bzw. Tabelle 9, aus den entsprechenden Eppendorf-Tubes jeweils 16 µl Mastermix in die Wells pipettieren.
7. Zu den mit «1:5» bezeichneten Wells jeweils 4 µl 20%ige cDNA pipettieren.
8. Zu den mit «1:25» bezeichneten Wells jeweils 4 µl 4%ige cDNA pipettieren.
9. Zu den mit «1:125» bezeichneten Wells jeweils 4 µl 0.8%ige cDNA pipettieren.
10. Zu den mit «1:625» bezeichneten Wells jeweils 4 µl 0.16%ige cDNA pipettieren.
11. Zu den mit «1:3125» bezeichneten Wells jeweils 4 µl 0.032%ige cDNA pipettieren.
12. Zu den mit «NTC» bezeichneten Wells jeweils 4 µl ddH₂O pipettieren.
13. Die Well-Platte zentrifugieren und anschliessend sorgfältig mit Folie bedecken.
14. Thermocycler und PC nach Reihenfolge der aufgeklebten Etiketten einschalten
15. Programm «Bio-Rad iQ5» starten.
16. csv- und tmo-File in Programm «Bio-Rad iQ5» importieren
17. Layout der Platte im Programm gemäss Tabelle 8 bzw. Tabelle 9 anpassen.
18. 96-Well-Platte in Thermocycler platzieren und Deckel schliessen.
19. Mit «Run» die qPCR starten.

4.4.2 Auswertung Verdünnungsreihe

Zur Auswertung der Verdünnungsreihe wurde das Programm Excel von Microsoft genutzt. Zu Beginn wurden dafür die durchschnittlichen C_T-Werte der unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Primer eingetragen. Anschliessend wurde der logarithmische Wert der Konzentrationen mit dem Befehl «=LOG» berechnet. Mit dem Befehl «=STEIGUNG» wurde die Steigung der durchschnittlichen C_T-Werte im Vergleich zu den logarithmischen Konzentrationen, welche zur Berechnung der Effizienz benötigt wird, berechnet. Zur Bestimmung der Effizienz in Prozent wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Effizienz [\%]} = \left(10^{\frac{-1}{\text{Steigung}}} - 1 \right) \times 100$$

Um die Linearität der Reihe zu ermitteln, wurden die C_T -Werte im Vergleich zu den logarithmischen Konzentrationen als Liniendiagramm dargestellt, eine Trendlinie eingefügt und der dazugehörige R^2 -Wert eingeblendet.

4.5 Überprüfung unstimmgiger Ergebnisse

Bei fragwürdigen Ergebnissen wurde eine erneute qPCR durchgeführt. Dafür wurden als erstes zwei unterschiedliche Mastermixe zusammengestellt, da nicht bei allen Primern gleichviele Wells benötigt wurden. Der Mix für wiederholte Verdünnungsreihen entspricht jenem in Tabelle 7, derjenige für die erneute Durchführung einer Standard-qPCR jenem in Tabelle 3. Bei der Zusammensetzung der Mastermixe wurden mögliche Pipettierverluste miteinberechnet.

Das Layout der 96-Well-Platte ist in Tabelle 11 ersichtlich. Um möglichst wenig Zeit auf die erneute Durchführung von Versuchen zu verwenden, wurden auf derselben Platte zwei Verdünnungsreihen wie auch zwei Standard-qPCR mit noRTC-Kontrollgruppen durchgeführt.

Tabelle 11: Layout qPCR zur Überprüfung fragwürdiger Ergebnisse

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DNAJA 1	DNAJA 1	DNAJA 1	DNAJA 1	DNAJA 1	DNAJA 2	DNAJA 2	DNAJA 2	DNAJA 2	DNAJA 2		
B	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125		
C	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125		
D	NTC											
E	18S	18S	B2M	B2M								
F	NP	noRTC	NP	noRTC								
G	NP	noRTC	NP	noRTC								
H	NTC	NTC	NTC	NTC								

Auf dem Dokument «qPCR_pipettingprotocol_examination_Diego_Andreska» basierend wurde der Well Sample Identifier erstellt, welcher über Makros das csv-File erstellt. Das benötigte tmo- sowie das pts-File wurden von vorgegangenen qPCR-Durchführungen übernommen. Alle für die Durchführung der Überprüfung benötigten Dokumente befinden sich im Anhang, im Order Primer Überprüfung.

Für die erneute Realisierung einer Verdünnungsreihe war zu wenig cDNA in den benötigten Konzentrationen vorhanden. Aus diesem Grund wurde neue cDNA synthetisiert, wobei das Vorgehen jenem aus Kapitel 4.4 und die Materialien jenen aus Tabelle 2 entsprachen. Bei der Durchführung der Verdünnung wurde wie folgt vorgegangen:

1. 4 Tubes vorbereiten und mit jeweils 80 μ l ddH₂O befüllen.
2. 20 μ l der 20%igen cDNA in erste Tube pipettieren und gründlich mischen.
3. Von erster Tube 20 μ l in zweite Tube pipettieren und gründlich mischen.
4. Von zweiter Tube 20 μ l in dritte Tube pipettieren und gründlich mischen.
5. Von dritter Tube 20 μ l in vierte Tube pipettieren und gründlich mischen.

Nach der Verdünnung der cDNA wurde die 96-Well-Platte vorbereitet, wobei auf Eis gearbeitet und der SYBRmix vor Licht geschützt wurde. Die Vorbereitung des Mastermix

sowie die Befüllung der 96-Well-Platte sind der Tabelle 12 nachfolgend aufgelistet. Diese Tabelle enthält die verwendeten Materialien.

Tabelle 12: Materialien zur Überprüfung fragwürdiger Ergebnisse

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
SYBRmix	Applied Biosystems	2201621
Vorwärts-Primer	n/a	n/a
Rückwärts-Primer	n/a	n/a
ddH ₂ O	n/a	n/a
cDNA (in unterschiedlichen Verdünnungen)	n/a	n/a
noRTC-Lösung	n/a	n/a
Thermocycler iQ5	Bio-Rad	n/a

