

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dipl. Ing. Dr. Volkmar Jansson

**Quantitativer und qualitativer Vergleich
verschiedener RNA-Extraktionsmethoden an
osteogen induzierbaren Geweben der Ratte**



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Pascal Notkamp

aus

Osnabrück

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Müller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Eric Hesse
PD Dr. Sven Lammich

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Ph.D. Roland Klar

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Pathophysiologie des Knochens	1
1.1.1	Bestandteile des Knochens.....	2
1.1.2	Remodeling.....	3
1.1.3	Histologischer Aufbau	4
1.1.4	Frakturheilung.....	7
1.2	Transplantate	9
1.3	Bone Tissue Engineering	10
1.4	RNA.....	13
1.4.1	Aufbau der RNA.....	13
1.4.2	RNA-Typen	14
1.5	RNA-Isolierung	15
1.6	Zielsetzung	18
1.7	Fragestellung.....	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Probengewinnung.....	20
2.1.1	Isolierung des Gewebes	20
2.1.2	Probeneinteilung und Wiegen.....	21
2.2	Homogenisierung	21
2.2.1	Trizol-Methode.....	22
2.2.2	Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit.....	23
2.2.3	innuPREP RNA Mini Kit	23
2.2.4	RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit	24
2.2.5	RNeasy® Lipid Tissue kit.....	24
2.3	RNA-Extraktion.....	24

2.3.1	Trizol-Methode	25
2.3.2	Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit.....	28
2.3.3	innuPREP RNA Mini Kit	31
2.3.4	RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit	34
2.3.5	RNeasy® Lipid Tissue Kit	37
2.4	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit.....	39
2.4.1	Durchführung der Messung.....	40
2.5	Elektrophoretische Bestimmung der RNA-Integrität	40
2.5.1	Lab-On-A-Chip-Technologie	40
2.5.2	RNA Integrity Number	41
2.5.3	Durchführung der Messung.....	43
2.6	Statistische Auswertung	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Gewicht	44
3.1.1	Muskelgewebe	44
3.1.2	Fettgewebe	45
3.2	Photometrische Bestimmung der RNA-Quantität und Reinheit	45
3.2.1	Muskelgewebe	45
3.2.2	Fettgewebe	47
3.3	Elektrophoretische Bestimmung der RNA-Integrität	49
3.3.1	Muskelgewebe	49
3.3.2	Fettgewebe	50
3.4	Zeit.....	51
4	Diskussion.....	52
4.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	52
4.2	Diskussion der Methoden	52
4.2.1	Trizol-Methode	52

4.2.2	Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit.....	54
4.2.3	innuPREP RNA Mini Kit.....	55
4.2.4	RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit.....	57
4.2.5	RNeasy® Lipid Tissue kit.....	58
4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	59
4.3.1	Muskelgewebe.....	59
4.3.2	Fettgewebe.....	63
4.4	Limitationen der Studie.....	66
4.5	Ausblick.....	66
5	Zusammenfassung.....	68
6	Anhang.....	69
6.1	Gelartige Bilder und Elektropherogramme (Muskelgewebe).....	69
6.2	Gelartige Bilder und Elektropherogramme (Fettgewebe).....	79
7	Literaturverzeichnis.....	89
8	Abbildungsverzeichnis.....	99
9	Tabellenverzeichnis.....	102
10	Abkürzungsverzeichnis.....	103
11	Danksagung.....	104
12	Eidesstattliche Erklärung.....	105

1 Einleitung

Wir leben in Deutschland laut dem Statistischen Bundesamt (2019) in einer alternden Gesellschaft. Diese Tatsache wird sich unmittelbar auf die Prävalenz altersbedingter Erkrankungen auswirken. In dieser Kategorie stehen unter anderem Knochenleiden an erster Stelle (Naegele, 2013). Diese können wiederum durch verschiedene Umstände oder Krankheiten wie zum Beispiel Traumata, Infektionen oder Knochenbildungsstörungen bedingt sein (Dimitriou, Jones, McGonagle & Giannoudis, 2011; Miron & Zhang, 2012). Bei immer älter werdenden Patienten spielt vor allem die Osteoporose eine große Rolle (Pisani et al., 2016). Diese Knochenleiden werden somit in Zukunft einen erhöhten Behandlungsbedarf erfordern. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Heilungsprozesse des Knochens zu verstehen und sie bestenfalls zu unterstützen und zu beschleunigen oder gar die Neubildung von Knochen initiieren zu können.

1.1 Pathophysiologie des Knochens

Der menschliche Körper besitzt Knochen verschiedenster Formen und Eigenschaften. Sie erfüllen stützende und schützende Funktionen und sind zudem für die Regulierung des Elektrolythaushalts, vor allem des Kalzium-Phosphat-Haushalts, von großer Bedeutung (Drenckhahn, 2008; Harder & Kuster, 2011). Außerdem befindet sich in den Knochen das rote Knochenmark, in welchem die Hämatopoese stattfindet (Harder & Kuster, 2011).

Es gibt verschiedene Knochentypen: lange und kurze Röhrenknochen, Plattenknochen, lufthaltige Knochen, sowie irreguläre Knochen. Alle Knochentypen zeigen zwar dieselbe Grundstruktur, allerdings ist sie je nach Knochentyp verschieden ausgeprägt. Im Inneren des Knochens befindet sich die sogenannte Substantia spongiosa (auch Spongiosa genannt) (Drenckhahn, 2008; Harder & Kuster, 2011). Sie besteht aus Knochen trabekeln in trajektorieller Ausrichtung, also in Richtung der Zug- und Druckspannungen, wodurch mit wenig Material eine gute Stabilität gewährleistet werden kann (Drenckhahn, 2008). Die Spongiosa wird von der Substantia compacta (auch Kortikalis genannt) umgeben, welche dem Knochen seine hauptsächliche Stabilität an Stellen der Biegespannung verleiht (siehe Abbildung 1) (Drenckhahn, 2008; Harder & Kuster, 2011). Röhrenknochen zum

Beispiel sind einer großen Traglast ausgesetzt, weshalb in ihnen die Kortikalis besonders stark ausgebildet ist. (Brydone, Meek & MacLaine, 2010).

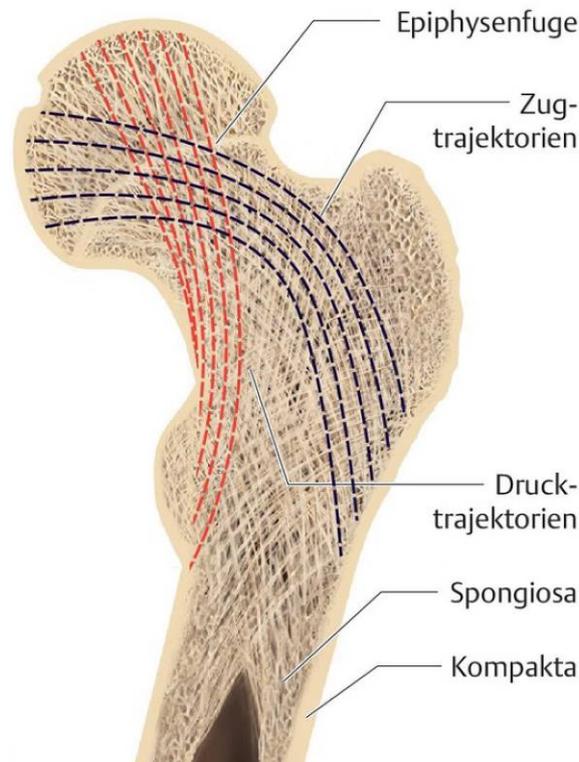


Abbildung 1 Schematischer Aufbau des Knochens und seiner Abschnitte am Beispiel des menschlichen Femurs (proximaler Teil). Die trajektorielle Verlaufsrichtung der Knochentrabekel ist farblich markiert. Quelle: adaptiert von Niethard, Pfeil & Biberthaler (2014).

1.1.1 Bestandteile des Knochens

Knochengewebe besteht aus extrazellulärer Matrix (EZM) in der sich Zelltypen zwei verschiedener Zellreihen befinden. Einerseits liegen die Zellen der mesenchymalen Zellreihe vor: Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteozyten. Dabei differenzieren sich die mesenchymalen Stammzellen zunächst zu Osteoprogenitorzellen und im weiteren Verlauf zu Osteoblasten. Schließlich erreicht zumindest ein Teil dieser Osteoblasten das Endstadium des Osteozyten. Es handelt sich hierbei um Zellen, die die Bildung der EZM aufrechterhalten und deren Auf-, Ab- und Umbau regulieren. Im Gegensatz dazu differenzieren sich die Osteoklasten, welche der Resorption der mineralisierten EZM dienen, aus hämatopoetischen Stammzellen (Welsch & Kummer, 2018; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

Die Knochenmatrix, die den Hauptbestandteil des Knochens bildet, besteht aus 45% anorganischem Material, 30% organischem Material und 25% Wasser. Für die

Funktion des Knochens sind dabei vor allem das Kollagen vom Typ I und das Hydroxyapatit von wichtiger Bedeutung. Die Kollagenfibrillen bilden eine Art Leitstruktur und sind in den jeweiligen Lamellen des ausgereiften Lamellenknochens parallel zueinander angeordnet. Es ist jedoch zu beachten, dass sich die Verlaufsrichtung der Kollagenfibrillen benachbarter Lamellen abwechselt (siehe Abbildung 2). An die Fibrillen wiederum lagern sich die Apatitkristalle an. Es entsteht eine Struktur, die durch die Kollagenfibrillen zugfest und durch die Apatitkristalle druckfest ist (Welsch & Kummer, 2018; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Nichtsdestotrotz handelt es sich nicht um ein starres Gebilde, da der Knochen auch nennenswerter Torsions- und Biegebeanspruchung standhält (Welsch & Kummer, 2018).



Abbildung 2 Verlauf der Kollagenfibrillen im Lamellenknochen. Die Lamellen sind zirkulär um das zentrale Haversgefäß (G) angeordnet. Die Kollagenfibrillen jeder Lamelle verlaufen parallel zueinander. Quelle: adaptiert von Lüllmann-Rauch & Asan (2019).

1.1.2 Remodeling

Damit der Knochen sich an verschiedene Belastungen anpassen kann, findet ein ständiger Umbau der EZM statt: das sogenannte Remodeling. Neben der Anpassung an sich ändernde mechanische Belastungen dient es ebenfalls der Regulierung des Mineralhaushalts. Nicht nur circa 99% des vom Körper gespeicherten Kalziums liegen im Knochen gebunden vor, sondern auch andere Ionen wie Magnesium, Phosphat und Natrium. Je nach Bedarf können diese Ionen an den Körperkreislauf abgegeben oder vermehrt in den Knochen eingebaut werden. Im Rahmen der Frakturheilung spielt das Remodeling ebenfalls eine essenzielle Rolle, da hierdurch

der initiale Geflechtknochen wieder durch Lamellenknochen ersetzt wird (Welsch & Kummer, 2018; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

Die Regulierung des Remodelings ist sehr komplex und findet zum einen lokal durch die Ausschüttung verschiedener Botenstoffe, zum anderen aber auch systemisch durch verschiedene Hormone statt. Eine zentrale Rolle kommt hierbei den Osteozyten zu. Sie besitzen mechanosensitive Membrankanäle, sogenannte Piezo-Kanäle, welche durch mechanische Reize aktiviert oder gehemmt werden. Ebenfalls finden sich auf den Osteozyten Rezeptoren für Hormone wie zum Beispiel das Parathormon. Abhängig von den Reizen und Botenstoffen, die auf die Zellen des Knochens einwirken, wird der Auf- oder Abbau des Knochens gefördert (Welsch & Kummer, 2018).

Die folgenden ausgewählten Faktoren haben einen substanzbildenden Effekt auf den Knochen: Kalzitriol (die aktive Form des Vitamin D3), Osteoprotegerin, Kalzitonin und die Wachstumsfaktoren BMP (bone morphogenetic proteins), PDGF (platelet-derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor) (Mundy, 1996; Shrivats, McDermott & Hollinger, 2014; Welsch & Kummer, 2018; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

Der Knochenabbau wird hingegen unter anderem durch folgende Faktoren gefördert: der sich auf den Osteozyten befindende RANKL (RANK-Ligand), Sclerostin, Parathormon und das Zytokin M-CSF (macrophage colony stimulating factor) (Welsch & Kummer, 2018; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

1.1.3 Histologischer Aufbau

1.1.3.1 Geflechtknochen

Bei der Osteogenese, aber auch bei der Frakturheilung entsteht zunächst Geflechtknochen. Er zeichnet sich dadurch aus, dass er aus ungeordneten Knochenbälkchen besteht (siehe Abbildung 3). Der Geflechtknochen unterliegt sehr starken Remodelingprozessen, sodass sich neben den Osteozyten viele aktive, knochenbildende Osteoblasten, aber auch viele knochenabbauende Osteoklasten vorfinden. Da der Geflechtknochen dem Lamellenknochen biomechanisch unterlegen ist, wird er mit der Zeit zu diesem umorganisiert (Welsch & Kummer, 2018; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

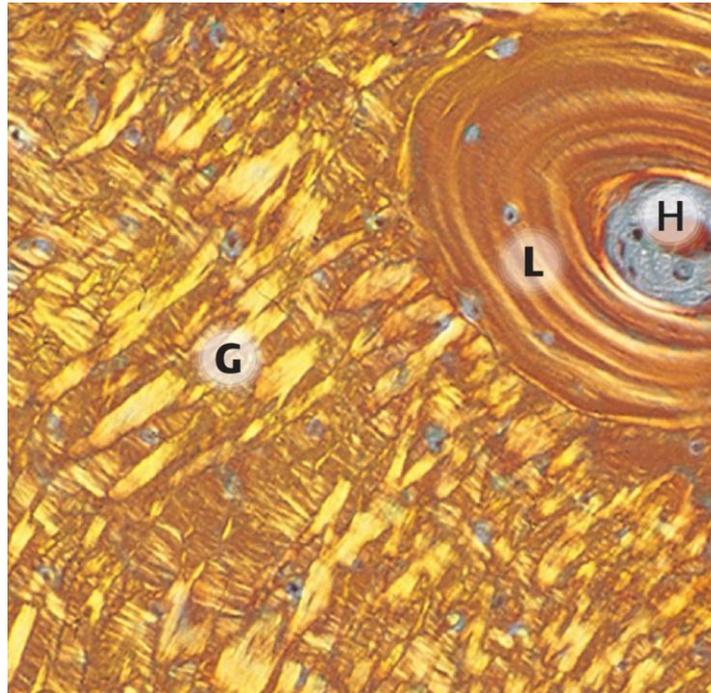


Abbildung 3 Histologische Struktur des Geflecht- (G) und Lamellenknochens (L) im Vergleich (polarisationsoptische Darstellung, Kompakta des Unterkiefers, Schwein). H = Haverskanal, als Zentrum eines Osteons und Merkmal des Lamellenknochens. Quelle: adaptiert von Lüllmann-Rauch & Asan (2019).

1.1.3.2 Lamellenknochen

Als Orientierungsstruktur des histologischen Aufbaus des Lamellenknochens dient das Gefäßsystem. Die arterielle Versorgung des Knochens erfolgt durch Aa. nutriciae. Sie führen das Blut auf direktem Weg und ohne Abzweigungen durch die Kortikalis bis in den Knochenmarksraum, um dort das Knochenmark und die Spongiosa zu versorgen. Von dort aus zweigen kleine Gefäße, die sogenannten Havers-Gefäße, ab und dringen wieder in die Kortikalis ein. Dort bilden sie das Zentrum kleiner Untereinheiten, den Osteonen (siehe Abbildung 4). Ein Osteon besteht von zentral nach peripher aus:

1. 1-3 Havers-Gefäßen
2. Endost, bestehend aus nichtmineralisiertem, lockerem Bindegewebe, Saumzellen (inaktive Osteoblasten) und inaktiven Osteoklastenvorstufen
3. die Gefäße zirkulär umgebende Speziallamellen, bestehend aus Osteozyten eingebettet in EZM (ein Osteon besitzt in der Regel circa 4 – 20 Schichten dieser Speziallamellen)

(Welsch & Kummer, 2018; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019)

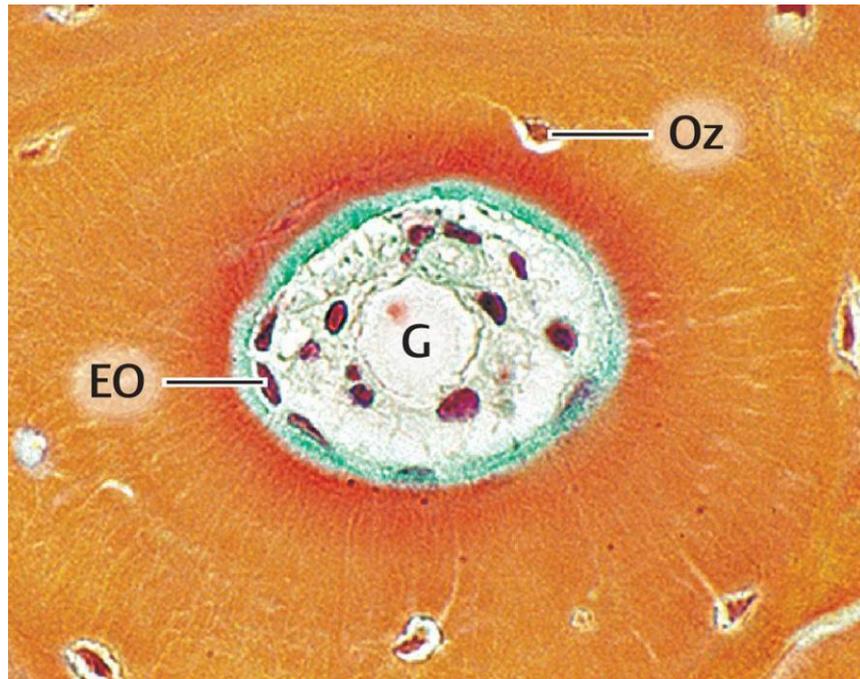


Abbildung 4 Osteon (Goldner-Färbung). Zentral liegt der Haverskanal, bestehend aus einem Havers-Gefäß (G) und dem Endost (EO). Die Osteozyten (Oz) synthetisieren die Speziallamellen (hier Orange) zirkulär um den Havers-Kanal. Quelle: adaptiert von Lüllmann-Rauch & Asan (2019).

Sowohl in den einzelnen Osteonen, als auch zwischen benachbarten Osteonen stehen die Osteozyten über ihre Ausläufer in den sogenannten Canaliculi in Kontakt. Die Havers-Gefäße können ebenfalls Abzweigungen bilden und so mit anderen Havers-Gefäßen in Verbindung stehen. Diese Abzweigungen verlaufen in den Volkmann-Kanälen (Welsch & Kummer, 2018; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

Neben den Speziallamellen sind noch zwei weitere Typen von Lamellen zu erwähnen:

1. die Schaltlamellen, die durch das ständige Remodeling und den partiellen Abbau von Osteonen entstehen; sie befinden sich zwischen den intakten Osteonen
2. die Generallamellen, die den Knochen sowohl von der Innen- als auch von der Außenseite komplett umgeben

Die Generallamellen orientieren sich nicht an einem Gefäß, sondern an der Knochenform. An ihnen schließt sich nach außen das Periost an. Nach innen wird der Knochen zum Markraum durch das Endost begrenzt (Welsch & Kummer, 2018; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

Im Gegensatz zur Kortikalis befinden sich in der Spongiosa keine kompletten Osteone, wie oben beschrieben. Hier liegen Lamellen vor, die das Trabekelnetzwerk bilden. Diese Trabekel werden direkt durch Diffusion aus dem Markraum ernährt (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

1.1.4 Frakturheilung

Knochengewebe befindet sich, wie oben beschrieben, bedingt durch mechanische oder metabolische Faktoren auch ohne Trauma in einem ständigen Umbau (Harder & Kuster, 2011; Niethard et al., 2014). Liegt jedoch eine Fraktur vor, kann bei den Umbauprozessen im Rahmen der Heilung zwischen der indirekten und der direkten Frakturheilung unterschieden werden (Seebach & Marzi, 2011).

1.1.4.1 Indirekte Frakturheilung

Die indirekte Frakturheilung kann in verschiedene Phasen aufgeteilt werden, die je nach Autor leicht unterschiedlich definiert sind, jedoch alle dieselben Vorgänge beinhalten (siehe Abbildung 5) (Schindeler, McDonald, Bokko & Little, 2008; Harder & Kuster, 2011; Niethard et al., 2014). Zu beachten gilt jedoch, dass die Frakturheilung kein linearer Prozess ist und durchaus alle Phasen gleichzeitig vorliegen können (Schindeler et al., 2008).

Am Anfang der indirekten Knochenheilung steht die Hämatombildung durch Gefäßläsionen im Rahmen der Fraktur des Knochens. Das Gewebe wird durch Thrombozyten und Entzündungszellen (vor allem Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) infiltriert. Diese Infiltration führt zur Ausbildung eines initialen Thrombus zur Blutstillung, der im Verlauf durch Granulationsgewebe ersetzt wird (Schindeler et al., 2008; Harder & Kuster, 2011). Um diese Vorgänge zu koordinieren wird eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren ausgeschüttet. Hierdurch werden sowohl weitere Entzündungszellen, als auch mesenchymale Stammzellen rekrutiert (Schindeler et al., 2008; Gerstenfeld, Cullinane, Barnes, Graves & Einhorn, 2003; Shapiro, 2008).

Nach wenigen Wochen schließt sich die Bildung des Knorpelkallus an (Harder & Kuster, 2011; Niethard et al., 2014). Er wird in dieser Phase durch Chondrozyten und Fibroblasten, die sich aus eingewanderten Stammzellen differenziert haben, produziert und dient primär der Stabilisierung der Fraktur (Schindeler et al., 2008;

Harder & Kuster, 2011). Im späteren Verlauf dient er bei der Ossifikation als Leitstruktur (Schindeler et al., 2008). Am Ende dieser Phase unterliegen die Chondrozyten einer Hypertrophie und einer sich anschließenden Apoptose (Schindeler et al., 2008; Harder & Kuster, 2011).

Die nächste Phase dauert mehrere Monate an und dient der Ossifikation des gebildeten Knorpels (Schindeler et al., 2008; Harder & Kuster, 2011). Wie bereits erwähnt, werden durch verschiedene Wachstumsfaktoren mesenchymale Stammzellen rekrutiert und zur Differenzierung zu osteogenen Zellen angeregt (Schindeler et al., 2008). Beispielhaft für die Wachstumsfaktoren sind die sogenannten „bone morphogenetic proteins“ (BMPs) zu nennen (Chen, Zhao & Mundy, 2004). Ihre Aktivität wurde 1965 zum ersten Mal von Urist beschrieben, auch wenn die genauen Proteine damals noch nicht bekannt waren. Die Stammzellen liegen teilweise bereits im knocheneigenen Endost und Periost vor (Malizos & Papatheodorou, 2005; Welsch & Kummer, 2018). Es finden sich aber auch osteogen induzierbare Stammzellen in anderen Geweben, wie zum Beispiel dem Fettgewebe (Zuk et al., 2001; De Ugarte et al., 2003; Fraser, Wulur, Alfonso & Hedrick, 2006). Auch Stammzellen aus dem Muskelgewebe sind in der Lage sich zu osteogenen Zellen zu differenzieren (Katagiri et al., 1994; Lee et al., 2002; Wosczyzna, Biswas, Cogswell & Goldhamer, 2012). Parallel zu diesen Vorgängen wird der Knorpelkallus abgebaut (Schindeler et al., 2008). Bei dem in dieser Phase entstehenden Knochen handelt es sich um Geflechtknochen, dessen Kollagenfibrillen und Apatitkristalle willkürlich und nicht den einwirkenden Kräften nach ausgerichtet sind (Schindeler et al., 2008; Welsch & Kummer, 2018; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

Aus diesem Grund schließt sich die letzte Phase der Knochenheilung an. Sie dauert mehrere Jahre an und dient dem Remodeling des Knochens. Hierbei wird der Geflechtknochen in Lamellenknochen umgebaut, sodass die ursprüngliche Ausrichtung der Knochen trabekel und -lamellen wiederhergestellt wird. Dieses Remodeling passt den Knochen wieder an die jeweiligen Krafteinwirkungen an (Schindeler et al., 2008; Harder & Kuster, 2011).

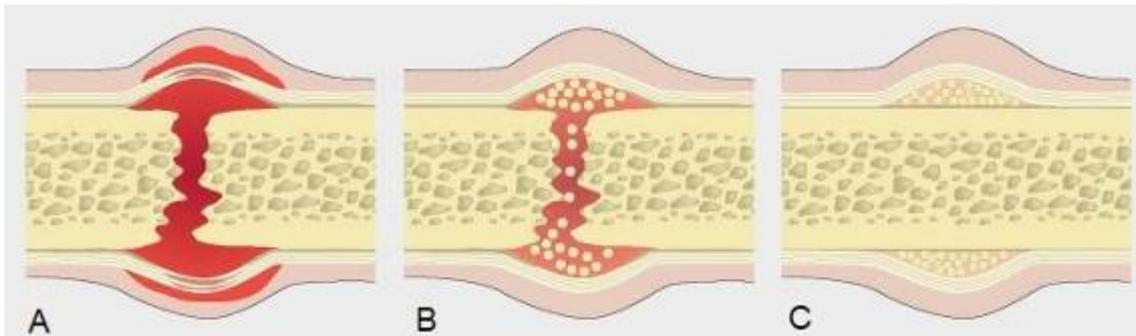


Abbildung 5 Schematische Darstellung der indirekten Frakturheilung. A) Bildung des Hämatoms, Einwanderung von Thrombozyten und Entzündungszellen. B) Bildung des Knorpelkallus und dessen Ossifikation im weiteren Verlauf. C) Remodeling. Quelle: adaptiert von Seebach & Marzi (2011).

1.1.4.2 Direkte Frakturheilung

Im Gegensatz zur indirekten Frakturheilung kann nach iatrogenen Behandlung, wie zum Beispiel einer Osteosynthese, die direkte Frakturheilung stattfinden. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass die Frakturrenden reponiert, komprimiert und dauerhaft ruhiggestellt werden. Im Idealfall wird durch diese Maßnahmen direkt der Knochenumbau aktiviert und kein Kallus gebildet. Dies bedeutet, dass neue Osteone ausgebildet werden, wodurch die Bruchenden wieder miteinander verbunden werden (Seebach & Marzi, 2011; Harder & Kuster, 2011).

1.2 Transplantate

Da die physiologische Knochenheilung allerdings nicht immer ausreichend ist, wie dies zum Beispiel bei sehr komplizierten Brüchen oder großen Tumorresektionen der Fall ist (Dimitriou et al., 2011; Seebach & Marzi, 2011), wurden alternative Therapien entwickelt. Eine Therapiemöglichkeit ist die Knochentransplantation. Es gibt verschiedene Arten von Transplantaten: autologe, allogene und xenogene (Bates & Ramachandran, 2006; Seebach & Marzi, 2011), wobei xenogene Transplantate im klinischen Alltag kaum Verwendung finden (Campana et al., 2014).

Den Goldstandard stellt heutzutage die autologe Knochentransplantation dar, bei der patienteneigenes Knochengewebe entnommen und an anderer Stelle wieder eingesetzt wird (Heiple, Chase & Herndon, 1963; Dimitriou et al., 2011; Miron & Zhang, 2012). Allerdings setzt solch eine autologe Knochentransplantation häufig mehrere Operationen voraus (Miron & Zhang, 2012). Einen weiteren Nachteil stellt die begrenzte Knochenmenge für eine autologe Transplantation dar, da sie nicht bei

jedem Eingriff die Knochenschäden ausreichend füllen und zur Regeneration anregen kann (Brydone et al., 2010; García-Gareta, Coathup & Blunn, 2015).

Die Menge des Materials kann durch allogene Knochentransplantationen gesteigert werden. Bei diesem Verfahren werden die Gewebespenden eines Spenders ausgiebig auf eventuell vorliegende Krankheiten geprüft und anschließend aufgearbeitet, um sie zu einem späteren Zeitpunkt bei einem Patienten einsetzen zu können (Bettin, Dethloff, Steinbeck & Polster, 1994; Wagner, Roth & Venbrocks, 2010). In Deutschland stellen die entnommenen Hüftköpfe aus der endoprothetischen Chirurgie einen Großteil dieser Gewebespenden dar (Wagner et al., 2010). Doch obwohl jährlich viel Knochenmaterial für allogene Knochentransplantationen gewonnen werden kann, reicht dies immer noch nicht aus, um den Bedarf zu decken (Pruß & Katthagen, 2008). Es besteht demnach die Notwendigkeit weitere Therapieansätze zur Knochenregeneration zu finden und zu entwickeln.

1.3 Bone Tissue Engineering

Ein Feld von großem Interesse ist das sogenannte Bone Tissue Engineering. Ziel des Bone Tissue Engineerings ist es, Therapien zu entwickeln mit der die Osteogenese und Frakturheilung gezielt und auf die jeweilige Fraktur angepasst gefördert werden können (Stevens, 2008; Shrivats et al., 2014). Solch eine Therapie erfüllt idealerweise verschiedene Kriterien. Zum einen sollte sie osteoinduktiv sein, d.h. die Osteogenese initiieren können. Dies geschieht durch die Rekrutierung von Osteoprogenitorzellen und deren Differenzierung zu Osteoblasten, die wiederum EZM synthetisieren und somit das neue Gewebe bilden (Urist, 1965; Seebach & Marzi, 2011). Zum anderen sollte sie osteokonduktiv sein. Hierbei wird den Zellen eine Art Leitstruktur zur Verfügung gestellt, an der sie sich bei der Synthese des neuen Knochens orientieren können (Cornell & Lane, 1998; Albrektsson & Johansson, 2001; Seebach & Marzi, 2011). Zusätzlich ist die ideale Therapie osteogen, also in der Lage neues Knochengewebe zu synthetisieren (Van de Putte & Urist, 1965; Seebach & Marzi, 2011).

