

## Versuch Quantitative Real-time PCR

**Betreuer:** PD Dr. Claus Buschmann  
Kontakt: [Claus.Buschmann@botanik2.uni-karlsruhe.de](mailto:Claus.Buschmann@botanik2.uni-karlsruhe.de)

Dipl.-Biol. Alexander Knoll  
Kontakt: [Alexander.Knoll@kit.edu](mailto:Alexander.Knoll@kit.edu)

### 1. Worum geht es bei diesem Versuch?

Einzelne Zellen, aber auch mehrzellige Organismen müssen auf innere und äußere Signale reagieren, um sich variierenden Bedingungen bestmöglich anzupassen. Zunächst müssen Signale spezifisch mit Hilfe von Rezeptoren erkannt werden. Anschließend erfolgt die Signalweiterleitung in der Zelle, wobei verschiedene Enzyme aktiviert oder inaktiviert werden. Diese lösen entweder direkt oder indirekt über andere als Effektoren fungierende Proteine eine Zellantwort aus.

Aus biologischer Sicht ist es wichtig, dass Proteine, welche als Rezeptoren oder Bestandteile von Signaltransduktionsketten fungieren, stets vorhanden sind, um eine schnelle Reaktion auf einen Stimulus hin zu erlauben. Die Reaktion einer Zelle auf einen gegebenen Reiz muss jedoch an Art und Intensität des Signals sowie an seine Dauer angepasst werden, um eine möglichst adäquate Antwort zu generieren. Diese Antwort der Zelle auf einen gegebenen Reiz hin kann nun z.B. durch das An- oder Abschalten bereits vorhandener Enzyme geschehen oder aber durch das Bereitstellen von Proteinen, die zuvor nicht in der Zelle vorhanden waren. Diese so genannte *differentielle Genexpression* ist von immenser Bedeutung, denn sie erlaubt es, unzählige verschiedene Effektoren innerhalb einer Zelle zu kombinieren und damit eine Vielzahl graduell angepasster Antworten zu ermöglichen. Das „An- bzw. Abschalten“ von Genen dient nicht nur regulatorischen Zwecken, vielmehr ist es eine biologische Notwendigkeit, denn es wäre völlig unökonomisch und energetisch nicht tolerierbar, alle im Genom einer Zelle kodierten Gene permanent zu exprimieren.

Die differentielle Genexpression hat zur Folge, dass die Zusammensetzung der RNAs innerhalb einer Zelle nicht statisch ist, sondern ständig variiert. Die Gesamtheit aller zu einem definierten Zeitpunkt in einer Zelle anzutreffenden Transkripte bezeichnet man auch als *Transkriptom* und dessen Veränderung als Reaktion auf einen exogenen oder endogenen Stimulus als *transkriptionelle Antwort*. Genau diese ist der Mittelpunkt unseres Versuches.

*Wie kann man sich die Vorgehensweise ganz allgemein vorstellen?* Zunächst wird eine einzelne Zelle oder wie in unserem Fall ein ganzer Organismus (die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*) für eine definierte Dauer einem bestimmten Reiz (hier: das DNA-schädigende Agens Bleomycin) ausgesetzt, während ein als Kontrolle fungierender Organismus weiter unter Standardbedingungen verbleibt. Anschließend wird aus beiden Ansätzen („*Behandlung*“ und „*Kontrolle*“) die RNA extrahiert. Alle zu diesem Zeitpunkt vorhandenen RNAs stellen das Transkriptom der jeweiligen Probe dar. Die RNA kann nun mit entsprechenden Enzymen in DNA umgeschrieben werden, die weitaus stabiler ist und daher besser gelagert werden kann. Da jedes RNA-Molekül nur einmal in DNA umgeschrieben wird, ergibt sich ein quantitativ gleichwertiges Abbild des Transkriptoms auf DNA-Ebene.

Die Variation zwischen den Transkriptomen von „behandelten“ und „unbehandelten“ Proben ist als transkriptionelle Antwort auf die „Behandlung“ aufzufassen. Möchte man sich hier einen globalen Überblick verschaffen, also die Veränderung der Expression aller Gene untersuchen, so kann man dies mit so genannten *DNA-Chips* tun. Diese ermöglichen die Identifizierung all jener Gene, welche auf den Reiz hin stärker oder schwächer als in der Kontrolle exprimiert werden. Eine sehr viel genauere Analyse der transkriptionellen Antwort erlaubt jedoch die quantitative Real-time PCR, die derzeit sensitivste Methode zu Quantifizierung von Nucleinsäuren. Allerdings hat diese Genauigkeit ihren Preis: da für jedes Experiment zahlreiche Standards als Vergleichswerte sowie andere interne Kontrollen mitgemessen werden müssen, kann man mit dieser Methode bei einem Experiment immer nur wenige Gene hinsichtlich ihrer Expression untersuchen.

### Umgang mit RNA

Der Umgang mit RNA ist eigentlich nicht komplizierter als der mit DNA, da der chemische Unterschied zwischen diesen beiden Molekülklassen sehr gering ist. Allerdings produzieren alle Organismen *RNasen*, die keine Cofaktoren wie  $Mg^{2+}$  für ihre katalytische Aktivität benötigen und außerdem extrem stabil sind – so werden RNase-Lösungen *DNase*-frei gemacht, in dem man sie für 20 – 30 Minuten kocht. Um einen Abbau der RNA während der Arbeitsschritte zu unterbinden, ist es notwendig, sehr sauber zu arbeiten, Handschuhe zu tragen und RNase-freie Lösungen zu verwenden. Diese werden erhalten, in dem man 1 / 200 Volumenanteil *Diethylpyrocarbonat* (DEPC) zugibt, mischt und nach mehreren Stunden die Lösung autklaviert. DEPC bindet u.a. an Histidin und führt zu kovalenten Verknüpfungen, was die Aktivität der RNasen unterbindet. DEPC selbst zerfällt beim Autoklavieren in  $CO_2$  und Ethanol. Während verschiedener Schritte der RNA-Aufarbeitung werden zudem RNase-Inhibitoren zugegeben, dies sind Proteine, die auch in der Natur vorkommen.

### RNA-Extraktion

Es gibt verschiedene Methoden der RNA-Extraktion – das Grundprinzip ist jedoch immer dasselbe. Zunächst wird das Gewebe mechanisch aufgebrochen, um die Zellen freizusetzen. Diese werden dann lysiert, RNasen inaktiviert und die RNA anschließend extrahiert. Bei diesen Methoden isoliert man die Gesamt-RNA, d.h. mRNAs, tRNAs, rRNAs und diverse andere RNA-Moleküle verschiedener Funktionen. Die mRNA macht hierbei nur etwa 2 % der Gesamt-RNA aus. Für Anwendungen, wie die quantitative Real-time PCR, ist das ausreichend.

Während klassische RNA-Aufreinigungstechniken die von DNA verschiedenen Löslichkeits-Eigenschaften unter Verwendung längerer Zentrifugations- und Fällungsschritten ausnutzen, wird bei der hier angewandten Methode das *RNeasy Plant Mini Kit* der Firma *Qiagen* verwendet. Hierbei wird zwar auch auf die klassische Lyse in hochkonzentriertem *Guanidinisothiocyant*-Puffer gesetzt – allerdings in Kombination mit der Aufreinigung über so genannte *Silica-Membranen*. Silikate sind die Salze und Ester der ortho-Kieselsäure ( $Si(OH)_4$ ) und deren Kondensate. Alle Salze sind aus  $SiO_4$ -Tetraedern aufgebaute Verbindungen, deren Tetraeder jedoch auf verschiedene Weise miteinander verknüpft sein können. Die meisten Silicate sind *unlöslich* in Wasser oder anderen Lösungsmitteln. Silica-Membranen fungieren als *Anionentauscher* und binden in Gegenwart hoher Konzentrationen *chaotroper Salze* (dies sind Salze, die geordnete Wasserstoffbrückenbindungen in Wasser auflösen; z.B.: Natriumiodid, Guanidinisothiocyant, Natriumperchlorat) spezifisch Nucleinsäuren, die nach dem Waschen (ein oft verwendeter Puffer hierzu ist: 0,1 M NaCl / 10 mM Tris pH 7.5 / 2,5 mM EDTA / 50 % EtOH) problemlos mit einem Salz-Ethanol-

Puffer oder Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen, wie Wasser oder TE-Puffer, eluiert werden können. Die in den RNeasy Mini spin Säulen verwendete Silica-Membran hat eine *Bindekapazität* von bis zu 100 µg RNA, das *maximale Ladevolumen* beträgt 700 µl und die untere *Ausschlussgröße* bei 200 Nukleotiden Länge. Laut Herstellerangaben können bei einer Probe von 100 mg *Arabidopsis*-Blattmaterial 35 µg RNA erhalten werden, wobei das Elutionsvolumen am Ende nicht kleiner als 30 µl sein soll.

Zunächst wird das Pflanzenmaterial (bis zu 100 mg) mit Hilfe kleiner Pistille in 1,5 ml Eppendorfgefäßen in Gegenwart eines hochkonzentrierten Guanidinisothiocyanat (GTC) enthaltenden Puffers (RLT-Puffer) mechanisch aufgebrochen. GTC ist ein chaotropes Salz, welches sehr effektiv Proteine denaturiert (auch RNasen). Nach der Zell-Lyse werden die Proben auf eine so genannte *QIAshredder* Säule geladen (eine Art grober Vorfilter). Hierbei wird unlösliches Material (Zelltrümmer) entfernt und die Viskosität des Lysates reduziert. Das homogenisierte Lysat wird anschließend mit Ethanol versetzt, wodurch geeignete Bindungseigenschaften der RNA an die Silica-Membran der RNeasy Mini spin Säule erreicht werden. Die Gesamt-RNA bindet an die Säule, so dass Kontaminanten (z.B. Polysaccharide, DNA) effizient durch Waschschriffe entfernt werden können. Die Säulenmatrix eignet sich hierbei zur Aufreinigung von RNA-Molekülen größer 200 Basen. Dies führt zu einer Anreicherung an mRNAs, da die meisten RNAs kleiner als 200 Nukleotide sind (wie z.B. 5.8S rRNA, 5S rRNA und tRNAs, die zusammen etwa 15 – 20 % der Gesamt-RNA ausmachen). Obwohl durch die Reinigungsschritte die genomische DNA weitgehend entfernt wird, ist eine zusätzliche *DNase-Behandlung* der RNA auf der Säulenmatrix ratsam, da DNA-Kontaminationen die Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR verfälschen würden. Am Ende der Prozedur kann die RNA mit RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert werden.

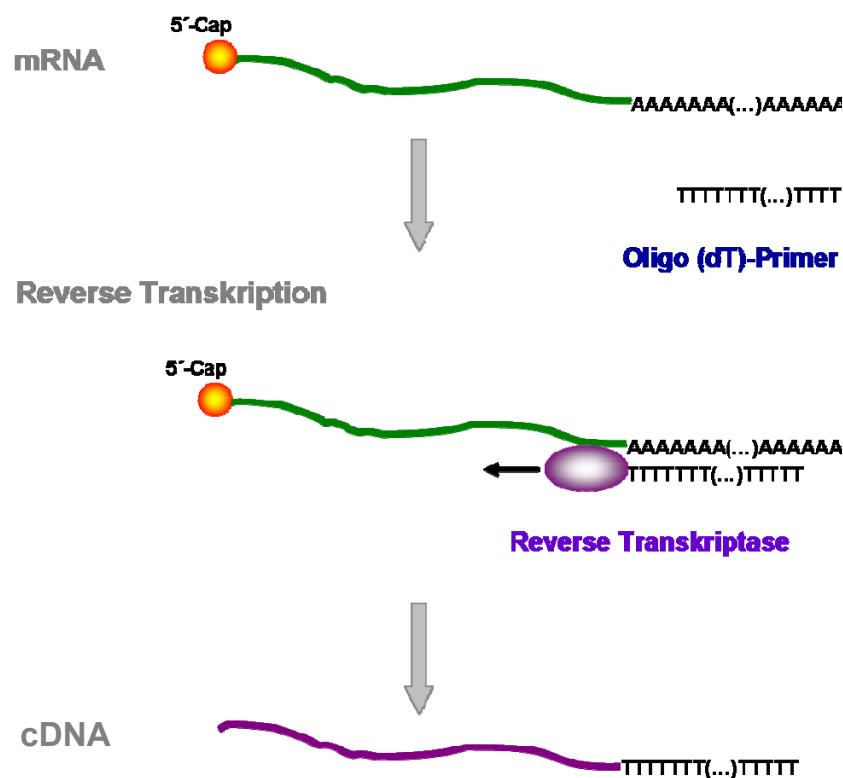
### Reverse Transkription

Bei der *reversen Transkription* wird – wie der Name schon sagt – das Prinzip der Transkription in umgekehrter Richtung verwirklicht: RNA dient hierbei als Matrize (*Template*) und wird in DNA umgeschrieben (Abbildung 1). Die dabei entstehende DNA ist komplementär zu dem als Template verwendeten RNA-Molekül, daher nennt man sie auch *cDNA (complementary DNA)*. Die Vorgehensweise ist recht einfach: RNA wird mit einem Primer gemischt und auf 70 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Während der anschließenden Abkühlung der Proben kommt es zu einer spezifischen Hybridisierung des Primers mit der RNA. Anschließend werden Puffer, Desoxynukleotidtriphosphate, RNase-Inhibitor und *Reverse Transkriptase* zugegeben und das Gemisch bei 42 °C für eine Stunde inkubiert.