1. Vorbereiten und beschriften einer Eppendorf-Tube pro Primer-Paar.
2. 125 µl ddH₂O in die Eppendorf-Tubes der DNAJA4_1- und DNAJA4_2-Primer pipettieren.
3. 12.5 µl des jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-Primers in die entsprechende Eppendorf-Tube der DNAJA4_1- und DNAJA4_2-Primer pipettieren.
4. 250 µl SYBRmix in in die Eppendorf-Tubes der DNAJA4_1- und DNAJA4_2-Primer pipettieren.
5. 50 µl ddH₂O in die Eppendorf-Tubes der 18S- und B2M-Primer pipettieren.
6. 5 µl des jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-Primers in die Eppendorf-Tubes der 18S- und B2M-Primer pipettieren.
7. 100 µl SYBRmix in die Eppendorf-Tubes der 18S- und B2M-Primer pipettieren und die Lösung mischen.
8. Die Tubes zentrifugieren.
9. Gemäss dem Layout aus Tabelle 11, aus den entsprechenden Eppendorf-Tubes jeweils 16 µl Mastermix in die Wells pipettieren.
10. Zu den mit «1:5» bezeichneten Wells jeweils 4 µl 20%ige cDNA pipettieren.
11. Zu den mit «1:25» bezeichneten Wells jeweils 4 µl 4%ige cDNA pipettieren.
12. Zu den mit «1:125» bezeichneten Wells jeweils 4 µl 0.8%ige cDNA pipettieren.
13. Zu den mit «1:625» bezeichneten Wells jeweils 4 µl 0.16%ige cDNA pipettieren.
14. Zu den mit «1:3125» bezeichneten Wells jeweils 4 µl 0.032%ige cDNA pipettieren.
15. Zu den mit «NP» bezeichneten Wells jeweils 4 µl 0.05%ige cDNA pipettieren.
16. Zu den mit «noRTC» bezeichneten Wells jeweils 4 µl der noRTC-Lösung pipettieren
17. Zu den mit «NTC» bezeichneten Wells jeweils 4 µl ddH₂O pipettieren.
18. Die Well-Platte zentrifugieren und anschliessend sorgfältig mit Folie bedecken.
19. Thermocycler und PC nach Reihenfolge der aufgeklebten Etiketten einschalten
20. Programm «Bio-Rad iQ5» starten.
21. csv- und tmo-File in Programm «Bio-Rad iQ5» importieren
22. Layout der Platte im Programm gemäss Tabelle 8 bzw. Tabelle 9 anpassen.
23. 96-Well-Platte in Thermocycler platzieren und Deckel schliessen.
24. Mit «Run» die qPCR starten.

4.6 Genexpressionsanalyse

Zur Berechnung der relativen Genexpressionen zweier Proben, welche aus unterschiedlichen Tieren stammten, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Zur Berechnung wurde die delta-delta- C_T -Methode angewandt. Diese Methode basiert auf der Berechnung des Unterschiedes zwischen den delta- C_T -Werten zweier unterschiedlicher Proben. Als delta- C_T wird die Differenz zwischen den durchschnittlichen C_T -Werten der interessierenden Genen und jenen der Referenzgenen bezeichnet. Als Referenz dienten die zwei Gene 18S und B2M, welche bereits in mehreren Genexpressionsanalysen verwendet wurden.

Da bei der delta-delta- C_T -Methode zwei Proben miteinander verglichen werden, können lediglich Aussagen in Relation der einen zur anderen Probe gemacht werden. Es können somit nur Auskünfte darüber gegeben werden, ob in der einen Probe mehr oder weniger eines bestimmten Gens im Vergleich zur anderen exprimiert wurden. Dies ermöglicht es jedoch Informationen darüber zu gewinnen, welche Auswirkungen unterschiedliche Umstände auf die Genexpressionen im Gewebe haben.

Für die Genexpressionsanalyse musste eine qPCR mit cDNA, welche aus RNA eines zweiten Tieres synthetisiert wurde, durchgeführt werden. Wie in Kapitel 4.3 und 4.4 mussten erst die benötigten Dokumente erstellt werden. Bei der Zusammensetzung des Mastermix, welcher in Tabelle 13 ersichtlich ist, wurde mit 5 Wells gerechnet, um mögliche Pipettierverluste dadurch auszugleichen.

Tabelle 13: Mastermix und cDNA für Genexpressionsanalyse

Mastermix		1x	5x
SYBRmix	µl	10.0	50.0
Primer F	µl	0.5	2.5
Primer R	µl	0.5	2.5
ddH2O	µl	5.0	25.0
Total MM	µl	16.0	80.0
cDNA	µl	4.0	36.0
Total Volumen	µl	20.0	116.0

Um eventuell auftretende Pipettierfehler auszugleichen und eine statistische Relevanz zu gewährleisten, wurden alle Proben in dreifacher Ausführung angefertigt. Ebenfalls wurde pro Primer-Paar eine NTC-Kontrolle vorgesehen, um so mögliche Kontaminierungen aufzudecken. Das Layout der 96-Well-Platte ist in Tabelle 14 ersichtlich.

Tabelle 14: Layout für Genexpressionsanalyse

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	B2M	HSPH1	ATF3	NR1D1	DNAJA4 1	DNAJA4 2					
B	18S	B2M	HSPH1	ATF3	NR1D1	DNAJA4 1	DNAJA4 2					
C	18S	B2M	HSPH1	ATF3	NR1D1	DNAJA4 1	DNAJA4 2					
D	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC					
E												
F												
G												
H												

Auf dem Layout aus Tabelle 14 basierend, wurde der Well Sample Identifier erstellt. Das benötigte csv-File wurde über Makros im Well Sample Identifier kreiert. Wie bei den vorherigen Durchläufen wurden das pts- und das tmo-File von vorherigen Durchführungen übernommen. Alle Dokumente befinden sich im Anhang, im Ordner qPCR Genexpressionsanalyse.

4.6.1 Durchführung qPCR

Bei der Vorbereitung der 96-Well-Platte wurde darauf geachtet, dass der SYBRmix mit Alufolie vor Licht geschützt und auf Eis gearbeitet wurde. Die für die qPCR verwendeten Materialien sind in Tabelle 15 aufgelistet. Die verwendete cDNA stammte aus früheren Versuchen anderer Studierenden.

Tabelle 15: Materialien für Genexpressionsanalyse

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
SYBRmix	Applied Biosystems	2201621
Vorwärts-Primer	n/a	n/a
Rückwärts-Primer	n/a	n/a
ddH ₂ O	n/a	n/a
cDNA (T2, Proximal)	n/a	n/a
Thermocycler iQ5	Bio-Rad	n/a

Nachfolgend ist das Vorgehen für die Vorbereitung des Mastermix sowie die Durchführung der qPCR beschrieben.

1. Vorbereiten und beschriften einer Eppendorf-Tube pro Primer-Paar.
2. 25 µl ddH₂O in jede Eppendorf-Tube pipettieren.
3. 2.5 µl des jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-Primers in die entsprechende Eppendorf-Tube pipettieren.
4. 50 µl SYBRmix in jede Eppendorf-Tube pipettieren und die Lösung mischen.
5. Die Tubes zentrifugieren.
6. Gemäss dem Layout aus Tabelle 14, aus den entsprechenden Eppendorf-Tubes jeweils 16 µl Mastermix in die Wells pipettieren.
7. Zu den mit Gen-Namen bezeichneten Wells jeweils 4 µl cDNA pipettieren.
8. Zu den mit «NTC» bezeichneten Wells jeweils 4 µl ddH₂O pipettieren.
9. Die Well-Platte zentrifugieren und anschliessend sorgfältig mit Folie bedecken.
10. Thermocycler und PC nach Reihenfolge der aufgeklebten Etiketten einschalten
11. Programm «Bio-Rad iQ5» starten.
12. csv- und tmo-File in Programm «Bio-Rad iQ5» importieren
13. Layout der Platte im Programm gemäss Tabelle 14 anpassen.
14. 96-Well-Platte in Thermocycler platzieren und Deckel schliessen.
15. Mit «Run» die qPCR starten.