Um all diese Eigenschaften zu vereinen, werden sogenannte „Scaffolds“ genutzt. Dabei handelt es sich um Implantate, die der Osteokonduktion dienen. In diese

Implantate können mesenchymale Stammzellen verschiedenster Herkunft gepflanzt werden. Diese können sich wiederum durch osteoinduktive Faktoren zu knochenbildenden Zellen differenzieren (Grayson, Bhumiratana, Cannizzaro & Vunjak-Novakovic, 2011; Yousefi et al., 2016).

Ein neuerer Ansatz des Bone Tissue Engineerings stellt die Gen-Therapie dar. Dabei werden Nukleinsäuren (cDNA oder auch RNA) in Zellen eingefügt. Diese Nukleinsäuren kodieren für Proteine, die die Knochensynthese fördern (siehe Kapitel 1.1.2) oder ihre Transkripte stimulieren die Synthese dieser Moleküle (Balmayor & van Griensven, 2015; Betz et al., 2018). Bei der miRNA handelt es sich beispielsweise um ein nicht-kodierendes RNA-Transkript, welches in die Genregulierung der Knochensynthese eingreift und es dadurch fördern kann (Kapinas & Delany, 2011; Lian et al., 2012). Die Nukleinsäuren werden mit Hilfe von sogenannten Vektoren in die Zellen gebracht. Bei Vektoren, die viraler Abstammung sind, wird dieser Prozess Transduktion genannt. Es können hingegen auch Moleküle, wie Lipide oder Peptide, für den Gentransfer genutzt werden. Hier wird von Transfektion gesprochen. Nachdem die Nukleinsäuren in die Zielzellen eingefügt wurden, produzieren diese kontinuierlich und lokal die Knochensynthese fördernde Faktoren (Balmayor & van Griensven, 2015; Betz et al., 2018).

Das Einfügen der Nukleinsäuren mit Hilfe von den Vektoren in die Zielzellen kann auf verschiedenste Art und Weise geschehen. Ein Beispiel ist die *ex vivo* Gentherapie: Dabei werden Stammzellen aus beispielsweise Muskel- (Katagiri et al., 1994; Lee et al., 2002; Wosczyzna et al., 2012) oder Fettgewebe (Zuk et al., 2001; De Ugarte et al., 2003; Fraser et al., 2006) isoliert, kultiviert und mit den Vektoren inkubiert, sodass sie sich zu osteogenen Zellen differenzieren. Diese werden dann an der Stelle implantiert, wo der Knochenschaden vorliegt. Dieses Verfahren ist zwar sicher, da die Vektoren vor der Implantation abgewaschen werden und somit nicht in den Organismus gelangen, jedoch ist es sehr mühsam, teuer und zeitintensiv (Betz et al., 2018). Safwani, Makpol, Sathapan & Chua (2013) zeigten in ihrer Studie zum Beispiel, dass sich mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe durch die lange Inkubation nur in unreife osteogene Zellen differenzieren konnten.

Um also solche zeitlich bedingten Komplikationen zu vermeiden, wurden sogenannte „same-day“ Verfahren entwickelt. Hierbei werden ganze Gewebeprobeen entnommen, für wenige Stunden mit den Vektoren inkubiert und am selben Tag wieder in den

Organismus eingesetzt. Dadurch verkürzt sich die Dauer des Verfahrens enorm, wodurch es vielversprechend für die zukünftige therapeutische Anwendung scheint (Betz, Betz, Harris, Vrahas & Evans, 2008; Virk et al., 2011).

Für die beschriebenen Ansätze des Bone Tissue Engineerings haben sich unter anderem das Muskel- und das Fettgewebe als geeignete Ausgangsgewebe herauskristallisiert. Vor allem die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe eignen sich hierbei ausgezeichnet. Sie sind im menschlichen Körper reichlich vorhanden und können sehr leicht und risikoarm durch eine Liposuktion gewonnen werden (De Ugarte, Ashjian, Elbarbary & Hedrick, 2003). Kakudo, Shimotsuma, Miyake, Kushida & Kusumoto (2008) pflanzten menschliche mesenchymale Stammzellen, die durch Liposuktion gewonnen wurden, in Scaffolds. Zusätzlich bereiteten sie ein osteoinduktives Medium vor und inkubierten die Scaffolds samt den Zellen für 14 Tage darin. Dies initiierte die Differenzierung der Stammzellen zu osteogenen Zellen. Daraufhin implantierten sie die Scaffolds im subkutanen Gewebe von Mäusen. Acht Wochen später wurden die Scaffolds untersucht und es konnte gezeigt werden, dass weiteres Knochengewebe produziert worden war. Im Rahmen der Gentherapie konnten Betz et al. mit Hilfe des Muskel- (2009) und des Fettgewebes (2010) große Frakturen des Femurs von Ratten heilen. Dazu wurden ganze autologe Gewebelappen (Muskel- und Fettgewebe) mit cDNA transduziert, die für BMP-2 kodierte. Diese Gewebe wurden binnen 24 Stunden in den Frakturspalt der Tiere eingesetzt. Vorher wurden die Gewebe abgewaschen und von den Vektoren befreit, um eine reine *ex vivo* Gentherapie durchzuführen und eine Übertragung in die Ratten zu vermeiden. Nach sechs Wochen waren die Frakturen der Femora komplett geheilt. Die manipulierten Femora zeigten sich im Vergleich zu gesunden Femora bezüglich Knochenvolumen und biomechanischer Stabilität mindestens gleichwertig. Ren et al. (2019) konnten basierend auf den Experimenten von Betz et al. (2009; 2010) zeigen, dass Stammzellen in Fettgewebelappen, die mit BMP-2 transduziert wurden, *in vitro* in der Lage waren sich zu osteogenen Zellen zu differenzieren und Knochengewebe zu synthetisieren. Somit konnte gezeigt werden, dass die frakturierten Knochen in der Studie von Betz et al. (2010) durch das gentransferierte und implantierte Fettgewebe geheilt wurden und dass das Fettgewebe nicht auf die Rekrutierung lokaler Stammzellen aus anderen Geweben angewiesen war. Im Rahmen der Gentherapie haben die heutigen Erkenntnisse

bereits dazu geführt, dass sich Studien in der klinischen Testung befinden (Bozo, Deev, Drobyshev, Isaev & Eremin, 2016; Betz et al., 2018).

Bisher konnte im Rahmen des Bone Tissue Engineerings trotz dieser verschiedenen Ansätze jedoch noch keine Therapie entwickelt werden, die der autogenen oder allogenen Knochentransplantation in der Klinik überlegen ist. Nichtsdestotrotz bleibt es ein vielversprechender Ansatz, um den steigenden Bedarf an Knochenmaterial in der Zukunft zu decken und die möglichen Risiken, die im Rahmen von Transplantationen auftreten können, zu vermeiden (Seebach & Marzi, 2011; Shrivats et al., 2014; Venkatesan, Bhatnagar, Manivasagan, Kang & Kim, 2015).

Um die Entwicklung klinisch anwendbarer Therapien im Rahmen des Bone Tissue Engineerings zu optimieren, können mit Hilfe der Genexpressionsanalyse physiologische Veränderungen von Zellen und Geweben nach bestimmten Manipulationen oder unter bestimmten Verhältnissen untersucht werden. Hierzu kann beispielsweise RNA genutzt werden. Auch ist die RNA selbst aufgrund ihres Einflusses auf die Knochensynthese von großem Interesse (Kapinas & Delany, 2011; Lian et al., 2012). Damit jedoch genaue Aussagen anhand der RNA über Zellvorgänge getroffen werden können, werden qualitativ hochwertige molekularbiologische Untersuchungsmethoden benötigt, die RNA von hoher Qualität liefern (Fleige & Pfaffl, 2006; Copois et al., 2007).

1.4 RNA

1.4.1 Aufbau der RNA

RNA (aus dem Englischen „ribonucleic acid“) oder auch RNS (Ribonukleinsäure) ist ein lineares Polymer aus Nukleotiden, genauer gesagt aus Ribonukleotiden. Diese Ribonukleotide bestehen aus den folgenden Grundbausteinen:

1. einem Molekül des Zuckers Ribose
2. einer oder mehrerer Phosphatgruppen (zur Bildung des Polymers RNA werden drei Phosphatgruppen benötigt, d.h. ein Nukleosidtriphosphat)
3. einer Base

(Alberts et al., 2011; Berg, Tymoczko, Gatto jr. & Stryer, 2018)

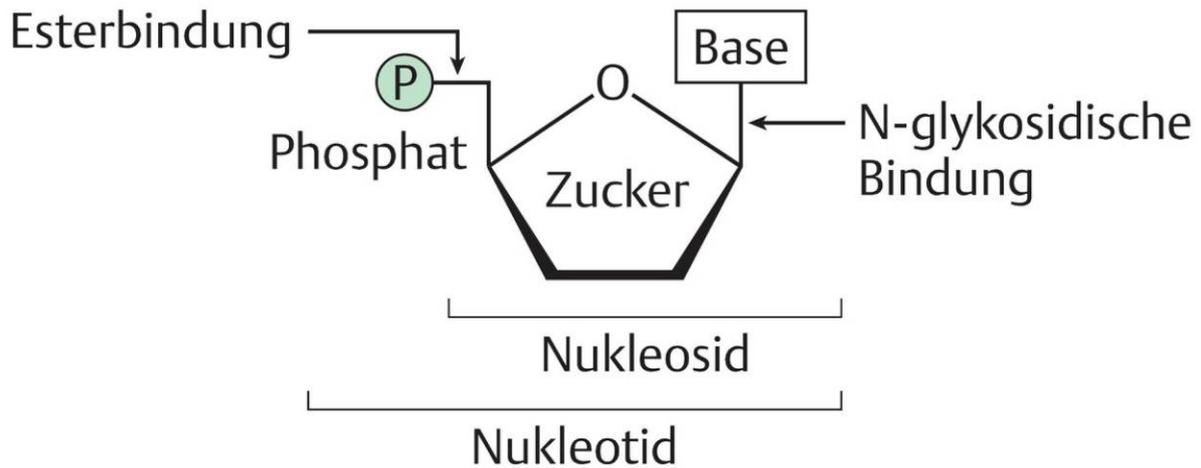


Abbildung 6 Aufbau eines Nucleotids. Quelle: adaptiert von Netzker (2016).

Die Ribonucleotide unterscheiden sich im Wesentlichen durch ihre Basen. In der RNA finden sich vier verschiedene Basen: Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Uracil (U). Adenin und Guanin zählen zu den Purinen, Cytosin und Uracil hingegen zu den Pyrimidinen. Diese Basen besitzen die Eigenschaft untereinander Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Adenin und Uracil stellen ein Paar und bilden zwischen einander zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus. Guanin und Cytosin bilden zwischen einander drei Wasserstoffbrückenbindungen aus. Dies ist wichtig für die teils komplexe Faltung der RNA-Polymere, durch die sie verschiedenste Aufgaben erfüllen oder Reaktionen katalysieren können (Alberts et al., 2011; Berg et al.; 2018).

1.4.2 RNA-Typen

In Zellen finden sich verschiedene RNA-Typen an. Es handelt sich bei allen um Ribonucleotidketten, jedoch werden diese nach der Transkription noch modifiziert. Prä-mRNA (prä messenger RNA) wird durch Spleißen, Capping und Polyadenylierung modifiziert, an rRNA (ribosomal RNA) hingegen werden verschiedene Spaltungen, Methylierungen und Isomerisierungen durchgeführt, bevor der endgültige RNA-Strang seine jeweilige Funktion in der Zelle ausüben kann. Die verschiedenen Typen können dabei in dieselben oder aber auch in komplett verschiedenen Prozessen eingebunden sein. Die essenzielle mRNA ermöglicht beispielsweise durch Transkription und Translation die Synthese von Proteinen aus

der DNA-Sequenz. Es gibt allerdings auch Gene, deren Endprodukt die RNA selbst ist. Diese werden non-coding RNAs (nicht-kodierende RNAs) genannt, da sie nicht für ein Protein kodieren. Den größten Teil der zellulären RNA macht die rRNA aus. Sie ist als Baustein der Ribosomen an der Translation beteiligt. Obwohl der Großteil der Gene für Proteine kodiert, macht die mRNA nur einen kleinen Teil der zellulären RNA aus (circa 3-5%). Dies ist darauf zurückzuführen, dass sie sich je nach Genexpression im ständigen Auf- und Abbau befindet (Alberts et al., 2011; Berg et al.; 2018).

RNA Typ	Funktion
mRNA	messenger RNA, kodiert für Proteine
rRNA	ribosomal RNA, bildet die Grundstruktur der Ribosomen und katalysiert die Proteinbiosynthese
tRNA	transfer RNA, wesentlich für die Proteinbiosynthese als Adapter zwischen mRNA und Aminosäuren
snRNA	small nuclear RNA, wird für eine Vielfalt an Prozessen im Zellkern benötigt, zum Beispiel beim Spleißen von prä-mRNA
snoRNA	small nucleolar RNA, wird benötigt, um rRNA weiter zu bearbeiten und zu modifizieren
miRNA	microRNA, reguliert die Genexpression üblicherweise durch Blockieren der Translation ausgewählter mRNAs
siRNA	small interfering RNA, schaltet die Genexpression dadurch aus, dass sie die Degradation ausgewählter mRNAs steuert und kompakte Chromatinstrukturen aufbaut

Tabelle 1 Ein Überblick über die Hauptklassen zellulärer RNAs. Es handelt sich nicht um eine vollständige Aufzählung aller RNA-Typen. Quelle: adaptiert von Alberts et al. (2011).

1.5 RNA-Isolierung

Seit der Entdeckung der Nukleinsäuren wurden viele verschiedene Methoden zur Isolierung ebenjener entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit wird näher auf die Isolierung der RNA eingegangen. Da die Anzahl der Techniken jedoch sehr breit

gestaffelt ist, kann nicht auf jede im Detail eingegangen werden. Im Folgenden sollen ein paar weltweit gebräuchliche Methoden erläutert werden.

Obwohl verschiedene Methoden entwickelt wurden, beruhen sie weitestgehend auf denselben Grundprinzipien:

1. Das biologische Material muss homogenisiert werden, damit die gewünschten Moleküle freigesetzt werden.
2. Die Nukleoproteinkomplexe müssen denaturiert werden, da in ihnen der Großteil der RNA an Proteine gebunden vorliegt.
3. Die im Probenmaterial vorhandenen und die ubiquitär vorkommenden RNasen müssen inaktiviert werden, damit sie das Material nicht beschädigen.
4. Das gesamte unerwünschte Material (Proteine, DNA und andere Zellbestandteile) muss entfernt werden.

(Tan & Yiap, 2009)

Eine der ältesten und etabliertesten Methoden ist die „*Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium-Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction*“ von Chomczynski & Sacchi (1987). Sie wird auch als Trizol-Methode bezeichnet, da einige Handelsnamen des auf Guanidiniumthiocyanat und Phenol basierenden Lysepuffers, TRIzol oder auch TRI Reagenz sind. Die RNA-Isolierung mit Hilfe von Guanidiniumthiocyanat war bereits von Chirgwin, Przybyla, MacDonald & Rutter (1979) beschrieben worden, jedoch setzte sich das Protokoll von Chomczynski & Sacchi (1987) aufgrund seiner schnelleren und einfacheren Durchführung durch. Ebenfalls war es mit Chomczynskis & Sacchis Protokoll (1987) im Vergleich zu dem von Chirgwin et al. (1979) möglich sowohl größere Erträge zu erzielen, als auch reinere RNA zu isolieren (Chomczynski & Sacchi, 1987).

Die Methode beruht auf den Eigenschaften des Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Gemisches, welches nach Zugabe zu Geweben oder Zellen die Auflösung dieser und derer Bestandteile bewirkt. Vor allem das Guanidiniumthiocyanat inaktiviert zudem die RNasen (Sela, Anfinsen & Harrington, 1957; Chomczynski & Sacchi, 1987). Durch Zugabe von Chloroform zu diesem Lysat bilden sich verschiedene Phasen in der Lösung (siehe Abbildung 7). Da die gewünschte RNA in der oberen wässrigen

Phase verbleibt, während DNA und Proteine sich in der Phenol- (untere Phase) und Interphase befinden, kann sie abpipettiert werden. Im Anschluss wird die RNA gefällt, mit Alkohol gewaschen und letztendlich in RNase-freiem Wasser eluiert, um für weiterführende Experimente verwendet werden zu können (Chomczynski & Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993). Diese Methode fällt unter den Begriff der Flüssig-Flüssig-Extraktion, da während des Prozesses flüssige Phasen voneinander getrennt werden.

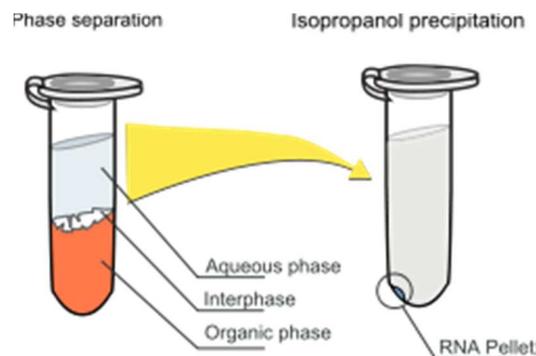


Abbildung 7 Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Chomczynski & Sacchi (1987). Links wird die Trennung des Lysats in verschiedene Phasen gezeigt. Es schließt sich die RNA-Fällung mit Isopropanol an, bei der sich ein Pellet bildet. Quelle: adaptiert von Squidoni (n.d.).

Im Gegensatz zur Methode von Chomczynski & Sacchi (1987) machen heutzutage viele der kommerziell erhältlichen Extraktionskits Gebrauch von einem anderen Ansatz. Es handelt sich dabei um eine Fest-Phasen-Reinigung der RNA. Hierbei bindet die RNA unter bestimmten Bedingungen an einen Trägerstoff. Die nicht erwünschten Zellbestandteile werden hingegen durch Zugabe von Waschlösungen und unter Zentrifugation herausgelöst. Abschließend wird die RNA mit einer Elutionslösung wieder vom Trägerstoff gelöst und steht der weiteren Verwendung zur Verfügung. Es gibt verschiedene Materialien, die genutzt werden können. Je nachdem um welches Material es sich handelt, müssen bestimmte Bedingungen hergestellt werden, unter denen die RNA bindet. Ein häufig verwendeter Trägerstoff ist das Silikagel (SiO_2) (Tan & Yip, 2009).

Einige der heutigen Kits beruhen auf demselben Prinzip, welches 1990 von Boom et al. mit ihrem Protokoll für Nukleinsäureaufreinigung veröffentlicht wurde. Sie machten genau wie Chomczynski & Sacchi (1987) Gebrauch vom chaotropischen Guanidiniumthiocyanat als Basis für ihren Puffer zum Lysieren der zu

untersuchenden Proben. Außerdem nutzten sie die Eigenschaft der Nukleinsäuren in Anwesenheit dieses Lysepuffers an Silikapartikel zu binden und gaben diese ebenfalls zu Beginn des Experiments zur Probe. Nachdem die Nukleinsäuren freigesetzt wurden und an die Silikapartikel gebunden hatten, wurden diese mit Alkohol gewaschen und trockengelegt. Schlussendlich wurden die Nukleinsäuren mit einer wässrigen Lösung eluiert, also von den Silikapartikeln gelöst (Boom et al., 1990).

Anfangs wurde hauptsächlich DNA extrahiert, aber es fand sich auch hier schon rRNA (Boom et al., 1990). Aufgrund ihrer einfachen Handhabung und des guten Ertrags an Nukleinsäuren etablierte sich diese Methode in den nächsten Jahren (Hale, Green & Brown, 1996). Im späteren Verlauf wurde diese Vorgehensweise angepasst, um reine RNA-Isolierungen durchführen zu können.

Heutzutage benutzen viele kommerziell erhältliche Kits Silikagel-Membranen, welche die Arbeit erleichtern. Sie sind in den Zentrifugationsröhrchen fest verankert, wodurch nicht mehr mit freien Silikakugeln gearbeitet werden muss (Bio-Rad Laboratories, n.d.; Qiagen, 2018; Qiagen 2018).

1.6 Zielsetzung

Von vielen Firmen wird damit geworben, dass mit ihren RNA-Isolationskits qualitativ hochwertige RNA in großen Mengen aus begrenztem Probenmaterial isoliert werden kann. Das Ziel dieser Arbeit war daher, die ursprüngliche Trizol-Methode von Chomczynski & Sacchi (1987) in modifizierter Form mit vier kommerziell erhältlichen RNA-Extraktionskits von drei etablierten Firmen zu vergleichen. Auf Basis der Ergebnisse sollte in Zukunft eine wissenschaftlich belegte Auswahl der RNA-Isolationsmethoden ermöglicht werden. Dies sollte bessere Voraussetzungen für Experimente und Studien mit RNA ermöglichen. Als Bewertungskriterien wurden dazu die Konzentration, Reinheit und Integrität der RNA-Isolate bestimmt. Als zu untersuchendes Gewebe wurde Muskel- und Fettgewebe einer Ratte (*Rattus norvegicus*) gewählt, da diese Gewebe für die Forschung im Rahmen des Bone Tissue Engineerings von großem Interesse sind (De Ugarte et al., 2003; Fraser et al., 2006; Betz et al. 2009; Betz et al. 2010; Wosczyzna et al., 2012). Bei den kommerziellen Kits handelte es sich um Folgende:

1. Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
2. innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena, Jena, Deutschland)
3. RNeasy Fibrous® Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
4. RNeasy® Lipid Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

1.7 Fragestellung

Wie bereits grob dargestellt, zeichnen sich verschiedene RNA-Isolationsmethoden durch individuelle Arbeitsschritte und die Verwendung unterschiedlicher Chemikalien aus. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass sich zwischen den Methoden Unterschiede in der Konzentration, Reinheit und Integrität der isolierten RNA aufzeigen. Mit dieser Studie sollte herausgearbeitet werden, ob die kommerziell erhältlichen Kits der Trizol-Methode in der RNA-Isolierung aus Muskel- und Fettgewebe überlegen sind. Außerdem sollte überprüft werden, ob das Gewebe einen Einfluss auf die Ergebnisse der jeweiligen Methoden hat.

2 Material und Methoden

Um möglichst RNase-frei zu arbeiten und somit die Degradation der RNA während der Versuche minimal zu gestalten, wurden vor Beginn eines jeden Arbeitsschrittes Oberflächen und verwendete Geräte mit 100%igem Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) abgewischt. Es wurden RNase-/DNase- und Pyrogen-freie Pipettenspitzen und Mikroreaktionsgefäße benutzt. Bei allen Tätigkeiten wurden Laborkittel und Latexeinweghandschuhe getragen. Alle Arbeitsschritte, bei denen Chemikalien verwendet wurden, wurden unter einem Abzug durchgeführt.

Um die Bearbeitungszeit zu verkürzen, wurden die Materialien, wenn möglich, im Voraus vorbereitet und beschriftet.

Es wurde in einigen Schritten mit verdünntem Ethanol gearbeitet. Beim Lesen kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei immer um 100%iges Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) handelt, der je nach Konzentration mit UltraPure™ DNase/RNase freiem destilliertem Wasser (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) verdünnt wurde.

2.1 Probengewinnung

2.1.1 Isolierung des Gewebes

Vor Beginn der Probengewinnung wurde Penicillin 40 I.E./ml (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) mit Streptomycin 40 I.E./ml (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) in gleichem Maße vermischt. Neun Milliliter dieser Mischung wurden zu 500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium - high glucose (kurz DMEM-hg) (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) gegeben.

Für dieses Experiment wurde eine männliche Ratte (*Rattus norvegicus*, Stamm Fischer 344, Rasse: DuCrI) (Charles River Laboratories, Wilmington, USA) verwendet. Das Töten des Tieres erfolgte nach den Vorschriften und Bestimmungen der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV), der Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates und wurde nach Tierschutzgesetz (TierSchG) §1, §4, §7 und §17 von der Ethikkommission für Tierversuche der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland) zur Verwendung eines Tieres ausschließlich zur Entnahme seines Gewebes genehmigt. Die Ratte wurde

chemisch durch die Applikation einer Überdosis des Inhalationsnarkotikums Isofluran (Abbott Laboratories, Chicago, USA) getötet.

Nach dem Feststellen des Todes wurde die Ratte geschoren. Anschließend wurde sie mit Braunol® (B. Braun, Melsungen, Deutschland) und darauffolgend mit 80%igem Ethanol desinfiziert, um sterile Bedingungen zu schaffen. Nun wurde sowohl Fett-, als auch Skelettmuskelgewebe der Extremitäten, des Thoraxes und des Abdomens unter sterilen Bedingungen präpariert und entnommen. Diese Präparate wurden, nach Gewebearten aufgetrennt, im oben beschriebenen DMEM-hg gesammelt.

2.1.2 Probeneinteilung und Wiegen

Um im späteren Verlauf mit ähnlichen Gewebemengen pro Probe arbeiten zu können, wurden mit 4mm-Biopsiestanzen mit Entnahmehilfe (pfm medical, Köln, Deutschland) Gewebestanzungen angefertigt. Von diesen Gewebestanzungen wurden randomisiert jeweils drei in ein 1,5 ml RNase-freies Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und in flüssigem Stickstoff (N₂) zwischengelagert um eine RNA-Degradierung zu verhindern. Da die RNA im späteren Verlauf aus beiden Gewebearten mit Hilfe von vier verschiedenen Methoden extrahiert werden sollte, wurden insgesamt 20 solcher Proben pro Gewebe angefertigt (pro Methode und Gewebe n = 5). Vor RNA-Isolierung wurden die Proben mit einer Mettler Toledo MS 304 TS Analytical Scale (Cole-Parmer, Vernon Hills, USA) gewogen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2 Homogenisierung

Zur Homogenisierung des Gewebes wurde eine SpeedMill Plus (Analytik Jena, Jena, Deutschland) mit den für dieses Gerät speziell hergestellten Probenröhrchen, InnuSpeed Lysis Tube E (Analytik Jena, Jena, Deutschland), verwendet. In diesen speziellen Probenröhrchen befanden sich Keramikugeln, welche das Gewebe in der SpeedMill Plus (Analytik Jena, Jena, Deutschland) durch mechanische Bewegung homogenisierten. Es handelte sich bei den Röhrchen samt Kugeln um Einwegprodukte.

Der Probenhalter der SpeedMill Plus (Analytik Jena, Jena, Deutschland) wurde geraume Zeit vor jeder Homogenisierung bei -80 °C gelagert, um ein Überhitzen des Geräts während des Vorgangs und dadurch eine Schädigung der RNA zu verhindern.

Die Proben wurden zwischenzeitlich in flüssigem Stickstoff gelagert, um ein eventuelles Auftauen zu verhindern. Da die Proben aus den RNase-freien Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in die oben beschriebenen Homogenisatorröhrchen (Analytik Jena, Jena, Deutschland) überführt werden mussten, wurden die Arbeitsfläche, sowie eine Pinzette mit RNase-Zap (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) und 100%igem Ethanol gereinigt. Die Metallpinzette zum Überführen der Proben wurde in 100%igem Ethanol zwischengelagert und vor jedem Kontakt mit einer neuen Probe desinfiziert. Pro Durchgang wurden 5 Proben homogenisiert.

Die Puffer wurden entgegen der Durchführungsanleitungen erst im Anschluss hinzugegeben, da die Proben sich in sehr kaltem Zustand besser homogenisieren ließen. Da die Proben sich durch das Überführen in die für den Homogenisator benötigten Röhrchen schon geraume Zeit bei Raumtemperatur befanden, hätte ein Hinzugeben der bei Raumtemperatur gelagerten Puffer ein weiteres Auftauen gefördert.

Ansonsten wurden die kommerziellen Kits nach den jeweiligen, von den Herstellern beigefügten, Anleitungen durchgeführt.

2.2.1 Trizol-Methode

Diese Methode wurde sowohl am Muskel-, als auch am Fettgewebe der Ratte durchgeführt.

Nach Überführen der gefrorenen Proben in die InnuSpeed Lysis Tubes E (Analytik Jena, Jena, Deutschland), wurden sie für eine Minute in der SpeedMill Plus (Analytik Jena, Jena, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde 1 ml des Lysepuffers TRIZOL™ Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) zu jeder Probe gegeben. Das Gemisch wurde manuell für 15 Sekunden kräftig geschüttelt um eine gute Vermischung und Inaktivierung der RNasen zu gewährleisten. Anschließend

wurden die Lysate in beschriftete RNase-freie Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert und sofort bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit

Diese Methode wurde sowohl am Muskel-, als auch am Fettgewebe der Ratte durchgeführt.

Nach Überführen der Proben in die InnuSpeed Lysis Tubes E (Analytik Jena, Jena, Deutschland) wurde die Homogenisierung in der SpeedMill Plus (Analytik Jena, Jena, Deutschland) für eine Minute durchgeführt. Anschließend wurde 1 ml des mitgelieferten PureZOL (Bio-Rad, Hercules, USA) zu jeder Probe gegeben. Das Gemisch wurde manuell für 15 Sekunden geschüttelt und anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die komplette Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu gewährleisten. Die Lysate wurden anschließend in beschriftete RNase-freie Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert und sofort bei -80 °C gelagert.

2.2.3 innuPREP RNA Mini Kit

Diese Methode wurde sowohl am Muskel-, als auch am Fettgewebe der Ratte durchgeführt.

Nach Überführen der Proben in die InnuSpeed Lysis Tubes E (Analytik Jena, Jena, Deutschland), wurde die Homogenisierung in der SpeedMill Plus (Analytik Jena, Jena, Deutschland) für eine Minute durchgeführt. Im Anschluss wurden 450 µl der mitgelieferten Lysissolution RL (Analytik Jena, Jena, Deutschland) zu jeder Probe pipettiert und die Tubes für zehn Minuten kontinuierlich manuell geschüttelt um eine maximale Lyse des Gewebes zu bewirken. Zuletzt wurden die Lysate in beschriftete RNase-freie Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert und sofort bei -20 °C gelagert.