Gängige Reverse Transkriptasen sind die *AMV-RT* aus dem *avian myoblastosis virus* und die *MMLV-RT* aus dem *Moloney murine leukemia virus*. Die *AMV-RT* kann RNA- oder DNA-abhängig DNA synthetisieren, besitzt eine Exonuklease- und eine RNaseH-Aktivität. Das Temperatur-Optimum dieses Enzyms liegt bei 42 °C, es ist allerdings auch bei höheren Temperaturen bis 60 °C noch aktiv. Die *MMLV-RT* ist eine ausschließlich RNA-abhängige DNA-Polymerase mit einer verglichen mit der *AMV-RT* schwächer ausgeprägten RNaseH-Aktivität. Das Temperatur-Optimum der *MMLV-RT* liegt bei 37 °C, das Maximum bei 42 °C. Der Vorteil in der Verwendung der *AMV-RT* liegt darin, dass bei höheren Arbeitstemperaturen Sekundärstrukturen in der RNA leichter überwunden werden können. Nachteilig wirkt sich jedoch die starke RNaseH-Aktivität aus, welche zu einem schnelleren Abbau der als Template dienenden RNA führt. Hier wiederum ist die *MMLV-RT* mit ihrer schwächeren RNaseH-Aktivität von Vorteil: da die RNA-Moleküle eine längere Halbwertszeit haben, werden längere cDNA-Transkripte erhalten. Kommerziell erhältlich Reverse

Transkriptasen sind oft insofern modifiziert, als dass sie keine intrinsische RNaseH-Aktivität mehr besitzen und damit die Ausbeute an langen cDNAs optimiert ist.

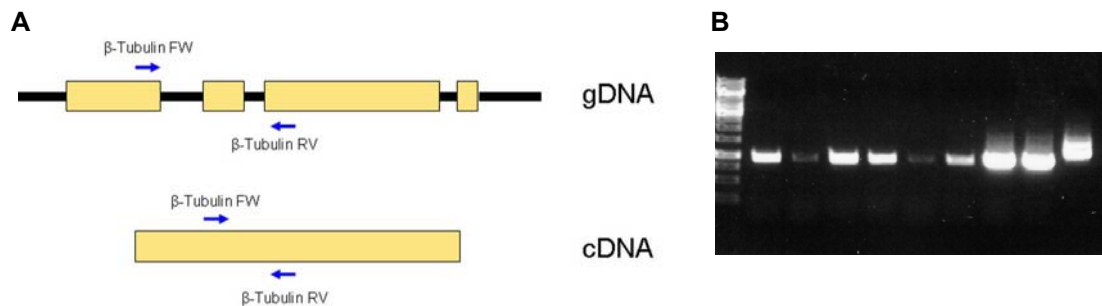
Bei der oben beschriebenen Methode wird Gesamt-RNA isoliert. Durch die Verwendung von Oligo-(dT)-Primern können bei der reversen Transkription selektiv RNAs in cDNA umgeschrieben werden, die ein polyadenyliertes Ende aufweisen. Dies ist bei den allermeisten mRNAs der Fall, nicht jedoch bei tRNAs und rRNAs. Dies bedeutet, dass nach der reversen Transkription für jedes mRNA-Molekül ein cDNA-Molekül vorliegt. Wurde also ein Gen sehr stark exprimiert und es lagen sehr viele mRNAs davon vor, so werden nach der reversen Transkription genauso viele komplementäre cDNAs vorliegen. War ein Gen dagegen nur sehr schwach exprimiert und nur durch wenige mRNAs repräsentiert, so spiegelt sich dieses Verhältnis auch quantitativ auf cDNA-Ebene wider.



**Abbildung 1: Reverse Transkription.** Der oligo(dT) Primer bindet an das poly(A)-Ende der mRNAs. Diese können dann durch die Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden.

### **$\beta$ -Tubulin-PCR – Qualitätskontrolle der cDNA**

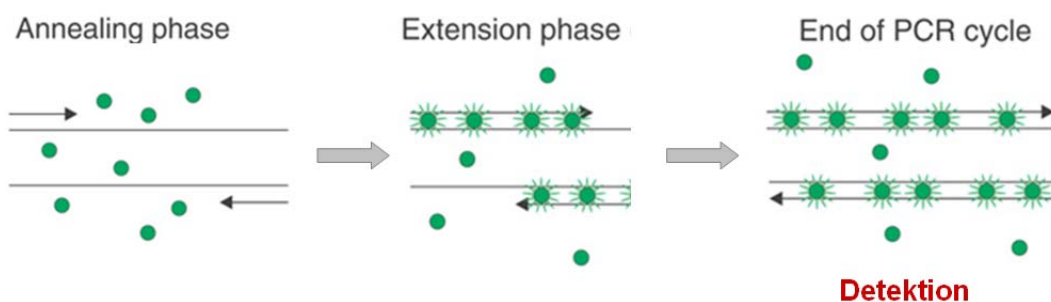
Während der RNA-Isolierung wird ein *DNase-Verdau* durchgeführt, um eventuell kontaminierende genomische DNA (gDNA) zu entfernen. Diese würde ansonsten zu fehlerhaften Messungen bei der quantitativen Real-time PCR führen. Um sicherzustellen, dass keine genomische DNA mehr in den cDNA-Proben enthalten ist, wird eine Kontroll-PCR mit  $\beta$ -Tubulinen-spezifischen Primern durchgeführt. Das Prinzip dieser Kontrolle ist Abbildung 2 zu entnehmen.



**Abbildung 2: Qualitätskontrolle der cDNA mittels  $\beta$ -Tubulin-PCR.** (A) Die Primer sind so gewählt, dass mindestens ein Intron (schwarzer Balken, hier zwei) zwischen den Exons liegt, an deren Sequenzen die Primer binden können. Für gDNA erhält man also ein größeres Produkt als für cDNA bzw. beide Produkte, wenn die cDNA mit gDNA kontaminiert ist. (B) Dargestellt ist die Auswertung einer solchen PCR, wobei als Template bei der Probe in der letzten Spur genomische DNA verwendet wurde. Der Größenunterschied ist deutlich zu erkennen. Informationen zu dem verwendeten Größenmarker sind dem Anhang zu entnehmen.

### Quantitative Real-time PCR

Die quantitative Real-Time PCR ist eine äußerst sensitive Methode zur Quantifizierung von Nucleinsäuren. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich selbst minimale Unterschiede in der Genexpression detektieren. Inzwischen gibt es zahlreiche innovative Variationen der Grundidee, so dass es technisch heutzutage auch möglich ist, in ein und demselben Ansatz verschiedene DNA-Bereiche gleichzeitig zu amplifizieren und die Daten zu einer Quantifizierung heranzuziehen. In den allermeisten Fällen reicht jedoch die in diesem Versuch zu erlernende Technik aus. Diese Methode basiert auf der Verwendung von *SYBR Green*, einer Chemikalie, die sich in doppelsträngige DNA (*dsDNA*) einlagern kann. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht kommt es zu einer Fluoreszenzemission – allerdings nur dann, wenn *SYBR Green* in die DNA eingelagert ist (Abbildung 3).



**Abbildung 3: SYBR Green** kann durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Dies gelingt allerdings nur, wenn SYBR Green in doppelsträngige DNA interkalieren. Da die Menge an dsDNA-Molekülen mit jedem Zyklus während der PCR im Idealfall verdoppelt wird, können immer mehr Farbstoffmoleküle interkalieren. Durch Messung der Fluoreszenz-Intensität für jede Probe kann so in „Echtzeit“ die Zunahme an DNA verfolgt werden.

Wenn nun während einer PCR ein bestimmtes cDNA-Molekül amplifiziert wird, verdoppelt sich bei jedem Zyklus die vorhandene Menge an dsDNA. Da SYBR Green im Überschuss vorhanden ist, werden sich also mit jedem Zyklus doppelt so viele Moleküle einlagern. Folglich ist das Fluoreszenzsignal doppelt so stark. Mit anderen Worten: die Fluoreszenz-Intensität korreliert direkt mit der Menge an doppelsträngiger DNA. Da bei der hier angewandten Technik die PCR-Gefäße mit speziellen transparenten Deckeln verschlossen sind, kann das Anregungslicht direkt von oben auf die Reaktionsansätze gelangen. Auf demselben Weg wird auch die Fluoreszenzemission durch spezielle Detektoren gemessen.

Diese Messung geschieht für alle Proben während jedem PCR-Zyklus am Ende des Elongationsschrittes (72 °C), d.h. wenn die Synthese der neuen DNA-Moleküle abgeschlossen ist (Abbildung 3). Da die Daten in Echtzeit ausgewertet werden, kann die verwendete Software die Fluoreszenzintensität direkt als Funktion des PCR-Zyklus darstellen. Man kann also auf dem Monitor tatsächlich *live* dabei zusehen, wie die DNA-Moleküle jedes Ansatzes pro Zyklus vermehrt werden (Abbildung 4 und Abbildung 6).

Eine PCR-Reaktion führt im Idealfall dazu, dass aus einem Molekül nach einem zwei werden. Diese beiden dienen im nächsten Zyklus wieder als Matrize und werden ebenfalls verdoppelt – das Resultat sind vier identische Moleküle. So lange keine der verwendeten Komponenten limitierend ist, kommt es also tatsächlich zu einer Verdopplung der spezifischen DNA-Moleküle pro Zyklus. Dies lässt sich sehr einfach mathematisch ausdrücken durch die *Exponentialgleichung*:

$$y = x \cdot 2^z$$

wobei: **x** = Anzahl der DNA-Moleküle zu Beginn der Reaktion

**2** = Vermehrungsfaktor pro Zyklus

**z** = Anzahl der Zyklen

**y** = Anzahl der DNA-Moleküle nach z Zyklen

Angenommen, in einer Probe befindet sich zu Beginn der Reaktion ein DNA-Doppelstrang (x), welcher als Matrize zur Amplifikation mit einer bestimmten Primerkombination verwendet werden kann, so findet man nach z = 0 Zyklen noch immer dieses eine Molekül im Reaktionsansatz (y = 1). Nach z = 1 Zyklus sind es zwei, nach zwei Zyklen vier, nach drei Zyklen acht und nach vier Zyklen 16 Moleküle.

*Wie viele Zyklen werden aus mathematischer Betrachtung benötigt, um aus einem Matrizenmolekül 10 Moleküle werden zu lassen?*

$$y = 2^z = 2^{3,3333} = 10$$

*Was bedeutet diese Tatsache für die Quantifizierung von DNA-Molekülen während einer PCR-Reaktion?* Nun, solange die Reaktion in allen Ansätzen der Exponentialfunktion genügt, hat dies folgende Konsequenzen: betrachten wir zwei cDNA-Proben – nennen wir sie **A** und **B** – wobei es sich bei **B** um eine *zehnfache Verdünnung* der Probe **A** handelt. Bei einer PCR-Reaktion unter identischen Bedingungen und unter Verwendung derselben Primerkombination (es wird also derselbe DNA-Abschnitt vermehrt) dauert es nach oben dargestelltem Rechenbeispiel *3,3 Zyklen länger*, bis im Ansatz **B** dieselbe DNA-Menge vorliegt wie in Ansatz **A**. Die DNA-Menge ist wie oben beschrieben proportional zu dem emittierten Fluoreszenzsignal durch SYBR Green. Definiert man also einen *Schwellenwert* (engl.: *Threshold*), d.h. eine bestimmte Fluoreszenzintensität (bzw.

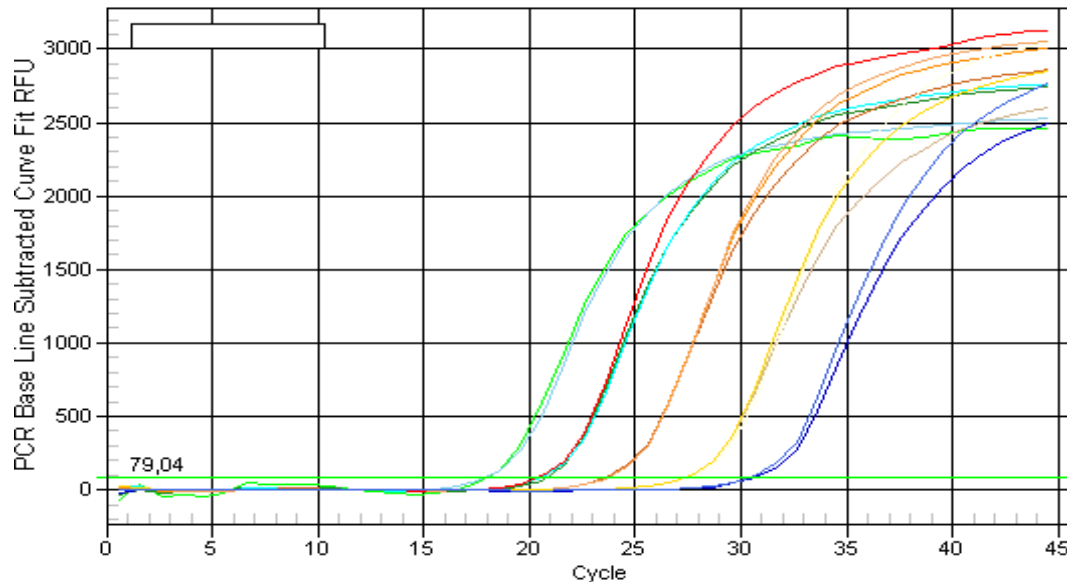
eine DNA-Konzentration), so kann man für jede Probe feststellen, wann dieser Wert erreicht bzw. überschritten wird. Das bedeutet, ein Konzentrationsunterschied des Faktors 10 (zwischen den betrachteten Proben A und B) führt dazu, dass im Fall von B der Schwellenwert erst 3,3 Zyklen später erreicht wird als in Ansatz A.

*Fassen wir das kurz zusammen:* betrachten wir die Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes und nehmen wir an, die Reaktion läuft in beiden Ansätzen mit gleicher Effizienz ab, so können wir Konzentrationsunterschiede in der anfänglich verwendeten DNA-Menge durch unterschiedliche Zeitpunkte (genauer gesagt Zyklen während der PCR) des Erreichens des Schwellenwertes bestimmen.