4.6.2 Durchführung Genexpressionsanalyse

Für die Durchführung der Genexpressionsanalyse wurde die Statistiksoftware «R» verwendet. Das benötigte Skript wurde vom Institut für Medizintechnik zur Verfügung gestellt und musste lediglich so angepasst werden, dass auf die richtigen Dateien zugegriffen wurde. Zusätzlich zu diesen Anpassungen musste noch ein neues Dokument erstellt sowie kleine

Veränderungen an den Ausgabedateien der qPCR-Maschine durchgeführt werden. Das erstellte Dokument «A1_qPCR_Description_Animal1_Diego» befindet sich im Anhang, im Ordner Dokumente Genexpressionsanalyse und dient der Identifizierung der unterschiedlichen Gene und Tiere. Die Files, welche von der qPCR Maschine als Excel-Dateien ausgegeben wurden, mussten um vier Zeilen ergänzt werden. So mussten zu den jeweiligen Wells die dazugehörigen Gene, das Tier von welchem die RNA stammte, ob es sich um eine NTC- oder ein Replikat handelt sowie welchen Einflüssen das Gewebe ausgesetzt wurde, angegeben werden. Da es sich um einen Vergleich zwischen zwei Tieren handelte, wurden die Angaben zu den Einflüssen darauf beschränkt, ob es sich um das Tier 1 oder das Tier 2 handelte. Diese Dateien mussten jeweils in ein csv-File umgewandelt werden und zusammen mit der Identifizierungsdatei in den Ordner «Input» geladen werden. Anzumerken ist, dass die korrekte Umwandlung des Excel- in ein csv-File nur bei englischer Spracheinstellung des Computers funktionierte. Beide csv-Dateien befinden sich im Anhang, im Ordner Dokumente Genexpressionsanalyse.

Nach der Erstellung aller benötigten Dokumente und Ordner sowie dem Eintragen der korrekten Verweise im Skript, konnte die Analyse durchgeführt werden. Das verwendete Skript befindet sich im Anhang, im Ordner Dokumente Genexpressionsanalyse.

5. Resultate

Die folgenden Unterkapitel zeigen die Resultate aus den, in Kapitel 4 beschriebenen, Prozessen auf.

5.1 Primer Design

Durch die Literaturrecherche konnten in unterschiedlichen Quellen Primer für alle Gene ausser DNAJA4 gefunden werden. In Tabelle 16 sind die Gene mit den jeweiligen Quellen der Primer aufgelistet.

Tabelle 16: Primer aus der Literaturrecherche mit Quellen

Gen	Quelle
HSPH1	Sakumoto et al., 2015, Comparison of the global gene expression profiles in the bovine endometrium between summer and autumn
ATF3	Mao et al., 2013, ATF3 Expression in the Corpus Luteum: Possible Role in Luteal Regression
NR1D1	Isayama et al., 2014., REV-ERBa Inhibits the PTGS2 Expression in Bovine Uterus Endometrium Stromal and Epithelial Cells Exposed to Ovarian Steroids
FOSB	Fang et al., 2022, Exploring the Genetic Basis of Xiangxi Cattle Ovary Reproduction: A Rudimentary Study of Ovary Transcriptome in Xiangxi and Angus Cattle

Die durch das Tool Primer BLAST erhaltenen Primer sind in Tabelle 17 aufgelistet, wobei die ersten zwei Zeilen ein Primer-Paar bilden und die letzten zwei Zeilen ein zweites.

Tabelle 17: Primer aus Primer BLAST

Primer-Paar	Gen	Richtung	Sequenz
1	DNAJA4	For	GGACGGATGGCTCGAGAGAG
		Rev	TCCCACCAACGCCTTCACAT
2	DNAJA4	For	TATCGGAAGCTGGCGCTCAA
		Rev	CTGTTCCGCCACCCTGGTCAT

Bei den Primern für die Gene ATF3 sowie FOSB konnten in der Literatur keine Angaben zur Länge des Amplicons gefunden werden. Diese Angabe ist jedoch essenziell um bei der Gelelektrophorese, welche in den Kapiteln 4.3.2 und 5.4 behandelt wird, die erhaltene Länge mit der erwarteten Länge der Produkte zu vergleichen. Um die Anzahl Basenpaare, welche die Amplicon theoretisch erreichen sollten, zu bestimmen, wurde das Programm AmplifX verwendet. Die berechneten Längen der Produkte belaufen sich für die Primer des ATF3-Gens auf 100 bp und für die Primer des FOSB-Gens auf 50 bp. Die Ergebnisse aus AmplifX für die Primer des ATF3-Gens sind in Abbildung 4, die für die Primer des FOSB-Gens sind in Abbildung 5 dargestellt.



Abbildung 4: Ergebnisse AmplifX für Gen ATF3



Abbildung 5: Ergebnisse AmplifX für Gen FOSB

Die Ergebnisse der Überprüfung durch den OligoAnalyzer sind in Tabelle 18 aufgelistet. Dabei wurde ebenfalls die Sequenz der Primer sowie die Länge der Amplicon inkludiert.

Tabelle 18: Ergebnisse OligoAnalyzer inklusive Primer-Sequenz und Amplicon-Länge

Primer-Paar	Gen	Richtung	Sequenz	Länge	Tm	GC%	bp	Self-Dimer	Hairpin	Hetero-Dimer
1	HSPH1	For	TGCAATCCTTTCCCGAGCAT	20	64.6°C	50	141	-7.05	-0.65	-5.09
		Rev	GGAGCAGCGTGGTTTCTACT	20	64°C	55		-3.61	-0.08	
2	ATF3	For	AGCACCTCTGCCACCGGATGT	21	69.9	61.9	100	-9.75	-1.72	-6.68
		Rev	CTTTCAGGGGCTACCTCGGCTTT	23	68°C	56.5		-4.67	-1.4	
3	NR1D1	For	ACCTCCAGTTGTGTCAAGGTCCA	23	67.4°C	52.2	134	-6.01	-1.06	-8.2
		Rev	GTGCGGTTTGGAGAGGAGCCAC	22	68.8°C	63.6		-5.02	-0.32	
4	FOSB	For	CCCTATGACATGCCAGGAACCAGT	24	67.7°C	54.2	50	-5.38	-1.12	-5.38
		Rev	TAGCCACTCATGCCCGGTGT	20	67.8°C	60		-9.75	-1.09	
5	DNAJA4	For	GGACGGATGGCTCGAGAGAG	20	61.79	65	142	-9.96	-2.48	-6.21
		Rev	TCCCACCAACGCCTTCACAT	20	62.02	55		-3.61	1.88	
6	DNAJA4	For	TATCGGAAGCTGGCGCTCAA	20	61.96°C	55	135	-9.89	-1.34	-11.77
		Rev	CTGTTCCGCCACCTGGTCAT	20	62.47°C	60		-5.02	-1.22	

5.2 Messung RNA-Konzentration

Das Ergebnis der RNA-Konzentrationsmessung ist in Abbildung 6 dargestellt. Der Peak der Kurve befindet sich bei 260nm und das 260/280 Verhältnis liegt bei 2.01. Als Konzentration wurde durch das Programm 274.6 ng RNA/µl angegeben. Dies wurde für die weiteren Berechnungen auf 270 ng RNA/µl abgerundet, da ein genaues Pipettieren auf zwei Nachkommastellen nur schlecht möglich ist.