2.2.4 RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit

Dieses Kit wurde ausschließlich am Muskelgewebe der Ratte durchgeführt, da es speziell für die RNA-Isolierung aus fibrösem Gewebe, wie zum Beispiel das der Aorta, des Herz- oder des Skelettmuskels, entwickelt wurde (Qiagen, 2018).

Vorbereitend wurde nach Herstellerangaben zu je 1 ml des mitgelieferten Buffer RLT (Qiagen, Hilden, Deutschland) 10 µl 14,3M β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gegeben. Nachdem die Proben in die InnuSpeed Lysis Tubes E (Analytik Jena, Jena, Deutschland) überführt und für eine Minute in der SpeedMill Plus (Analytik Jena, Jena, Deutschland) homogenisiert wurden, wurde zu jeder 300 µl des Buffer RLT/β-Mercaptoethanol-Gemisches pipettiert. Die Lysate wurden für 15 Sekunden manuell geschüttelt, in beschriftete RNase-freie Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert und sofort bei -80 °C gelagert.

2.2.5 RNeasy® Lipid Tissue kit

Diese Methode wurde ausschließlich am Fettgewebe der Ratte durchgeführt, da der Hersteller angibt, dass sich das RNeasy Lipid Tissue Kit für dieses Gewebe sehr gut eignet (Qiagen, 2018).

Die Proben wurden in die InnuSpeed Lysis Tubes E (Analytik Jena, Jena, Deutschland) überführt und für eine Minute in der SpeedMill Plus (Analytik Jena, Jena, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde 1 ml des mitgelieferten QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland) zum Gewebe gegeben, für 15 Sekunden manuell kräftig geschüttelt und anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die komplette Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu gewährleisten. Zuletzt wurden die Lysate in beschriftete RNase-freie Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert und sofort bei -80 °C gelagert.

2.3 RNA-Extraktion

Für alle Methoden galt, dass die Proben zuerst wieder auf eine Temperatur gebracht werden mussten, bei der sie weiterverarbeitet werden konnten. Hierzu wurden sie vor

der Durchführung der jeweiligen RNA-Extraktionsmethode für zehn Minuten in einem Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 37 °C inkubiert und anschließend manuell geschüttelt, damit sie in gelöster Form vorlagen.

Die Kits enthielten den Großteil der zu verwendenden Materialien und Chemikalien. Beim Lesen kann also davon ausgegangen werden, dass die genannten Materialien vom selben Hersteller produziert wurden. Sollte dies nicht der Fall sein, wird der Hersteller ausdrücklich angegeben.

Alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden in einer Eppendorf Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

2.3.1 Trizol-Methode

Die RNA-Extraktion wurde nach dem Protokoll von Simms, Cizdziel & Chomczynski (1993), welches auf dem Protokoll von Chomczynski & Sacchi (1987) basiert, in modifizierter Form durchgeführt.

Nachdem die Proben wieder in aufgetauter Form vorlagen und weiterverarbeitet werden konnten, wurden 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hinzupipettiert. Sofort wurde das Gemisch für 15 Sekunden manuell kräftig geschüttelt und anschließend für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auf die Inkubation folgte eine Zentrifugation der Proben für 20 Minuten bei 4 °C und bei 15.000 g.

Durch diesen Schritt wurde die Lösung in drei Phasen aufgeteilt:

1. eine rote, untere Phenol-Chloroform Phase
2. eine Interphase
3. eine obere, wässrige Phase

Die Phenol-Chloroform Phase und die Interphase enthielten DNA und Proteine, die obere wässrige Phase hingegen die gewünschte RNA (Chomczynski & Sacchi, 1987). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues RNase-freies Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Es wurde sorgfältig darauf geachtet die Phasen bei diesem Schritt nicht zu vermischen. Die Interphase und die Phenol-Chloroform-Phase wurden verworfen.

Zu den RNA-haltigen Proben wurden jeweils 0,5 ml Isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gegeben, wonach sie manuell kräftig geschüttelt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach diesem Schritt wurden sie für über 20 Stunden bei 4 °C und 20.817 g zentrifugiert. Das vom Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie angepasste Protokoll empfiehlt generell mindestens eine Stunde, bei kleinen Gewebemengen jedoch über Nacht, zu zentrifugieren. Die Anpassung des Protokolls basiert auf der langjährigen Erfahrung der Labormitarbeiter in der RNA-Isolierung mit dieser Methode.

Dieser Schritt diente der sogenannten RNA-Fällung. Es bildeten sich Pellets am Boden der RNase-freien Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in denen die RNA enthalten war. Die RNase-freien Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden dabei so ausgerichtet, dass die Position der entstehenden Pellets auch dann hätte erahnt werden können, falls sie optisch nicht sichtbar gewesen wären.

Die flüssige Komponente wurde daraufhin vorsichtig abgegossen und die Pellets wurden mit einer 10 µl Pipette trockengelegt. Anschließend wurde 1 ml 75%iges Ethanol zu jedem Pellet pipettiert und erneut für 20 Minuten bei 20.817 g und 4 °C zentrifugiert.

Diese Schritte wurden noch einmal fast identisch wiederholt. Die flüssige Komponente wurde vorsichtig abgegossen, die Pellets mit einer 10 µl Pipette trockengelegt und dieses Mal wurden 0,5 ml 75%iges Ethanol pro Pellet hinzugegeben. Die Zentrifugation verlief identisch für 20 Minuten bei 20.817 g und 4 °C.

Wieder wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und die Pellets mit einer 10 µl Pipette trockengelegt. Da sie mit der Pipette nicht vollständig trockengelegt werden konnten, wurden die Proben im Anschluss drei Minuten mit geöffnetem Deckel in den Händen gehalten, um ein vollständiges Verdampfen des Ethanols zu garantieren. Dies wurde an durchsichtigen/glasigen Pellets festgemacht.

Im Anschluss an die RNA-Isolierung wurde 32 µl UltraPure™ DNase/RNase freies destilliertes Wasser (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) zu jedem Isolat hinzugegeben und einige Male auf- und abpipettiert, um die RNA im Wasser zu lösen. Anschließend wurde die Lösung bei 37 °C für 20 Minuten im Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert.

Darauffolgend wurden die Proben auf Eis gelagert, um sie vor Degradation zu schützen. Direkt im Anschluss erfolgte die photometrische Auswertung.

2.3.2 Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit

2.3.2.1 Übersicht



Abbildung 8 Übersicht der Arbeitsschritte des Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit. Quelle: adaptiert von Bio-Rad Laboratories (n.d.).

2.3.2.2 Vorbereitungen

Die mitgelieferte Low Stringency Wash Solution (20 ml) wurde mit 80 ml 100%igem Ethanol verdünnt. Des Weiteren wurde die DNase I vorbereitet, indem zunächst 250 µl 10mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zur lyophilisierten DNase I hinzugefügt und anschließend auf- und abpipettiert wurde. Anschließend wurde diese Lösung in 30 µl-großen Portionen bis zum Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.2.3 Durchführung

Jeder Zentrifugationsschritt wurde bei 12.200 g durchgeführt.

Nachdem die Proben wieder in aufgetauter Form vorlagen und weiterverarbeitet werden konnten, wurden sie für zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert um eventuelle Gewebepartikel zu trennen.

Die flüssige Komponente und 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurden in ein neues RNase-freies Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert und manuell für 15 Sekunden stark geschüttelt. Dieses Gemisch wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Proben jede Minute manuell kurz geschüttelt wurden. Daraufhin wurden die Proben bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert.

Alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 20 °C durchgeführt.

In der Zwischenzeit wurde die DNase I gebrauchsfertig vorbereitet. Die bereits in Tris(hydroxymethyl)-aminomethan gelöste DNase I wurde dazu bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden jeweils 75 µl „DNase dilution solution“ zu 5 µl gelöster DNase I gegeben.

Während der Zentrifugation der Proben bildeten sich auch bei dieser Methode 3 Phasen:

1. eine untere, rote, organische Phase
2. eine weiße Interphase
3. eine obere, farblose, wässrige Phase

Auch hier enthielten die beiden unteren Phasen die DNA und Proteine, die obere Phase hingegen die RNA. Die wässrige Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Es wurde sorgfältig darauf geachtet die Phasen bei diesem Schritt nicht zu vermischen. Zu diesen Proben wurde 70%iges Ethanol im Volumenverhältnis 1:1 hinzugegeben und anschließend durch auf- und abpipettieren vermischt.

Von diesem Gemisch wurden 700 µl in die RNA-bindende Filtrationssäule gegeben, welche vorher bereits in ein deckellooses Röhrchen gesetzt wurde. Das Röhrchen samt Filtrationssäule wurde für 60 Sekunden zentrifugiert.

Die filtrierte Flüssigkeit wurde verworfen, die Filtrationssäule wieder in dasselbe Röhrchen gesetzt und der Schritt mit dem übrigen Volumen der Probe und derselben Filtrationssäule wiederholt.

Daraufhin wurden 700 µl der „low stringency wash solution“ in die Säule gegeben und für 30 Sekunden zentrifugiert. Das Filtrat wurde erneut verworfen.

Zur DNA-Verdauung wurden nun 80 µl der DNase-I-Lösung mittig auf die Membran pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt sollte die Kontamination der RNA-Probe mit genomischer DNA verhindern.

Nach Ablauf der 15 Minuten Inkubationszeit wurden 700 µl „high stringency wash solution“ auf die Säule pipettiert und diese für 30 Sekunden zentrifugiert. Das Filtrat wurde wieder verworfen.

Nun wurden 700 µl „low stringency wash solution“ hinzupipettiert und die Säule für 60 Sekunden zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen.

Es schloss sich eine 2-minütige Zentrifugation an, um zu verhindern, dass sich Reste der Waschlösung in der Membran befanden. Verunreinigungen solcher Art würden Folgeexperimenten beeinflussen und die Probe somit unbrauchbar machen.

Die Filtrationssäule wurde in ein 1,5 ml RNase-freies Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben und es wurden 32 µl „elution solution“ in die Mitte der Membran pipettiert. Eine Minute lang wurde bei Raumtemperatur inkubiert, bevor das Röhrchen für zwei Minuten zentrifugiert wurde. In diesem Schritt wurden die Bindungen zwischen Silikagel-Membran und RNA-Molekülen aufgehoben, sodass die RNA gelöst in der Elutionslösung vorlag.

Der Durchfluss wurde komplett auf die Membran pipettiert, noch einmal für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und es wurde ein letztes Mal für zwei Minuten zentrifugiert.

Die Proben wurden nun auf Eis gelagert, um sie vor Degradation zu schützen. Die photometrische Auswertung erfolgte direkt im Anschluss.

2.3.3 innuPREP RNA Mini Kit

2.3.3.1 Übersicht

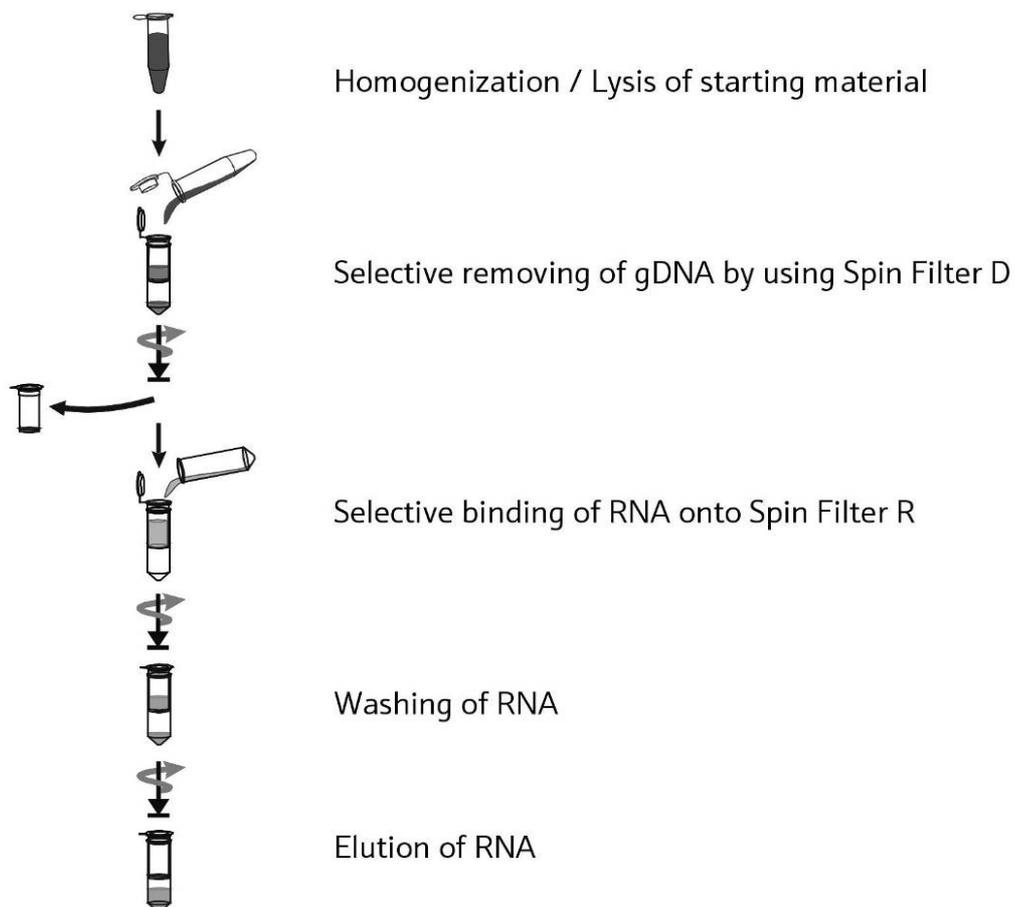


Abbildung 9 Übersicht der Arbeitsschritte des innuPREP RNA Mini Kit. Quelle: adaptiert von Analytik Jena (2018).

2.3.3.2 Vorbereitungen

Zu beiden Waschlösungen musste vorab Ethanol gegeben werden. Zu den 15 ml der „Washing Solution HS“ wurden deshalb 15 ml 100%iges Ethanol gegeben. Zu den 8

ml der „Washing Solution LS“ wurden 32 ml 100%iges Ethanol gegeben. Beide Gefäße wurden anschließend manuell geschüttelt, sodass der Inhalt sich vermischte.

2.3.3.3 Durchführung

Alle Zentrifugationsschritte wurden, solange nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur und 10.000 g durchgeführt.

Die Proben wurden aufgetaut und resuspendiert. Hierauf folgte eine ein-minütige Zentrifugation bei 20.800 g, damit sich das unlysierte Material absetzte. Der flüssige Überstand wurde in den blauen „spin filter D“, der bereits in ein 2,0 ml „Receiver Tube“ gesetzt wurde, übertragen. Im Anschluss wurden die Proben für zwei Minuten zentrifugiert.

Beim Muskelgewebe ist in diesem Schritt ein für den Hersteller bekanntes Problem aufgetreten: Die Filter verstopften teilweise und ein Teil der Proben blieb ungefiltert. Deshalb empfiehlt der Hersteller in diesem Fall noch einmal für längere Zeit und/oder mit schnellerer Geschwindigkeit zu zentrifugieren. Da sich dieses Problem für alle fünf Muskelgewebeproben ergab, wurden sie wiederholt für drei Minuten bei 15.000 g zentrifugiert.

Da auch dieser Schritt keinen Erfolg brachte, wurden die Proben nochmals für drei Minuten bei 20.800 g zentrifugiert.

Auch nach diesem Schritt war Flüssigkeit oberhalb der Filter vorhanden, sodass die ungefilterten Teile der Proben auf neue „spin filter D“ gegeben und sie bei 20.800 g für drei Minuten zentrifugiert wurden. Wieder wurden nur Teile der Proben filtriert.

Aus diesem Grund wurde der vorherige Schritt mit einem weiteren, frischen „spin filter D“ pro Probe wiederholt. Letztendlich passierten somit alle Proben diesen Filter komplett. Die „spin filter D“ banden die in den Proben enthaltene genomische DNA und wurden verworfen.

Bei den Fettgewebeproben wurde das Protokoll nach Herstellerangaben normal fortgeführt, da sich kein Verstopfen der Filter zeigte.

Zum Filtrat wurde 70%iges Ethanol im Volumenverhältnis 1:1 gegeben. Das Filtrat und der Alkohol wurde durch auf- und abpipettieren vermischt. Diese Mischung wurde auf einen violetten „spin filter R“ gegeben, der sich in einem „Receiver Tube“

befand. Anschließend wurden die Proben für zwei Minuten zentrifugiert und das Filtrat samt Röhrchen verworfen.

Der Filter wurde in ein neues Röhrchen gesetzt. Die RNA lag nun gebunden an der Filtermembran vor und konnte anschließend gewaschen werden, sodass Verunreinigungen entfernt wurden. Hierzu wurden 500 µl „washing solution HS“ auf den Filter gegeben und für eine Minute zentrifugiert. Röhrchen und Filtrat wurden verworfen, der Filter wurde in ein neues Röhrchen gegeben.

Im nächsten Schritt wurden 700 µl „washing solution LS“ auf den Filter gegeben und für eine Minute zentrifugiert. Röhrchen und Filtrat wurden verworfen, der Filter wurde in ein neues Röhrchen gegeben.

Daraufhin fand eine zwei-minütige Trockenzentrifugation statt, die dazu dienen sollte alle Reste der Waschlösung aus der Membran zu entfernen.

Abschließend wurde er in ein 1,5 ml RNase-freies Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben. Es wurden 32 µl UltraPure™ DNase/RNase freies destilliertes Wasser (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) auf die Membran pipettiert und eine Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Proben für eine Minute bei 6.000 g zentrifugiert wurden.

Der Durchfluss wurde ein weiteres Mal komplett auf die Membran gegeben, um die restliche RNA zu lösen. Wieder wurde eine Minute lang inkubiert und zuletzt eine Minute bei 6.000 g zentrifugiert.

Die Proben wurden nun auf Eis gelagert, um sie vor Degradation zu schützen. Die photometrische Auswertung erfolgte direkt im Anschluss.

2.3.4 RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit

2.3.4.1 Übersicht

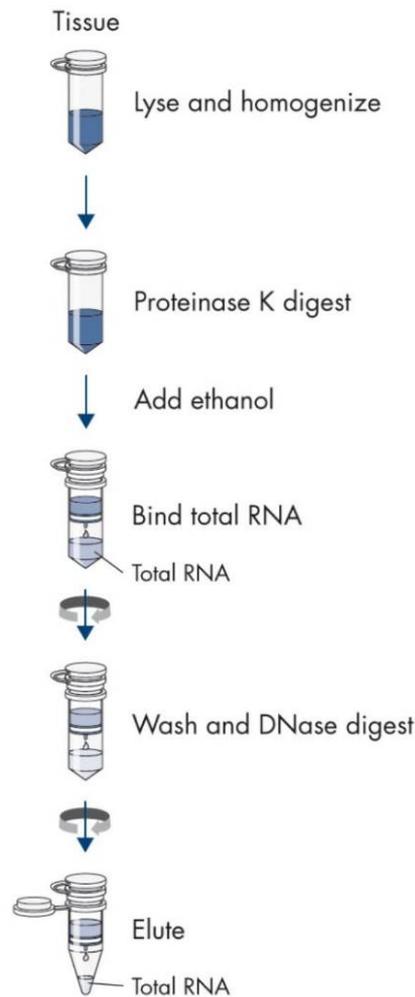


Abbildung 10 Übersicht der Arbeitsschritte des RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit. Quelle: adaptiert von Qiagen (2018).

2.3.4.2 Vorbereitungen

Zu 11 ml des Buffer RPE wurden 44 ml 100%iges Ethanol gegeben. Außerdem wurde die DNase I vorbereitet, indem die lyophilisierte DNase I (1.500 Kunitz Einheiten) in 550 µl RNase-freiem Wasser gelöst und anschließend bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert wurde.

2.3.4.3 Durchführung

Alle Zentrifugationsschritte wurden, solange nicht ausdrücklich anders beschrieben, bei 20 °C und 8.000 g durchgeführt.

Zuerst wurden die Proben aufgetaut und resuspendiert. Darauffolgend wurden sie mit 590 µl RNase-freies Wasser und 10 µl Proteinase K Lösung durch auf- und abpipettieren vermischt. Nun wurden die Proben für zehn Minuten bei 55 °C im Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert und anschließend für drei Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Dieser Schritt sorgte dafür, dass sich alle festen Bestandteile am Boden des Mikroreaktionsgefäßes sammelten. Während die flüssige Phase abpipettiert und in ein 1,5 ml RNase-freies Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben wurde, wurden die festen Bestandteile verworfen.

Anschließend wurde ein zur Probe 0,5-faches Volumen an 100%igem Ethanol hinzugegeben. 700 µl dieses Gemisches wurden in eine „RNeasy Mini spin column“ gegeben, die zuvor in ein 2 ml „collection tube“ gesetzt wurde. Die Proben wurden 15 Sekunden lang zentrifugiert, das Filtrat verworfen und der Rest der unfiltrierten Proben wurde auf die Filter gegeben, sodass auch diese 15 Sekunden lang zentrifugiert werden konnten. Wieder wurde das Filtrat verworfen.

Nun wurden 350 µl „Buffer RW1“ in die „RNeasy spin column“ gegeben und für 15 Sekunden zentrifugiert um die Membran zu waschen. Das Filtrat wurde verworfen.

Als nächster Schritt schloss sich die DNA-Verdauung an. Sie sollte die RNA-Proben von einer eventuellen Kontamination mit DNA befreien. Hierzu wurden zu je 10 µl „DNase stock solution“ jeweils 70 µl „Buffer RDD“ gegeben und durch sanftes invertieren des Gefäßes vermischt. Jeweils 80 µl von diesem Gemisch wurden direkt auf eine Membran pipettiert, ohne diese zu berühren. Damit die Reaktion der DNase I ablaufen konnte, wurde das Ganze für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurden 350 µl „Buffer RW1“ in die „RNeasy spin column“ gegeben. Es wurde 15 Sekunden lang zentrifugiert, um die Membran mit dem Puffer zu waschen. Das Filtrat wurde verworfen.

Anschließend wurden 500 µl „Buffer RPE“ auf die Membran gegeben. Wieder wurde für 15 Sekunden zentrifugiert und das Filtrat verworfen.

Noch einmal wurden 500 µl „Buffer RPE“ in die „RNeasy spin column“ gegeben, diesmal wurde jedoch für zwei Minuten zentrifugiert und das „collection tube“ samt Filtrat verworfen.

Die letzten drei beschriebenen Zentrifugationsschritte dienten der Waschung der RNA mit den verschiedenen Puffern. Hierdurch wurden unerwünschte Moleküle, wie Proteine, DNA und Salze, herausgewaschen und in Form des Filtrats verworfen.

Die „RNeasy spin column“ wurde nun in einem neuen 2 ml „collection tube“ platziert. Es schloss sich eine Trockenzentrifugation für eine Minute bei 20.800 g an. Dieser Schritt sollte eine Membran frei von Ethanol und Puffer garantieren, da diese Stoffe folgende Experimente beeinflussen könnten.

Die „RNeasy spin column“ wurde nun in ein 1,5 ml RNase-freies Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gesetzt. Um die RNA wieder aus der Membran zu lösen, wurden 32 µl UltraPure™ DNase/RNase freies destilliertes Wasser (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) aufpipettiert, für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für eine Minute zentrifugiert.

Der Durchfluss wurde noch einmal auf die Membran gegeben, für eine Minute inkubiert und abschließend für eine Minute zentrifugiert, um zuvor nicht gelöste RNA aus der Membran zu lösen.

Darauffolgend wurden die Proben auf Eis gelagert, um sie vor Degradation zu schützen. Direkt im Anschluss erfolgte die photometrische Auswertung.

2.3.5 RNeasy® Lipid Tissue Kit

2.3.5.1 Übersicht

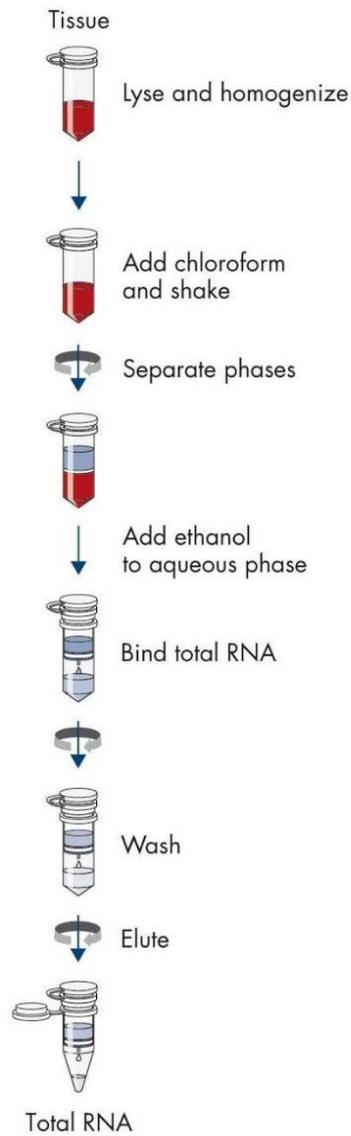


Abbildung 11 Übersicht der Arbeitsschritte des RNeasy® Lipid Tissue kit. Quelle: adaptiert von Qiagen (2018).

2.3.5.2 Vorbereitungen

Zu den 11 ml des konzentrierten „Buffer RPE“ wurden 44 ml 100%iges Ethanol gegeben.

2.3.5.3 Durchführung

Solange nicht anders beschrieben, wurden die Zentrifugationsschritte bei 20 °C und 8.000 g durchgeführt.

Nachdem die Proben wieder vollständig aufgetaut und resuspendiert vorlagen, wurden zu jeder 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gegeben. Anschließend wurden die Proben für 15 Sekunden manuell kräftig geschüttelt, bevor sie drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Damit die 3-Phasentrennung, in obere, wässrige Phase mit RNA, Interphase mit DNA und untere, rote Phase mit Proteinen, erfolgen konnte, wurden die Proben für 15 Minuten bei 12.200 g und 4 °C zentrifugiert.

Die wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein RNase-freies Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben. Es wurde zusätzlich 70%iges Ethanol im Volumenverhältnis 1:1 hinzugegeben und durch auf- und abpipettieren mit der wässrigen Phase vermischt.

700 µl dieses Gemisches wurden in eine „RNeasy Mini spin column“ gegeben, die vorher in einem 2 ml „collection tube“ platziert wurde. Daraufhin wurde dieses für 15 Sekunden zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Der Rest des ungefilterten Gemisches wurde in dieselbe „RNeasy Mini spin column“ gegeben und erneut für 15 Sekunden zentrifugiert. Auch dieses Filtrat wurde verworfen.

Nun wurden 700 µl des „Buffer RW1“ auf die Membran gegeben und ebenfalls für 15 Sekunden zentrifugiert, das Filtrat wurde verworfen.

Anschließend wurden 500 µl des „Buffer RPE“ in die „RNeasy Mini spin column“ gegeben und es wurde für 15 Sekunden zentrifugiert. Auch dieses Filtrat wurde verworfen.

Wieder wurden 500 µl „Buffer RPE“ in die „RNeasy Mini spin column“ gegeben, dieses Mal wurde jedoch für zwei Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen.

Die letzten drei beschriebenen Zentrifugationsschritte dienten der Waschung der RNA mit den verschiedenen Puffern. Hierdurch wurden unerwünschte Moleküle, wie Proteine, DNA und Salze herausgewaschen und in Form des Filtrats verworfen.

Die spin column wurde nun in einem neuen 2 ml „collection tube“ platziert. Es schloss sich eine Trockenzentrifugation für eine Minute bei 20.800 g an. Dieser Schritt sollte

eine Membran frei von Ethanol und Puffer garantieren, da diese Stoffe folgende Experimente beeinflussen könnten.

Die „RNeasy spin column“ wurde nun in ein 1,5 ml RNase-freies Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben und 32 µl UltraPure™ DNase/RNase freies destilliertes Wasser (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) auf die Membran pipettiert. Dies wurde für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eine Minute lang zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut auf die Membran gegeben, für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und ein abschließendes Mal eine Minute lang zentrifugiert.

Darauffolgend wurden die Proben auf Eis gelagert, um sie vor Degradation zu schützen. Direkt im Anschluss erfolgte die photometrische Auswertung.

2.4 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit

Durch die spektrophotometrische Untersuchung der Proben mit einem NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) wurden zwei verschiedene Werte bestimmt:

1. die RNA-Konzentration der Proben
2. der sogenannte 260/280-Quotient

Das Gerät bestimmt dazu zunächst die Absorbanz des Isolats bei einer bestimmten Wellenlänge und berechnet daraus die Konzentration der RNA. Anhand dieser Konzentration ist die Effektivität der RNA-Isolationsmethoden beurteilbar.

Zu Beginn wird am Gerät eingestellt, von welcher Probenart die Konzentration zu bestimmen ist. Für die Berechnung der Konzentration eines RNA-Isolats bedeutet dies, dass die Absorbanz bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wird. Durch Verunreinigung der Isolate, mit zum Beispiel Proteinen oder Phenol, wird jedoch eine verfälschte Absorbanz gemessen. Dadurch berechnet das Gerät bei Verunreinigungen der Probe falsche Werte für die Konzentration (Thermo Fisher Scientific, 2012).

Aus diesem Grund muss beim Bewerten der Konzentration unter anderem auch der 260/280-Quotient, welcher die Reinheit der Probe als Qualitätsmerkmal beschreibt,

beachtet werden. Er setzt sich aus der Absorbanz der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm, typisch für Nukleinsäuren, und der Absorbanz bei einer Wellenlänge von 280 nm, bei der Proteine eine hohe Absorption aufweisen, zusammen. Generell wird eine RNA-Probe mit einem 260/280-Quotienten $\sim 2,00$ als komplett rein angesehen (Sambrook & Russell, 2001; Thermo Fisher Scientific, 2012), wobei für viele Anwendungen ein minimaler 260/280-Quotient von 1,80 akzeptiert wird (Becker, Hammerle-Fickinger, Riedmaier & Pfaffl, 2010; Jeffries, Kiss, Smith & Oris, 2014).