*Wenden wir diese Betrachtung einmal an:* wir haben RNA aus *Arabidopsis thaliana* isoliert und diese mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Stellen wir uns weiter vor, wir bereiten eine Verdünnungsreihe vor, bei der die cDNA-Probe mit ihrer gar nicht näher bestimmten Konzentration als Ausgangsprobe dient. Wir stellen eine 1 : 10-Verdünnung her, diese wird gut durchmischt und dann weiter 1 : 10 verdünnt. Bezogen auf die ursprüngliche Probe ist dies die 1 : 100-Verdünnung. Das lässt sich natürlich fortsetzen – nehmen wir nun an, wir haben eine Verdünnungsreihe erzeugt in der Form:

**cDNA (unverdünnt) → 1 : 10 → 1 : 100 → 1 : 1000 → 1 : 10.000**

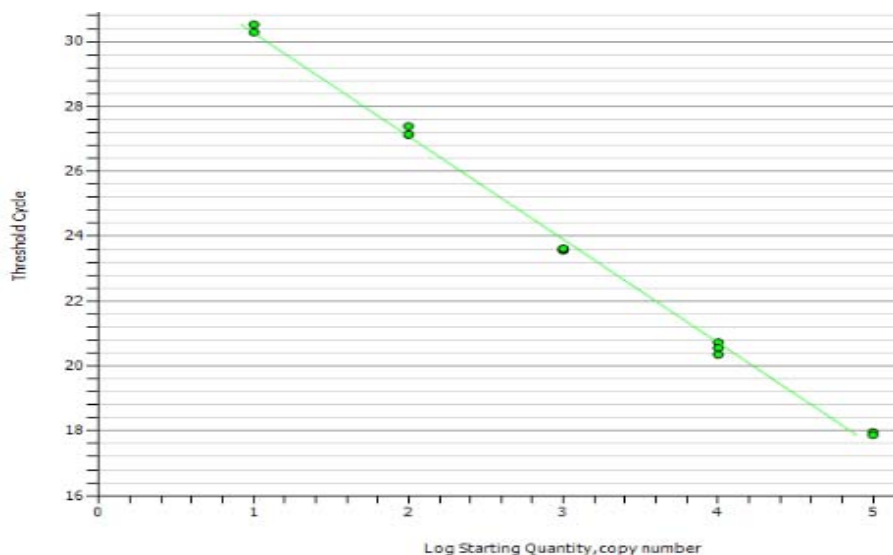
Nun setzen wir diese fünf Proben jeweils in einer PCR-Reaktion als Template ein – z. B. von jedem Ansatz 2  $\mu$ l. Wir wissen nicht, wie viele Moleküle sich in den Ansätzen zu Beginn der Reaktion befinden – was wir aber wissen, ist, dass sich die Proben jeweils um den *Faktor 10* in der DNA-Konzentration unterscheiden – und zwar *zu Beginn der Reaktion* – das ist wichtig!



**Abbildung 4: Amplifikation einer Verdünnungsreihe über fünf Größenordnungen.** Wie bei jeder normalen PCR kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation von DNA-Fragmenten (*Amplicons*). Liegt zu Beginn der Reaktion viel cDNA als Template vor, so kommt es schnell zu einer Amplicon-Anreicherung (Kurven bei Zyklus 18). In Proben mit sehr viel weniger Ausgangsmaterial dauert es länger, bis die gleiche DNA-Menge erreicht wird (z.B. Kurven bei Zyklus 31). Der Schwellenwert wird durch die hellgrüne Gerade festgelegt – als  $C_T$ -Wert wird der *Schnittpunkt der Amplifikationsgraphen mit dieser Geraden* bezeichnet. Dieser wird automatisch von der Software ermittelt. Da die quantitative Real-time PCR so extrem sensitiv ist – auch gegenüber Pipettierungenauigkeiten – werden i.d.R. alle Proben als *Triplikate* gemessen, daher sind in der Abbildung immer mehrere nahezu deckungsgleiche Kurven zu sehen.

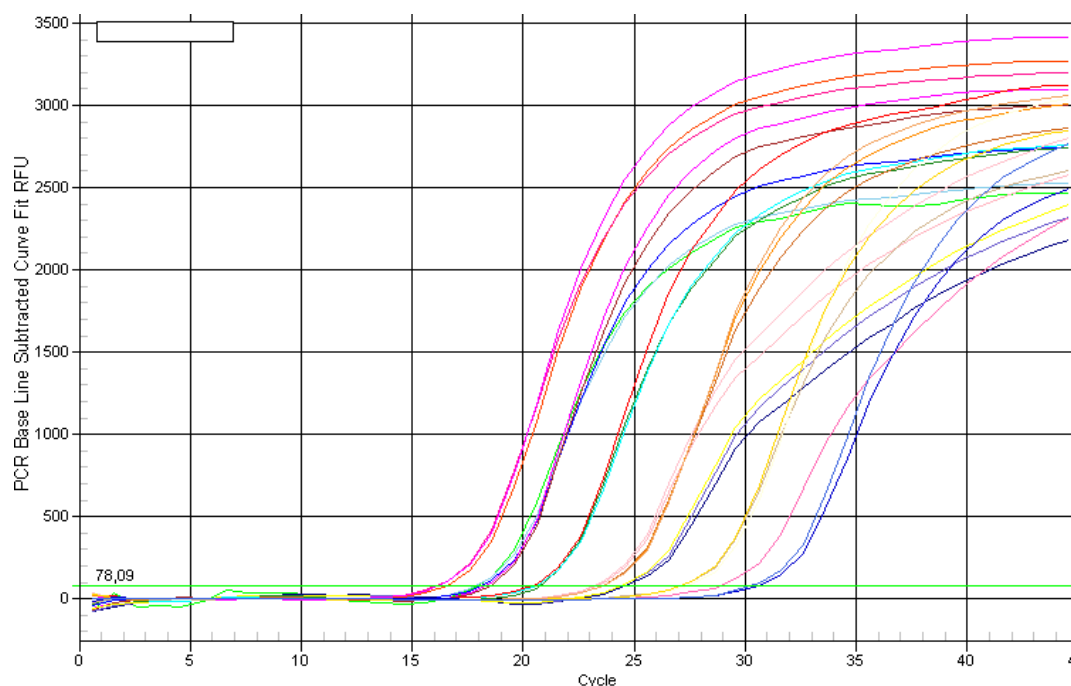
Nun starten wir die PCR mit einer Primerkombination, die zur Amplifikation eines Genabschnittes X führt, der ja in allen Proben vorkommt – wenngleich in verschiedener Konzentration. Bei dem Ansatz „cDNA (unverdünnt)“ wird es ein paar Zyklen dauern, bis durch die exponentielle Reaktion nach einigen Zyklen soviel DNA-Moleküle des Genabschnittes X entstanden sind, dass die Fluoreszenzintensität den festgelegten Schwellenwert übersteigt (Abbildung 4). Bei der Probe „1 : 10“ wird das 3,3 Zyklen länger dauern, bei „1 : 100“ werden 6,6 Zyklen mehr benötigt usw. Den Zyklus, bei dem dieser Schwellenwert erreicht wird, bezeichnet man auch als *Threshold-Zyklus* (engl.: *Cycle Threshold* oder auch  $C_T$ ). **Dieser  $C_T$ -Wert ist also abhängig von der Konzentration der zu Anfang der Reaktion eingesetzten DNA-Menge.** Betrachten wir nun wieder unsere fünf Proben aus der Verdünnungsreihe: je Verdünnungsschritt (Faktor 10) wird der  $C_T$ -Wert um 3,3 größer.

Tragen wir diese  $C_T$ -Werte nun in einem Diagramm auf der Y-Achse als Funktion der DNA-Konzentration zu Reaktionsbeginn auf, erhalten wir eine Eichgerade – vorausgesetzt, wir geben auf der X-Achse die DNA-Konzentration nach unserer Definition an: „cDNA (unverdünnt)“ hat natürlich die höchste Konzentration an cDNA, nennen wir die Probe  $10^5$ . Die 1 : 10-Verdünnung können wir folglich als  $10^4$  bezeichnen. Dies soll nicht implizieren, in der ersten Probe befänden sich 10.000 Moleküle und in der 1 : 10 Verdünnung 1000. Das wäre eine richtige Annahme, wenn wir die exakte Molekülzahl in der Ausgangsprobe mit 100.000 bestimmt hätten – dies ist aber nicht der Fall. Also beschränken wir uns darauf, den **relativen Konzentrationsunterschied** zwischen den Proben wissenschaftlich korrekt als Unterschied in den Zehnerpotenzen anzugeben. Trägt man nun auf der Y-Achse die oben genannten  $C_T$ -Werte als Funktion des dekadischen Logarithmus der „relativen DNA-Konzentration“ (also 5, 4, 3, 2, 1) auf, so ergibt sich eine Gerade – die **Standardkurve** (Abbildung 5).

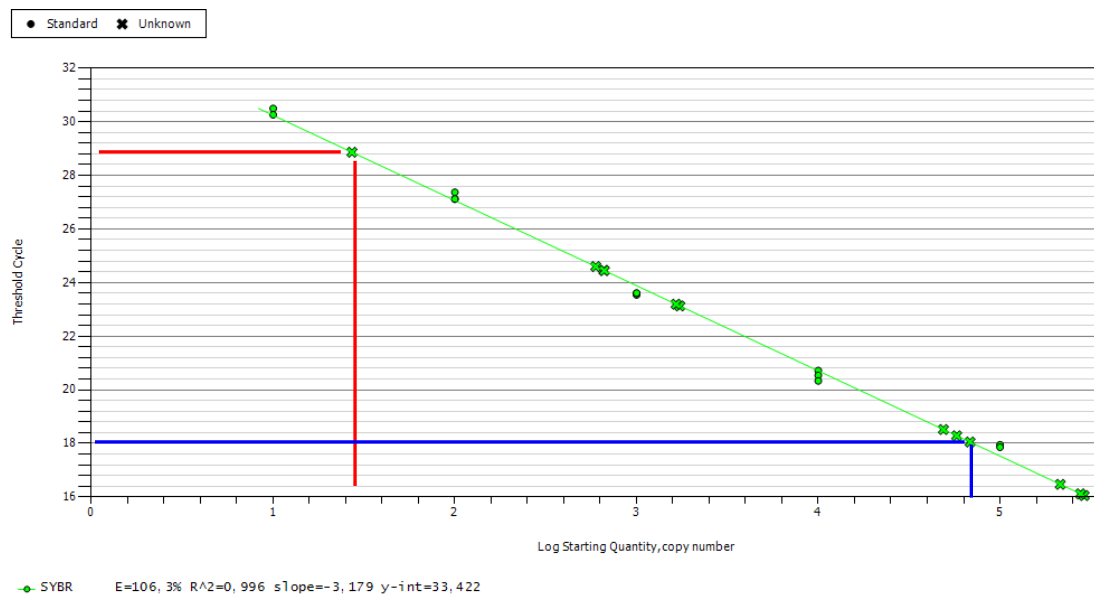


**Abbildung 5: Standardkurve.** Gezeigt ist eine von der Software errechnete Standardkurve. Aufgetragen sind die  $C_T$ -Werte der in einer Reaktion gemessenen Standardproben (grüne Kreise) als Funktion des dekadischen Logarithmus der vom Experimentator für sie angegebenen cDNA-Menge. Durch Linear-Regression wird daraus eine als Standardkurve dienende Geradengleichung berechnet (nicht dargestellt) und zusammen mit dem Korrelations-Koeffizienten angegeben. Da diese Funktion anhand von Standards unbekannter absoluter Konzentration ermittelt wird, bezeichnet man diese Art der Transkript-Quantifizierung auch als „*relative Standardkurven-Methode*“. Des Weiteren wird aus dem Wert für die Steigung der Geradengleichung anhand der Formel ( $E = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1$ ) die PCR-Effizienz ermittelt.

Es existieren generell zwei verschiedene Quantifizierungs-Strategien: die *absolute* und die *relative Quantifizierung* (Pfaffl, 2004). Erstere zielt darauf ab, als Ergebnis aussagen zu können, wie viele Moleküle einer bestimmten cDNA sich in einer Probe zu Beginn der Reaktion befanden. Hierzu benötigt man eine Eichkurve mit exakt bekannten Molekülzahlen. Für bestimmte Anwendungen – zum Beispiel in der klinischen Diagnostik – ist diese Vorgehensweise oft sinnvoll. Möchte man nun aber die Frage beantworten, wie stark sich die Expression eines Gens (also die Menge zu einem definierten Zeitpunkt davon transkribierter mRNAs) auf Grund einer bestimmten Behandlung verändert, so benötigt man keine absoluten Konzentrationsangaben – es reicht völlig aus, die Ergebnisse der relativen Quantifizierung von „Kontrolle“ und „Behandlung“ miteinander zu vergleichen. Damit lässt sich die Aussage treffen, Gen XYZ ist durch die Behandlung z.B. 50 mal stärker exprimiert worden als in der unbehandelten Vergleichsprobe.