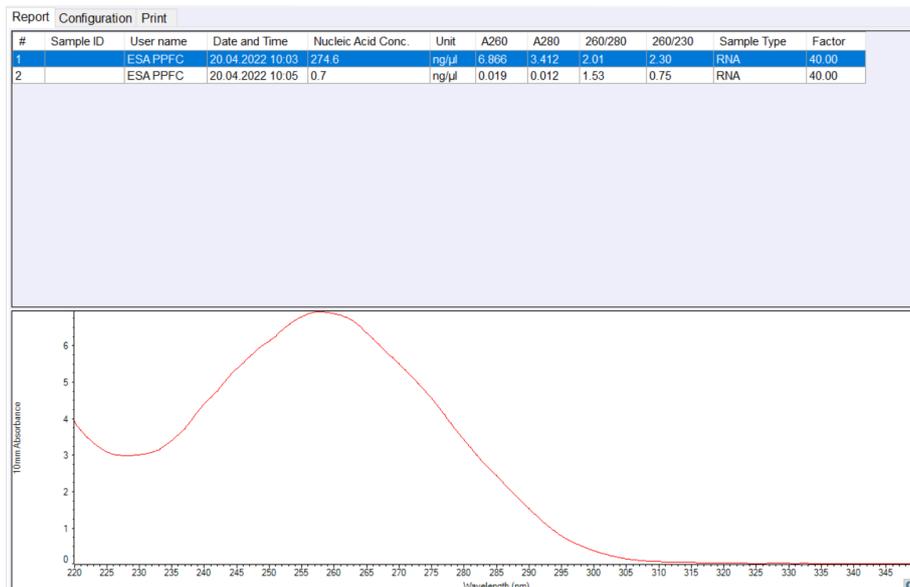


Abbildung 6: Ergebnis Messung RNA Konzentration mit Nanodrop 2000

5.3 qPCR

In Tabelle 19 sind die durchschnittlichen C_T -Werte der jeweiligen Triplets und Kontrollproben dargestellt. Der C_T -Wert entspricht der Anzahl an Zyklen, ab welcher der Schwellenwert überschritten wurde und sich das Signal somit vom Hintergrundrauschen abhebt. Die kompletten Datensätze befinden sich im Anhang, im Ordner Ergebnisse Verifizierung.

Tabelle 19: Durchschnittliche C_T -Werte der Triplets und Kontrollproben

Gen	Gruppe	C_T -Wert (Durchschnitt)
18S	NP	06.99
	noRTC	27.6
	NTC	30.62
B2M	NP	22.16
	noRTC	35.98
	NTC	n/a
HSP1	NP	25.35
	noRTC	n/a
	NTC	n/a
ATF3	NP	26.14
	noRTC	n/a
	NTC	n/a
NR1D1	NP	25.82
	noRTC	n/a
	NTC	n/a
FOSB	NP	30.38
	noRTC	36.84
	NTC	n/a
DNAJA4, Primer-Paar 5	NP	27.11
	noRTC	n/a
	NTC	n/a
DNAJA4, Primer-Paar 6	NP	28.02
	noRTC	n/a
	NTC	n/a

5.4 Gelelektrophorese

Abbildung 7 zeigt eine Aufnahme des Gels auf der Leuchtplattform. Für eine bessere Erkennbarkeit der verschiedenen Banden wurde die Helligkeit und der Kontrast erhöht. Das Originalbild befindet sich im Anhang, im Ordner Ergebnisse Verifizierung. Bei der Überführung des Gels aus dem mit Wasser befüllten Behälter auf die Leuchtplattform entstand ein Riss, welcher rechts im unteren Bereich erkennbar ist. Dieser Riss tangierte die Banden nicht.



Abbildung 7: Gel nach Elektrophorese, mit erhöhter Helligkeit und Kontrast

Die Verteilung der unterschiedlichen qPCR-Produkte in die Taschen des Gels sowie die ungefähre Länge der Amplicon sind in Tabelle 20 aufgelistet, wobei die Nummerierung der Taschen von links nach rechts aufsteigt.

Die DNA-Leiter in der Tasche 1 dient als Vergleichswert für die Banden der qPCR-Produkte. Die unterste Bande entspricht einer Amplicon-Länge von 100 Basenpaaren, wobei die Länge der Amplicon mit jeder weiteren Bande um 100 Basenpaare zunimmt.

Tabelle 20: Verteilung der qPCR-Produkte während Gelelektrophorese

Tasche	qPCR-Produkt	Ungefähre Länge [bp]
1	DNA-Leiter	n/a
2	HSPH1	140
3	ATF3	100
4	NR1D1	140
5	FOSB	50
6	FOSB, noRTC	50
7	DNAJA4, 1	150
8	DNAJA4, 2	140

Die Banden der Produkte der beiden FOSB-Primer sind in Abbildung 7 nur schlecht erkennbar, da sie nur schwach ausgeprägt waren. Von Auge war jedoch erkennbar, dass beide sich ungefähr auf der gleichen Höhe von 50 Basenpaaren befanden. Weiter gab es von jeder Tasche ausgehend jeweils eine Bande.

5.5 Verdünnungsreihe

In den Tabellen 21 bis 27 sind die durchschnittlichen C_T -Werte der verschiedenen Konzentrationen an cDNA inklusive der Effizienz pro Primer-Paar aufgelistet. Weiter sind auch die Konzentrationen in Dezimalzahlen, die logarithmische Funktion dieser Zahlen, die erhaltene Steigung der Reihe und der R^2 -Wert festgehalten. Die kompletten Ergebnisse

inklusive der grafischen Darstellung der Kurven befinden sich im Anhang, im Ordner Ergebnisse Validierung.