2.4.1 Durchführung der Messung

Nachdem das Gerät wie empfohlen vor Gebrauch gereinigt wurde, wurde es mit UltraPure™ DNase/RNase freiem destilliertem Wasser (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) oder der für das jeweilige Kit verwendeten Elutionslösung kalibriert. Die Kalibrierung wurde für jede Methode separat durchgeführt.

Von jeder Probe wurden 2 μ l des Isolats auf das „measurement pedestal“ pipettiert und analysiert. Vor der Analyse der nächsten Probe, wurden sowohl das untere, als auch das obere „measurement pedestal“ gereinigt, sodass es nicht zu Vermischungen der Isolate und dadurch zu falschen Werten kam.

Nach der Analyse wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.5 Elektrophoretische Bestimmung der RNA-Integrität

Um die RNA-Qualität der Proben beurteilen zu können, wurde zusätzlich zum 260/280-Quotienten die sogenannte RNA Integrity Number (RIN) mit Hilfe eines Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bestimmt. Im Rahmen dieser Studie wurde das RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) zur Bestimmung der RNA-Integrität verwendet.

2.5.1 Lab-On-A-Chip-Technologie

Der Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bedient sich bei der Bestimmung der RNA-Integrität einer sogenannten Lab-On-A-Chip-Technologie. Auf den Chips des RNA 6000 Nano Kits (Agilent Technologies, Santa

Clara, USA) befinden sich mit Polymeren gefüllte Glaskanäle. In diesen Kanälen befinden sich ebenfalls RNA-interkalierende, fluoreszierende Farbstoffe, welche durch einen Laser aktiviert werden können. Lab-On-A-Chip bedeutet in diesem Fall, dass die zu untersuchenden Isolate nur noch in die Vertiefungen der korrekten Chips pipettiert werden müssen und diese im Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verarbeitet und ausgewertet werden (Mueller, Lightfoot & Schroeder, 2004; Schroeder et al., 2006; Agilent Technologies, 2018).

Dazu wird eine sogenannte Kapillarelektrophorese durchgeführt, um die RNA-Moleküle ihrer Größe nach aufzutrennen. Durch Anlegen einer Spannung wandern die geladenen RNA-Moleküle durch die Kanäle und werden durch die Polymere gesiebt: kleine Moleküle durchwandern die polymergefüllten Kanäle schneller als die größeren. Um die RNA-Moleküle zu erkennen, binden die angesprochenen RNA-interkalierenden Farbstoffe die RNA-Moleküle. Diese werden durch einen Laser aktiviert und vom Gerät registriert. Die Auftrennung der RNA wird durch den Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) als gelartiges Bild mit Banden, Elektropherogramm und Tabelle dargestellt (Mueller et al., 2004; Schroeder et al., 2006; Agilent Technologies, 2018).

Die Verwendung einer solchen Maschine bringt den Vorteil, reproduzierbare Ergebnisse zu generieren, da der Anwenderfehler minimiert wird. Des Weiteren muss keine aufwendige Gelelektrophorese durchgeführt werden, bei der der Anwender/die Anwenderin gegebenenfalls längere Zeit gefährlichen Stoffen, wie zum Beispiel Ethidiumbromid, ausgesetzt ist. Zuletzt bietet diese Art der Qualitätskontrolle den Vorteil nur minimale Mengen des Isolats zu verbrauchen, was vor allem bei begrenzter Probengröße wünschenswert ist (Mueller et al., 2004; Schroeder et al., 2006; Agilent Technologies, 2018).

2.5.2 RNA Integrity Number

Die Unversehrtheit der RNA bildet eine wichtige Grundlage für folgende Experimente, wie zum Beispiel im Rahmen der Genexpressionsanalyse. Aus diesem Grund wird ein Parameter zur Beurteilung der Qualität der RNA benötigt. Die RNA Integrity Number (RIN) eignet sich hierzu und wurde in den letzten Jahren zum Standard für diese Bewertung. Sie wird mit Hilfe eines Algorithmus berechnet, der die vom Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) erhobenen Daten aus

der Kapillarelektrophorese ausgewertet. Im Vergleich zum Quotienten aus 18S und 28S rRNA (28S:18S Quotient), einem geläufigen Parameter zur Beurteilung der RNA-Qualität, werden bei diesem Algorithmus nicht nur die 18S rRNA und 28S rRNA Spitzen, sondern zusätzlich auch andere Punkte der Kapillarelektrophorese, berücksichtigt (siehe Abbildung 12). Das Gerät berechnet anhand des Algorithmus eine RIN zwischen 1 und 10, wobei eine Probe mit einer RIN = 1 komplett degradierte und eine Probe mit einer RIN = 10 komplett intakte RNA aufweist (siehe Abbildung 13) (Mueller et al., 2004; Imbeaud et al., 2005; Schroeder et al., 2006; Agilent Technologies, 2018).

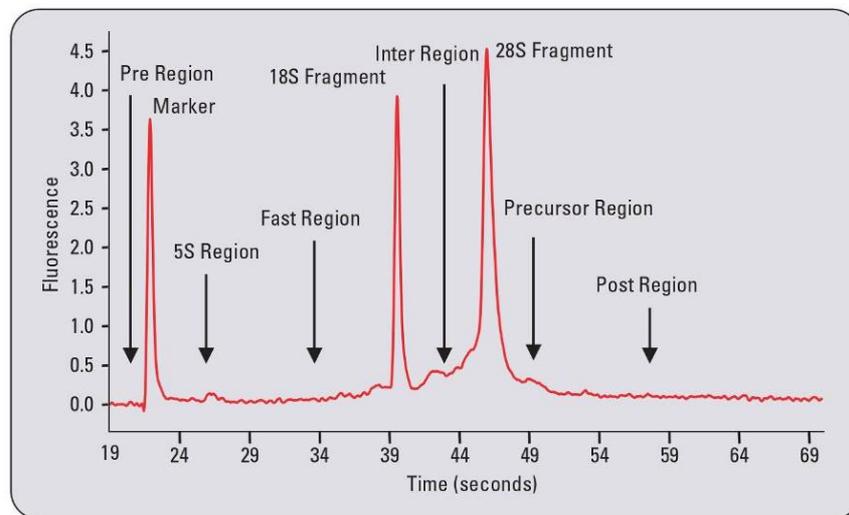


Abbildung 12 Aussagekräftige Punkte eines Elektropherogramms über die Integrität der RNA. Quelle: adaptiert von Mueller et al. (2004).

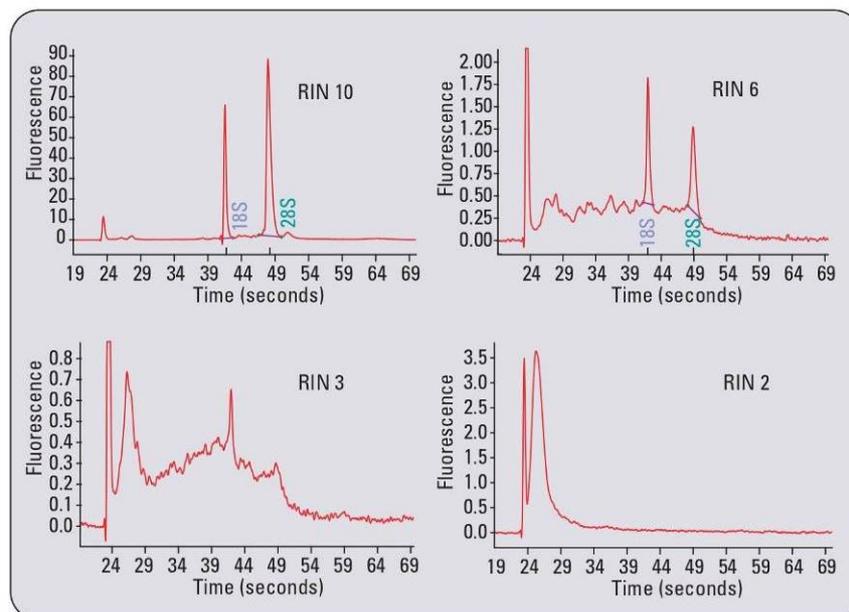


Abbildung 13 Beispielhafte Elektropherogramme für RNA-Proben verschiedener Integrität. Quelle: adaptiert von Mueller et al. (2004).

Je nachdem welche weiteren Untersuchungen mit der RNA durchgeführt werden sollen, wird eine minimale RIN gefordert. Generell ist davon auszugehen, dass ein RNA-Isolat mit einer RIN ≥ 7 bis 8 eine sehr gute Qualität für Folgeexperimente bietet (Fleige & Pfaffl, 2006; Jahn, Charkowski & Willis, 2008; Kuang, Yan, Genders, Granata, & Bishop, 2018).

Der Vorteil eines solchen Algorithmus kombiniert mit der Lab-On-A-Chip-Technologie liegt darin, dass es zur genaueren Bestimmung der Qualität kommt. Es werden zum Beispiel menschliche Ablesefehler oder -ungenauigkeiten, wie sie bei der Bestimmung des 28S:18S Quotienten von herkömmlichen Gelelektrophoresen auftreten, ausgeschlossen (Mueller et al., 2004; Imbeaud et al., 2005; Schroeder et al., 2006; Agilent Technologies, 2018).

2.5.3 Durchführung der Messung

Zur Bestimmung der RINs wurden die RNA-Isolate an das Genzentrum der LMU, Arbeitsgruppe Dr. Blum, übergeben. Dort wurde die Analyse mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und dem RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben befanden sich während des gesamten Transports auf Eis gelagert um eine Degradation der RNA zu verhindern. Im Anschluss wurden sie zur weiteren Aufbewahrung bei -80 °C verwahrt.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Graphpad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Als deskriptive Statistik wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messungen bestimmt. Da es sich pro Gewebe um vier Testgruppen gleicher Probenzahl handelte, wurde zur vergleichenden statistischen Bewertung eine One-Way ANOVA (One-Way Analysis of Variance) gefolgt von einem post hoc test (Tukey honestly significant difference test) durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden dabei folgendermaßen festgelegt und in den Diagrammen dementsprechend gekennzeichnet: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

3 Ergebnisse

3.1 Gewicht

Das durchschnittliche Gewicht, welches für jede der Methoden genutzt wurde unterschied sich weder signifikant ($p < 0,05$) für das Muskel- (siehe Abbildung 14), noch für das Fettgewebe (siehe Abbildung 15).

3.1.1 Muskelgewebe

Für das Muskelgewebe ergaben sich für die jeweilige Methode folgende Werte:

- Trizol-Methode: 127,2 mg \pm 10,15 mg
- innuPREP-Kit: 138,7 mg \pm 11,26 mg
- Aurum-Kit: 124,9 mg \pm 13,60 mg
- RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit: 132,6 mg \pm 18,36 mg

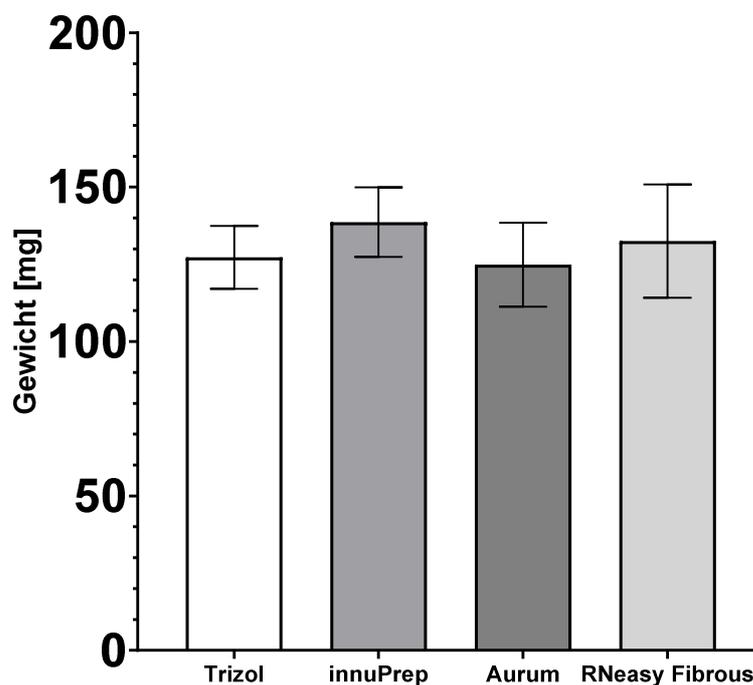


Abbildung 14 Gewicht der Muskelgewebeproben ($n = 5$ pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

3.1.2 Fettgewebe

Für das Fettgewebe ergaben sich für die jeweilige Methode folgende Werte:

- Trizol-Methode: 100,8 mg ± 26,91 mg
- innuPREP-Kit: 108,5 mg ± 47,71 mg
- Aurum-Kit: 106,8 mg ± 19,26 mg
- RNeasy Lipid Tissue Kit: 98,76 mg ± 10,05 mg

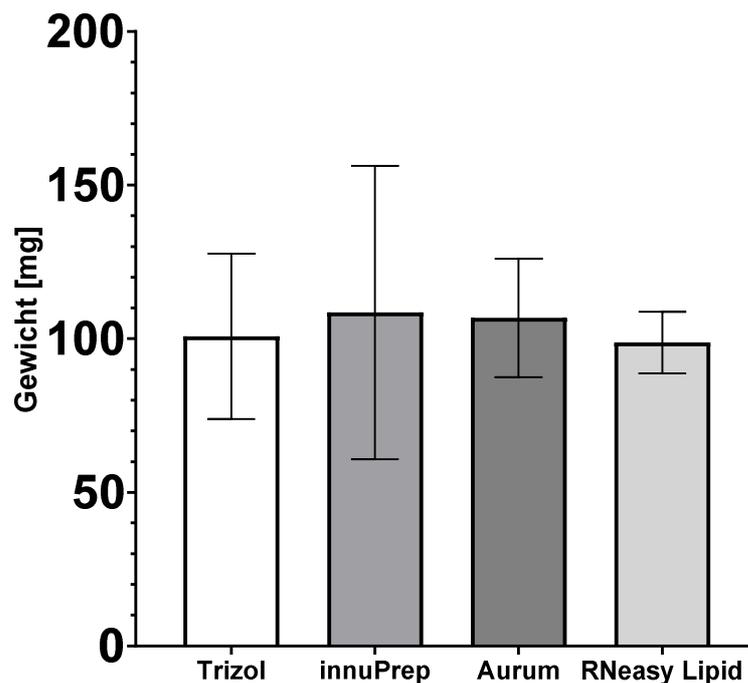


Abbildung 15 Gewicht der Fettgewebeproben (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

3.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Quantität und Reinheit

3.2.1 Muskelgewebe

3.2.1.1 RNA-Konzentration

Mit der Trizol-Methode (411,8 ng/μl ± 70,59 ng/μl) konnte durchschnittlich die höchste RNA-Konzentration erzielt werden. Sie lieferte eine signifikant höhere Konzentration als das innuPREP-Kit (159 ng/μl ± 30,72 ng/μl) mit $p \leq 0,001$ und als das Aurum-Kit (240,3 ng/μl ± 26,71 ng/μl) mit $p \leq 0,01$. Auch mit dem RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (359,8 ng/μl ± 91,76 ng/μl) konnten signifikant höhere Konzentrationen als mit dem innuPREP-Kit ($p \leq 0,01$) und dem Aurum-Kit ($p \leq 0,05$)

erzielt werden. Die Trizol-Methode und das RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit lieferten somit die durchschnittlich höchsten Konzentrationen, wobei die Ergebnisse dieser beiden Methoden sich nicht signifikant unterschieden (siehe Abbildung 16).

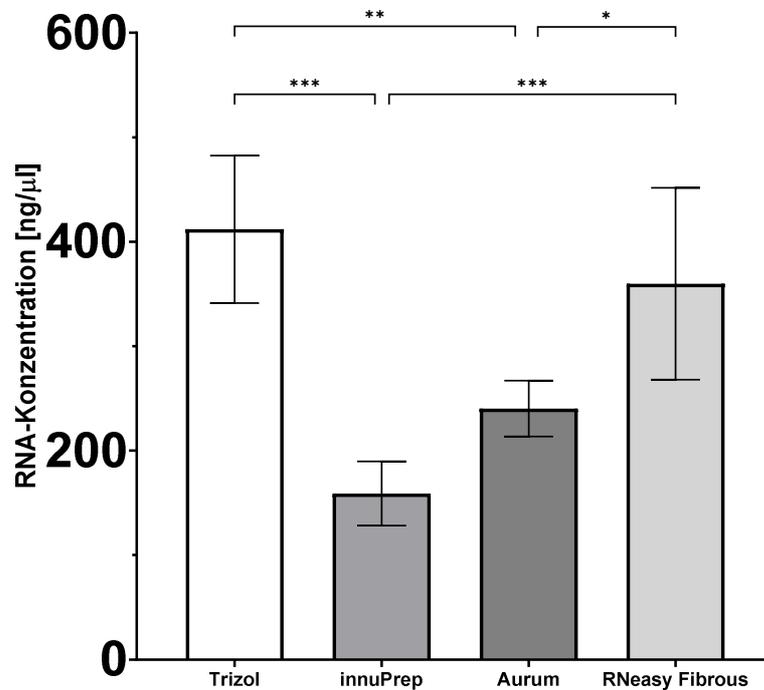


Abbildung 16 RNA-Konzentration der Isolate aus dem Muskelgewebe (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

3.2.1.2 260/280-Quotient

Für die Reinheit der RNA-Isolate ergab sich bei der Trizol-Methode ein 260/280-Quotient von $1,95 \pm 0,02$ und damit im Vergleich zum innuPREP-Kit ($2,13 \pm 0,16$) ein signifikant ($p \leq 0,05$) niedriger Wert. Im Vergleich mit dem Aurum-Kit ($2,07 \pm 0,02$) und dem RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit ($2,02 \pm 0,07$) war hingegen kein signifikanter Unterschied festzustellen. Auch die Kits unterschieden sich untereinander nicht signifikant bezüglich der Reinheit der Isolate. Es sei jedoch erwähnt, dass sowohl die Kits, als auch die Trizol-Methode sehr reine RNA-Isolate lieferten und allesamt über der geforderten Marke von 1,80 lagen (siehe Abbildung 17).

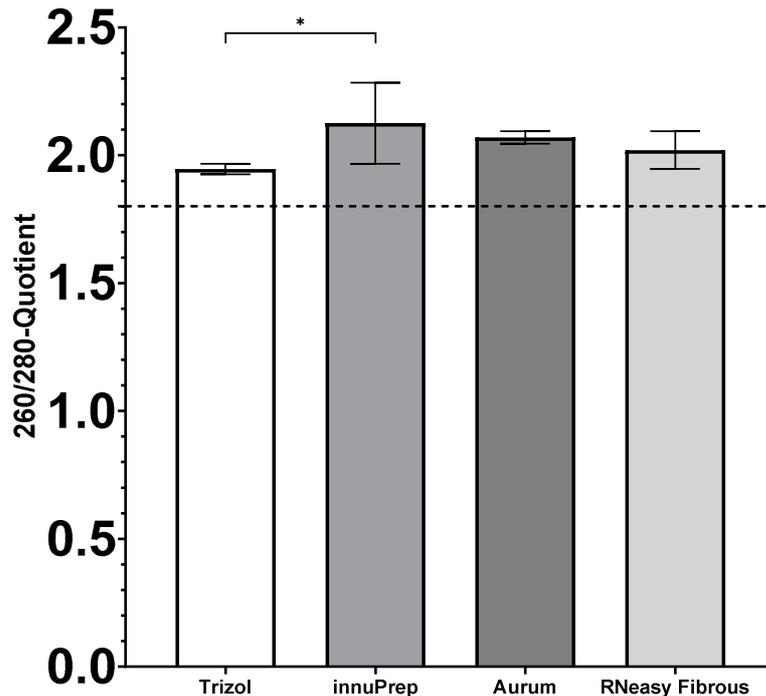


Abbildung 17 260/280-Quotient der Isolate aus dem Muskelgewebe (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Mit der gestrichelten Linie wird der für Folgeexperimente minimal geforderte 260/280-Quotient von 1,80 markiert.

3.2.2 Fettgewebe

3.2.2.1 RNA-Konzentration

Für das Fettgewebe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Methoden bezüglich der RNA-Konzentration (siehe Abbildung 18). Tendenziell zeigten die Trizol-Methode (213,7 ng/μl ± 133,8 ng/μl) und das RNeasy Lipid Tissue Kit (193,3 ng/μl ± 46,16 ng/μl) die größte Ausbeute, wobei letztgenanntes deutlich konstantere Werte lieferte. Auch mit dem innuPREP-Kit konnten hohe Konzentrationen mit großer Schwankung erzielt werden (161,9 ng/μl ± 134,7 ng/μl). Das Aurum-Kit zeigte durchschnittlich zwar die geringste Konzentration, dafür aber die konstantesten Ergebnisse (124,3 ng/μl ± 25,85 ng/μl).

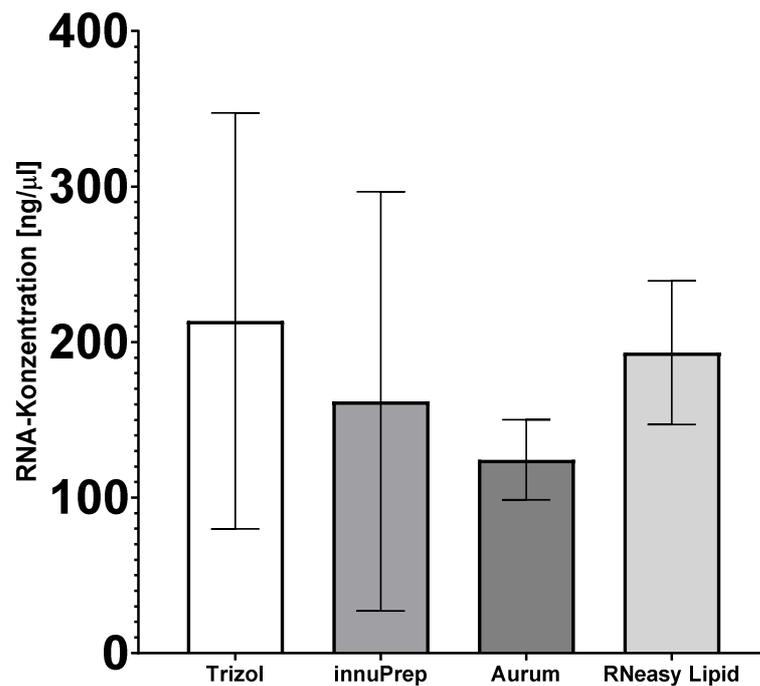


Abbildung 18 RNA-Konzentration der Isolate aus dem Fettgewebe (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

3.2.2.2 260/280-Quotient

Der 260/280-Quotient der Trizol-Methode ($1,90 \pm 0,04$) war signifikant niedriger als der 260/280-Quotient der Kits. Das innuPREP-Kit ($2,08 \pm 0,02$) lieferte im Vergleich zum RNeasy Lipid Tissue Kit ($1,98 \pm 0,03$) signifikant ($p \leq 0,01$) höhere Werte. Die mit dem Aurum-Kit erzielte Reinheit ($2,03 \pm 0,06$) unterschied sich nicht signifikant von den anderen beiden kommerziellen Kits. Auch hier sei jedoch erwähnt, dass alle Methoden ausreichend reine RNA-Isolate mit 260/280-Quotienten $> 1,80$ lieferten (siehe Abbildung 19).

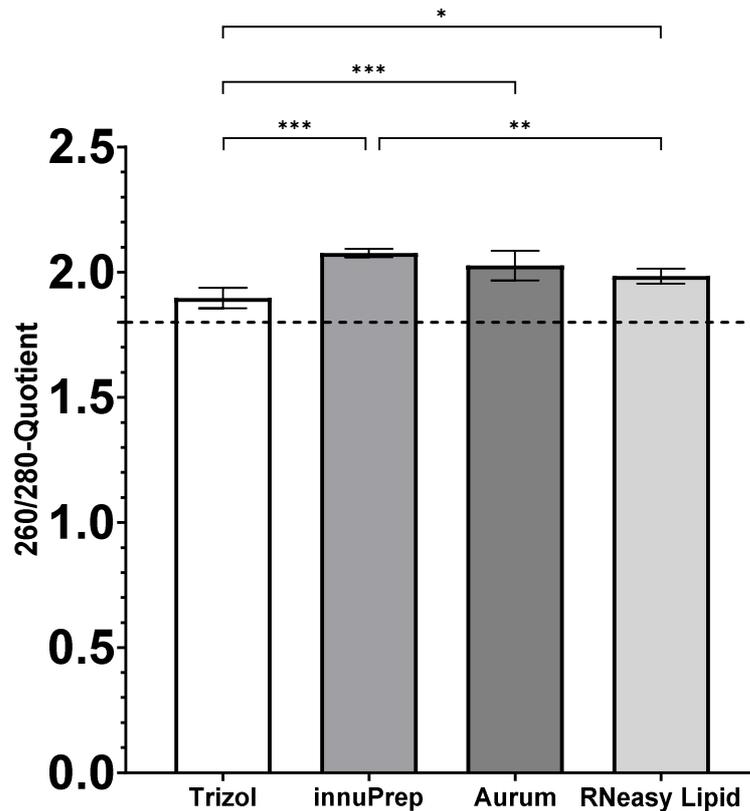


Abbildung 19 260/280-Quotient der Isolate aus dem Fettgewebe ($n = 5$ pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Mit der gestrichelten Linie wird der für Folgeexperimente minimal geforderte 260/280-Quotient von 1,80 markiert.

3.3 Elektrophoretische Bestimmung der RNA-Integrität

3.3.1 Muskelgewebe

Bei der RNA, die aus dem Muskelgewebe isoliert wurde, gab es keine signifikanten ($p \leq 0,05$) Unterschiede zwischen den Methoden bezüglich der RNA-Integrität (siehe Abbildung 20). Mit dem RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit ($8,84 \pm 0,13$) konnte durchschnittlich die qualitativ hochwertigste RNA isoliert werden. Darauf folgte das Aurum-Kit ($8,34 \pm 0,05$), welches außerdem die konstantesten RINs aller Methoden aufwies. Die Trizol-Methode ($8,00 \pm 0,27$) lieferte, wie die beiden vorher genannten Kits, RNA guter Integrität. Das innuPREP-Kit ($6,60 \pm 2,57$) hingegen lieferte die größten Schwankungen in der RNA-Integrität und war durchschnittlich betrachtet die einzige Methode, welche die minimal geforderte RIN von 7 nicht erfüllen konnte.

Es gilt zu beachten, dass bei der Qualitätsanalyse der RNA-Isolate, die mit dem innuPREP-Kit gewonnen wurden, Probleme auftraten. Es konnte nur bei drei der fünf Proben eine RIN bestimmt werden. Aus diesem Grund wurde entschieden, bei der

statistischen Analyse für die zwei fehlenden Werte vom Mittelwert der übrigen drei Proben auszugehen.

Die gelartigen Bilder mit Banden und die Elektropherogramme der einzelnen Proben sind im Anhang (Kapitel 6.1) einsehbar.

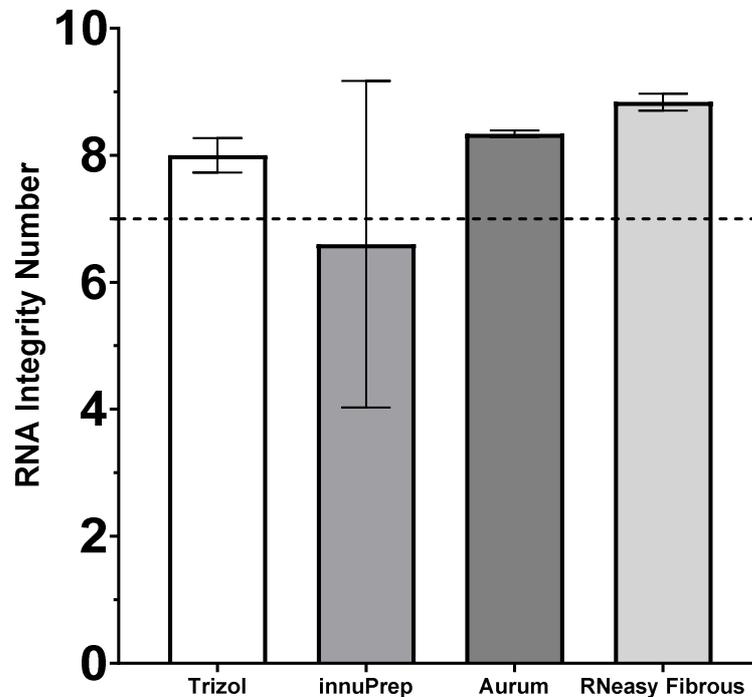


Abbildung 20 RNA Integrity Number (RIN) der Isolate aus dem Muskelgewebe (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Mit der gestrichelten Linie wird die für Folgeexperimente minimal geforderte RIN von 7 markiert.

3.3.2 Fettgewebe

Bei der RNA, die aus dem Fettgewebe isoliert wurde, gab es keine signifikanten ($p \leq 0,05$) Unterschiede zwischen den Methoden bezüglich der RNA-Integrität (siehe Abbildung 21). Auch hier zeigte das innuPREP-Kit ($4,52 \pm 3,18$) wieder die größten Schwankungen der RIN. Die Trizol-Methode ($4,24 \pm 0,51$) und das Aurum-Kit ($4,32 \pm 0,26$) hingegen lieferten die konstantesten Werte. Das RNeasy Lipid Tissue Kit ($5,34 \pm 1,55$) lieferte durchschnittlich die hochwertigste RNA. Zu beachten ist jedoch, dass mit keiner der Methoden RNA von zufriedenstellender Integrität isoliert werden konnte, da sie allesamt eine $RIN < 7$ lieferten.

Die gelartigen Bilder mit Banden und die Elektropherogramme sind im Anhang (Kapitel 6.2) einsehbar.