**Abbildung 6: Typische Grafik einer quantitativen Real-time PCR.** Diese Abbildung entstammt demselben Experiment wie Abbildung 4 – mit dem Unterschied, dass nun zusätzlich zu den Standardproben auch die unbekanntes Proben eingeblendet sind. Wie auch die Standardproben werden die unbekanntes Proben bei der Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes mit Hilfe eines Primerpaares zu irgendeinem Zeitpunkt (Zyklus) den Schwellenwertbalken schneiden. Dieser  $C_T$ -Wert ist charakteristisch für jede Probe – denn er lässt auf die Ausgangskonzentration der Matrize in diesem Ansatz zurückrechnen – bezogen auf die mit Hilfe der Standardproben erzeugten Eichkurve. Dies geht im Detail aus Abbildung 7 hervor. Eine *wichtige Beobachtung* kann man hier noch machen: die meisten Amplifikationsgraphen „knicken“ nach zahlreichen Zyklen ab – es kommt zu keiner weiteren Bildung von dsDNA bei weiteren Zyklen. Dies kann verschiedene Ursachen haben: eine oder beide Primer sind verbraucht, es liegen keine dNTPs mehr vor – oder die Polymerase macht schlapp. Würde man den grünen Balken nun weiter nach oben verlegen, z.B. auf 2500, so würden einige Proben niemals den Schwellenwert erreichen – ganz davon abgesehen, dass die Reaktion zu diesem Zeitpunkt nicht mehr der *Grundvoraussetzung* gehorcht, die wir gefordert hatten, nämlich das es während eines jeden Zyklus zu Verdopplung aller in einem Ansatz befindlichen Matrizen kommt. Folglich *muss* die Quantifizierung während der exponentiellen Phase der PCR ablaufen – am Ende haben ja die meisten Proben mehr oder weniger dieselbe Endkonzentration erreicht, so dass an eine Quantifizierung nicht mehr zu denken ist.

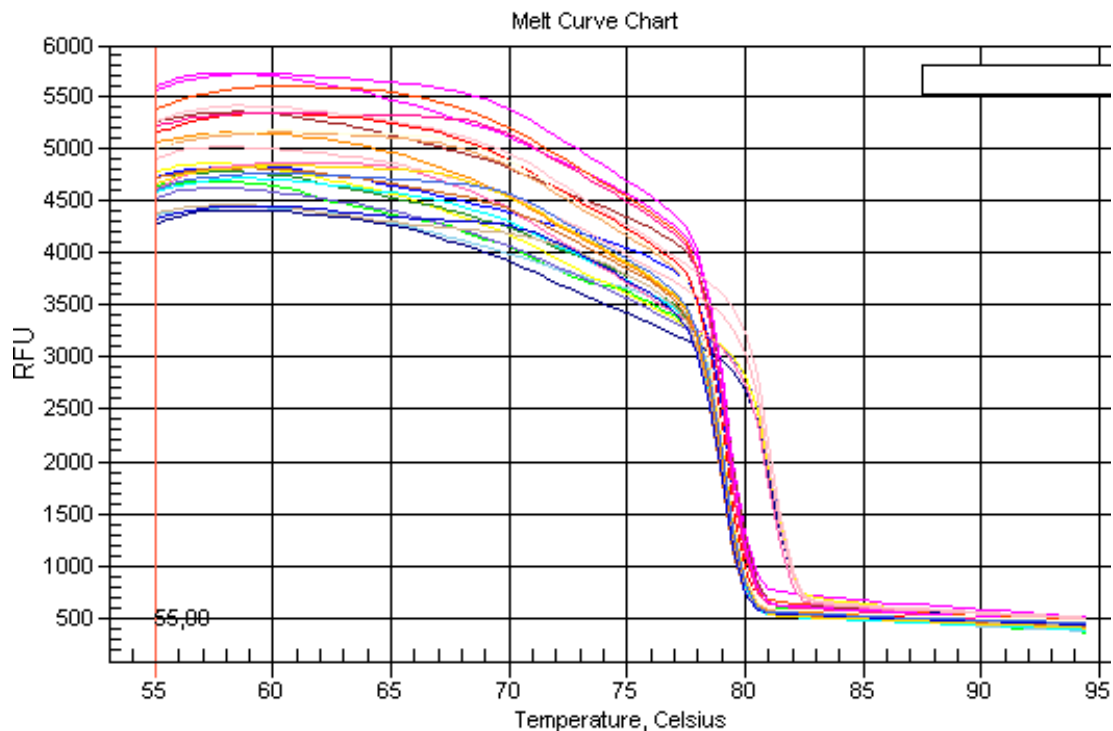


**Abbildung 7: Relative Quantifizierung.** Die hier gezeigte Standardkurve ist dieselbe wie in Abbildung 5 (die Abbildung ist nur weniger gestaucht) – die grünen Kreise symbolisieren wieder die Standardproben unbekannter Konzentration (mit jeweils 10-fachem Konzentrationsunterschied zueinander). Wie in Abbildung 6 gezeigt, gibt es für jede der unbekannt Proben aus dem Experiment ebenfalls einen charakteristischen  $C_T$ -Wert. Dieser wird – bildlich ausgedrückt – auf die Eichkurve projiziert (grüne Kreuze): hier z.B. hat eine Probe während der Amplifikation den Schwellenwert bei Zyklus 29 erreicht – folglich muss die verwendete Matrize zu Beginn der Reaktion etwa die Konzentration  $\log_{10}^{1,42}$  gehabt haben. Mathematisch ausgedrückt: durch Einsetzen der für die untersuchten Proben gemessenen  $C_T$ -Werte in die Geradengleichung der Standardkurve kann durch die Software die zu Beginn der PCR eingesetzte cDNA-Menge für das jeweils untersuchte Transkript bezogen auf die relativen Konzentrations-Bezeichnungen berechnet werden. Im vorliegenden Fall ist die Geradengleichung  $y = -3,179x + 33,422$ , wobei  $y$  der Schnittpunkt einer Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert ist,  $-3,179$  ist die Geradensteigung,  $x$  die DNA-Konzentration zu Reaktionsbeginn und  $33,422$  der  $y$ -Achsenabschnitt. Durch Auflösen der Gleichung nach  $x$  erhält man anhand der gemessenen  $C_T$ -Werte für jede Probe den zugehörigen  $x$ -Wert – also die Konzentration der Matrizen-DNA zu Reaktionsbeginn – natürlich bezogen auf die relative Standardkurve. Für die zweite Probe (blaue Linien) ergibt sich durch dasselbe Vorgehen eine anfängliche Template-Konzentration von etwa  $\log_{10}^{4,82}$ .

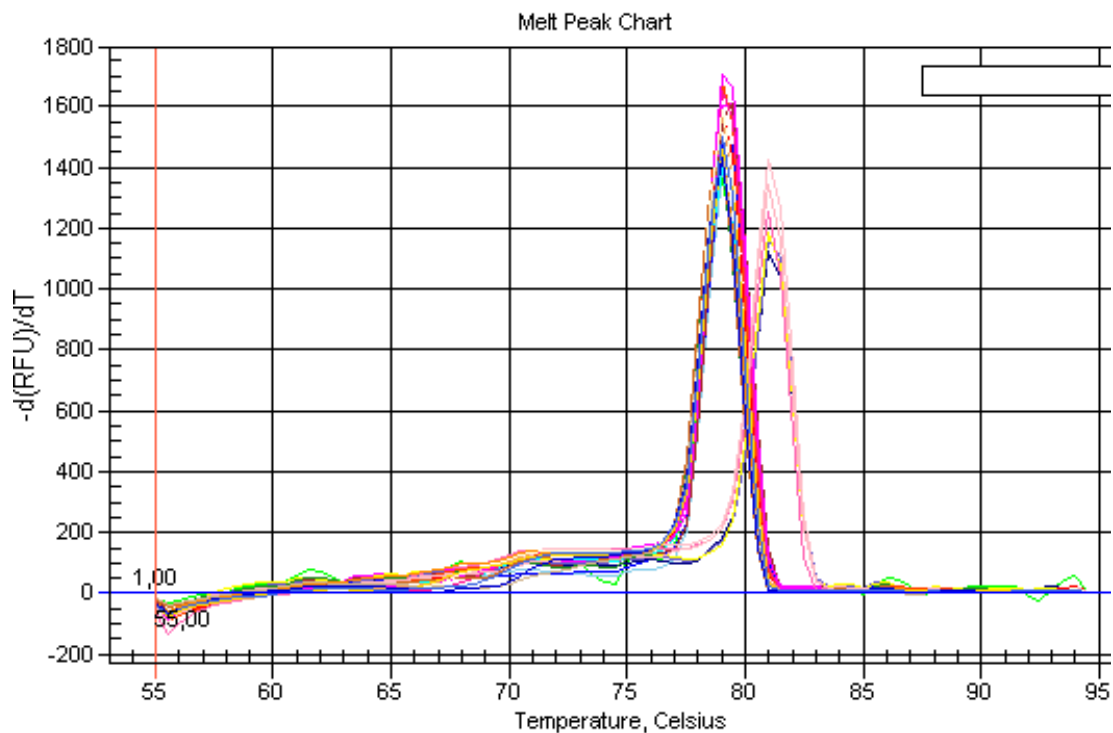
Bei jeder PCR-Reaktion kann es auf Grund von Fehlpaarungen der verwendeten Primer mit ähnlichen Sequenzen in der Template DNA oder durch Reaktionen zweier teilweise zueinander komplementären Primer zur Amplifikation unerwünschter Produkte bzw. Ausbildung von Primer-Dimeren kommen. Da es sich dabei ebenfalls um dsDNA handelt, in welche SYBR Green interkaliert, werden solche Produkte bei der Fluoreszenz-Emission mitgemessen. Diese können in der Folge zu erheblichen Fehlern bei der oben beschriebenen Quantifizierung führen. Aus diesem Grund sollte bei einer quantitativen Real-time PCR-Analyse eine Art Qualitätskontrolle durchgeführt werden, die Aussagen über die Reinheit der gebildeten PCR-Produkte liefert. Hierzu verwendet man die so genannte *Schmelzkurven-Analyse* nach Beendigung der Amplifikations-Zyklen.

### Schmelzkurve

Am Ende des letzten PCR-Zyklus (vgl. Abbildung 5) haben in der Regel alle Proben eine konstante DNA-Konzentration erreicht – die Fluoreszenzemission der Proben bleibt konstant hoch. Fährt man nun eine so genannte Schmelzkurve, so werden die Proben langsam erhitzt, z.B. um 0,5 °C alle 10 Sekunden. Startet man bei 55 °C und lässt 80 Schritte zu, so werden die Proben am Ende eine Temperatur von 94,5 °C aufweisen. *Was passiert nun währenddessen?* Zunächst erhalten wir für alle Proben die maximale Fluoreszenzintensität, da sie als dsDNA vorliegen und SYBR Green interkaliert ist. Nimmt die Temperatur nun immer weiter zu, so wird die zugeführte thermische Energie ausreichen, bei einer bestimmten Temperatur die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen „aufzubrechen“, d.h. die Stränge weichen auseinander und SYBR Green „fällt heraus“. Folglich nimmt das Fluoreszenzsignal ab (Abbildung 8 und Abbildung 9).



**Abbildung 8: Schmelzkurve.** Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität (Relative Fluorescence Units, RFU) als Funktion der Temperatur in °C. Alle Proben werden gleichmäßig langsam erhitzt, wodurch dsDNA-Moleküle in Einzelstränge zerfallen. Das freigesetzte SYBR Green fluoresziert nicht mehr, so dass man einen Abfall der Fluoreszenzintensität mit steigender Temperatur beobachtet. Bei einer für ein definiertes PCR-Produkt charakteristischen Temperatur geschieht dies für nahezu alle Moleküle einer Probe gleichzeitig und das Fluoreszenzsignal fällt schlagartig auf ein Grundrauschen ab (hier bei etwa 79 °C, *Schmelzpunkt*). Ist ein anderes PCR-Produkt amplifiziert worden, so hat es mit ziemlicher Sicherheit eine andere Nukleotidzusammensetzung, d.h. die Anzahl der Wasserstoffbrücken ist verschieden. Folglich wird mehr oder weniger Energie benötigt, um die dsDNA aufzuschmelzen. Diese Darstellung ist schon sehr hilfreich, eine weitere ist es noch mehr (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Die Ableitung der Schmelzkurve.** Aufgetragen ist die erste Ableitung der in Abbildung 8 gezeigten Graphen. Auf der Y-Achse ist die *Fluoreszenzänderung pro Zeitintervall* angegeben und auf der X-Achse weiterhin die Temperatur der Proben. Zu Beginn ist die Fluoreszenz noch nahezu konstant, die Änderung also nahe bei Null. Dann weichen die ersten dsDNA-Moleküle auseinander, es kommt zu einem leichten Abfall der Fluoreszenz (Abbildung 8), hier gekennzeichnet durch eine leichte Zunahme der Fluoreszenzänderung pro Zeiteinheit. Diese Änderung ist maximal bei jener Temperatur, bei der nahezu zeitgleich alle dsDNA-Moleküle schmelzen und stellt den für ein bestimmtes PCR-Produkt charakteristischen Schmelzpunkt dar. Hier sind zwei verschiedene *Maxima* zu erkennen, eines bei etwa 79 °C und das andere bei 81,5 °C. Bei der zu Grunde liegenden PCR-Reaktion waren hier zwei völlig verschiedene Bereiche aus dem cDNA-Pool aus *Arabidopsis* amplifiziert worden.

### Normalisierung

Betrachten wir unser Beispiel aus Abbildung 7 und nehmen wir an, bei den unbekanntenen Proben handele es sich um cDNA aus *Arabidopsis thaliana* – und zwar aus der „Kontrolle“ und aus der „Behandlung“. Nehmen wir weiter an, die verwendeten Primer hätten während der PCR zu einer Amplifikation der *Brca1*-cDNA geführt (*Brca1* ist ein Gen, welches für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen sehr wichtig ist – und genau diese wurden durch die Behandlung mit Bleomycin in großer Zahl herbeigeführt). Nehmen wir nun an, die „Kontrolle“ sei die Probe, für die mit Hilfe der relativen Quantifizierung eine Konzentration von  $4,2 \cdot 10^1$  (relativen Einheiten) für die *Brca1*-cDNA zu Reaktionsbeginn errechnet wurde. Eine weitere Annahme sei, die Probe „Behandlung“ sei jene, für die  $8,2 \cdot 10^4$  (relative Einheiten) für die *Brca1*-cDNA zu Reaktionsbeginn berechnet wurde.