HSPH1

Tabelle 21: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der HSPH1-Primer

Probe	CT Durchschnitt	Konzentration	Log Konzentration	Steigung	Effizienz	R ²
1:5	24.81	0.200000	-0.698970004	-3.53998	91.64043	0.9974
1:25	26.93	0.040000	-1.397940009			
1:125	29.51	0.008000	-2.096910013			
1:635	31.84	0.001575	-2.802773725			
1:3125	34.74	0.000320	-3.494850022			

ATF3

Tabelle 22: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der ATF3-Primer

Probe	CT Durchschnitt	Konzentration	Log Konzentration	Steigung	Effizienz	R ²
1:5	25.43	0.200000	-0.698970004	-3.55996	90.94235	0.9985
1:25	27.98	0.040000	-1.397940009			
1:125	30.33	0.008000	-2.096910013			
1:635	32.65	0.001575	-2.802773725			
1:3125	35.55	0.000320	-3.494850022			

NR1D1

Tabelle 23: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der NR1D1-Primer

Probe	CT Durchschnitt	Konzentration	Log Konzentration	Steigung	Effizienz	R ²
1:5	24.55	0.200000	-0.698970004	-3.41706	96.17764	0.9985
1:25	26.84	0.040000	-1.397940009			
1:125	29.22	0.008000	-2.096910013			
1:635	31.43	0.001575	-2.802773725			
1:3125	34.21	0.000320	-3.494850022			

DNAJA4, Primer-Paar 5, Run 1

Tabelle 24: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der DNAJA4-Primer, Primer-Paar 5, Run 1

Probe	CT Durchschnitt	Konzentration	Log Konzentration	Steigung	Effizienz	R ²
1:5	26.51	0.200000	-0.698970004	-3.44371	95.15705	0.9414
1:25	28.01	0.040000	-1.397940009			
1:125	30.03	0.008000	-2.096910013			
1:635	34.77	0.001575	-2.802773725			
1:3125	35.17	0.000320	-3.494850022			

DNAJA4, Primer-Paar 5, Run 2

Tabelle 25: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der DNAJA4-Primer, Primer-Paar 5, Run 2

Probe	CT Durchschnitt	Konzentration	Log Konzentration	Steigung	Effizienz	R ²
1:5	26.1	0.200000	-0.698970004	-3.06126	112.1597	0.972
1:25	29.82	0.040000	-1.397940009			
1:125	30.98	0.008000	-2.096910013			
1:635	33.02	0.001575	-2.802773725			
1:3125	35.21	0.000320	-3.494850022			

DNAJA4, Primer-Paar 6, Run 1

Tabelle 26: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der DNAJA4-Primer, Primer-Paar 6, Run 1

Probe	CT Durchschnitt	Konzentration	Log Konzentration	Steigung	Effizienz	R ²
1:5	31.06	0.200000	-0.698970004	-2.11354	197.2618	0.78
1:25	30.11	0.040000	-1.397940009			
1:125	33.96	0.008000	-2.096910013			
1:635	33.29	0.001575	-2.802773725			
1:3125	36.87	0.000320	-3.494850022			

DNAJA4, Primer-Paar 6, Run 2

Tabelle 27: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der DNAJA4-Primer, Primer-Paar 6, Run 2

Probe	CT Durchschnitt	Konzentration	Log Konzentration	Steigung	Effizienz	R ²
1:5	28.66	0.200000	-0.698970004	-3.79015	83.58703	0.9493
1:25	29.61	0.040000	-1.397940009			
1:125	33.92	0.008000	-2.096910013			
1:635	36.08	0.001575	-2.802773725			
1:3125	n/a	0.000320	-3.494850022			

5.6 Genexpressionsanalyse

Das Ergebnis der Genexpressionsanalyse ist im Plot in Abbildung 8 festgehalten. Der Plot zeigt das Verhältnis der Genexpressionen der unterschiedlichen Gene von Tier 1 im Vergleich zu Tier 2. Die Genexpressionen von Tier 1 wurden somit auf jene von Tier 2 zusammen mit den Referenzgenen 18S und B2M genormt.

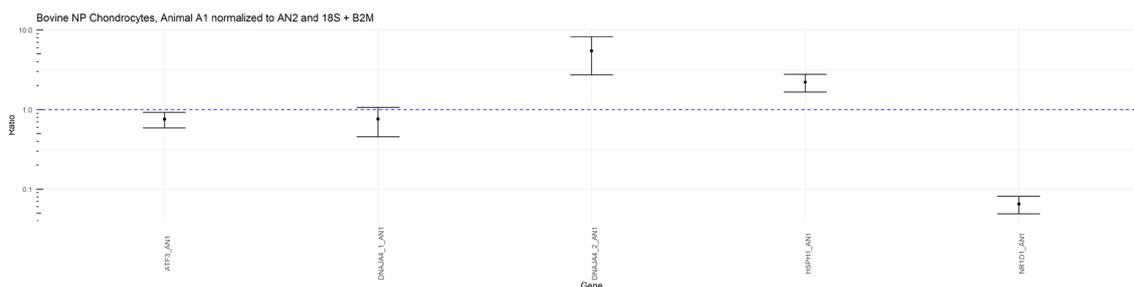


Abbildung 8: Plot der Genexpressionen von Tier 1 im Vergleich zu Tier 2

6. Diskussion

Die folgenden Unterkapitel dienen der Diskussion und Interpretation der Ergebnisse aus Kapitel 5.

6.1 Primer-Design

Bei der Betrachtung von Tabelle 18 sticht hervor, dass beim Vorwärts-Primer von ATF3, beim Rückwärts-Primer von FOSB sowie bei den Vorwärts-Primern von DNAJA4 sowohl beim Primer-Paar 5 als auch beim Primer-Paar 6 die freie Enthalpie bei den Self-Dimern negativer als -9 kcal/mol ist. Ebenfalls ragen die stark negativen Werte der freien Enthalpie bei den Hetero-Dimern zwischen dem Primer-Paar 6 heraus. Weiter sind die hohen Schmelztemperaturen der Primer-Paare 1-4 auffällig. Diese wurden durch den OligoAnalyzer berechnet und scheinen generell höher als bei der Berechnung durch andere Tools. So wurde beim Vorwärts-Primer für das Gen DNAJA4 des Primer-Paares 5, welcher mit dem Tool Primer BLAST der NCBI-Webseite entworfen wurde, die Schmelztemperatur mit 61.79° Celsius angegeben, während der OligoAnalyzer dafür 65.2° Celsius berechnete. Alle Auffälligkeiten wurden allerdings in Absprache mit den betreuenden Dozenten als unproblematisch eingestuft und dadurch alle Primer der Literaturrecherche für passend befunden.

6.2 Primer-Verifizierung

Die Analyse der Schmelzkurven, aus dem Ordner Ergebnisse Validierung im Anhang, ermöglichte erste Aussagen über die Spezifität der Primer und die Exaktheit der Arbeitsweise während der Durchführung der qPCR. Die Kurven der drei Wells sollten alle einen ähnlichen bis identischen Verlauf haben und die Koordinaten der Peaks sollten nahe beieinander liegen. Falls die Kurven zu grosse Unterschiede aufgewiesen hätten, hätte dies einen Hinweis auf mögliche Pipettierfehler geliefert. Da dies nicht eintraf konnte davon ausgegangen werden, dass in den vorhergehenden Schritten korrekt gearbeitet wurde. Ein wichtiges Kriterium zur Bewertung der Spezifität ist, dass pro Kurve nur ein Peak vorhanden ist. Die Anwesenheit mehrerer Peaks deutet auf unspezifische Nebenprodukte hin, wobei es sich meist um Primer-Dimer handelt. Alle Schmelzkurven der Primer besaßen nur einen Peak. Aus diesem Grund konnte davon ausgegangen werden, dass die Primer eine ausreichende Spezifität haben.