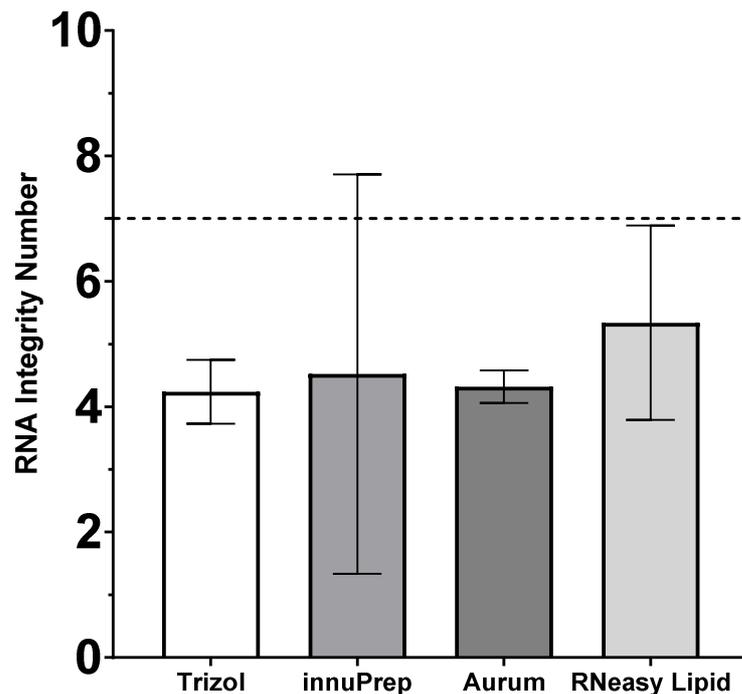


Abbildung 21 RNA Integrity Number (RIN) der Isolate aus dem Fettgewebe (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Mit der gestrichelten Linie wird die für Folgeexperimente minimal geforderte RIN von 7 markiert.

3.4 Zeit

Während der Durchführung der RNA-Isolierung wurde die Zeit für die jeweiligen Methoden gemessen. Es wurden je Durchgang fünf Proben mit derselben Methode bearbeitet. Dabei wurde die Messung nach der Homogenisierung begonnen, da diese für alle Proben dieselbe Zeit in Anspruch genommen haben sollte. Es ergaben sich folgende Zeiten:

- Trizol-Methode: circa 26 Stunden 15 Minuten
- Aurum-Kit: circa 3 Stunden 45 Minuten
- innuPREP-Kit: circa 2 Stunden 50 Minuten
- RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit: circa 2 Stunden 25 Minuten
- RNeasy Lipid Kit: circa 2 Stunden

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

In dieser Studie wurde die RNA-Isolierung aus Fett- und Muskelgewebe einer Ratte mit verschiedenen Methoden durchgeführt. Anschließend wurden die Konzentration, Reinheit und Integrität der RNA-Isolate verglichen.

Für das Muskelgewebe ergaben sich signifikante Unterschiede für die RNA-Konzentration, wobei die Trizol-Methode und das RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit durchschnittlich höhere Werte als die beiden anderen Kits lieferten. Die Reinheit der RNA überzeugte bei allen verwendeten Methoden. Einzig nach Anwendung des innuPREP-Kits war die minimal erforderliche RNA-Integrität ($RIN \geq 7$) nicht gegeben, die anderen drei Methoden lieferten konstant hohe RINs ($RIN > 8$).

Bei den Isolaten aus dem Fettgewebe ergaben sich homogenere Ergebnisse. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der RNA-Konzentration. Alle Methoden konnten zwar ausreichend reine RNA liefern, die RNA-Integrität hingegen lag bei allen vier verwendeten Methoden unter dem generell geforderten Wert ($RIN \geq 7$) für Folgeuntersuchungen. Auch für die RNA-Integrität der Proben ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Trizol-Methode

Diese Methode beruht auf der Verwendung eines Lysepuffers, der sowohl Phenol, als auch Guanidiniumthiocyanat enthält. Es handelt sich bei dieser Methode um eine reine Flüssig-Flüssig-Extraktion (siehe Kapitel 1.5).

Die Trizol-Methode ist eine weltweit verbreitete Methode um RNA zu isolieren und hat sich über die Jahre in vielen Labors etabliert (Chomczynski & Sacchi, 2006). Sie bietet den Vorteil gegenüber vielen kommerziellen Kits, dass mit ihr die komplette RNA aus einer Zellkultur oder einem Gewebe isoliert werden kann. Dies ist vor allem wichtig, wenn mit kleineren RNA-Molekülen (< 200 Nukleotide), wie zum Beispiel tRNA, gearbeitet wird (Damm et al., 2015).

Ein weiterer Vorteil für das Labor ergibt sich in der Beschaffung der Materialien. Abgesehen vom TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), oder dem Lysepuffer eines anderen Herstellers, müssen häufig keine Anschaffungen speziell für die RNA-Isolierung getätigt werden. In der Regel sind die weiteren Materialien wie RNase-freie Mikroreaktionsgefäße, Ethanol und Pipetten bereits in einem Labor, in dem mit RNA geforscht wird, vorhanden. Dadurch muss kein komplettes Kit angeschafft werden, dessen Materialien und Chemikalien ausschließlich für die RNA-Isolation genutzt werden können. Hierdurch werden Qualitätseinschränkungen durch etwaige lange Lagerung der Materialien minimiert.

Weiterhin ergibt sich mit dieser Methode vor allem bei sehr begrenzten Mengen Startgewebe ein Vorteil, indem nicht nur RNA, sondern in folgenden Schritten auch Proteine und DNA aus ein und derselben Probe gewonnen werden können. Dabei sind verschiedene Protokolle im Umlauf, die die Methode des Entwicklers optimiert haben (Hummon, Lim, Difilippantonio & Ried, 2007; Simões et al., 2013). Mit ihrem Protokoll konnten Simões et al. (2013) aus Proben, die mit Trizol behandelt wurden, noch circa 50% der Proteinerträge erzielen, die sie mit anderen reinen Proteinisolationmethoden aus unbehandelten Proben desselben Gewebes erzielten. Es ist allerdings anzumerken, dass die Proteinisolation aus einer mit Trizol behandelten Probe zwar möglich ist, jedoch nach Möglichkeit aus einer weiteren Probe erfolgen sollte. Dies liegt daran, dass nicht 100% des Proteingehalts aus Proben, die mit Trizol behandelt wurden, isoliert werden konnten (Simões et al., 2013). Andererseits ist die Tauglichkeit dieses Proteins für Folgeexperimente fraglich, was auf die denaturierenden Eigenschaften des Lysepuffers, der für die Extraktion der RNA notwendig ist, zurückzuführen sein wird. Da es sich im Gegensatz zu Proteinen bei DNA, genau wie bei RNA, um Nukleinsäuren handelt, sollten sich bei deren Isolierung aus Gewebeproben nach der Anwendung von Trizol-Reagenzien keine größeren Qualitätseinbußen ergeben.

Der wohl größte Nachteil der Trizol-Methode ist, dass sie viele potenzielle Fehlerquellen aufweist. Beispielsweise ist es bei der Phasentrennung extrem wichtig nur die wässrige Phase ab zu pipettieren und sie nicht mit den anderen Phasen zu vermischen. Bereits eine kleine Unachtsamkeit kann zur Vermischung führen, die wässrige Phase mit Salzen kontaminieren und die Probe für Folgeexperimente unbrauchbar machen. Auch beim Waschen der gefällten RNA kann es zum Abtragen

von Teilen oder auch des gesamten Pellets kommen, da dieser Arbeitsschritt komplett manuell durchgeführt wird. Dies kann zu verminderten Erträgen führen. Vor allem zeigen sich Schwierigkeiten beim Arbeiten mit geringen Gewebemengen, da das RNA-Pellet teilweise mit dem menschlichen Auge kaum wahrnehmbar ist. In diesem Fall kann es beim Pipettieren leicht zum RNA-Verlust kommen.

Der oben erwähnte Vorteil der Flexibilität durch Benutzung des Materials für andere Experimente kann gegebenenfalls auch zum Nachteil werden. Laborangestellte oder auch der Anwender/die Anwenderin selbst könnten die Materialien während anderer Experimente verunreinigen und somit die Quantität und Qualität der RNA in den Isolaten beeinflussen. Nicht nur aus diesem Grund ist es extrem wichtig, dass das Laborpersonal zu jedem Zeitpunkt auf ein sauberes Arbeiten achtet.

Um diese Voraussetzungen gewährleisten zu können, ist es bei der Trizol-Methode von besonderer Bedeutung das Personal, sowohl für die Methode selbst, aber auch für generelles Arbeiten im Labor gründlich zu schulen.

Ein letzter zu beachtender Faktor ist, dass die Durchführung dieser Methode ab der Homogenisierung circa 26 Stunden und 15 Minuten dauerte. Voraussichtlich hätte diese Zeit durch eine kürzere Zentrifugation zur Fällung der RNA minimiert werden können, jedoch wäre sie nichtsdestotrotz die zeitintensivste Methode gewesen, da auf jeden Fall eine Zentrifugation über Nacht nötig war.

4.2.2 Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit

Dieses Kit macht sowohl von der Flüssig-Flüssig-Extraktion, als auch von der Fest-Phasen-Reinigung mit Hilfe einer Membran Gebrauch. Es werden dabei auf Guanidiniumsalzen basierende Lysepuffer und Waschlösungen verwendet (siehe Kapitel 1.5).

Durch die Verwendung dieser Membranen, an die die RNA-Moleküle zwischenzeitlich binden, können im Vergleich zur Trizol-Methode Fehler im Rahmen der RNA-Fällung und anschließenden Waschung des Pellets eliminiert werden.

Ein weiterer Vorteil ist die zusätzliche Durchführung einer DNA-Verdauung. DNA-Fragmente, die sich gegebenenfalls am Ende der RNA-Extraktion in der Probe befinden, können in Folgeexperimenten, wie zum Beispiel der Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), gravierende Folgen haben (Dilworth &

McCarrey, 1992; Huang, Fasco & Kaminsky, 1996). Bei der RT-PCR würden sowohl RNA als auch DNA Fragmente multipliziert werden, wodurch es zu falschen Ergebnissen kommen kann (Dilworth & McCarrey, 1992).

Die DNA-Verdauung wird „on-column“, also in der Säule, durchgeführt. Die hinzugefügte DNase I muss im Anschluss auf jeden Fall entfernt werden, da sie bei der RT-PCR das Endprodukt verdauen würden. Herkömmliche DNA-Verdauungen erfordern die Inaktivierung der DNase I durch große Hitze, welche unter Umständen auch schädlichen Einfluss auf die RNA haben könnte (Dilworth & McCarrey, 1992; Huang et al., 1996). Eine andere Methode zur Entfernung der DNase erfordert eine sich an die DNA-Verdauung anschließende Phenolextraktion und RNA-Fällung mit Ethanol (Liang & Pardee, 1993; Rio, Ares, Hannon & Nilsen, 2010). Die Verdauung „on-column“ hingegen bietet eine elegante Möglichkeit um die DNase nach dem Verdau zu entfernen. Es werden verschiedene Waschlösungen durch die Membran gefiltert, wodurch die DNase herausgewaschen wird und verworfen werden kann.

Auch dieses Kit schafft es jedoch nicht eine Ungenauigkeit des Anwenders komplett auszuschließen, da auch hier eine Trennung flüssiger Phasen stattfindet. Deshalb besteht die Möglichkeit für das Auftreten von Fehlern beim Pipettieren und dem eventuellen Vermischen der Phasen.

Außerdem können mit diesem Kit laut Hersteller nur größere RNA-Moleküle, wie mRNA oder längere rRNA-Moleküle, isoliert werden. Kleinere RNA-Moleküle (< 200 Nukleotide), wie tRNA, 5.8S rRNA, 5S rRNA, werden hingegen herausgewaschen (Bio-Rad Laboratories, n.d.).

4.2.3 innuPREP RNA Mini Kit

Auch bei diesem Kit werden bei der Durchführung die Eigenschaften von Guanidiniumsalzen genutzt. Das Kit beruht ausschließlich auf einer Fest-Phasen-Reinigung der RNA (siehe Kapitel 1.5).

Dies bringt den Vorteil mit sich, dass der Anwenderfehler minimiert wird. Im Vergleich zu den Methoden, die von der Flüssig-Flüssig-Extraktion Gebrauch machen, können sich bei der Durchführung des innuPREP-Kits keine Phasen vermischen und dadurch Unreinheiten verursachen. Im Vergleich zur Trizol-Methode werden ebenfalls die Fehler, die bei der RNA-Fällung und Waschung des Pellets auftreten können,

eliminiert. Es bedarf dadurch keiner intensiven Schulung zur Durchführung, sodass auch unerfahreneres Personal diese Isolierung durchführen können sollte.

Erreicht wird die Isolierung der RNA durch die Nutzung zwei verschiedener Filtermembranen. Zunächst wird die DNA mit Hilfe der ersten Membran aus der Probe gefiltert, sodass das Filtrat mit der RNA weiterverwendet werden kann. Dieses wird auf eine zweite Membran gegeben, an welche die RNA bindet und die restlichen, unerwünschten Moleküle durch eine Reihe von Waschschrritten entfernt werden können. Die Entfernung der DNA aus der Probe scheint eine sehr elegante Lösung darzustellen. Es wird keine DNase I verwendet und dadurch treten keine der mit ihr assoziierten Komplikationen auf (siehe Kapitel 4.2.2).

Ein Nachteil dieses Kits ist, dass nur eine maximale Gewebemenge von 20 mg pro Durchgang bearbeitet werden kann. Bei größeren Proben stellt dies ein Problem dar.

Bei dieser Studie wurde sich dafür entschieden dieselbe Gewebemenge für alle Methoden zu verwenden, um bei der statistischen Analyse von gleichen Bedingungen ausgehen zu können. Im Falle des innuPREP-Kits bedeutete dies, dass sowohl für das Muskel- als auch das Fettgewebe die maximale Menge übertroffen wurde.

Im Rahmen der Verarbeitung der Muskelproben trat eine für den Hersteller bekannte Komplikation auf. Bei der Filtration der Probe durch den „spin filter D“ verstopfte dieser. Die vom Hersteller hierzu angeratenen Maßnahmen (bei einer höheren Geschwindigkeit zu zentrifugieren oder die Zentrifugationsdauer zu verlängern) waren wirkungslos. Infolgedessen wurden die Proben auf neue „spin filter D“ gegeben, durch die sie sich filtern ließen. Die geschilderte Komplikation lässt den Verdacht aufkommen, dass das Gewebe nicht komplett lysiert wurde. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Membranen bei einem hohen Angebot an DNA und RNA dermaßen verstopfen, dass keine weiteren Substanzen oder Flüssigkeiten mehr passieren können.

Nichtsdestotrotz wurde in den Herstellerangaben sowohl bei der Verwendung des „spin filter D“, als auch des „spin filter R“, gewarnt. Es scheint also ein regelmäßig vorkommendes Problem dieses Kits zu sein. Im Rahmen der Isolierung der RNA aus dem Fettgewebe trat dieses Problem bei keinem der beiden Filter auf. Eventuell lässt sich dies auf die unterschiedliche Zusammensetzung der beiden Gewebearten zurückführen.

Der Hersteller gibt in seinem Protokoll an, dass mit diesem Kit die gesamte RNA aus der Probe herausgefiltert werden kann (Analytik Jena, 2018). Dies wäre im Vergleich zu den anderen Kits ein bedeutender Vorteil, da diese bei RNA mit einer Stranglänge von < 200 Nukleotide versagen. Ob das innuPREP-Kit tatsächlich in der Lage ist die gesamte RNA zu isolieren, müsste in einer weiteren Studie untersucht werden. Aus anderen Studien ist bekannt, dass nicht alle Kits alle RNA-Typen gleich gut isolieren, obwohl sie damit werben die komplette RNA zu extrahieren (Brown et al., 2018).

Von den getesteten Methoden ist dieses Kit wahrscheinlich das bedienerfreundlichste. Jedoch können auch hier unerwartete Probleme, wie oben beschrieben, auftreten, die einen unerfahrenen Anwender überfordern.

4.2.4 RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit

Dieses Kit beruht ebenfalls ausschließlich auf dem Prinzip der Fest-Phasen-Reinigung. Es wird Gebrauch von Guanidinium-Thiocyanat und β -Mercaptoethanol gemacht (siehe Kapitel 1.5).

Es handelt sich hierbei um ein Kit, welches speziell für faserreiches Gewebe, wie zum Beispiel das der Aorta, des Herz- oder des Skelettmuskels, entwickelt wurde. Eine Besonderheit stellt die Verwendung der Proteinase K dar. Wie schon von Wiegers & Hilz (1971) beschrieben, inaktiviert diese Serinprotease die im Gewebe enthaltenen Ribonukleasen. Sie stellten fest, dass die Proteinase K die RNA nicht nur vor dem Abbau schützt, sondern auch, dass die Protease selbst keinen degradierenden Einfluss auf die RNA hat, wie dies bei anderen Ribonukleaseinaktivatoren der Fall war. Zugleich ist sie natürlich für die Anwendung bei proteinreichen Geweben äußerst geeignet, da sie auch andere Proteine und Enzyme spaltet. Die Spaltprodukte können dadurch besser von der RNA getrennt werden.

Ebenfalls macht dieses Kit Gebrauch von einer „on-column“ DNA-Verdauung. Dies bietet die in Kapitel 4.2.2 bereits erklärten Vorteile. Die Durchführung ist identisch zu der des Aurum-Kits, da auch hier die DNase I nach der Inkubation mit einer Waschlösung aus der Membran entfernt wird. Auch hier sind also keine komplizierten Schritte nötig, um die DNase I zu inaktivieren und zu entfernen, was sich schonend auf die RNA auswirkt.

Da es sich bei diesem Kit um eine komplette Fest-Phasen-Reinigung handelt, wird auch hier der Anwenderfehler im Vergleich zu Flüssig-Flüssig-Extraktionen minimiert. Es können weder Vermischungen von Phasen auftreten, noch kann RNA beim Fällern oder Waschen eines Pellets verloren gehen.

Dieses Kit ist laut Hersteller jedoch ebenfalls nicht in der Lage RNA-Moleküle mit einer Länge von < 200 Nukleotide (zum Beispiel 5.8S rRNA, 5S rRNA oder tRNA) zu isolieren, da diese im Verlauf der Filtrationsschritte herausgewaschen werden (Qiagen, 2018).

Genau wie beim innuPREP-Kit, wird vom Hersteller angegeben, dass sich dieses Kit nur für eine begrenzte Menge Gewebe (30 mg) eignet. Auch hier sei noch einmal erwähnt, dass entschieden wurde, keine signifikant unterschiedlichen Mengen des Ausgangsmaterials zu verwenden, um dieselbe Grundlage für den Vergleich der Methoden zu schaffen. Während der Durchführung traten bei diesem Kit jedoch keine Komplikationen auf.

4.2.5 RNeasy® Lipid Tissue kit

Dieses Kit zeigt Merkmale der Flüssig-Flüssig-Extraktion, aber auch der Fest-Phasen-Reinigung. Es handelt sich hierbei um ein Kit, welches für verschiedenste Gewebe genutzt werden kann. Laut Hersteller eignet es sich unter anderem für die RNA-Extraktion aus Geweben wie dem Fettgewebe, aus welchem es sich normalerweise schwieriger gestaltet intakte RNA zu isolieren. Auch dieses Kit macht Gebrauch von den Eigenschaften von Phenol und Guanidiniumsalzen (siehe Kapitel 1.5).

Durch die Verwendung einer Silikagel-Membran, an die die RNA-Moleküle zwischenzeitlich binden, können im Vergleich zur Trizol-Methode Fehler im Rahmen der RNA-Fällung und anschließenden Waschung des Pellets eliminiert werden.

Auch dieses Kit schafft es jedoch nicht den Anwenderfehler komplett auszuschließen, da auch hier eine Trennung flüssiger Phasen stattfindet. Deshalb besteht die Möglichkeit für das Auftreten von Fehlern beim Pipettieren und dem eventuellen Vermischen der Phasen.

Ein weiterer Nachteil ist auch hier, dass sich laut Hersteller mit diesem Kit RNA-Moleküle einer Länge von < 200 Nukleotiden nicht herausfiltern lassen. Sie gehen im

Laufe der Waschvorgänge verloren. Dies schließt RNA-Moleküle wie zum Beispiel tRNA, 5S rRNA oder 5.8S rRNA ein (Qiagen, 2018).

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Muskelgewebe

Mit der Trizol-Methode und dem RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit konnten für das Muskelgewebe der Ratte die höchsten RNA-Konzentrationen erzielt werden. Allerdings ergab sich für die mit diesen Methoden erzielten Konzentrationen auch die größte Streuung.

Die Streuung der RNA-Konzentrationen in den Isolaten, die mit der Trizol-Methode gewonnen wurden, könnte unter Umständen auf Anwenderfehler bei der Durchführung zurückzuführen sein. Bei jeder Probe musste individuell versucht werden so viel wie möglich der wässrigen Phase, und damit so viel wie möglich der RNA, zu überführen. Gleichzeitig durfte es jedoch nicht zu einer Phasenvermischung kommen, da die Proben hierdurch unbrauchbar geworden wären. Eine minimale Vermischung hätte bereits zur Übertragung von Phenolen oder Guanidiniumsalzen führen können, welche wiederum Folgeexperimente beeinflusst hätten. Hierdurch können sich unterschiedliche Volumina beim Überführen der wässrigen Phase jeder Probe ergeben haben.

Ein weiterer Schritt, durch den es zu den unregelmäßigen Ergebnissen gekommen sein kann, ist das Waschen des Pellets mit Ethanol. Nach jeder Waschung musste es trocken pipettiert werden. Im Rahmen dieses Schritts wurden eventuell Teile des Pellets abgetragen und somit auch die sich in ihm enthaltene RNA.

Für die verhältnismäßig größere Streuung der erzielten RNA-Konzentrationen mit dem RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit könnten die unterschiedlichen Gewebemengen der Proben verantwortlich gewesen sein. Es lagen keine signifikanten Unterschiede für das Gewicht der Proben jeder Methode vor. Nichtsdestotrotz zeigten die Proben, aus denen die RNA mit dem RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit isoliert wurde, mit einer Standardabweichung von 18,3 mg die größte Streuung im Gewicht. Wird vom selben RNA-Gehalt pro Muskelmenge ausgegangen, führt dies zwangsläufig auch zu größeren Schwankungen der RNA-Konzentration in den Isolaten.

Das innuPREP-Kit und das Aurum-Kit hingegen erbrachten konstantere Werte, was womöglich daran liegt, dass diese Kits weniger anfällig für Anwenderfehler sind. Allerdings wurden mit diesen beiden Kits durchschnittlich signifikant geringere Konzentrationen erzielt. Aus den Ergebnissen der Trizol-Methode und des RNeasy Fibrous Tissue Mini Kits geht hervor, dass in den Gewebeproben größere Mengen RNA vorlagen. Offenbar konnten diese mit den anderen beiden Kits jedoch nicht komplett isoliert werden.

Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die Membranen, an denen die RNA-Moleküle zwischenzeitlich gebunden vorlagen, mit RNA aufsättigten. Während des Experiments wurden die Membranen in mehreren Schritten gewaschen und somit wurden auch die nicht-gebundenen RNA-Moleküle ausgewaschen und verworfen. Dies würde wiederum bedeuten, dass mit dem innuPREP- und dem Aurum-Kit bei großem RNA-Angebot nur ein gewisser Teil der Gesamt-RNA extrahiert werden kann. Es ist wahrscheinlich, dass auch die Membran des RNeasy Fibrous Tissue Mini Kits ab einem gewissen RNA-Angebot aufsättigt. Diese Schwelle scheint jedoch deutlich höher zu liegen, da mit diesem Kit im Rahmen der Studie höhere Konzentrationen als mit den anderen Kits erzielt werden konnten und sie sich außerdem nicht signifikant von denen der Trizol-Methode unterschieden.

Das geschilderte Problem der verstopften Membranen bei Verwendung des innuPrep-Kits, welches während des Versuchs deutlich zu beobachten war, könnte auch bei den anderen Kits in abgeschwächter Form eine Rolle gespielt haben. Dadurch wurde beim innuPrep-Kit offenbar neben der DNA auch RNA aus den Proben gefiltert oder herausgewaschen und anschließend verworfen. Die durchschnittlich zweithöchste Konzentration lieferte jedoch das RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit. Ein Faktor hierfür könnte der Proteinverdau durch die Proteinase K sein. Mit der Proteinase wurde unlysiertes Material ein weiteres Mal behandelt, wodurch Proteine zu kleineren Spaltprodukten abgebaut wurden und in den Waschschritten besser herausgewaschen werden konnten. Die RNA konnte hierdurch besser Bindungen mit der Membran ausbilden und dementsprechend konnten höhere Konzentrationen in den endgültigen Isolaten erzielt werden.

Es gilt jedoch zu beachten, dass mit dem Aurum-Kit und dem RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit kleine RNA-Moleküle (< 200 Nukleotide), wie zum Beispiel tRNA, nicht isoliert wurden. Damm et al. (2015) konnten zeigen, dass die Trizol-Methode sich

hingegen für kleinere RNA-Moleküle sehr gut eignet. Dies könnte eine zusätzliche Erklärung für die niedrigeren Erträge der Kits sein. Wenn hiervon ausgegangen wird, erscheint es jedoch inkohärent, dass das innuPREP-Kit die insgesamt niedrigste Konzentration lieferte, da vom Hersteller beworben wird, dass es die gesamte RNA isoliert (Analytik Jena, 2018). In einer weiteren Studie müsste dies überprüft werden, wobei wahrscheinlicher erscheint, dass auch diese membranbasierte Methode RNA erst ab einer Nukleotidlänge von > 200 isoliert.

Eine Erklärung für die niedrige Konzentration, die mit dem innuPREP-Kit erreicht wurde, könnte die maximale Bindungskapazität der Membran sein. Diese wird vom Hersteller bei $100 \mu\text{g}$ RNA festgelegt (Analytik Jena, 2018). Allerdings wurde sie in dieser Studie bei Weitem nicht erreicht ($99 \text{ ng}/\mu\text{l} * 32 \mu\text{l} = 3,168 \mu\text{g}$).

Das innuPREP-Kit lieferte im Vergleich zur Trizol-Methode signifikant reinere RNA. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass alle vier getesteten Methoden eine ausreichende Reinheit erzielen konnten und sich somit bei keiner ein Vorteil für Folgeexperimente ergab.

Bezüglich der RNA-Integrität schnitt das innuPREP-Kit erneut am Schlechtesten ab, da mit ihm nur eine durchschnittliche RIN von 6,60 erzielt wurde. Sowohl die Trizol-Methode, als auch das Aurum- und das RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit erzielten konstant eine RIN > 8 . Obwohl sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Methoden zeigten, wäre eine Probe mit einer RIN von 6,60 für Folgeexperimente nur eingeschränkt brauchbar (Fleige & Pfaffl, 2006; Jahn et al., 2008; Kuang et al., 2018).

Es ist jedoch zu beachten, dass sich für die Proben des innuPREP-Kits nur drei von fünf RINs ermitteln ließen. Dieses Problem könnte auf einen Anwenderfehler beim Bedienen des Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) oder aber auf einen technischen Fehler des Geräts zurückzuführen sein. Ebenfalls könnte es an den Proben selbst gelegen haben und ein Indikator für deren mangelnde Qualität sein. Da die Proben für diese Analyse an ein externes Labor weitergeleitet wurden, war die Fehlerquelle retrospektiv nicht ausmachbar.

Wie in den Kapiteln 4.2.3 und 4.2.4 bereits angesprochen, wurden insbesondere bei der Verwendung des innuPREP-Kits und des RNeasy Fibrous Tissue Mini Kits die von den Herstellern maximal empfohlene Gewebemenge am deutlichsten überschritten. Die Hersteller warnen davor, dass dies zu verminderten RNA-Erträgen

oder RNA verminderter Qualität führen kann. Interessanterweise war beim innuPREP-Kit beides der Fall. Das RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit hingegen lieferte nichtsdestotrotz sowohl für die RNA-Konzentration (durchschnittlich zweithöchster Wert), als auch für die RNA-Integrität (durchschnittlich höchster Wert) exzellente Werte. Das RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit scheint dementsprechend eine gewisse Resistenz gegen äußere Störfaktoren aufzuweisen.

Die Tendenz, dass mit der Trizol-Methode höhere RNA-Konzentrationen aus Muskelgewebe gewonnen werden können und dass sie auch bezüglich der Qualität den membran-basierten Methoden nicht signifikant unterlegen ist, wurde von Hong et al. (2015) für menschliches Herzmuskelgewebe und von Kuang et al. (2018) für menschliches Skelettmuskelgewebe gezeigt. Hieraus kann gefolgert werden, dass, obwohl die Ratte eine andere Spezies ist, sich die Isolationsmethoden bei der Durchführung an ihrem Muskelgewebe ähnlich wie beim Menschen verhalten. Dieses Erkenntnis liefert eine ausgezeichnete Grundlage für die Genexpressionsanalysen am Gewebe der Ratte, welche im späteren Verlauf auf menschliches Gewebe übertragen werden sollen. Die Laborangestellten können für die Durchführung einer einzigen Methode ausgebildet werden und diese sowohl am Muskelgewebe der Ratte, als auch an dem des Menschen durchführen. Sie müssen dementsprechend nicht wiederholt zwischen verschiedenen Methoden hin- und herwechseln.

Abschließend kann gesagt werden, dass bereits eine Vielzahl an RNA-Extraktionsmethoden existiert, mit denen effektiv RNA aus dem Muskelgewebe isoliert werden kann. Je nach Bedarf und Möglichkeiten muss entschieden werden, welche der hier getesteten Methoden sich am besten eignet. In dieser Studie zeigten sich die Trizol-Methode und das RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) jedoch als besonders effektiv. Mit ihnen konnten im Vergleich zu den anderen beiden getesteten Kits signifikant höhere RNA-Konzentrationen erzielt werden. Untereinander unterschieden sie sich dabei weder in der Konzentration, noch in der Qualität der isolierten RNA signifikant. Die Trizol-Methode besitzt den Vorteil, dass mit ihr das komplette RNA-Spektrum isoliert werden kann. Das RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit ist im Vergleich jedoch deutlich zeitsparender, wodurch schneller Ergebnisse geliefert werden und zeitnah weitere Experimente mit der RNA durchgeführt werden können. Außerdem kann dieses Kit durch sein anwenderfreundliches Design tendenziell auch von unerfahrenem Laborpersonal

angewendet werden. Aufgrund des speziellen Fokus des RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit auf der RNA-Extraktion aus fibrösem Gewebe zum Beispiel durch die Verwendung der Proteinase K, überrascht es nicht, dass es mit äußerst guten Ergebnissen für die Anwendung auf Muskelgewebe abschloss.