*Was würde dies bedeuten?* Nun, rein mathematisch betrachtet kann man „Behandlung“ durch „Kontrolle“ dividieren – hier ergibt sich gerundet 1952,4 – wir könnten also behaupten, die Behandlung der Pflanze mit Bleomycin würde zu einer nahezu 2000-fachen Menge an *Brca1*-cDNA geführt haben. Da wir weiter oben

bereits diskutiert hatten, dass jede cDNA eine mRNA repräsentiert, würden wir also schließen, dass die behandelte Pflanze durch eine extreme Steigerung der *Brca1*-Transkription versucht, mehr BRCA1-Protein zur Reparatur der entstandenen Schäden bereitzustellen.

Diese Interpretation ist einleuchtend und auch nicht ganz falsch – wir haben hier jedoch einige Parameter außer acht gelassen:

1. haben wir wirklich bei beiden Ansätzen mit exakt gleich viel Pflanzenmaterial die RNA-Extraktion begonnen?
2. beim Zermahlen der Proben haben verschiedene „Köche“ ihre Hände im Spiel gehabt – und mit Sicherheit mit unterschiedlicher Effizienz gearbeitet.
3. die RNA-Extraktion mit dem Kit ist sicher recht einheitlich, doch in der Regel pipetiert im Praktikum ja nicht nur eine Person, sondern mehrere...
4. die cDNA-Synthese muss ebenfalls nicht immer mit gleicher Effizienz in beiden Proben abgelaufen sein.
5. wenn man genauer hinsieht, wird man wohl noch mehr potentielle Fehlerquellen finden...

*Wie kann man trotz dieser potentiellen Fehlerquellen eine zuverlässige Quantifizierung gewährleisten?* Durch verschiedene Vorexperimente lassen sich Gene identifizieren, die in allen Geweben – also *ubiquitär* – und zudem *stark* exprimiert werden – und zwar *unabhängig vom Alter des Organismus* und viel wichtiger: *die Expression dieser Gene wird nicht durch die „Behandlung“ – im vorliegenden Fall Bleomycin – beeinflusst.* Gene, die diese Kriterien erfüllen, nennt man **Haushaltsgene** (engl.: *Housekeeping genes*).

Mit dem Wissen, dass das Haushaltsgen in den Proben „Kontrolle“ und „Behandlung“ gleich stark exprimiert wird – also pro Zelle bzw. pro Gramm Frischgewicht die gleiche Konzentration an mRNA-Molekülen dieses Gens vorliegt, lassen sich oben angesprochenen variablen Parameter berücksichtigen. Haushaltsgene lassen sich in diesem Zusammenhang als eine **interne Kontrolle** verstehen.

Ist die Effizienz der RNA-Isolierung zwischen den beiden Proben verschieden, so betrifft dies nicht nur das Gen, dessen Expression man eigentlich quantifizieren möchte (Zielgen), sondern auch das Haushaltsgen – und zwar in gleichem Maße. Findet man also bei der Real-time PCR Unterschiede in der Menge der zu Reaktionsbeginn vorhandenen cDNA-Mengen zwischen den beiden Proben, so kann man sehr einfach einen **Korrekturfaktor** ermitteln, um z.B. den niedrigeren Wert des Haushaltsgens der einen Probe an den höheren anzugleichen. Da die Quantifizierung der Zielgen-Expression in gleichem Maße betroffen ist, kann dieser Faktor auch bei der entsprechenden Probe angewandt werden, um das Ergebnis rechnerisch zu korrigieren – dieses Verfahren nennt man **Normalisierung auf das Haushaltsgen**.

Im konkreten Fall wurde für *Arabidopsis* ermittelt, dass das Gen, welches für die L27A-Untereinheit des 60S Ribosoms kodiert, den Anforderungen als Haushaltsgen gerecht wird. Mit einer entsprechend gewählten Primerkombination lässt sich aus der hergestellten cDNA ein Teilstück amplifizieren. Aus denselben cDNA-Proben kann man mit zwei anderen Primern diejenige cDNA anreichern, die das ursprünglich exprimierte *Brca1*-Gen repräsentiert.

Die folgenden Tabellen sollen das beschriebene Normalisierungsverfahren verdeutlichen. Die angegebenen Zahlen stellen zunächst *relative Transkriptmengen* (in der Fachliteratur auch Transkript-Abundanzen genannt) dar. *Per definitionem* muss das Haushaltsgen in beiden Proben gleich stark exprimiert worden sein,

folglich sollte auch die Quantifizierung denselben Wert ergeben: hier messen wir für die „Kontrolle“ 50.000 und für die „Behandlung“ 60.000. Dividiert man 60.000 durch 50.000, so erhält man den Faktor 1,2 – dies ist der Korrekturfaktor! Multipliziert man die für das Haushaltsgen der Kontrolle gemessenen Werte mit ihm, sind die Daten nun auf das 60S-Transkript normalisiert: aus dem für *Brca1* gemessenen Wert 100 wurde durch die Korrektur 120.

SQ Mean	60S	BRCA1
Kontrolle (GM)	50.000	100
Behandlung (Bleomycin)	60.000	1200

↓ Normalisierung auf 60S-Transkript-Abundanz

SQ Mean (normalisiert)	60S	BRCA1
Kontrolle (GM)	60.000	120
Behandlung (Bleomycin)	60.000	1200

Nun sind wir wieder am Ausgangspunkt unserer Überlegungen zur Normalisierung – und wir können nun noch einmal die Frage stellen, welche Auswirkungen auf die Transkription des *Brca1*-Gens hatte die Behandlung mit Bleomycin?

SQ Mean (normalisiert)	60S	BRCA1
Kontrolle (GM)	60.000	120
Behandlung (Bleomycin)	60.000	1200

↓ Berechnung der „Transkriptionellen Änderung“

Δ Transkription	60S	BRCA1
Behandlung / Kontrolle	1	10

Im vorliegenden Beispiel würden wir die Aussage treffen können: „Die Behandlung mit Bleomycin führt zu einer 10-fachen Zunahme des *Brca1*-mRNA-Gehaltes in den behandelten Pflanzen.“

Mit Hilfe der quantitativen Real-time PCR lassen sich also sehr genaue Aussagen über die Veränderungen der Transkriptmengen in einem Organismus oder einer Zelle auf Grund einer Behandlung machen. Diese können gute Hinweise sein, um die biologische Bedeutung des untersuchten Gens näher zu charakterisieren – doch es bleiben noch Fragen offen... – *welche dies sind, verbleibt Ihnen vorzuschlagen!*

## 2. Wie ist der Versuch aufgebaut?

- 1. Tag: Behandlung von *Arabidopsis*-Pflanzen mit Bleomycin, Isolierung von RNA aus *Arabidopsis*, cDNA-Synthese
- 2. Tag:  $\beta$ -Tubulin-PCR zur Kontrolle der cDNA-Qualität, quantitative Real-time PCR
- 3. Tag: Auswertung der Real-time PCR, Besprechung der Ergebnisse

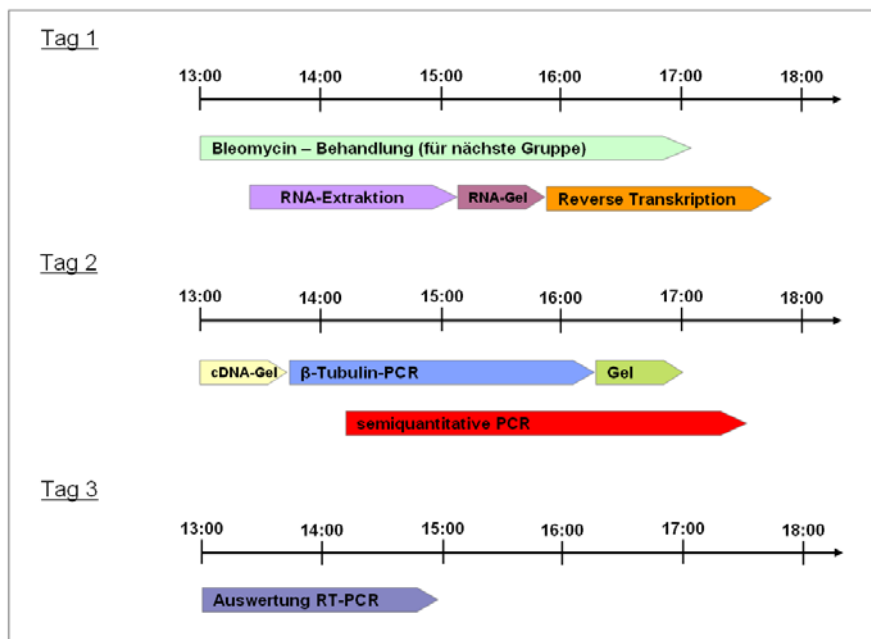


Abbildung 10: Überblick über den zeitlichen Ablauf der Versuche.

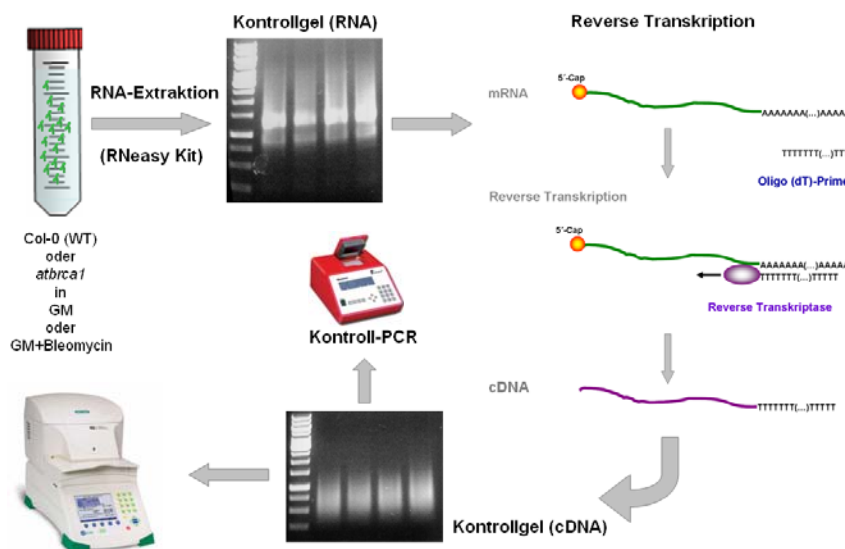


Abbildung 11: Überblick über den experimentellen Ablauf.

## Arbeitsanweisungen und Protokolle

### Behandlung von *Arabidopsis thaliana* mit Bleomycin

Referenz: Harsch *et al.* (2000)

Bleomycin ist ein sehr potentes DNA-Gift, da es bereits in sehr geringen Konzentrationen Doppelstrangbrüche verursacht. Es werden *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen (Ökotyp Columbia-0, Col-0) verwendet sowie eine *Arabidopsis*-Mutantenlinie, bei der das Gen *Brca1* durch die Insertion einer T-DNA mutiert ist (*atbrca1*, Abbildung 12). Für den Wildtyp als auch für die Mutante ist eine unbehandelte Kontrolle erforderlich, auf die später die Messungen bezogen werden können.

#### Allgemeine Hinweise

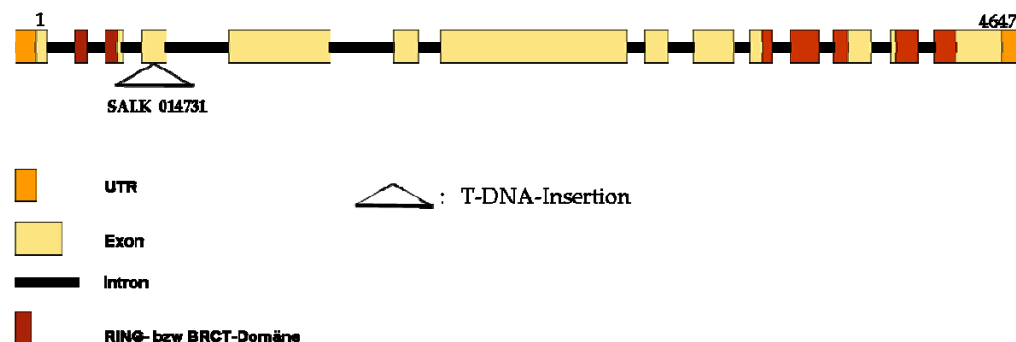
Durch die geplante Vorgehensweise wird der gesamte Versuch mit insgesamt vier Proben durchgeführt. Alle für die folgenden Abläufe zu verwendenden Gefäße sollen entsprechend beschriftet werden: „WT –“, WT +“, „Brca –“, „Brca +“, wobei + immer für die behandelten Proben steht und – für die Kontrollen. Die Reaktionsgefäße, in denen RNA bzw. cDNA der vier Ansätze bei -20 °C gelagert wird, werden zusätzlich auf der Seite beschriftet mit „Gruppe \_\_\_“ und „Datum“, damit eine eindeutige Zuordnung möglich ist.

#### Anzucht von *A. thaliana*

Zweieinhalb Wochen vor dem Experiment werden vom Betreuer Samen für die Anzucht von Wildtyp-*Arabidopsis*-Pflanzen und von *atbrca1*-Mutanten oberflächensterilisiert und auf GM-Medium (4,9 g/l Murashige & Skoog-Medium, 10 g/l Saccharose, pH 5.7, 8 g/l Plant Agar) angezogen.

At4g21070

*AtBRCA1*



**Abbildung 12: Die T-DNA-Insertions-Mutante SALK\_014731.** Bei dieser Mutante ist eine T-DNA in das vierte Exon des 4647 Nukleotide umfassenden *AtBRCA1*-Gens (Gen-Locus: At4g21070) integriert. Eine Expression eines vollständigen und intakten BRCA1-Proteins ist daher in Pflanzen, welche homozygot für diese Mutation sind, nicht möglich. UTR, Untranslated region. RING- und BRCT-Domänen des BRCA1-Proteins wurden in dieser Darstellung auf die entsprechenden Exon-Abschnitte projiziert.