Bei der qualitativen Auswertung der logarithmischen Amplifikationskurven, welche ebenfalls im Ordner Ergebnisse Validierung im Anhang ersichtlich sind, wurde darauf geachtet, ob die Kurven der gleichen Primer jeweils einen ähnlichen Verlauf haben und nahe beieinander liegen. Ebenfalls sollten die noRTC- und die NTC-Proben, welche als Negativkontrollen dienten, den Schwellenwert nicht überschreiten. Die Proben aller zu testenden Primer, ausser jenen des FOSB-Gens erfüllten diese Voraussetzungen. Der C_T -Wert der beiden 18S-Primer war jedoch deutlich zu tief und sowohl die noRTC- als auch die NTC-Kontrollgruppen überschritten alle den Schwellenwert. Dies kann einerseits ein Anzeichen für eine zu hohe Konzentration an cDNA sein, die Überschreitung des Schwellenwertes bei den NTC-Proben könnte allerdings auch ein Hinweis auf mögliche Dimer sein. Bei den B2M-Primern, welche gleichermassen als Referenz gelten sollten, überschritten zwei Proben der noRTC-Kontrollgruppen ebenfalls den Schwellenwert. Diese Auffälligkeiten der Referenzgene waren bereits bekannt und wurden somit als unproblematisch eingestuft. Die Amplifikationskurven der unterschiedlichen Wells der FOSB-Primer hatten zwar alle einen sehr ähnlichen Verlauf

und lagen nahe beieinander, jedoch überschritten alle drei Kurven der noRTC-Kontrollproben den Schwellenwert. Dies war ein Hinweis darauf, dass diese Primer möglicherweise nicht nur cDNA amplifizierten, sondern auch genomische DNA. Die Vervielfältigung von genomischer DNA ist besonders beim verwendeten SYBR Green Farbstoff problematisch, da dieser sich unspezifisch an jegliche doppelsträngige DNA bindet. Dies führt dazu, dass die Unterscheidung von Produkten aus cDNA und ungewollten Produkten aus genomischer DNA unmöglich ist. Aus diesem Grund wurde entschieden, die Gelelektrophorese ebenfalls mit den Produkten aus den noRTC-Wells der FOSB-Primer durchzuführen.

Die Gelelektrophorese diente der Überprüfung der ungefähren Länge der erhaltenen Amplicon. Die Anzahl an Basenpaaren der erhaltenen Produkte konnte durch einen Vergleich mit der Position der Banden der Produkte und jener der DNA-Leiter abgeschätzt werden. Dies lieferte Erkenntnisse darüber, ob die erhaltenen qPCR-Produkte ungefähr den erwarteten Produkten entsprachen. Falls während der qPCR mehrere Produkte mit unterschiedlicher Länge entstanden wären, wären diese durch mehrere Banden in derselben Reihe erkennbar gewesen. Die Positionen der Banden der qPCR-Produkte entsprachen allen den erwarteten Positionen. Ebenfalls war pro Reihe jeweils nur eine Bande sichtbar, was die Annahme der Spezifität der Primer weiter erhärtete. Die Banden, sowohl der regulären als auch der noRTC-Proben der FOSB-Primer, lagen auf der gleichen Höhe. Dies zeigte, dass die Produkte aus beiden Wells eine ungefähre Länge von 50 Basenpaaren aufwiesen und mit grosser Wahrscheinlichkeit genomische DNA in der noRTC-Probe vervielfältigt wurde.

Die Primer des FOSB-Gens wurden aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse mit dem Tool Primer BLAST genauer überprüft. Die Analyse zeigte, dass die Primer keine Exon-Exon-Junction spannten, also kein Intron beinhalteten. Aus diesem Grund wurde entschieden, dass die Primer für das FOSB-Gen für das weitere Vorgehen unbrauchbar sind und nicht verifiziert werden. Alle anderen Primer konnten verifiziert werden.

6.3 Primer-Validierung

Für eine erfolgreiche Validation von Primern durch eine Verdünnungsreihe sollte die Effizienz der Primer optimalerweise bei 100% liegen. Dies würde bedeuten, dass sich die Anzahl an qPCR-Produkten mit jedem Zyklus verdoppelt. Da verschiedene Faktoren bei einer qPCR involviert sind, wird empfohlen, dass sich die Effizienz der Primer zwischen 90 – 110% befindet. Der zweite Wert der betrachtet werden sollte, ist der R^2 -Wert. Dieser zeigt an, wie stark die Linearität der Reihe ausgeprägt ist. Bei einem Wert von 1 wäre die Reihe perfekt linear. Da bei der Linearität unterschiedliche Faktoren involviert sind, ist es unwahrscheinlich, dass der R^2 -Wert genau 1 ist. Aus diesem Grund wird dort ein Wert von höher als 0.99 empfohlen. Dies ist insofern wichtig, da bei einer ungenügenden Linearität die Aussagekraft der Effizienz stark beeinflusst wird.

Bei den Primern für das Gen HSPH1 befand sich die Effizienz mit 91.64% im unteren Toleranzbereich. Der R^2 -Wert war mit 0.9974 nicht zu beanstanden. Beim Gen ATF3 war die Effizienz mit 90.94% noch tiefer. Da dies jedoch immer noch in der Toleranz liegt, wurde die Validierung mit einem R^2 -Wert von 0.9985 ebenfalls bestanden. Die Primer des Gens NR1D1 erreichten eine Effizienz von 96.18% bei einer Linearität von 0.9985 und konnten somit auch validiert werden.

Bei den beiden Primer-Paaren für das Gen DNAJA4 war der R^2 -Wert ungenügend. Beim ersten Paar, dem Primer-Paar 5, betrug die Linearität 0.9414 und die Effizienz 95.15%. Das

Primer-Paar 6 erreichte einen R^2 -Wert von lediglich 0.78, wodurch die Effizienz 197.26% betragen hätte. Da ungenügende R^2 -Werte häufig ein Indiz für Pipettierfehler sind, wurde eine weitere Verdünnungsreihe mit den beiden Primer-Paaren des DNAJA4 Gens durchgeführt. Beim zweiten Run verbesserte sich der R^2 -Wert beider Primer-Paare. Beim Primer-Paar 5 betrug er 0.972 mit einer Effizienz von 112.16% und beim Primer-Paar 6 lag die Linearität bei 0.9493 bei einer Effizienz von 83.59%. Aus Zeitgründen konnte keine weitere Verdünnungsreihe mit diesen Primern durchgeführt werden. Somit konnten sowohl das Primer-Paar 5 als auch das Primer-Paar 6 nicht validiert werden. Um zum endgültigen Abschluss der Validierung dieser Primer zu kommen, müsste eine Verdünnungsreihe durch eine zweite Person durchgeführt werden, um so systematische Pipettierfehler der ersten beiden Durchführungen auszuschliessen.