4.3.2 Fettgewebe

Weltweit zeigen sich Schwierigkeiten bei der RNA-Extraktion aus dem Fettgewebe verschiedener Spezies. Zum einen liegt dies wahrscheinlich an der geringen Zelldichte im Fettgewebe, dadurch dass die Zellen verhältnismäßig groß sind (Durchmesser bis zu 160 μm). Andererseits kommt erschwerend dazu, dass der Nukleinsäuregehalt in diesen wenigen Zellen relativ gering ist. Die Zellen können im Gegensatz dazu sehr hohe Triglyceridkonzentrationen (bis zu 95% des Zellvolumens) aufweisen, welche gewisse Komplikationen bei der Isolierung der RNA verursachen können. Diese Eigenschaften des Fettgewebes führen dazu, dass die Protokolle, die sich im Umlauf befinden, häufig geringe RNA-Erträge oder RNA schlechter Qualität liefern (Janke, Engeli, Gorzelniak & Sharma, 2001; Cirera, 2013; Sinitsky, Matveeva, Asanov & Ponasenkov, 2018).

In dieser Studie wiesen alle getesteten Methoden diese Problematik auf. Bezüglich der Konzentration unterschieden sich die Isolate aus dem Fettgewebe zwar nicht signifikant, jedoch zeigen sie im Vergleich zu den Muskelgewebeproben im Durchschnitt einen geringeren RNA-Ertrag. Dies war aufgrund der Annahme eines geringen Nukleinsäuregehalts im Fettgewebe zu erwarten.

Die RNA-Isolate der Trizol-Methode waren signifikant unreiner, als die der drei kommerziellen Kits. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es bei der Verarbeitung von Fettgewebe mit dieser Methode zu leichten Verunreinigungen kommen kann. Diese werden bei den Kits durch ein anwenderfreundliches Design scheinbar minimiert. Jedoch ist anzumerken, dass sowohl die Proben aller Kits, als auch die der Trizol-Methode den minimal geforderten 260/280-Quotienten von 1,8 übertrafen und aufgrund dessen als rein genug für Folgeexperimente anzusehen waren.

Das eigentliche Problem aller Methoden zeigte sich in der RNA-Integrität. Keine der Methoden konnte diesbezüglich überzeugen und es wurden ausschließlich RINs < 7 erzielt.

Die mangelhaften RINs könnten auf den hohen Triglyceridanteil zurückzuführen sein. Nach der Lyse des Gewebes bildete sich eine hydrophobe Fettschicht, die auf der flüssigen Probe schwamm. Diese Fettschicht enthielt voraussichtlich die aus den Zellen freigesetzten Triglyceride. Auch Janke et al. (2001) beobachteten diese Fettschicht und folgerten aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Adipozyten, dass sich neben den Triglyceriden wahrscheinlich auch intakte Zellen vorfanden, die durch die Ansammlung in dieser Schicht nicht in Kontakt mit dem Lysepuffer kamen. In folgenden Schritten musste bei allen Methoden diese Fettschicht mit der Pipettenspitze durchstoßen werden, um die sich darunter befindliche RNA-haltige Probe abpipettieren zu können. Hierbei war es nicht möglich auszuschließen, dass zumindest kleinere Fettanteile überführt wurden. Dies könnte zu einer verminderten RNA-Qualität führen, wenn mit diesen Fettbläschen auch minimal RNasen oder unlysierte Fettzellen überführt wurden.

Es wäre außerdem vorstellbar, dass der hohe Triglyceridanteil im Gewebe die Lysepuffer direkt beeinflusst und die RNasen bereits während des Lysevorgangs weniger effizient inaktiviert werden (Sharma, Golla, Singh & Onteru, 2018). Alle Methoden beruhen auf der Verwendung eines Guanidiniumsalzes zur RNase-Inaktivierung, wodurch sich erklären ließe, dass die Ergebnisse der Qualitätsmessung bei allen Methoden ähnlich ausfielen.

Da sich diese Probleme, wie oben bereits angesprochen, nicht nur in unserer Studie zeigten, gibt es bereits einige Ansätze für eine verbesserte RNA-Extraktion aus Fettgeweben.

2001 machten Janke et al. einige Modifikationen für eine Reihe von Protokollen und Kits. Unter anderem versuchten sie aufgrund der erschwerten Lyse des Fettgewebes das 5-fache Volumen des empfohlenen Lysepuffers zu verwenden. Dies führte allerdings bei allen, bis auf bei einer membran-basierten Methode, zu unreinen Isolaten. Abgesehen von der membran-basierten Methode des Herstellers Qiagen wurde maximal ein 260/280-Quotient von 1,62 erzielt. Außerdem wurde bei dieser Studie kein Qualitätsmerkmal, wie zum Beispiel die RIN oder der 28S:18S Quotient, angegeben. Bustin et al. (2009) stellten eine Reihe von Qualitäts- und

Beurteilungsmerkmalen zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Studien zusammen, die sich mit der RNA-Isolierung und RT-PCR beschäftigen. Laut diesen Richtlinien (MIQE-Guidelines) ist eine Angabe zur Integrität der RNA unabdingbar. Janke et al. (2001) tun dies jedoch nicht, wodurch Zweifel an der Effizienz ihrer Anpassungen aufkommen. Insbesondere aufgrund der Tatsache, dass mit den in dieser Studie verwendeten Protokollen im Durchschnitt reinere RNA-Isolate erzielt werden konnten, sind ihre Anpassungen wahrscheinlich nicht geeignet.

Cirera veröffentlichte 2013 ein Protokoll, in dem die Trizol-Methode mit einer membran-basierten Methode kombiniert wird. Dieses Protokoll wurde am Fettgewebe des Schweins getestet. Es konnte im Vergleich zur regulären Trizol-Methode zwar tendenziell mehr RNA besserer Qualität isoliert werden, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant.

Sinitsky et al. haben 2018, auf den Ergebnissen von Cirera (2013) basierend, ein weiteres Protokoll entwickelt, welches die Trizol-Methode und ein membran-basiertes Kit kombiniert. Sie konnten mit dieser Kombination im Vergleich zur reinen Trizol-Methode und zum reinen membran-basierten Kit eine signifikant höhere Reinheit erzielen. Im Vergleich zum reinen membran-basierten Kit erzielten sie sogar eine signifikant höhere Konzentration. Unglücklicherweise werden auch bei dieser Studie keine Angaben über die Integrität der RNA in Form von RIN oder 28S:18S Quotient gemacht. Dies lässt auch hier Zweifel aufkommen, da in unserer Studie ebenfalls reine RNA ausreichender Konzentration isoliert werden konnte, die geforderte Integrität jedoch nicht vorlag.

Sharma et al. (2018) verwendeten einen anderen Ansatz und arbeiteten mit zwei Lysepuffern: Puffer I basierte auf Natriumdodecylsulfat (SDS) und Desoxycholsäure. Diese Stoffe emulgierten die Fettpartikel, die auf den homogenisierten Proben schwammen. Dadurch sollten sie sich nicht in der wässrigen Phase ansammeln oder auf ihr treiben. Zusätzlich enthielt dieser Puffer β -Mercaptoethanol, welches die RNasen inaktivierte. Puffer II basierte auf Guanidiniumchlorid, welches ebenfalls der RNase-Inaktivierung diente. Sie konnten mit dieser Methode reine RNA von guter Integrität (RIN > 7) aus dem Fettgewebe eines Büffels gewinnen. Sie gaben jedoch an, dass dieses Protokoll speziell für das Fettgewebe eines Büffels entwickelt wurde. Sie haben sich bei der Entwicklung des Protokolls an der Fettsäurezusammensetzung dieses Gewebes orientiert, weshalb sie davor warnen,

dass diese beim Fettgewebe anderer Organismen sehr unterschiedlich sein kann. Die Anwendung dieser Methode am Fettgewebe anderer Organismen könnte laut der Arbeitsgruppe deshalb andere Ergebnisse liefern.

4.4 Limitationen der Studie

Wie jede Studie, zeigte auch die vorliegende gewisse Limitationen auf.

Es wurde zum einen nur eine begrenzte Anzahl von Methoden getestet. Es war bekannt, dass es viele andere Kits von anderen Firmen gibt und dass viele Labore ihre eigenen Protokolle auf der Basis von erhältlichen Kits/Protokollen erstellt haben. Es war nicht möglich, jede dieser Methoden zu testen, weshalb einige repräsentative Methoden ausgewählt wurden, die jeweils unterschiedliche Charakteristika aufwiesen.

Es war ebenfalls bekannt, dass es zwischen verschiedenen Spezies Unterschiede bezüglich der Beschaffenheit der Gewebe gibt und dass die hier erzielten Ergebnisse eventuell nicht auf andere Tiere oder gar menschliches Gewebe übertragbar sind.

Wie aus dieser Studie entnommen werden konnte, unterscheiden sich bereits verschiedene Gewebearten desselben Organismus bezüglich ihrer Ergebnisse der RNA-Isolierung anhand verschiedener Methoden. Genau genommen, müsste jedes Gewebe individuell untersucht werden, um für jedes die optimale Methode zu finden. Im Rahmen der Möglichkeiten wurde beschlossen, diese Studie am Muskel- und Fettgewebe einer Ratte durchzuführen, da diese Gewebe eine wichtige Rolle in der Forschung des Bone Tissue Engineerings spielen (De Ugarte et al., 2003; Fraser et al., 2006; Betz et al. 2009; Betz et al. 2010; Wosczyzna et al., 2012).

4.5 Ausblick

Für die RNA-Isolierung aus dem Fettgewebe wird auch in Zukunft noch nach einer optimalen Methode gesucht werden. Sharma et al. (2018) lieferten einen vielversprechenden Ansatz, für den in Zukunft getestet werden muss, ob er auch auf das Fettgewebe anderer Organismen anwendbar ist.

Außerdem ist vorstellbar, dass noch weitere Puffer entwickelt werden, um die Lyse des Fettgewebes zu optimieren. Es muss nach einer Möglichkeit gesucht werden, die

fettreiche Schicht der Probe zu entfernen und dabei eine Vermischung mit der RNA-haltigen Phase zu vermeiden. Erst wenn dies gelingt und intakte RNA in ausreichender Menge isoliert werden kann, wird auch für die Genexpressionsforschung am Fettgewebe eine gute Grundlage geschaffen.

Insgesamt ist anzumerken, dass der Faktor Mensch, wie bei vielen anderen Tätigkeiten im Labor, auch bei der RNA-Isolierung eine große Rolle spielt. Mit den kommerziell erhältlichen Kits wurde bereits versucht, den Anwenderfehler zu minimieren. In Zukunft ist jedoch vorstellbar, dass Maschinen die gesamte RNA-Isolierung durchführen werden, um diesen Faktor komplett zu eliminieren. Die Technisierung verschiedenster Arbeitsschritte in wissenschaftlichen Laboren hat sich in der Vergangenheit bereits als effizient und zuverlässig erwiesen und wird auch in Zukunft weiter voranschreiten.

Erst wenn eine zuverlässige RNA-Extraktionsmethode für das Fettgewebe verfügbar ist, werden ideale Bedingungen für die Entwicklung von Therapiemöglichkeiten im Rahmen des Bone Tissue Engineerings anhand dieses vielversprechenden Gewebes geschaffen.

5 Zusammenfassung

Aufgrund einer stets alternden Bevölkerung und damit einer steigenden Prävalenz von Knochenerkrankungen, steigt das Interesse am Bone Tissue Engineering. Muskel- und Fettgewebe, in denen mesenchymale Stammzellen anzufinden sind, spielen eine vielversprechende Rolle bei der Entwicklung von Therapiemöglichkeiten zur Knochenregeneration. Im Rahmen der Forschung auf diesem Gebiet wird die Genexpressionsanalyse genutzt, um das Verhalten der Gewebe unter verschiedenen Einflussfaktoren zu untersuchen. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Studie eine RNA-Isolationsmethode aus dem großen Angebot ausfindig zu machen, die auf Muskel- und/oder Fettgewebe anwendbar ist und ausreichende Mengen RNA guter Qualität liefert. Hierdurch sollte eine zuverlässige Grundlage für Folgeexperimente und die Entwicklung von knochenregenerativen Therapien geschaffen werden.

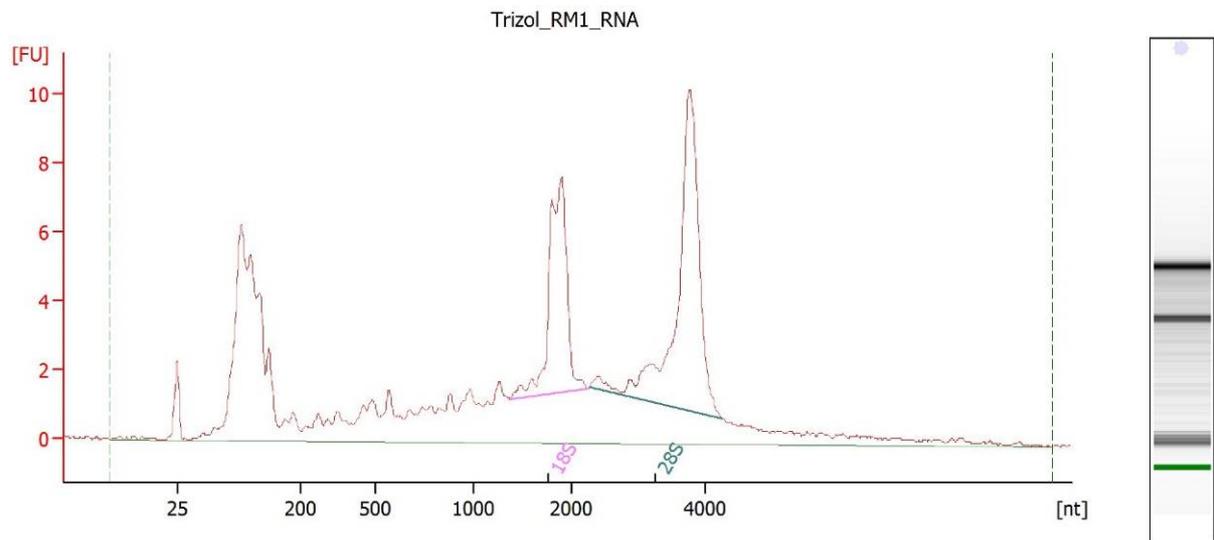
Es wurden vier verschiedene kommerziell erhältliche Kits und die Trizol-Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) getestet. Alle Methoden zeigten unterschiedliche Charakteristika, wobei es sich bei der Trizol-Methode um eine reine Flüssig-Flüssig-Extraktion handelte. Die Kits bedienten sich dem Prinzip der Fest-Phasen-Reinigung oder kombinierten sie mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion. Es wurden die Konzentration, die Reinheit und die Integrität der RNA-Isolate analysiert.

Insgesamt zeigte sich, dass sich für das Muskelgewebe das RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit sehr gut eignet, da es RNA einer sehr guten Integrität (RIN = 8,84) lieferte. Außerdem war die Verwendung des Kits mit weniger Zeitaufwand als die Trizol-Methode verbunden. Zu beachten ist jedoch, dass mit der Trizol-Methode im Gegensatz zum RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit alle RNA-Typen isoliert werden können, wodurch sie bei der Forschung mit kurzsträngiger RNA bevorzugt anzuwenden ist. Für das Fettgewebe konnte sich keine der getesteten Methoden auszeichnen, da mit keiner die geforderte Integrität der RNA (RIN > 7) erzielt werden konnte.

In Zukunft wird weiter an einer zuverlässigen Methode zur RNA-Isolierung aus Fettgeweben gearbeitet werden müssen, damit auch hier, wie beim Muskelgewebe, RNA hoher Qualität für folgende Experimente und Untersuchungen verwendet werden kann. Weiterhin wird versucht werden den Anwenderfehler bei der RNA-Isolierung zu minimieren oder gar auszuschalten, was voraussichtlich nur durch die maschinelle Durchführung der Arbeitsschritte zu erreichen sein wird.

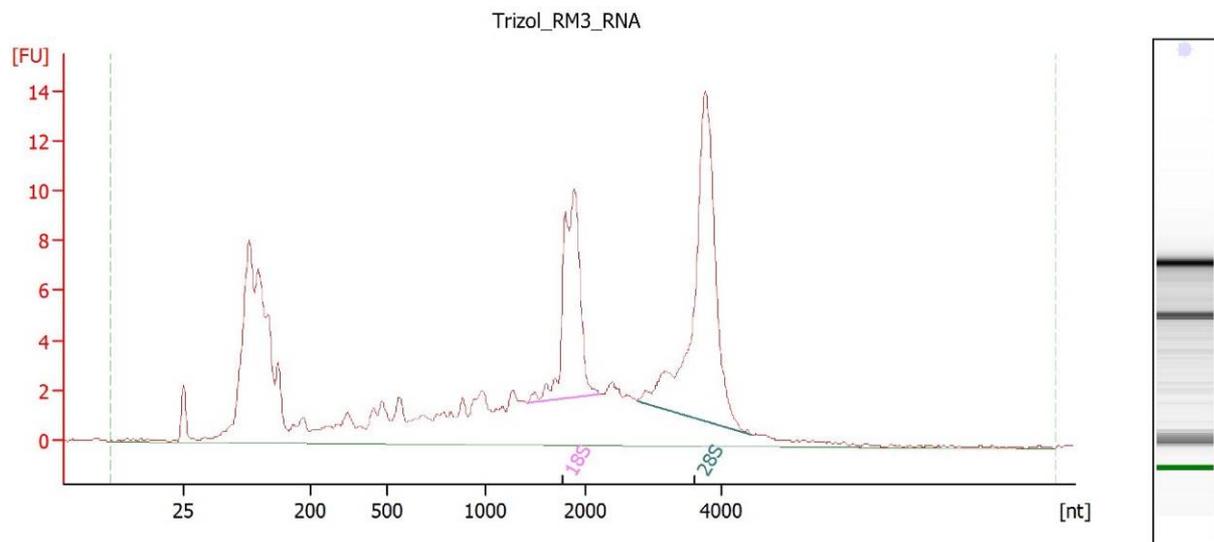
6 Anhang

6.1 Gelartige Bilder und Elektropherogramme (Muskelgewebe)



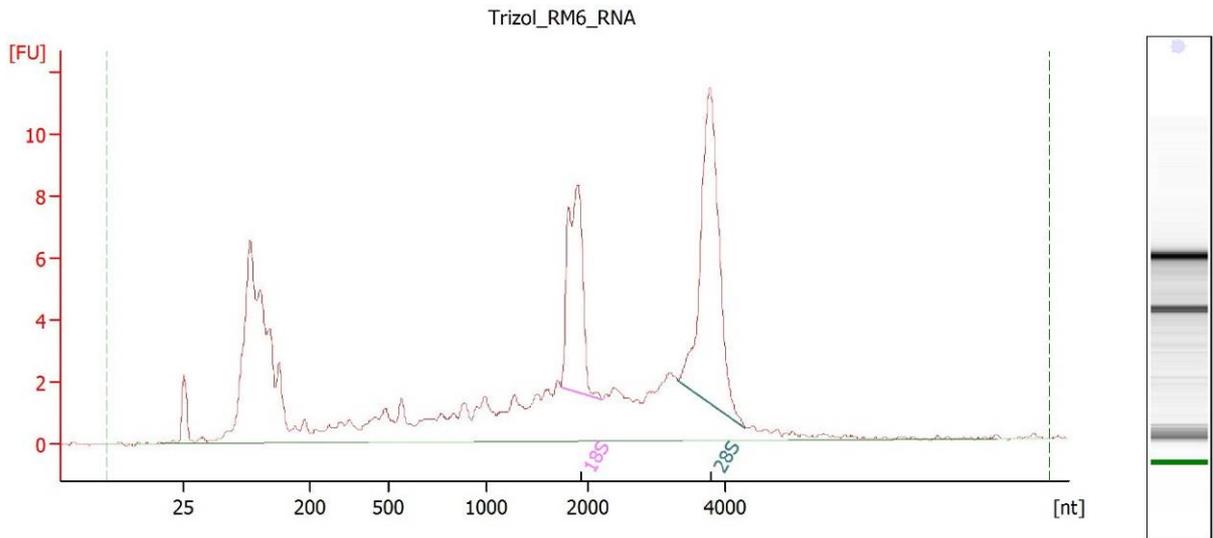
Overall Results for sample 1 : Trizol_RM1_RNA

RNA Area:	148,4	RNA Integrity Number (RIN):	8 (B.02.08)
RNA Concentration:	267 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,6	Result Flagging Label:	RIN:8



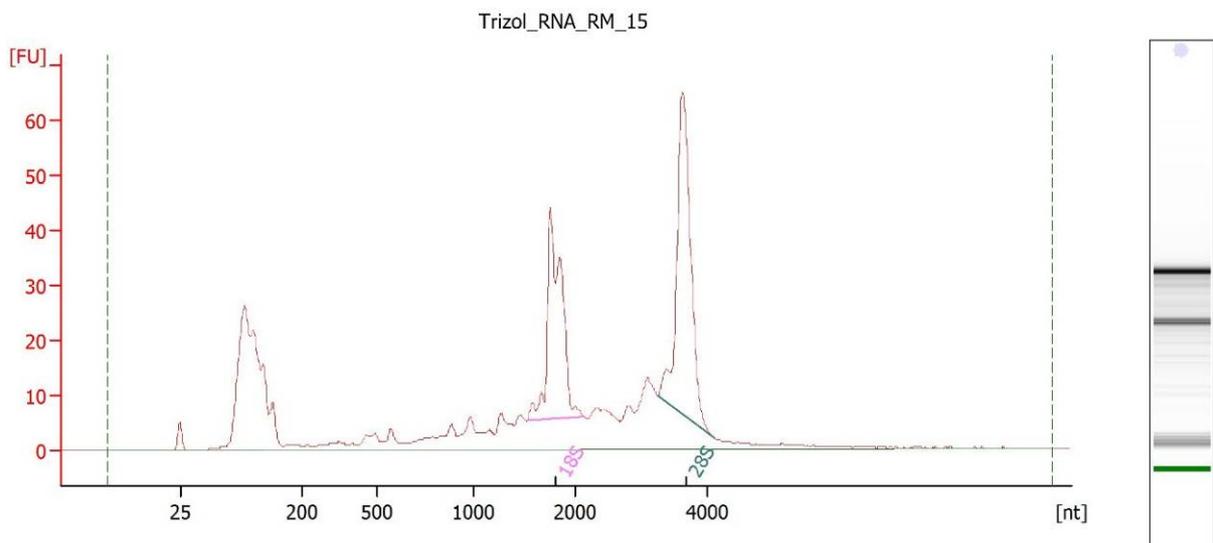
Overall Results for sample 3 : Trizol_RM3_RNA

RNA Area:	184,5	RNA Integrity Number (RIN):	8.1 (B.02.08)
RNA Concentration:	332 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,8	Result Flagging Label:	RIN: 8.10



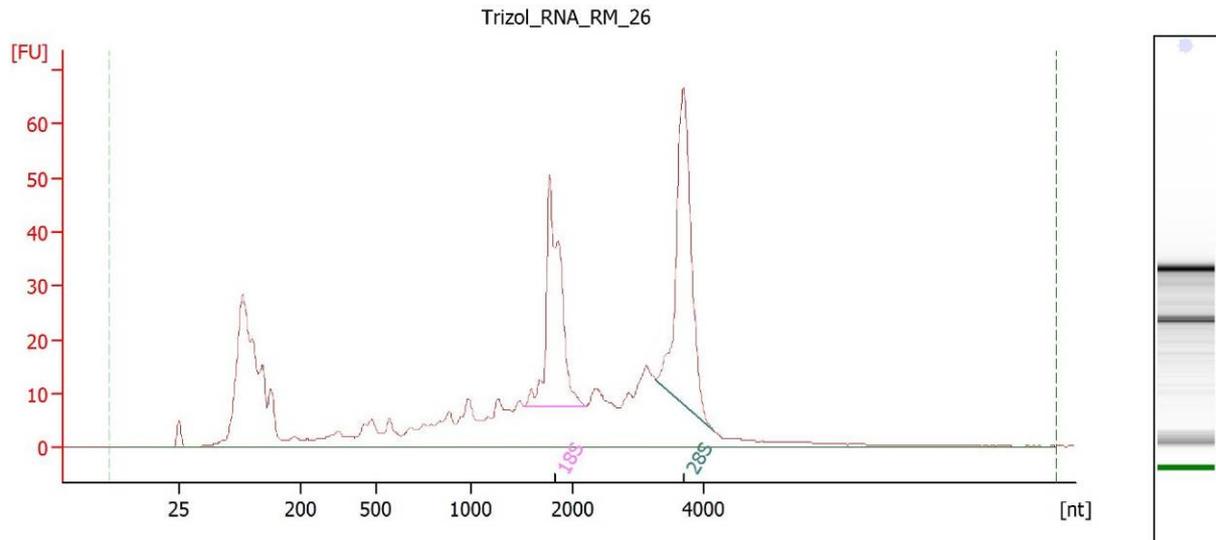
Overall Results for sample 6 : Trizol_RM6_RNA

RNA Area:	135,9	RNA Integrity Number (RIN):	7.7 (B.02.08)
RNA Concentration:	245 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,6	Result Flagging Label:	RIN: 7.70



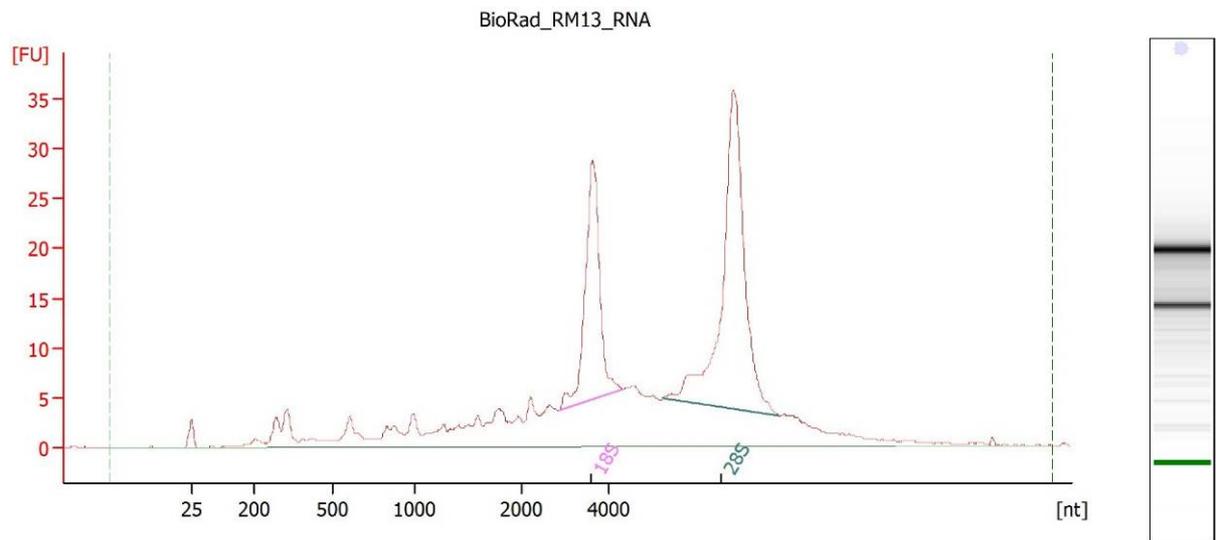
Overall Results for sample 7 : Trizol_RNA_RM_15

RNA Area:	550,4	RNA Integrity Number (RIN):	8.4 (B.02.08)
RNA Concentration:	351 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,3	Result Flagging Label:	RIN: 8.40



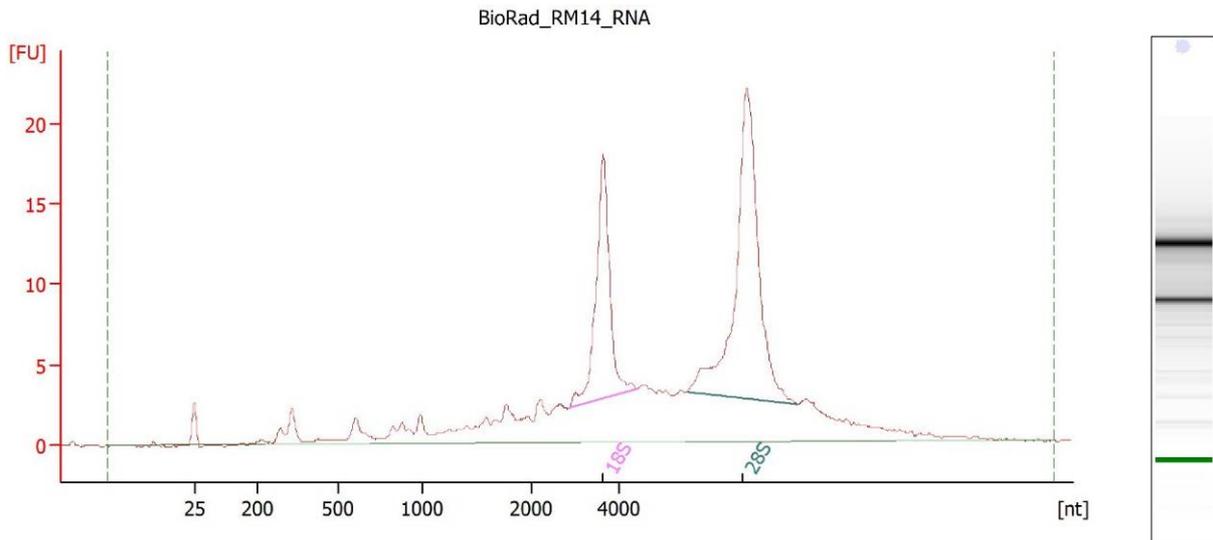
Overall Results for sample 8 : Trizol RNA RM 26