### Behandlung von *A. thaliana* mit Bleomycin

- zunächst werden 4x 50 ml Falcons wie oben angegeben beschriftet
- die Falcons werden mit 25 ml flüssigem GM befüllt
- **ACHTUNG!** Informationen zu Bleomycin beachten (siehe Appendix)
- bei den mit + gekennzeichneten Gefäßen wird Bleomycin zu einer Endkonzentration von 37,5 µg / ml ( $3,75 \times 10^{-2}$  U) zugegeben (Stammlösung: 1 mg / ml) – *wie viele µl der Stammlösung müssen zugegeben werden?*
- 6 Pflänzchen vorsichtig mit der Pinzette von der Platte in das Medium überführen
- Inkubation bei RT für \_\_\_\_ Stunden (wird am Versuchstag festgelegt)
- Pflanzen vorsichtig entnehmen und auf Küchenpapier abtrocknen

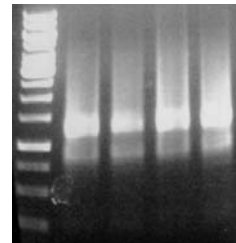
## RNA-Isolierung aus *Arabidopsis*

Referenz: *RNeasy-Plant Mini Kit* von Qiagen



- Vorbereitung des RLT-Puffers:
  - Unter dem Abzug arbeiten!
  - Zugabe von 20 µl Thioglycerol zu 2 ml RLT-Puffer, mischen
- 6 Pflanzen in einem 1,5 ml Eppi mit dem Pistill zermahlen
- Zugabe von 450 µl RLT-Puffer
- Gemisch für 2 Minuten bei 56 °C inkubieren
- Lysat in beschriftete QIAshredder-Säule (lila, mit 2 ml Sammelgefäß) überführen
- Zentrifugation bei RT: 2 Minuten bei 13.400 rpm
- währenddessen: 225 µl 100%-iges Ethanol in ein neues beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß vorlegen
- Durchfluss aus QIAshredder-Säule nach Zentrifugation vorsichtig in das Gefäß mit Ethanol (s.o.) überführen (ACHTUNG: Pellet nicht transferieren!) und mittels Pipette vorsichtig mischen
- Gemisch in eine beschriftete RNeasy-Säule (rosa, mit 2 ml Sammelgefäß) überführen
- Zentrifugation bei RT: 1 Minute bei 13.400 rpm
- Durchfluss verwerfen und Säule wieder mit Sammelgefäß verbinden
- Zugabe von 350 µl RW1-Puffer zum „waschen“ der Säule

- Zentrifugation bei RT: 1 Minute bei 13.400 rpm
- Durchfluss verwerfen und Säule wieder mit Sammelgefäß verbinden
- DNase Verdau:
  - DNase I-Mix vorbereiten:
    - 248 µl ddH<sub>2</sub>O
    - 32 µl DNase I – Puffer (Fermentas)
    - 40 µl DNase I (Fermentas)
    - mischen (Gesamtvolumen 320 µl)
  - Zugabe von 80 µl DNase I-Mix auf RNeasy-Säule
  - Inkubation bei RT für 20 Minuten
  - Währenddessen: DEPC-Wasser aus Kit auf 60 °C vorwärmen
- RNeasy-Säule erneut mit 350 µl RW1-Puffer waschen (s.o.)
- Säule in ein neues Sammelgefäß (2 ml Eppi, im Kit enthalten) überführen
- Zugabe von 500 µl RPE-Puffer zum „waschen“ der Säule
- Zentrifugation bei RT: 2 Minuten bei 13.400 rpm
- Säule in ein frisches Sammelgefäß (2 ml Eppi, im Kit enthalten) überführen und erneut eine Minute bei 13.400 rpm zentrifugieren
- Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen (im Kit enthalten)
- Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser, auf 60 °C vorgewärmt)
- Inkubation bei 60 °C für 2 Minuten
- Zentrifugation bei RT: 1 Minute bei 13.400 rpm
- Eluat erneut auf die Säule pipettieren und für 2 Minuten bei 60 °C inkubieren
- Zentrifugation bei RT: 1 Minute bei 13.400 rpm
- Kontrolle der RNA-Konzentration
  - 2 µl RNA mit 5 µl Ladepuffer mischen und damit:
  - 0,9 %-iges Agarosegel beladen
  - Gelelektrophorese: 85 Volt, ca. 30 Minuten
  - Auswertung am Geldokumentations-System
  - ➔ welche RNAs sieht man?



**Abbildung 13:**  
**Gelkontrolle RNA-**  
**Konzentration.**

## Reverse Transkription – cDNA-Synthese

**Referenz:** Hierzu wird das *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma Fermentas eingesetzt.

- für jede Probe wird ein 1,5 ml Reaktionsgefäß beschriftet
- Planung des Ansatzes (siehe Tabelle 1) – hierbei sind ggf. unterschiedliche RNA-Konzentrationen zu berücksichtigen
- alle der folgenden Schritte werden auf Eis durchgeführt!

**Tabelle 1: Vorbereitung der reversen Transkription.** Alle Angaben in  $\mu\text{l}$ .

Probe	1	2	3	4
RNA				
oligo(dT) <sub>18</sub>	1	1	1	1
DEPC-ddH <sub>2</sub> O				
$\Sigma$	12	12	12	12

- Ansätze mischen und kurz anzentrifugieren
- Proben bei 70 °C für 5 Minuten inkubieren
- Proben kurz auf Eis stellen und kurz anzentrifugieren
- weiter nach Tabelle 2 vorgehen

**Tabelle 2: Vorbereitung der reversen Transkription.** Alle Angaben in  $\mu\text{l}$ .

Probe	1	2	3	4
Ansatz aus Tab. 1	12	12	12	12
5x Puffer	4	4	4	4
RNase-Inhibitor	1	1	1	1
10 mM dNTP-Mix	2	2	2	2
$\Sigma$	19	19	19	19

- Ansätze mischen und kurz anzentrifugieren
- Proben bei 37 °C für 5 Minuten inkubieren
- Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  *RevertAid<sup>TM</sup> H Minus M-MuLV Reverser Transkriptase* (Konzentration: 200 U /  $\mu\text{l}$ )  $\Leftrightarrow$  Gesamtvolumen der Ansätze: 20  $\mu\text{l}$
- Inkubation der Proben bei 42 °C für 60 Minuten
- Reaktion abstoppen durch Inkubation bei 70 °C für 10 Minuten
- Proben auf Eis stellen
- Gelkontrolle: 2  $\mu\text{l}$  cDNA mit 5  $\mu\text{l}$  Ladepuffer mischen und damit ein 0,9 %-iges Agarose-Gel beladen (85 Volt, ca. 30 Minuten). Anschließend erfolgt die Auswertung am Geldokumentations-System.

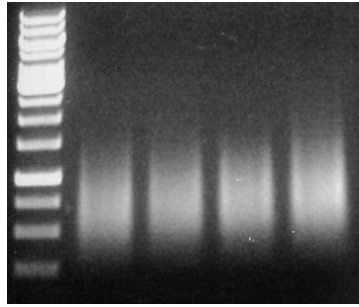


Abbildung 14: Geldokumentation der reversen Transkription

- Lagerung der cDNA bei -20 °C (die cDNAs können ohne weitere Aufreinigung für die Real-time PCR verwendet werden)

### β-Tubulin-PCR – Kontrolle der cDNA-Qualität

Sie erhalten zusätzlich zu den von Ihnen hergestellten cDNAs vom Betreuer eine gDNA-Probe von *Arabidopsis thaliana*. Sie haben für das folgende Experiment also fünf Proben. Um höchste Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, sollten Sie sich überlegen, ob der Ansatz auch mit Hilfe eines *Mastermixes* vereinfacht werden kann.

#### PCR-Ansatz

<u>Reaktion</u>		
cDNA, gDNA	2	μl
Primerpaare	1	μl
dNTPs (10mM)	1	μl
Amplification Buffer (10x)	5	μl
Biomaster-Polymerase	0,2	μl
ddH <sub>2</sub> O (auf 50 μl)	40,8	μl
Volumen	50	μl

**Primer:** β-Tubulin FW 5' - CCT GAT AAC TTC GTC TTT GG - 3'  
 β-Tubulin RV 5' - GTC AAC TCC ATC TCG TCC AT - 3'

#### PCR-Protokoll

Zyklus 1:	(1X)		
Schritt 1:		95,0°C	für 3:00 Minuten
Zyklus 2:	(30x)		
Schritt 1:		95,0°C	für 00:20 Minuten
Schritt 2:		54,0°C	für 00:20 Minuten
Schritt 3:		72,0°C	für 01:00 Minute
Zyklus 3:	(1X)		
Schritt 1:		72,0°C	für 02:00 Minuten
Zyklus 4:	(1X)		
Schritt 1		10,0°C	Reaktions-Stopp



## Quantitative Real-time PCR

### Standardkurve

Zunächst wird von allen hergestellten cDNA-Proben ein Gemisch hergestellt: hierzu 5 µl von jedem Ansatz in ein neues Gefäß pipettieren und mischen. Dieses Gemisch unbekannter DNA-Konzentration (Bezeichnung:  $10^5$ ) dient zur Herstellung einer Verdünnungsreihe über mehrere Größenordnungen (Verdünnungsfaktor 1 : 10, Bezeichnungen:  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ). Dazu wird in die Gefäße mit den Bezeichnungen  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  jeweils 90 µl steriles deionisiertes Wasser vorgelegt. Anschließend werden aus dem Gefäß mit der Bezeichnung  $10^5$  exakt 10 µl des hochkonzentrierten cDNA-Gemisches in das Gefäß mit der Bezeichnung  $10^4$  pipettiert. Um diese 1 : 10 – Verdünnung richtig zu mischen, bietet es sich an eine weitere Pipette mit der Einstellung „90 µl“ zu verwenden. Anschließend werden aus dem Gefäß mit der Bezeichnung  $10^4$  exakt 10 µl der 1 : 10 – Verdünnung in das Gefäß mit der Bezeichnung  $10^3$  pipettiert usw. Am Ende der Verdünnungsreihe ( $10^1$ ) sollte die cDNA-Konzentration nur noch ein Zehntausendstel des Ausgangsgemisches betragen. Da diese Standards später zur relativen Einordnung der anderen zu messenden Proben herangezogen werden, ist genaues Arbeiten hier von größter Bedeutung.

*Warum stellt man zunächst ein Gemisch aus allen vorbereiteten cDNA-Proben her?* Man könnte auch ausgehend von einer einzigen cDNA-Probe die Verdünnungsreihe pipettieren – ist ausgerechnet diese aber von sehr niedriger Konzentration, so werden die Proben, die um mehrere Größenordnungen niedriger konzentriert sind, möglicherweise nicht mehr während der 45 PCR-Zyklen amplifiziert, was die Genauigkeit der als Eichkurve dienenden Standardgerade beeinträchtigt.

Eine weitere Frage, die sich aufdrängt: *welches Gen, welche Matrize soll für die Standardkurve amplifiziert werden?* Es bietet sich an, das Haushaltsgen, welches auch zur Normalisierung der anderen Daten verwendet werden wird, zu amplifizieren, da es stark und ubiquitär exprimiert wird. Im vorliegenden Falle wird dies also das für die L27A-Untereinheit des 60S Ribosoms kodierende Gen sein. Die zu verwendende Primerkombination ist „60S FW“ mit „60S RV“.

### Platten Setup

Die Software des Real-time Cyclers muss verständlicherweise „wissen“, welche Probe sich an welcher Position befindet. Aus diesem Grund ist es notwendig, sich ein geeignetes Belade-Schema für die PCR zu überlegen. Dazu sollte man sich zunächst die Frage stellen: *welche Proben müssen mit welchen Primerkombinationen analysiert werden?* Wie bereits oben angesprochen ist die Real-time PCR so sensitiv gegenüber kleinsten Pipettierfehlern, dass es sinnvoll ist, jede Probe dreimal unabhängig voneinander zu testen. Konsequenterweise wird also z.B. die Standardprobe  $10^5$  in drei PCR-Gefäßen hinsichtlich der Expression der L27A-Untereinheit des 60S Ribosoms getestet werden. Für die Planung der Ansätze muss also berücksichtigt werden, dass jede Probe in Form von *Triplikaten* angesetzt wird.

Alle fünf Proben der Verdünnungsreihe ( $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ ) werden mit der Primerkombination „60S FW“ + „60S RV“ analysiert. Dies gilt ebenfalls für die vier experimentellen Proben „WT –“, „WT +“, „Brca –“, „Brca +“, da wie oben besprochen eine Normalisierung der Daten unerlässlich ist, um alle während der vorangegangenen Schritte auftretenden Variationen in den Parametern auszugleichen. Schlussendlich soll in dem vorliegende Experiment die Expression des *Brca1*-Gens von *Arabidopsis* in Bezug auf eine Behandlung der Pflanzen mit Bleomycin untersucht werden. Folglich müssen alle experimentellen Proben „WT –“, „WT +“, „Brca –“, „Brca +“ auch mit einer Primerkombination getestet werden, die ein *Brca1*-spezifisches DNA-Stück aus dem cDNA-Pool amplifiziert.

*Wie könnte nun das Setup aussehen, welches man innerhalb der Software programmiert?* Wir werden eine 96Well-Platte verwenden und diese, sobald sie beschickt ist, mit planen 8er Deckelketten verschließen. Abbildung 15 zeigt einen Vorschlag für das Platten-Setup.