6.4 Genexpressionsanalyse

Damit eine Genexpression signifikant von der anderen abweicht und damit ausserhalb der zu erwartenden Streuung liegt, ist ein Unterschied von mindestens Faktor 2 nötig. Das bedeutet, dass Punkte, die zwischen 0.5 und 2 liegen innerhalb und alle anderen Punkte ausserhalb der normalen Streuung liegen. Bei der Betrachtung von Abbildung 8 fallen drei Gene auf, die ausserhalb der Streuung liegen. Die Gene DNAJA4_2, HSPH1 und NR1D1 liegen alle innerhalb des signifikanten Bereichs. Beim Gen HSPH1 ist das Verhältnis mit ca. 2 jedoch nur schwach signifikant stärker ausgeprägt. Das Gen NR1D1 ist mit einem Verhältnis von ungefähr 0.06 signifikant schwächer ausgeprägt als in Tier 2. Die Ausprägung von DNAJA4_2 wird im Plot mit einem Verhältnis von ungefähr 5 als signifikant stärker angegeben. Da es sich dort aber um das gleiche Gen wie bei DNAJA4_1 handelt, welches als insignifikant dargestellt wird, und beide Primer-Paare für das Gen DNAJA4 nicht validiert werden konnten, können diese beiden Ergebnisse nicht als korrekt angenommen werden. Ebenfalls zeigen die stark unterschiedlichen Ergebnisse für das gleiche Gen, dass mindestens eines der Primer-Paare unbrauchbar ist, möglicherweise sogar beide.

7. Fazit

Rücken- und Nackenschmerzen sind ein häufiges Leiden, von dem ca. 70% aller Erwachsenen mindestens einmal im Leben betroffen sind. Diese Schmerzen werden häufig mit Bandscheibendegenerationen in Verbindung gebracht. Bandscheiben befinden sich zwischen den Wirbelkörpern der Hals-, Brust- und Lendenwirbelsäulen sowie zwischen dem Lendenwirbelkörper 5 und dem Kreuzbein. Die Hauptaufgabe der Bandscheiben ist es, Stösse abzdämpfen. Zuständig für diese Funktion ist der Nucleus pulposus, welcher den Kern der Bandscheibe darstellt. Dieser besteht aus Wasser, Proteoglykanen und Kollagen und ist dadurch verformbar. Umgeben wird der Nucleus pulposus vom Anulus Fibrosus, einem Ring aus Faserknorpel. Der Anulus Fibrosus wird sowohl cranial als auch kaudal durch knorpelige Endplatten, welche auch die Schnittstelle zu den Wirbelkörpern darstellen, begrenzt. Mit dem Fortschreiten des Alters verändern sich die Bandscheiben und ihre Zusammensetzung. Dabei nimmt der Gehalt an Kollagenen zu, während der Gehalt an Wasser und Proteoglykanen abnimmt. Diese Degenerationen können zu Rissen in den Strukturen der Bandscheibe und somit zu Schmerzen führen. Damit Behandlungsmethoden für Bandscheibendegenerationen kreiert werden können, muss ein Bewusstsein für die zelluläre Zusammensetzung bei solchen Erkrankungen geschaffen werden. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten Genexpressionen von gesunden und kranken Bandscheiben mit der qPCR Methode untersucht werden. Diese

Methode benötigt pro zu untersuchendem Gen jeweils einen Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Das Ziel in dieser Bachelor-Thesis war es, für fünf bereitgestellte Gene, welche gewebespezifisch für den Nucleus pulposus sind, Primer zu etablieren. Diese Gene waren: HSPH1, DNAJA4, ATF3, NR1D1 und FOSB.

Für die Gene HSPH1, ATF3 und NR1D1 konnten Primer etabliert werden. Die Primer für das FOSB-Gen scheiterten bei der Verifizierung und jene des DNAJA4-Gens bei der Validierung. Die gewählten Methoden entsprechen dem wissenschaftlichen Standard und können deshalb als geeignet bezeichnet werden.

Zu Beginn der Arbeit wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, bei welcher Primer für die Gene HSPH1, ATF3, NR1D1 und FOSB aufgefunden werden konnten. Für das Gen DNAJA4 wurden manuell zwei Primer-Paare mit dem Tool Primer BLAST erstellt. Bei der Verifikation, welche aus einer qPCR und anschliessender Gelelektrophorese bestand, stellte sich heraus, dass die Primer für das FOSB-Gen neben cDNA auch genomische DNA amplifizierten und deshalb als ungeeignet eingestuft werden mussten. Die anschliessende Auswertung einer Verdünnungsreihe, welche als Validation eingesetzt wurde, bestätigte die Effizienz der Primer für die Gene HSPH1, ATF3 und NR1D1. Für beide Primer-Paare des Gens DNAJA4 konnte die Validation nicht abgeschlossen werden, da die Linearität der Verdünnungsreihe nicht dem gewünschten Standard entsprach. Die darauffolgende Genexpressionsanalyse zeigte auf, dass das Gen NR1D1 im Tier 2 signifikant schwächer ausgeprägt war als im Tier 1. Das Gen HSPH1 zeigte ebenfalls eine schwach signifikant stärkere Ausprägung im Tier 2. Ebenfalls zeigte die Genexpressionsanalyse, dass mindestens einer der beiden Primer-Paare für das Gen DNAJA4 unbrauchbar war, da für das eine Primer-Paar ein signifikanter Unterschied in der Genexpression detektiert wurde, während das andere sich in der zu erwartenden Streuung befand.

Als nächstes sollte die Validierung der DNAJA4-Primer durch eine weitere Person durchgeführt werden, um diese so abzuschliessen. Weiter sollten für die verbleibenden Gene Primer etabliert werden, um so in Zukunft die Analyse der Bandscheibe zu ermöglichen und damit einen Schritt weiter an die erfolgreiche Behandlung von Bandscheibendegenerationen zu kommen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der Bandscheibe, ohne knorpelige Endplatte (Thieme eRef, o. J.).....	4
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der DNA (Quora, o. J.).....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der PCR (Wikimedia, 2020).....	8
Abbildung 4: Ergebnisse AmplifX für Gen ATF3.....	25
Abbildung 5: Ergebnisse AmplifX für Gen FOSB.....	25
Abbildung 6: Ergebnis Messung RNA Konzentration mit Nanodrop 2000.....	26
Abbildung 7: Gel nach Elektrophorese, mit erhöhter Helligkeit und Kontrast.....	28
Abbildung 8: Plot der Genexpressionen von Tier 1 im Vergleich zu Tier 2.....	30