RNA Area:	674,3	RNA Integrity Number (RIN):	7.8 (B.02.08)
RNA Concentration:	430 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,2	Result Flagging Label:	RIN: 7.80



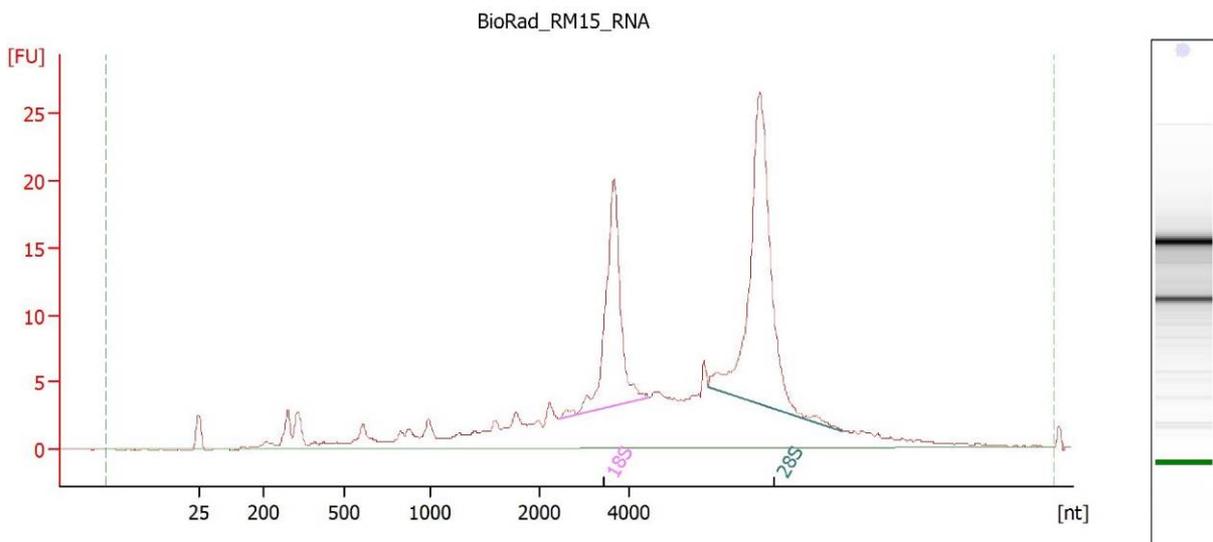
Overall Results for sample 1 : BioRad_RM13 RNA

RNA Area:	337,9	RNA Integrity Number (RIN):	8.3 (B.02.08)
RNA Concentration:	266 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,8	Result Flagging Label:	RIN: 8.30



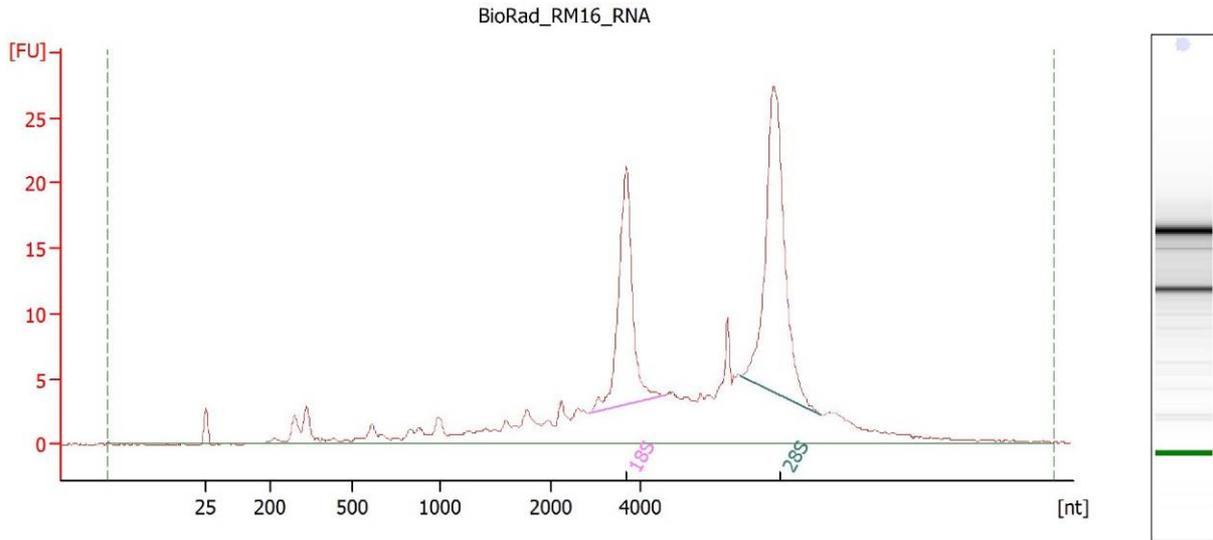
Overall Results for sample 2 : BioRad_RM14_RNA

RNA Area:	206,9	RNA Integrity Number (RIN):	8.3 (B.02.08)
RNA Concentration:	163 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,8	Result Flagging Label:	RIN: 8.30



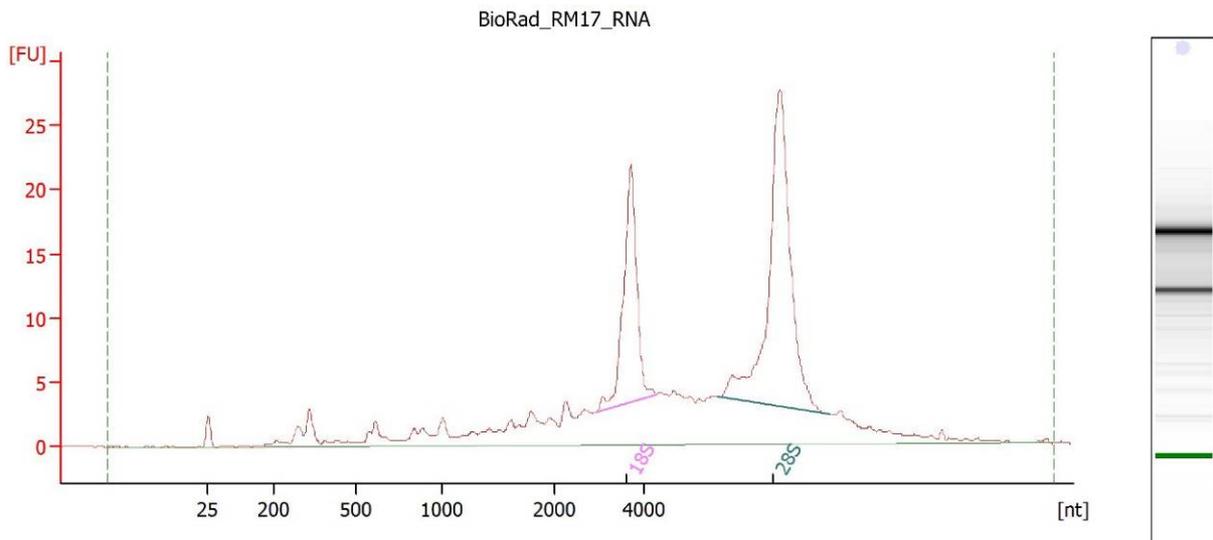
Overall Results for sample 3 : BioRad_RM15_RNA

RNA Area:	234,5	RNA Integrity Number (RIN):	8.4 (B.02.08)
RNA Concentration:	184 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,6	Result Flagging Label:	RIN: 8.40



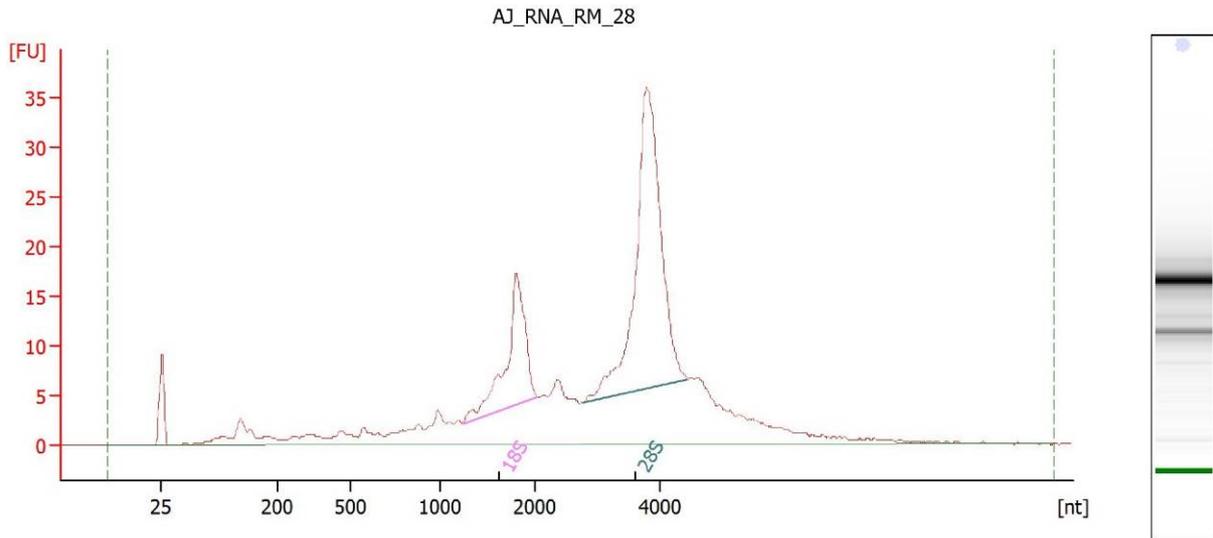
Overall Results for sample 4 : BioRad_RM16_RNA

RNA Area:	225,0	RNA Integrity Number (RIN):	8.3 (B.02.08)
RNA Concentration:	177 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,5	Result Flagging Label:	RIN: 8.30



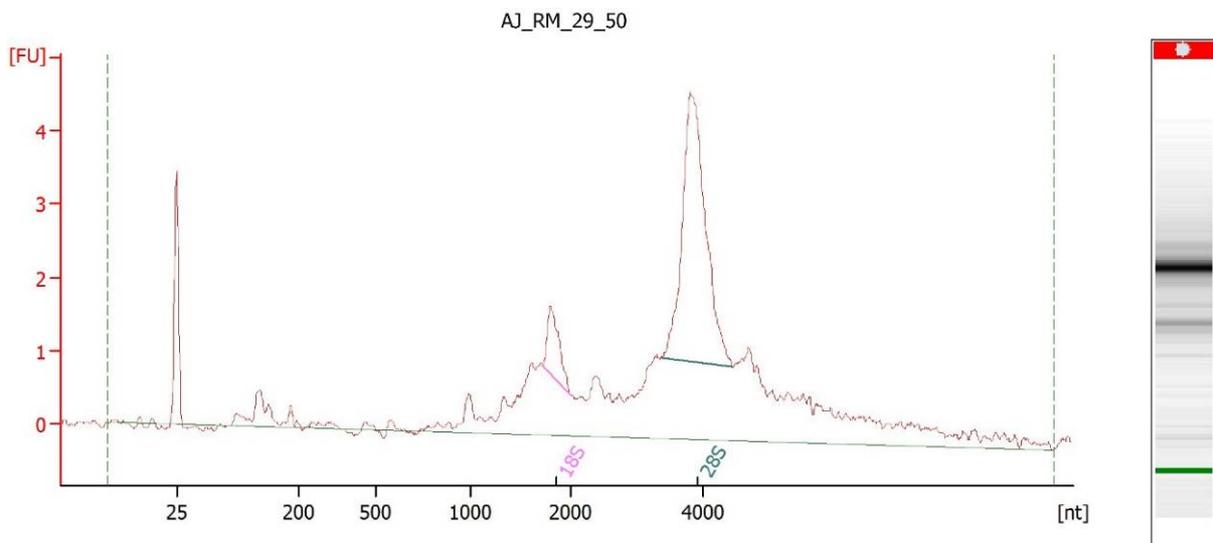
Overall Results for sample 5 : BioRad_RM17_RNA

RNA Area:	234,5	RNA Integrity Number (RIN):	8.4 (B.02.08)
RNA Concentration:	184 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,9	Result Flagging Label:	RIN: 8.40



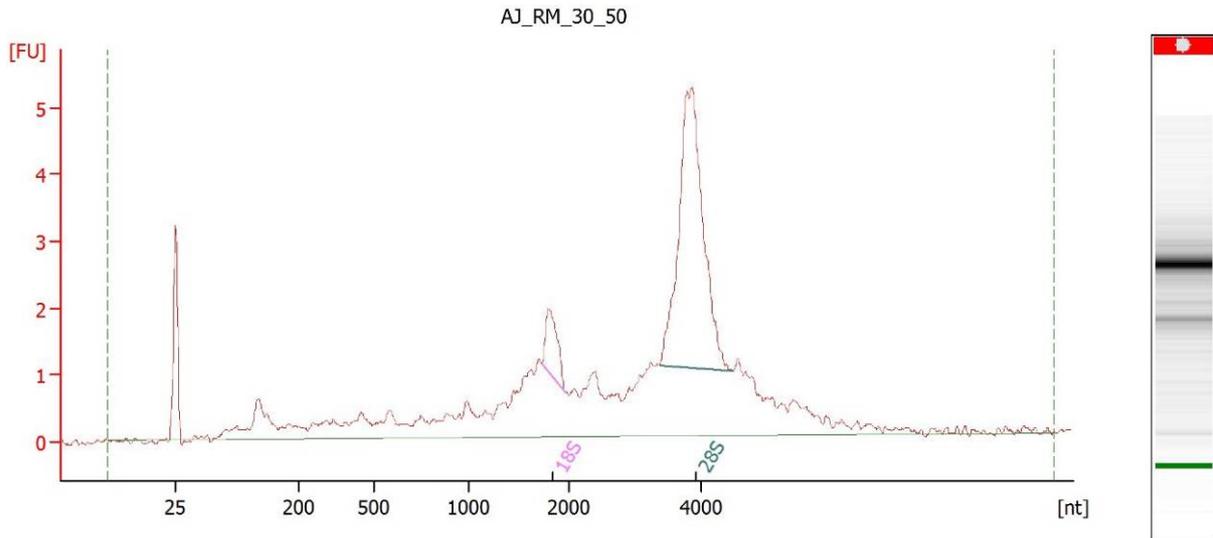
Overall Results for sample 1 : AJ RNA RM 28

RNA Area:	353,1	RNA Integrity Number (RIN):	8.8 (B.02.08)
RNA Concentration:	184 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2,6	Result Flagging Label:	RIN: 8.80



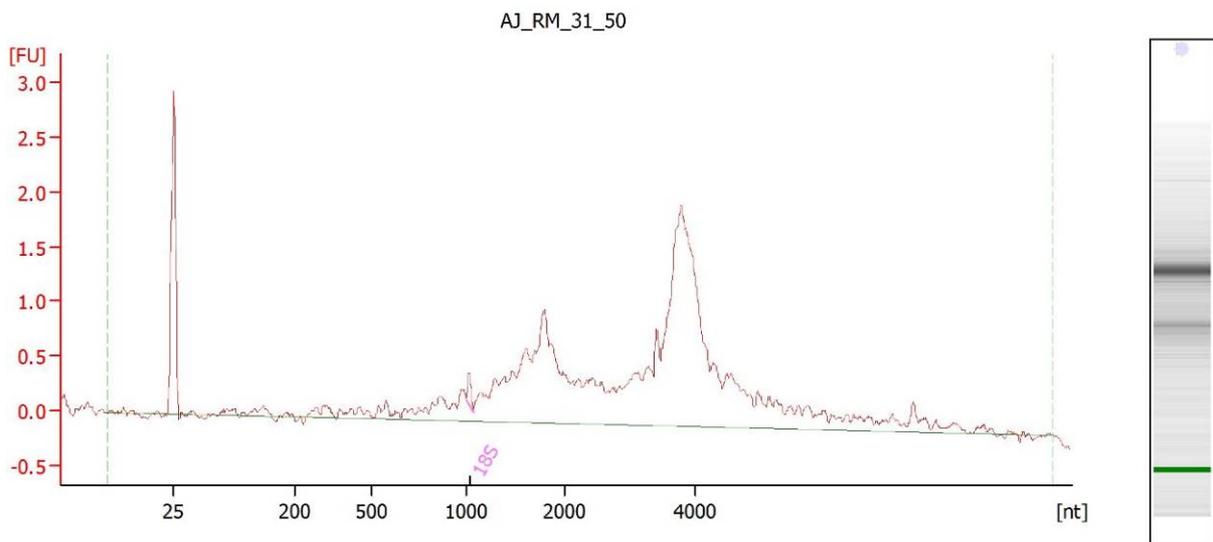
Overall Results for sample 6 : AJ RM 29 50

RNA Area:	48,1	RNA Integrity Number (RIN):	N/A (B.02.08)
RNA Concentration:	41 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	6,7	Result Flagging Label:	RIN N/A



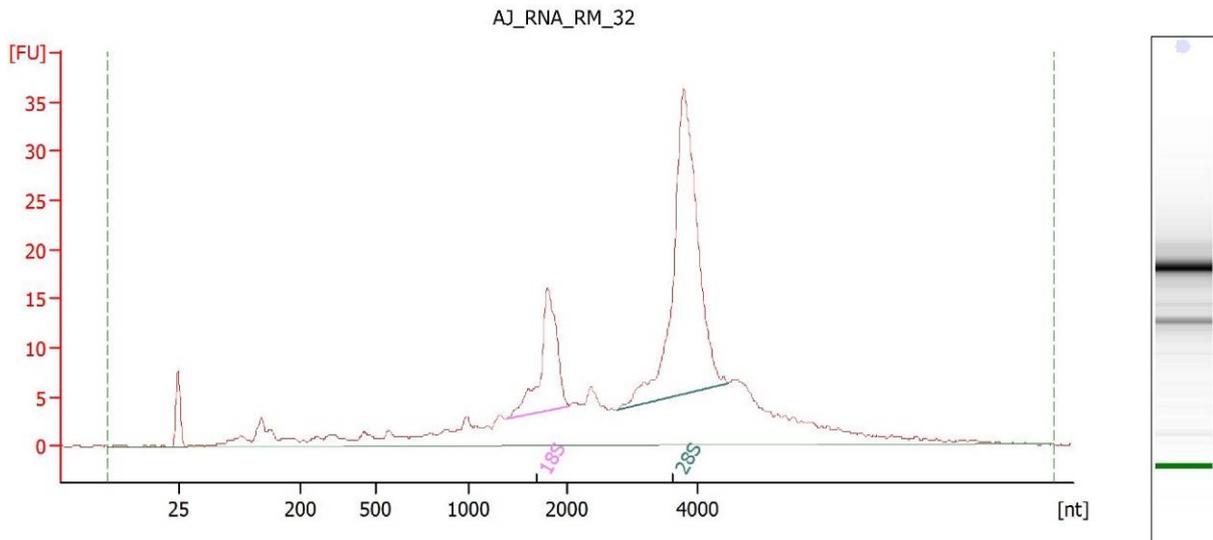
Overall Results for sample 7 : AJ_RM_30_50

RNA Area:	54,6	RNA Integrity Number (RIN):	N/A (B.02.08)
RNA Concentration:	47 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	7,5	Result Flagging Label:	RIN N/A



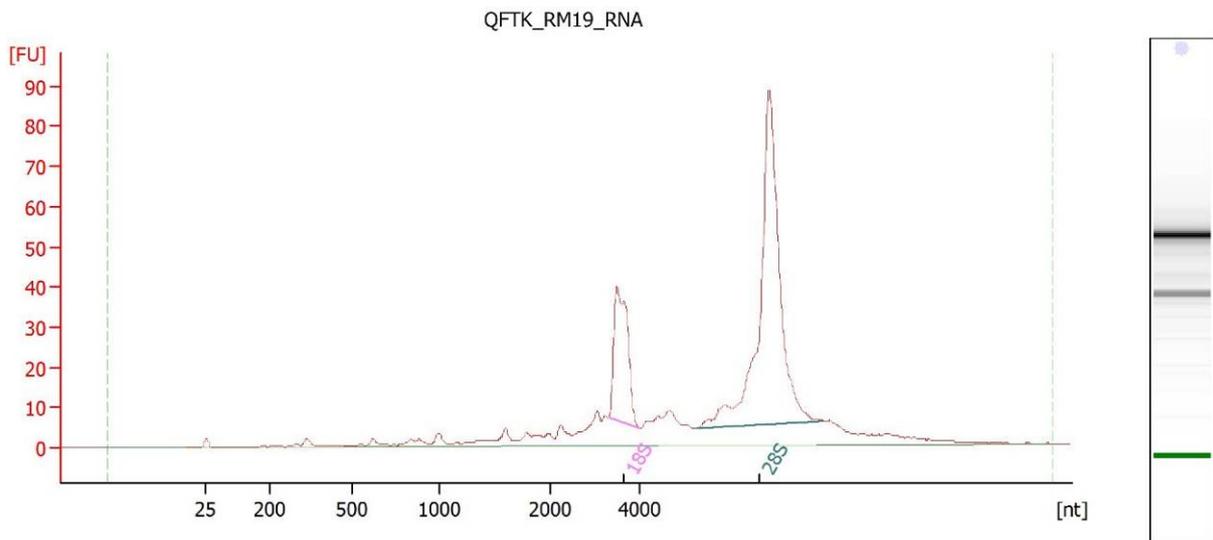
Overall Results for sample 8 : AJ_RM_31_50

RNA Area:	24,9	RNA Integrity Number (RIN):	2.4 (B.02.08)
RNA Concentration:	21 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,0	Result Flagging Label:	RIN: 2.40



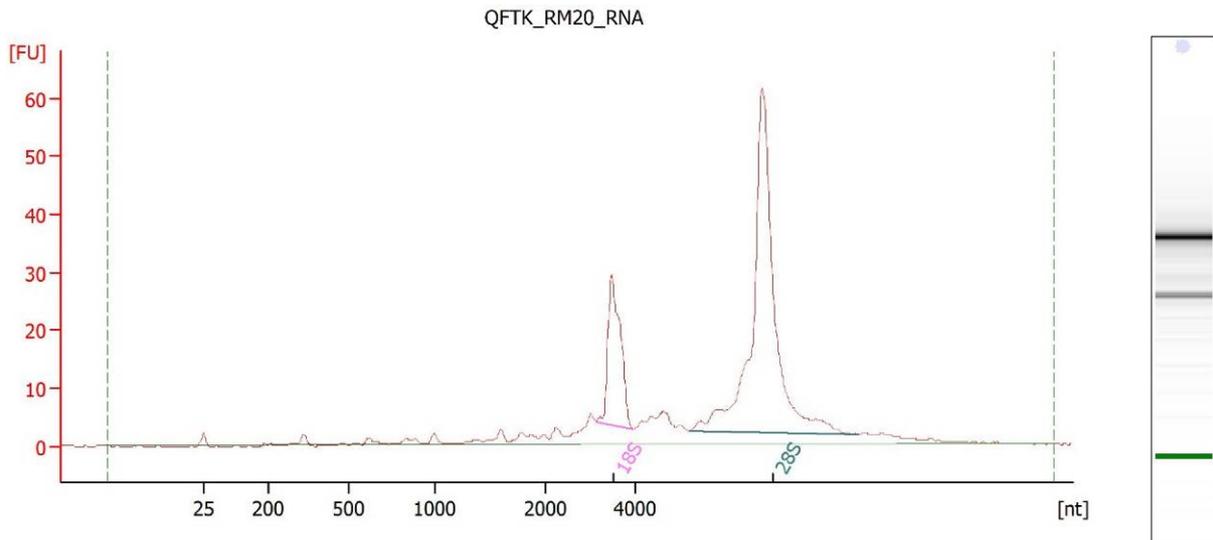
Overall Results for sample 5 : AJ_RNA_RM_32

RNA Area:	323,5	RNA Integrity Number (RIN):	8.6 (B.02.08)
RNA Concentration:	168 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	3,1	Result Flagging Label:	RIN: 8.60



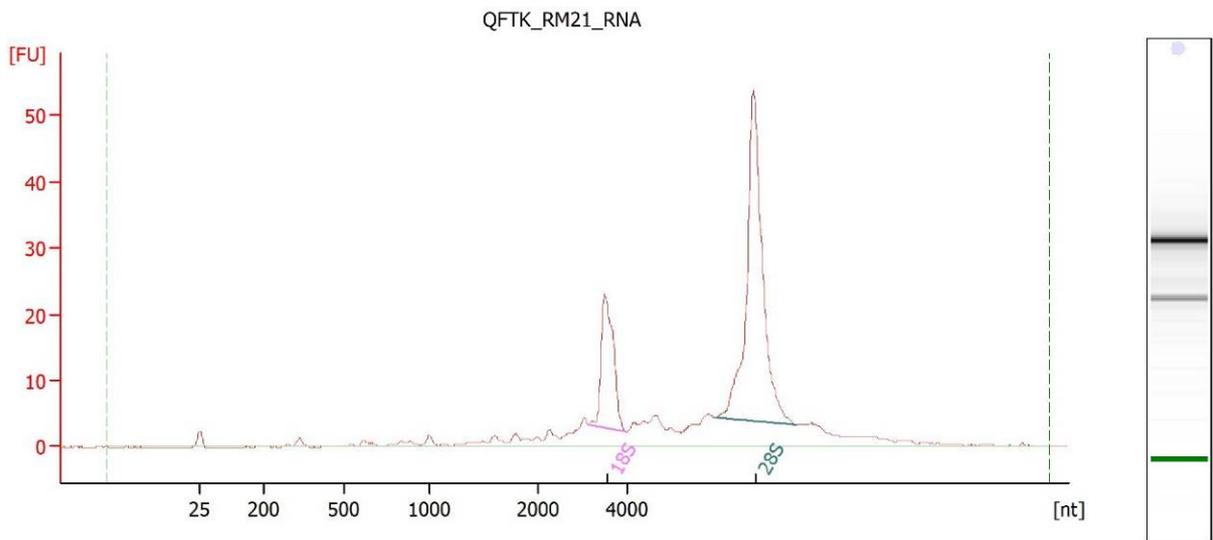
Overall Results for sample 7 : QFTK_RM19_RNA

RNA Area:	469,5	RNA Integrity Number (RIN):	8.7 (B.02.08)
RNA Concentration:	369 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	3,1	Result Flagging Label:	RIN: 8.70



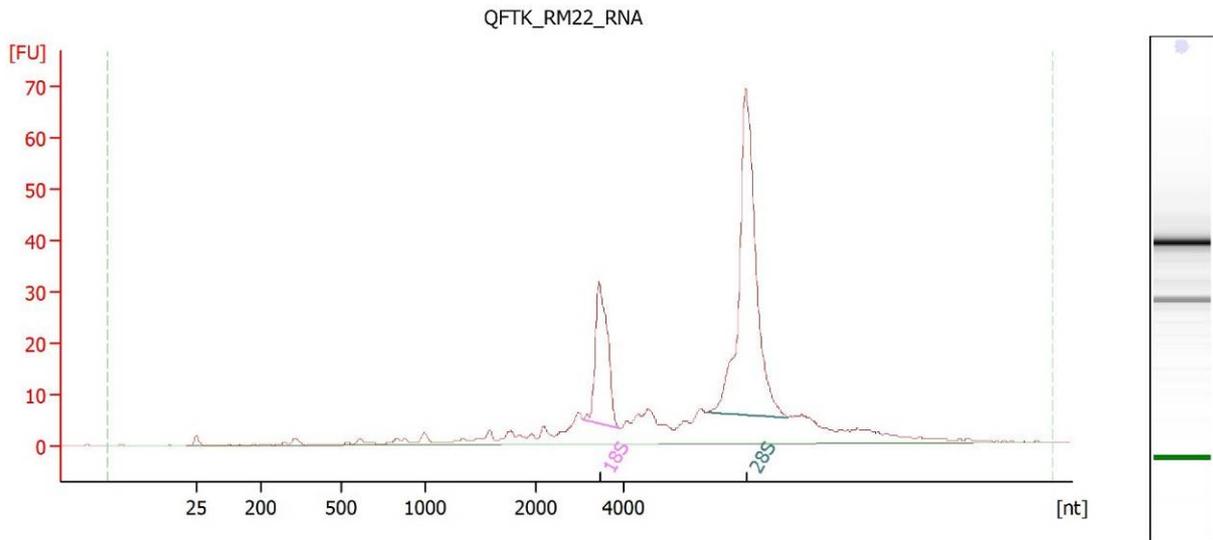
Overall Results for sample 8 : QFTK_RM20_RNA

RNA Area:	308,5	RNA Integrity Number (RIN):	9 (B.02.08)
RNA Concentration:	243 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	3,4	Result Flagging Label:	RIN:9