**Platten-Setup**

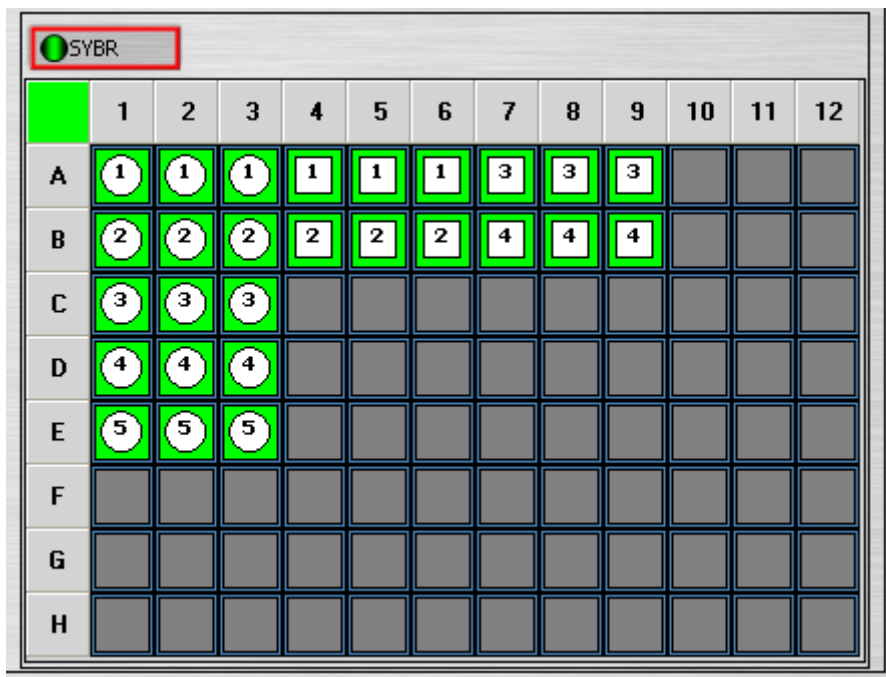
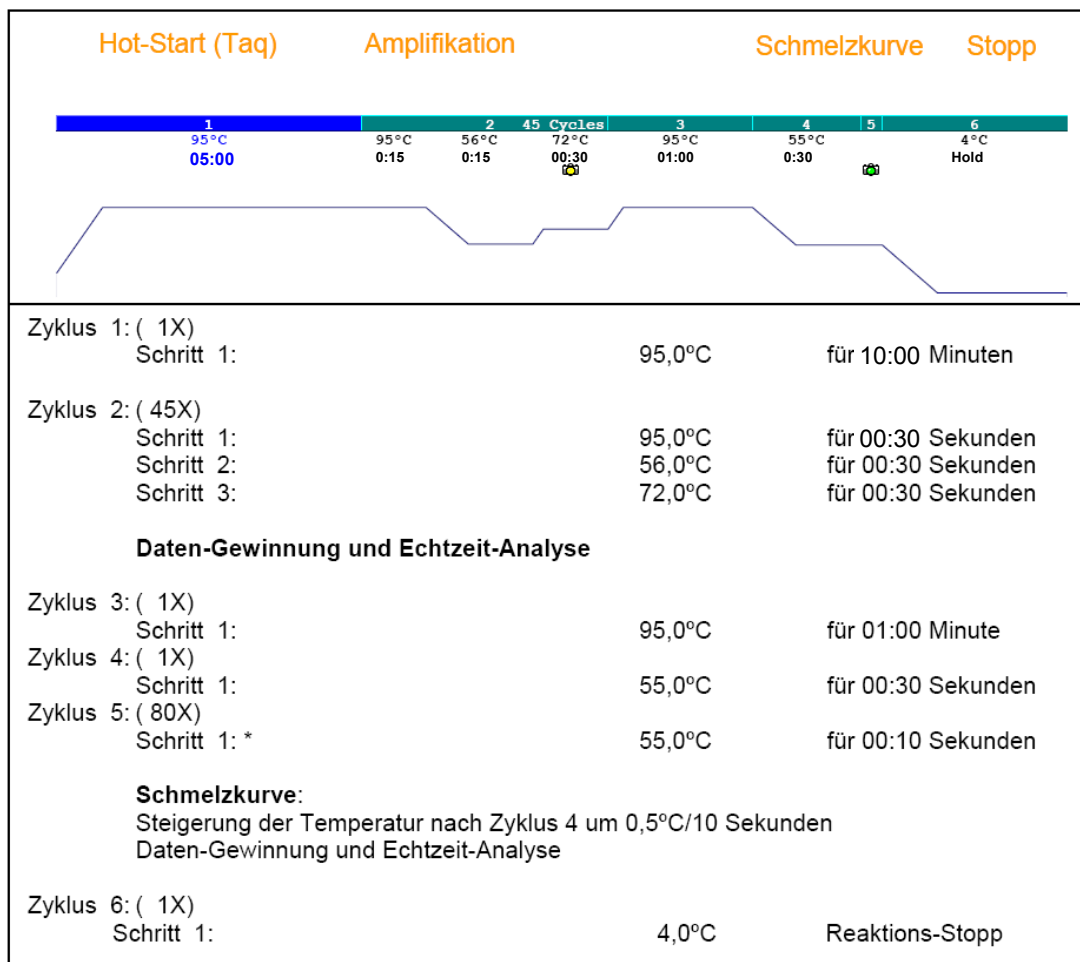


Abbildung 15: Platten-Setup.

**PCR-Protokoll**





**Abbildung 16: Der IQ5 Real-time-PCR Cycler von BioRad.** Der untere Teil des Gerätes beherbergt die PCR-Einheit mit Stellplätzen für 96 Reaktionen. Im oberen Geräteteil ist das optische System mit der Detektor-Einheit lokalisiert. Computergesteuert kann monochromatisches Licht einer Anregungswellenlänge auf die Proben eingestrahlt werden. Von den Proben emittiertes Fluoreszenzlicht wird detektiert und von der am angeschlossenen PC installierten Software verrechnet.

### Probenvorbereitung

→ wie viele Proben werden untersucht?

- Planung des Mastermixes und der Pipettierschritte
- alle Probenvorbereitungen erfolgen auf Eis
- das Gesamtvolumen der Reaktionsansätze beträgt 25  $\mu$ l
- der SYBR Green Master Mix (2x) ist lichtempfindlich und sollte daher bei allen Arbeitsschritten möglichst vor Lichtexposition bewahrt werden

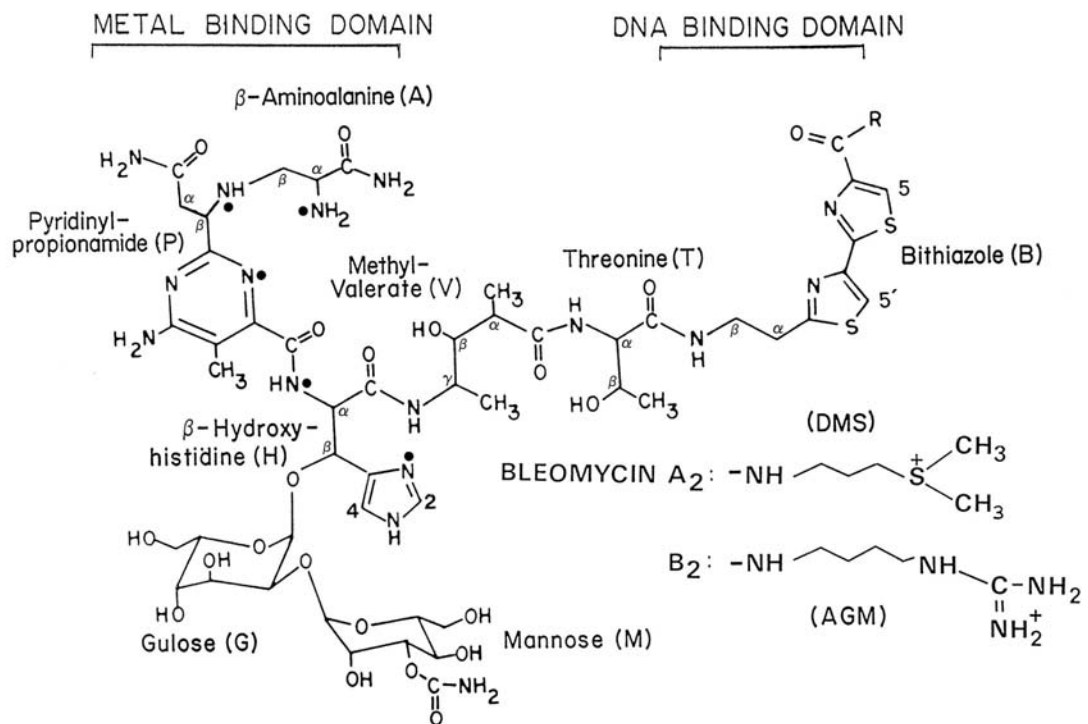
Der Reaktions-Ansatz besteht aus folgenden Komponenten:

<u>60S-Primer:</u>	60S FW	5' - CAA AAT CCA ACA AAA GGT TC - 3'
	60S RV	5' - GAA GAT TAA GGA AGC TGG - 3'
<u>BRCA1-Primer:</u>	BRCA1 FW	5' - TCT TGG AAG ACA AAG AGC - 3'
	BRCA1 RV	5' - AAG AAA CAG GCC GCC TAC - 3'

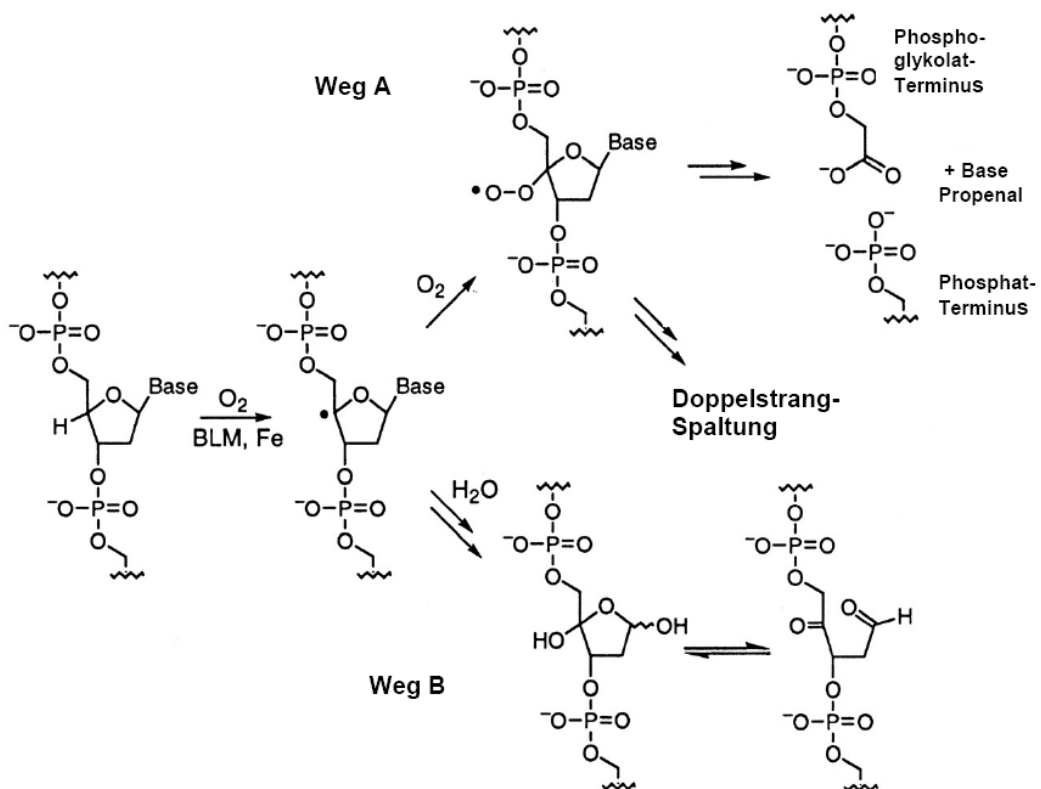
SYBR Green Mastermix (2x)	12,5 $\mu$ l
Primerpaare	1 $\mu$ l
cDNA	2 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	9,5 $\mu$ l
$\Sigma$	25 $\mu$ l

## Anhang:

**Bleomycin** ist ein Gemisch aus Glykopeptiden, welches aus Kulturen von *Streptomyces verticillus* gewonnen wird und als Hauptbestandteil von Bleomycin in der Krebstherapie Verwendung findet. Es wirkt antibiotisch und auf Grund seiner Strangbrüche verursachenden Aktivität nach spezifischer Bindung an DNA cytotoxisch. Die Bindungsart an DNA wird als Interkalation beschrieben, wobei eine Sequenzspezifität beobachtet wurde. Dabei wird die DNA durch jedes eingelagerte Bleomycin-Molekül lokal um  $12^\circ$  entwunden und streckt sich dadurch um 0.31nm. Die Einzel- und Doppelstrangbrüche verursachende Aktivität von Bleomycin erfordert die koordinierte Bindung von  $Fe^{2+}$ . Der Mechanismus der durch Bleomycin induzierten Einzelstrangbrüche gilt inzwischen als geklärt, wogegen der genaue Ablauf der zu Doppelstrangbrüchen führenden Reaktionen nur unvollständig verstanden wird. *In vitro* wird Bleomycin durch zweiwertige Eisen-Ionen in Gegenwart von molekularem Sauerstoff und einem Reduktionsmittel bzw. durch  $Fe^{3+}$  und  $H_2O_2$  zu einer sehr reaktiven Eisen-Peroxid-Verbindung aktiviert, von der sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche hervorgerufen werden. In beiden Fällen kommt es bevorzugt bei den Sequenzen  $GTX$  bzw.  $GCX$  zur Strangspaltung, wobei bei Spaltungen von Doppelsträngen stumpfe Enden entstehen, wenn X eine Pyrimidin-Base ist und Ein-Nucleotid-Überhänge, wenn X eine Purin-Base ist.