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien für die Messung der RNA Konzentration.....	12
Tabelle 2: Materialien für cDNA Synthese.....	12
Tabelle 3: Mastermix und cDNA für qPCR.....	14
Tabelle 4: Layout qPCR.....	14
Tabelle 5: Materialien für qPCR.....	15
Tabelle 6: Materialien für Gelelektrophorese.....	16
Tabelle 7: Mastermix und cDNA für Verdünnungsreihe.....	17
Tabelle 8: Layout Verdünnungsreihe Platte 1.....	18
Tabelle 9: Layout Verdünnungsreihe Platte 2.....	18
Tabelle 10: Materialien für Verdünnungsreihe.....	19
Tabelle 11: Layout qPCR zur Überprüfung fragwürdiger Ergebnisse.....	20
Tabelle 12: Materialien zur Überprüfung fragwürdiger Ergebnisse.....	21
Tabelle 13: Mastermix und cDNA für Genexpressionsanalyse.....	22
Tabelle 14: Layout für Genexpressionsanalyse.....	22
Tabelle 15: Materialien für Genexpressionsanalyse.....	23
Tabelle 16: Primer aus der Literaturrecherche mit Quellen.....	24
Tabelle 17: Primer aus Primer BLAST.....	24
Tabelle 18: Ergebnisse OligoAnalyzer inklusive Primer-Sequenz und Amplicon-Länge.....	26
Tabelle 19: Durchschnittliche C _T -Werte der Triplets und Kontrollproben.....	27
Tabelle 20: Verteilung der qPCR-Produkte während Gelelektrophorese.....	28
Tabelle 21: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der HSPH1-Primer.....	29
Tabelle 22: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der ATF3-Primer.....	29
Tabelle 23: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der NR1D1-Primer.....	29
Tabelle 24: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der DNAJA4-Primer, Primer-Paar 5, Run 1.....	29
Tabelle 25: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der DNAJA4-Primer, Primer-Paar 5, Run 2.....	30
Tabelle 26: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der DNAJA4-Primer, Primer-Paar 6, Run 1.....	30
Tabelle 27: Ergebnisse der Verdünnungsreihe der DNAJA4-Primer, Primer-Paar 6, Run 2.....	30

Literatur- & Quellenverzeichnis

Adams, M. A., & Roughley, P. J. (2006). What is Intervertebral Disc Degeneration, and What Causes It?: *Spine*, 31(18), 2151–2161.

<https://doi.org/10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c>

Bustin, S., & Huggett, J. (2017). QPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>

Calió, M., Gantenbein, B., Egli, M., Poveda, L., & Ille, F. (2021). The Cellular Composition of Bovine Coccygeal Intervertebral Discs: A Comprehensive Single-Cell RNAseq Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4917.

<https://doi.org/10.3390/ijms22094917>

Fang, H., Ao, S., Yun, L., Jianbo, L., Haobang, L., Yang, Sheng, L., Xiong, L., Baizhong, Z., & Kangle, Y. (2022). *Exploring the Genetic Basis of Xiangxi Cattle Ovary Reproduction: A Rudimentary Study of Ovary Transcriptome in Xiangxi and Angus Cattle*. <https://doi.org/10.29261/pakvetj/2022.013>

Guzek, B., Hasel, H., Munk, K., & Renz-Polster, H. (2016). *Biologie, Anatomie, Physiologie: Kompaktes Lehrbuch Pflegeberufe* (N. Menche & G. Raichle, Hrsg.; 8. Auflage). Elsevier, Urban & Fischer.

Holzappel, B., & Wickert, L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 37(2), 120–126.

<https://doi.org/10.1002/biuz.200610332>

How TaqMan Assays Work. (o. J.). ThermoFisher Scientific. Abgerufen 18. März 2022, von [//www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html](https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html)

Isayama, K., Chen, H., Yamauchi, N., & Hattori, M. (2014). REV-ERB α Inhibits the *PTGS2* Expression in Bovine Uterus Endometrium Stromal and Epithelial Cells Exposed to

- Ovarian Steroids. *Journal of Reproduction and Development*, 60(5), 362–370.
<https://doi.org/10.1262/jrd.2014-040>
- Kepler, C. K., Ponnappan, R. K., Tannoury, C. A., Risbud, M. V., & Anderson, D. G. (2013). The molecular basis of intervertebral disc degeneration. *The Spine Journal*, 13(3), 318–330. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2012.12.003>
- Ma, K., Chen, S., Li, Z., Deng, X., Huang, D., Xiong, L., & Shao, Z. (2019). Mechanisms of endogenous repair failure during intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.08.021>
- Mao, D., Hou, X., Talbott, H., Cushman, R., Cupp, A., & Davis, J. S. (2013). ATF3 Expression in the Corpus Luteum: Possible Role in Luteal Regression†. *Molecular Endocrinology*, 27(12), 2066–2079. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1274>
- Müller, H.-J., & Prange, D. R. (2016). *PCR - Polymerase-Kettenreaktion* (2. Auflage). Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-48236-0>
- Pattappa, G., Li, Z., Peroglio, M., Wismer, N., Alini, M., & Grad, S. (2012). Diversity of intervertebral disc cells: Phenotype and function: Diversity of intervertebral disc cells. *Journal of Anatomy*, 221(6), 480–496. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01521.x>
- Picó, Y. (Hrsg.). (2007). *Food toxicants analysis: Techniques, strategies and developments* (1st ed). Elsevier.
- Quora. (o. J.). *What are the components of a DNA molecule?* Quora. Abgerufen 20. März 2022, von <https://www.quora.com/What-are-the-components-of-a-DNA-molecule>
- Roberts, S., Evans, H., Trivedi, J., & Menage, J. (2006). Histology and Pathology of the Human Intervertebral Disc. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 88(suppl_2), 10–14. <https://doi.org/10.2106/JBJS.F.00019>
- Sakumoto, R., Hayashi, K.-G., Saito, S., Kanahara, H., Kizaki, K., & Iga, K. (2015). Comparison of the global gene expression profiles in the bovine endometrium between

- summer and autumn. *Journal of Reproduction and Development*, 61(4), 297–303.
<https://doi.org/10.1262/jrd.2015-024>
- Schürer, R. (2008). Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie der Bandscheiben – eine Literaturübersicht: Teil I: Anatomie und Physiologie der Bandscheiben. *Manuelle Medizin*, 46(1), 23–26. <https://doi.org/10.1007/s00337-007-0564-3>
- Schwegler, J. S., & Lucius, R. (2011). *Der Mensch: Anatomie und Physiologie* (5., überarb. Aufl). Thieme.
- Tanner, S. (2021). *Primer Design Introduction*.
- Thieme eRef. (o. J.). *Aufbau eines Discus intervertebralis (Zwischenwirbelscheibe bzw. Bandscheibe)*. Abgerufen 19. März 2022, von <https://eref.thieme.de/cockpits/clsport0001clAna0001/0/coAna00005/4-1296>
- Vergroesen, P.-P. A., Kingma, I., Emanuel, K. S., Hoogendoorn, R. J. W., Welting, T. J., van Royen, B. J., van Dieën, J. H., & Smit, T. H. (2015). Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: A vicious circle. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(7), 1057–1070. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.03.028>
- Wikimedia. (2020). *Schematic mechanism of PCR (Deutsch)*. Own work.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction-de.svg
- Wink, M. (Hrsg.). (2011). *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie* (4., aktualisierte Aufl). Wiley-VCH.