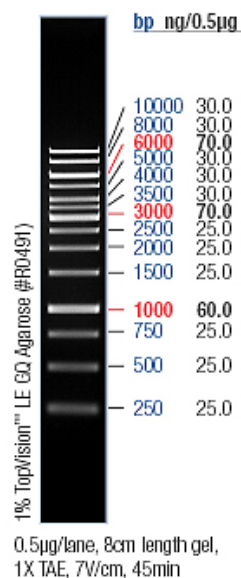


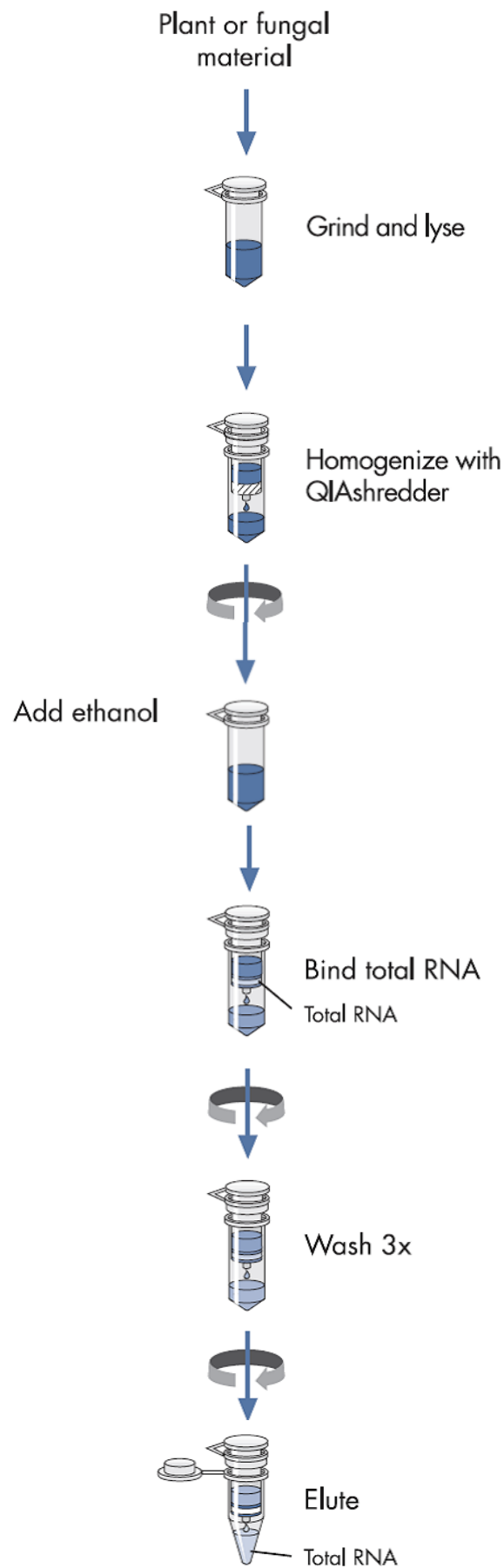
**Struktur von Bleomycin.** Bleomycin ist ein Gemisch aus etwa 60% Bleomycin  $A_2$ , 30% Bleomycin  $B_2$  und ca. 10% anderen Bleomycinen.



**Mechanismus der durch Bleomycin induzierten DNA-Spaltung.** Aktiviertes Bleomycin (BLM) abstrahiert das 4'-H-Atom vom Deoxyribose-Rest eines Pyrimidins in 3'-Position neben Deoxyguanosin. Die entstandenen 4'-Radikale reagieren abhängig vom Sauerstoffgehalt über zwei verschiedene Reaktionswege. Die sauerstoffabhängige Bildung von 3'-Phosphoglykolat und 5'-Phosphat-Enden sowie der Base Propenal führen direkt zu Strangbrüchen (Weg A). Sauerstoffunabhängig entstehen unter alkalischen Bedingungen 4'-keto-abasische Stellen und freie Nucleinsäure-Basen (Weg B). Es wird angenommen, dass Bleomycin-induzierte Doppelstrangbrüche nach vorausgegangener Einzelstrangspaltung und Reorganisation des BLM-DNA-Komplexes über den in Weg A angegebenen Mechanismus erfolgen.

**DNA-Größenmarker: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder von Fermentas**



**Plant RNeasy Mini Kit Flussdiagramm:**

## Literatur

**Harsch A, Marzilli LA, Bunt RC, Stubbe J und Vouros P** (2000). Accurate and rapid modeling of iron–bleomycin-induced DNA damage using tethered duplex oligonucleotides and electrospray ionization ion trap mass spectrometric analysis. *Nuc. Acids Res.* **28**: 1978-1985

**Pfaffl MW** (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* **1**: 92-94

### Buchtip:

Cornel Mülhardt. **Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics**. 6. Auflage (2009). Spektrum Akademischer Verlag

### Weiterführende Literatur zum Thema:

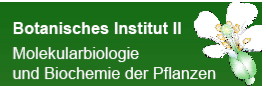
**Chen I-P, Schubert I, Haehnel U, Altschmied L and Puchta H** (2003). The transcriptional response of *Arabidopsis* to genotoxic stress – a high density colony array study (HDCA). *Plant J.* **35**: 771-786

**Lafarge S and Montane MH** (2003). Characterization of *Arabidopsis thaliana* ortholog of the human breast cancer susceptibility gene 1: *AtBRCA1*, strongly induced by gamma rays. *Nucleic Acids Res.* **31**: 1148–1155

**Puchta H** (2005). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J. Ex. Bot.*, **56**: (409) 1-14

**Reidt W, Wurz R, Wanieck K, Chu HH and Puchta H** (2006). A homologue of the breast cancer associated gene BARD1 is involved in DNA repair in plants. *EMBO J.* **25**: 4326-4337

**Exkurs: Brustkrebsgene in Arabidopsis – Eine Laune der Natur?**



**Brustkrebsgene in Arabidopsis**  
**Eine Laune der Natur?**

Rebecca Wurz, Kristina Wanieck, Wim Reidt und Holger Puchta

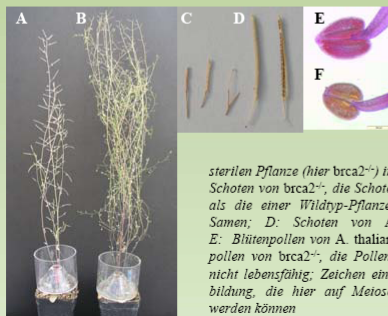
Die Bezeichnung „Brustkrebsgen“ lässt bereits darauf schließen, dass es sich bei diesen Genen um Faktoren handelt, die mit der Entstehung von Brustkrebs korreliert sind. Die genaue Bezeichnung dieser Gene lautet *Breast cancer susceptibility gene (BRCA)*, was besagt, dass die Integrität dieser Gene für die Unterdrückung der Tumorentstehung essentiell ist. In der Zelle sind zwei *BRCA*-Gene vorhanden, die der Reihenfolge ihrer Entdeckung nach als *BRCA1* und *BRCA2* bezeichnet wurden. Aufgrund ihrer Tumorsuppressor-Funktion mag es verwunderlich sein, dass diese Gene auch in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gefunden wurden.

**Wozu braucht eine Pflanze solche Gene?**

BRCA-Proteine spielen eine wichtige Rolle innerhalb der DNA-Schadensreparatur, wobei sie auf unterschiedlichen Ebenen der Reparaturarbeit aktiv sind. Unter den Begriff DNA-Schaden können sehr unterschiedliche Veränderungen innerhalb der DNA-Doppelhelix fallen: Die Verknüpfung von Basen zu sog. Pyrimidin-Dimeren, die Deletion einzelner Basen oder Nukleotide, Quervernetzungen der DNA-Stränge sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche. *BRCA1* und *BRCA2* sind vor allem an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) beteiligt, wobei auch Quervernetzungen der DNA während Replikationsprozessen zu DSB führen. *BRCA1* ist dabei ein wichtiger Faktor innerhalb der Erkennung eines DNA-Schadens und ist an der Rekrutierung von Reparaturproteinen an die geschädigte Stelle beteiligt, während *BRCA2* direkt an der Reparatur des DSB mitarbeitet. Zudem erfüllen die Proteine eine Reihe weiterer zellulärer Funktionen wie z.B. die Kontrolle des Zellzyklus oder die Prozessierung meiotischer Vorgänge (z.B. Rekombination, Cross-over).

**Weshalb ist gerade Arabidopsis ein hilfreicher Modellorganismus für die Untersuchung dieser Gene?**

Die Deletion von DNA-Reparaturgenen führt bei Säugetieren häufig zu embryonaler Letalität, was die Erforschung ihrer Funktion erschwert und auf Zellkulturebene reduziert. Dies bedeutet, dass einige Funktionen der Proteine, wie z.B. die Beteiligung an meiotischen Prozessen, nicht untersucht werden können. Interessanterweise sind die entsprechenden *Arabidopsis*-Mutanten während ihres somatischen Wachstums vollkommen vital. Dadurch ist es möglich DNA-Reparaturproteine wie *BRCA1* und *BRCA2* an vollständigen, lebensfähigen Organismen zu studieren, was den Wissenschaftlern ein deutlich breiteres Methodenspektrum eröffnet. Einige dieser Mutanten, wie z.B. die *brca2<sup>-/-</sup>*-Mutante, sind steril (Abb. 1 B, C, F), ein Phänotyp, der dem entsprechenden Protein neben der Funktion als DNA-Reparaturfaktor, eine wesentliche Rolle innerhalb der Meiose bzw. Gametogenese zuweist.



**Abb 1: Phänotypische Merkmale**  
A: Habitus von Arabidopsis thaliana, Wildtyp im Stadium der Fruchtreife; B: Habitus einer sterilen Pflanze (hier *brca2<sup>-/-</sup>*) im gleichen Stadium; C: Schoten von *brca2<sup>-/-</sup>*; die Schoten sind deutlich kleiner als die einer Wildtyp-Pflanze und enthalten keine Samen; D: Schoten von *A. thaliana*, Wildtyp; E: Blütenpollen von *A. thaliana*, Wildtyp; F: Blütenpollen von *brca2<sup>-/-</sup>*; die Pollen sind degeneriert und nicht lebensfähig; Zeichen einer gestörten Gametenbildung, die hier auf Meiosedefekte zurückgeführt werden können

**Untersuchung von Brustkrebsgenen in Arabidopsis**

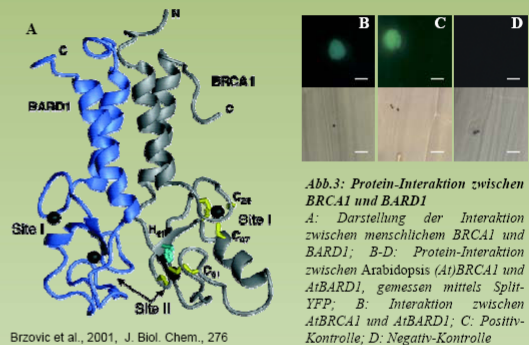
Zur Untersuchung von Brustkrebsgenen und anderen an der DNA-Reparatur beteiligten Faktoren stehen in der pflanzlichen Molekularbiologie einige interessante und aufschlussreiche Methoden zur Verfügung. Die Beobachtung rein phänotypischer Merkmale, wie z.B. die Sterilität von Mutanten (Abb. 1) oder die Sensitivität gegenüber bestimmten Mutagenen (Abb. 2), steht nur am Anfang einer Vielfalt von Experimenten. Dazu gehören unter anderem die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und die Bestimmung des Expressionsverhaltens der zu untersuchenden Gene bei genotoxischem Stress. Die Protein-Protein-Interaktion ist im Folgenden etwas genauer dargestellt.



**Abb.2: Sensitivitätstest.**  
1 Arabidopsis thaliana, Wildtyp; 2 und 3 insensitive Mutanten; 4 und 5 sensitive Mutanten

**Protein-Protein-Wechselwirkungen**

Die meisten Reparaturproteine erfüllen ihre Aufgabe in enger Assoziation mit anderen Proteinen. So ist z.B. *BARD1 (BRCA1 associated ring domain 1)* ein wichtiger Interaktionspartner von *BRCA1*, der für die volle Entfaltung der *BRCA1*-Funktion notwendig ist. Gemessen werden können solche Interaktionen z.B., indem die Proteine mit Teilstücken eines fluoreszierenden Proteins fusioniert werden und diese Fusionsproteine in pflanzlichen Zellen zur Expression gebracht werden (Split-YFP [yellow fluorescent protein], Abb. 3). Interagieren die beiden untersuchten Proteine, werden die Fragmente des Fluoreszenzproteins in räumliche Nähe gebracht, wodurch die Fluoreszenz wieder hergestellt wird.



**Abb.3: Protein-Interaktion zwischen BRCA1 und BARD1**  
A: Darstellung der Interaktion zwischen menschlichem BRCA1 und BARD1; B-D: Protein-Interaktion zwischen Arabidopsis (*At*)BRCA1 und *At*BARD1, gemessen mittels Split-YFP; B: Interaktion mittels Split-YFP; C: Postitiv-Kontrolle; D: Negativ-Kontrolle

**Wozu das alles?**

Untersuchungen von DNA-Reparaturgenen, wie z.B. den hier beschriebenen Brustkrebsgenen, an menschlichen Zellen, Invertebraten und Pflanzen haben gezeigt, dass die entsprechenden Proteine eine ubiquitäre Funktion in allen Lebewesen erfüllen. Erkenntnisse, die aus der Erforschung pflanzlicher Systeme gewonnen werden, können also auch auf menschliche Zellen übertragen werden. Die Forschung an Pflanzen als Modellsystem kann damit einen großen Beitrag zur Aufklärung der Entstehung, Diagnostik und in Zukunft vielleicht auch zur Bekämpfung verschiedener Krebsarten leisten.