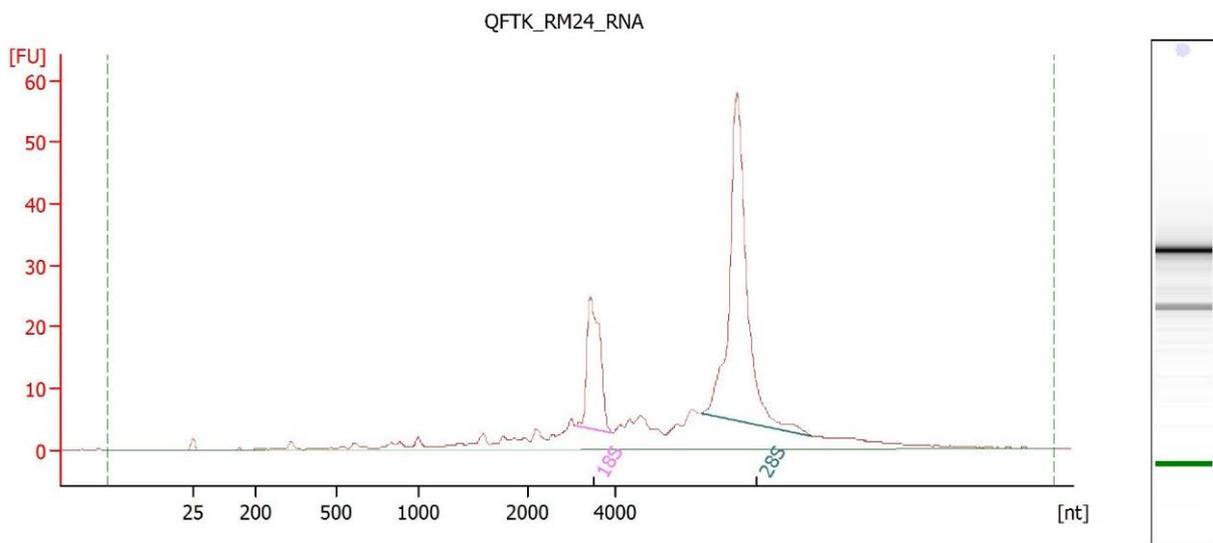
Overall Results for sample 9 : QFTK_RM21_RNA

RNA Area:	242,2	RNA Integrity Number (RIN):	8.9 (B.02.08)
RNA Concentration:	190 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2,8	Result Flagging Label:	RIN: 8.90



Overall Results for sample 10 : QFTK_RM22_RNA

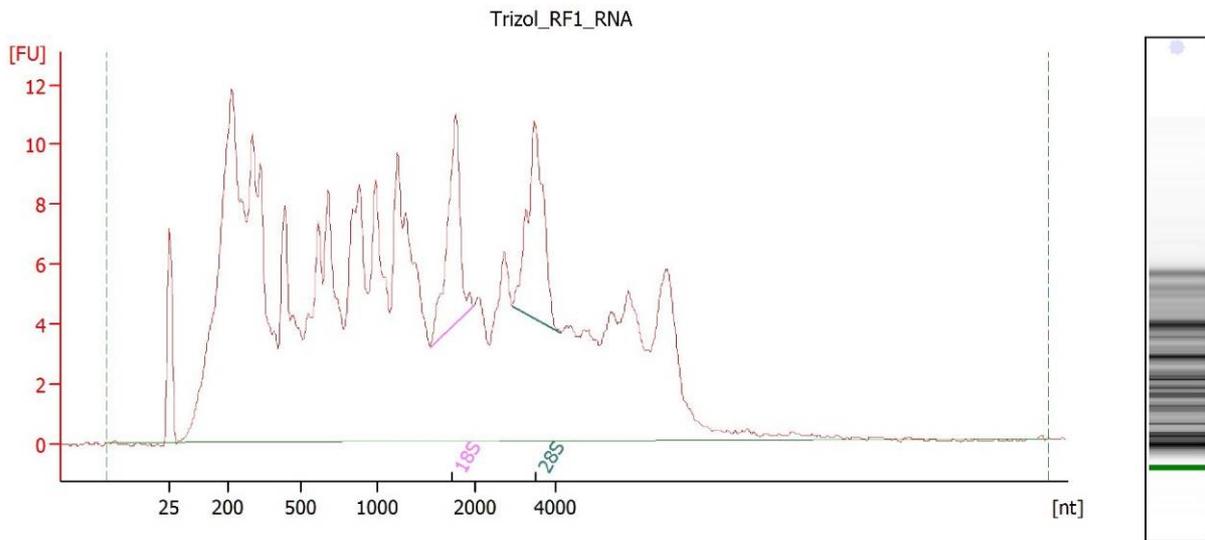
RNA Area:	364,1	RNA Integrity Number (RIN):	8.9 (B.02.08)
RNA Concentration:	286 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2,7	Result Flagging Label:	RIN: 8.90



Overall Results for sample 12 : QFTK_RM24_RNA

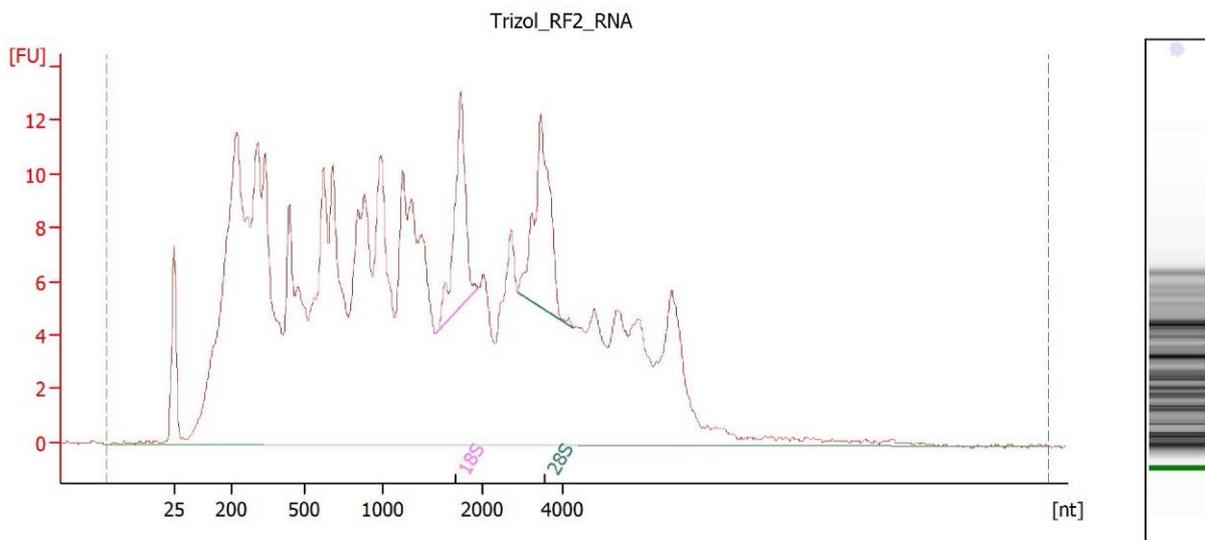
RNA Area:	303,9	RNA Integrity Number (RIN):	8.7 (B.02.08)
RNA Concentration:	239 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2,8	Result Flagging Label:	RIN: 8.70

6.2 Gelartige Bilder und Elektropherogramme (Fettgewebe)



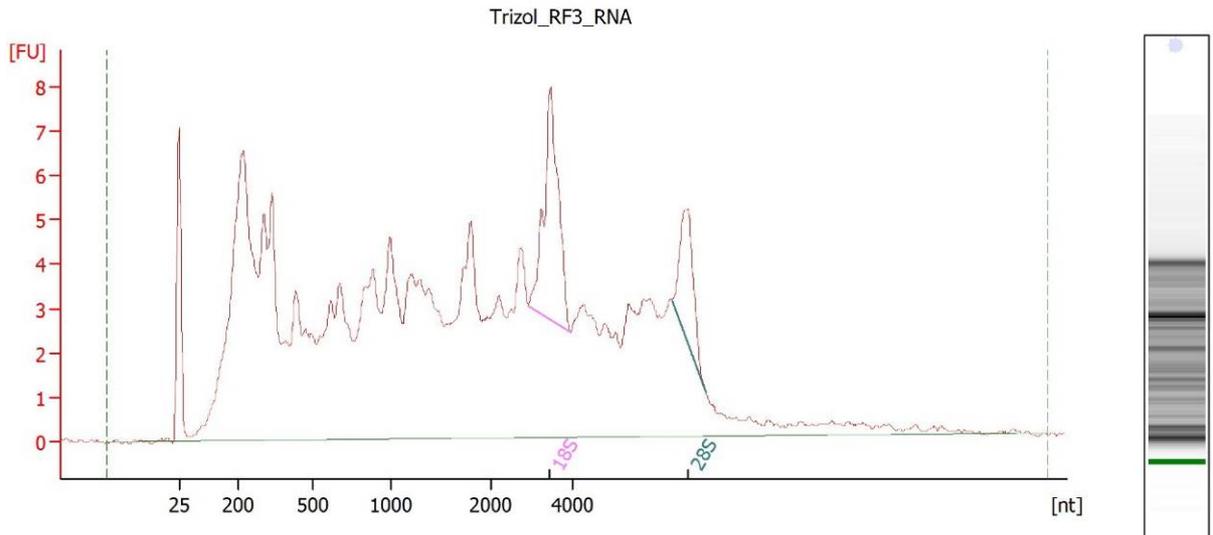
Overall Results for sample 1 : Trizol_RF1_RNA

RNA Area:	405,9	RNA Integrity Number (RIN):	4.3 (B.02.08)
RNA Concentration:	192 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,1	Result Flagging Label:	RIN: 4.30



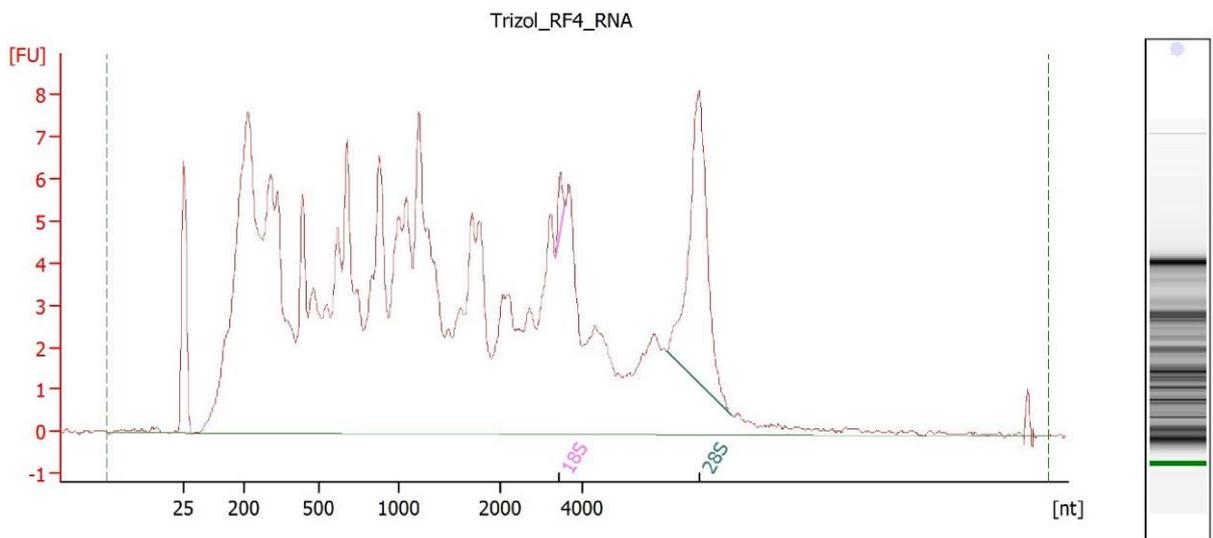
Overall Results for sample 2 : Trizol_RF2_RNA

RNA Area:	470,2	RNA Integrity Number (RIN):	4.1 (B.02.08)
RNA Concentration:	223 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,1	Result Flagging Label:	RIN: 4.10



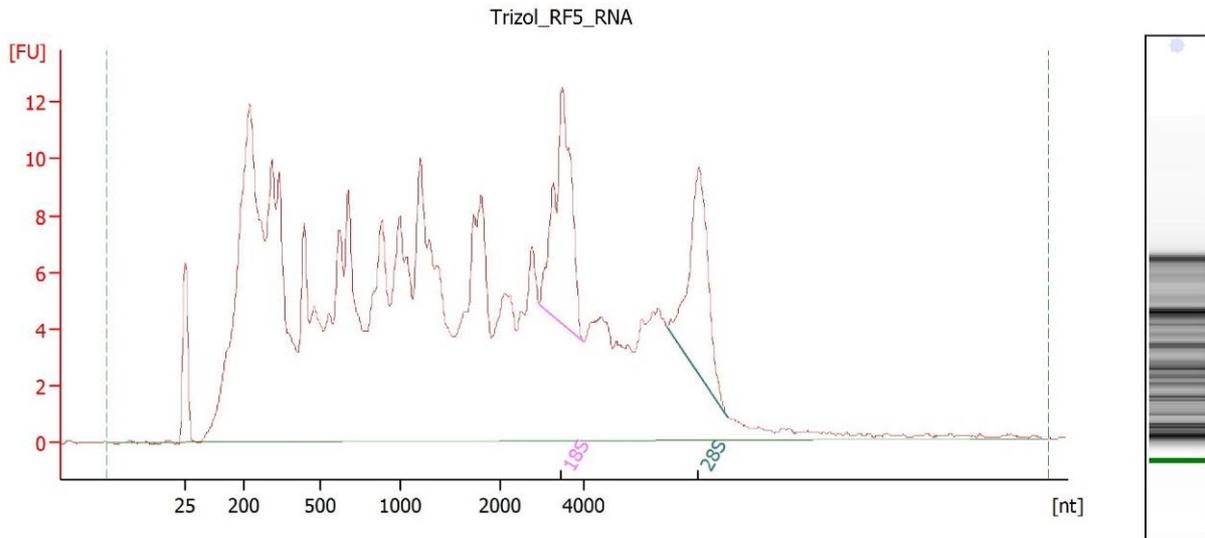
Overall Results for sample 3 : Trizol_RF3_RNA

RNA Area:	241,0	RNA Integrity Number (RIN):	4.4 (B.02.08)
RNA Concentration:	114 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,5	Result Flagging Label:	RIN: 4.40



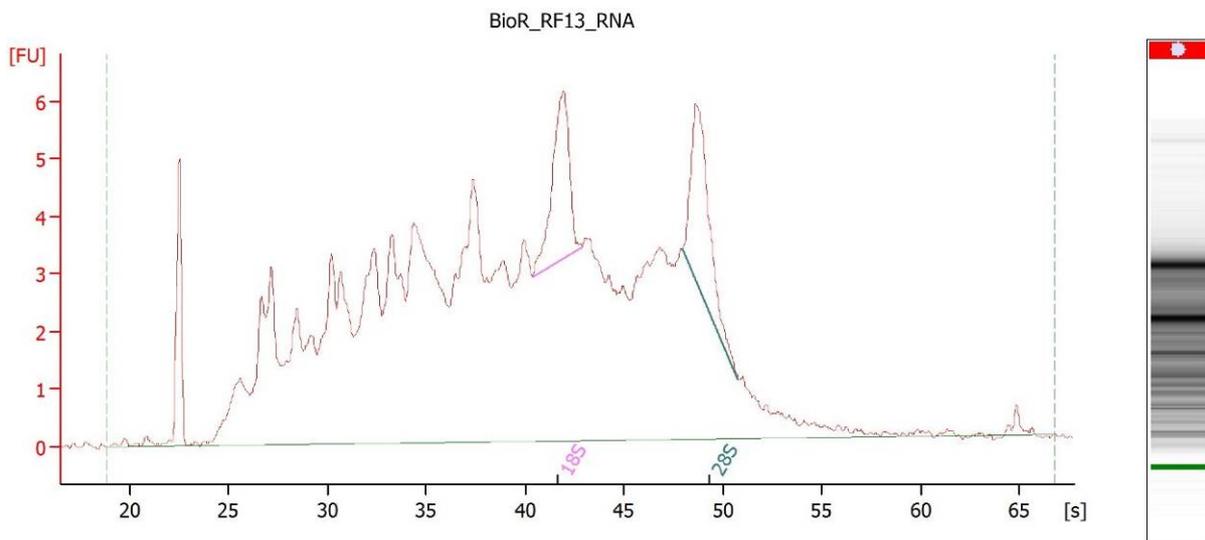
Overall Results for sample 4 : Trizol_RF4_RNA

RNA Area:	268,8	RNA Integrity Number (RIN):	3.5 (B.02.08)
RNA Concentration:	127 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	18,7	Result Flagging Label:	RIN: 3.50



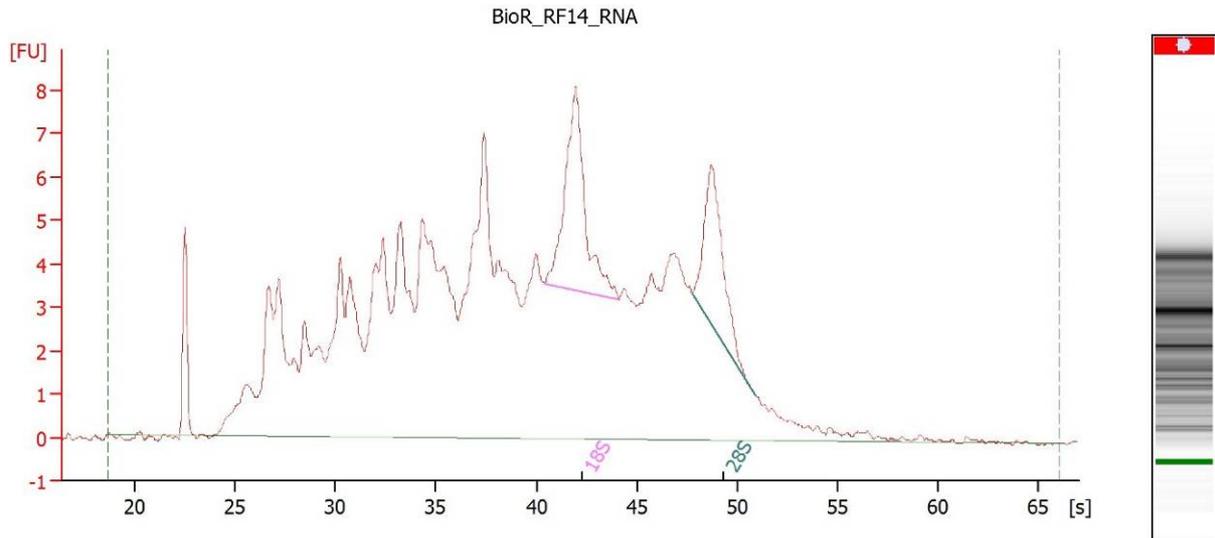
Overall Results for sample 5 : Trizol_RF5_RNA

RNA Area:	414,8	RNA Integrity Number (RIN):	4.9 (B.02.08)
RNA Concentration:	197 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,8	Result Flagging Label:	RIN: 4.90



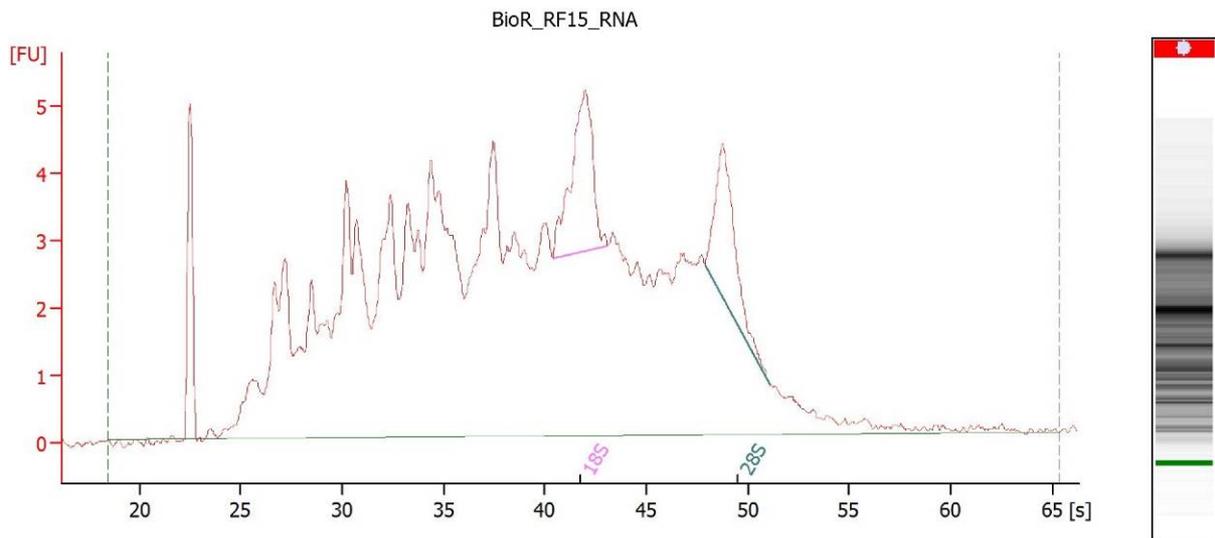
Overall Results for sample 1 : BioR_RF13_RNA

RNA Area:	203,4	RNA Integrity Number (RIN):	4 (B.02.08)
RNA Concentration:	130 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,0	Result Flagging Label:	RIN:4



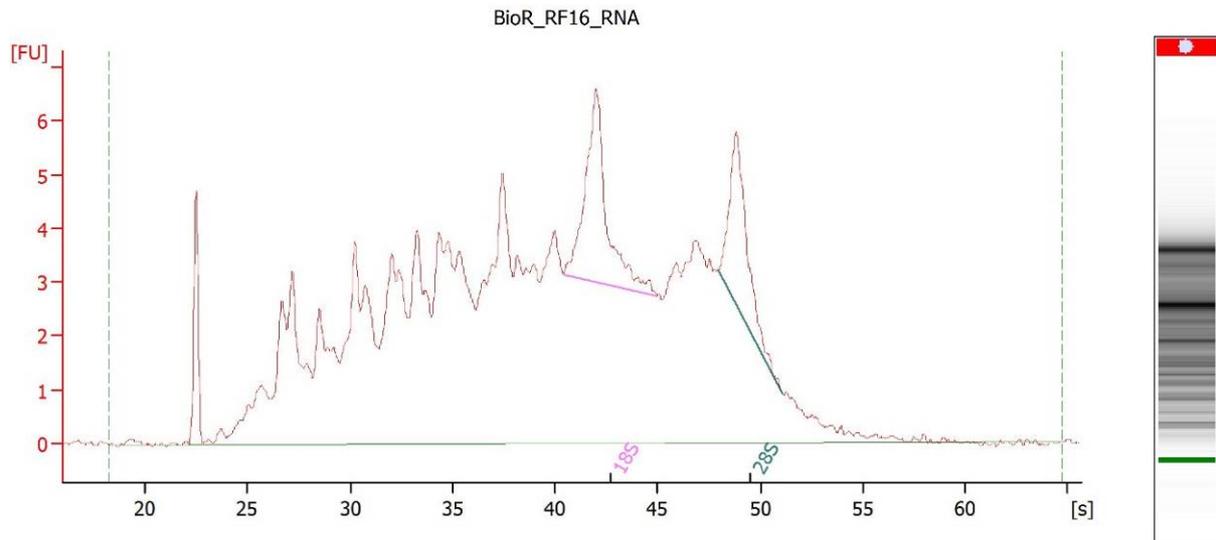
Overall Results for sample 2 : BioR_RF14_RNA

RNA Area:	243,1	RNA Integrity Number (RIN):	4.6 (B.02.08)
RNA Concentration:	155 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,7	Result Flagging Label:	RIN: 4.60



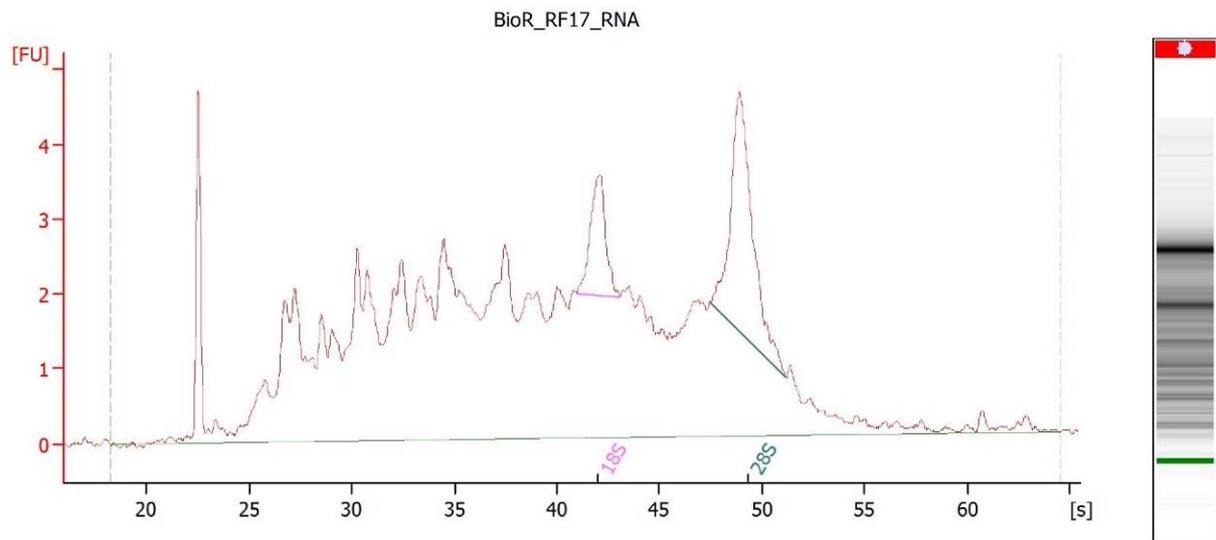
Overall Results for sample 3 : BioR_RF15_RNA

RNA Area:	183,9	RNA Integrity Number (RIN):	4.1 (B.02.08)
RNA Concentration:	117 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,8	Result Flagging Label:	RIN: 4.10



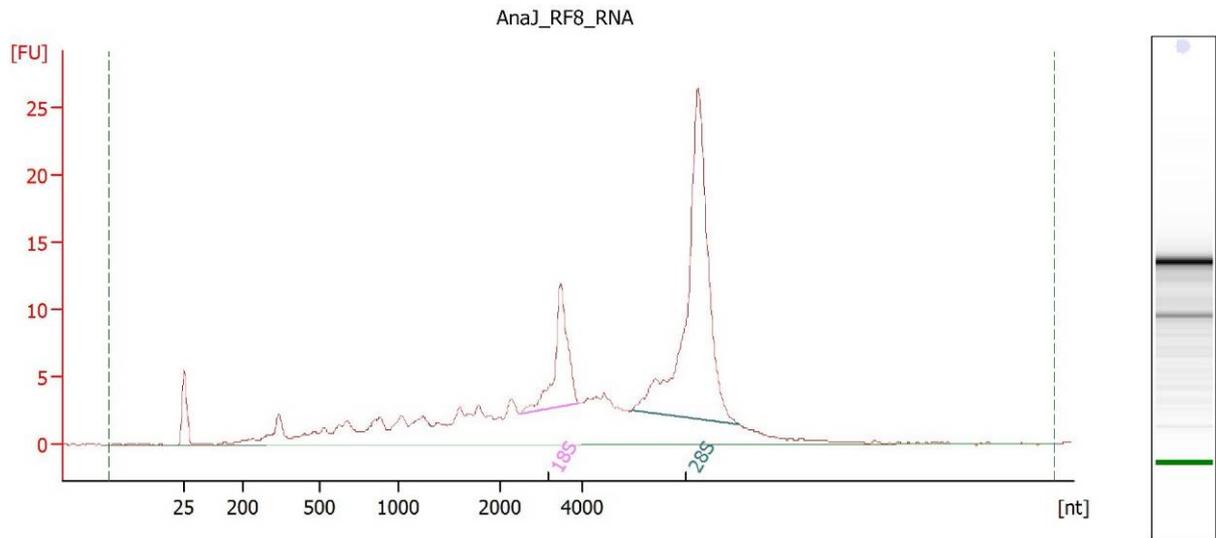
Overall Results for sample 4 : BioR_RF16_RNA

RNA Area:	210,6	RNA Integrity Number (RIN):	4.4 (B.02.08)
RNA Concentration:	134 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,7	Result Flagging Label:	RIN: 4.40



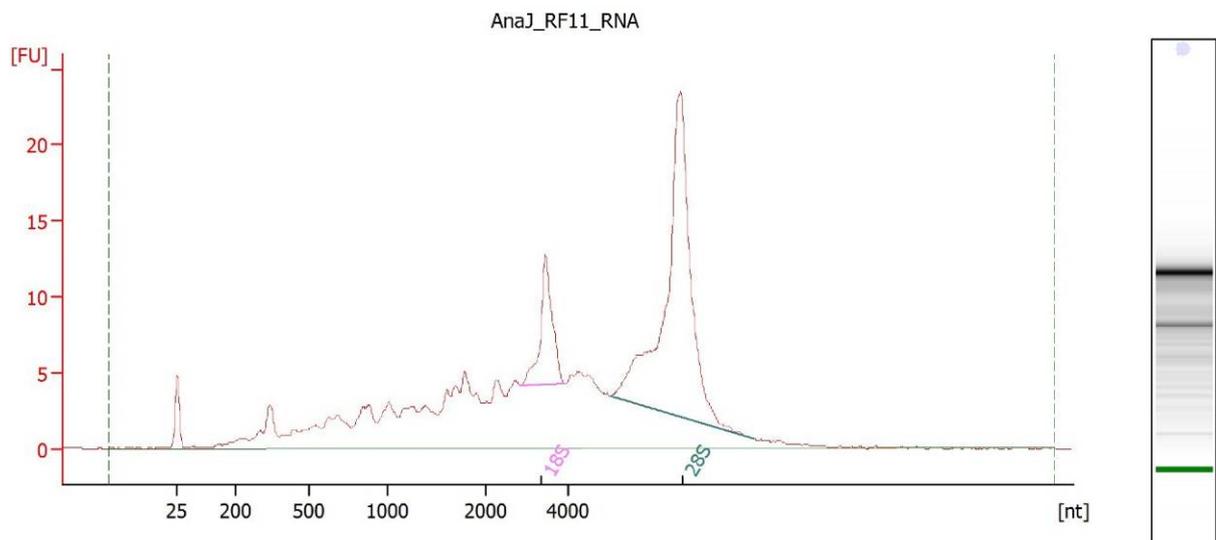
Overall Results for sample 5 : BioR_RF17_RNA

RNA Area:	133,4	RNA Integrity Number (RIN):	4.5 (B.02.08)
RNA Concentration:	85 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2,4	Result Flagging Label:	RIN: 4.50



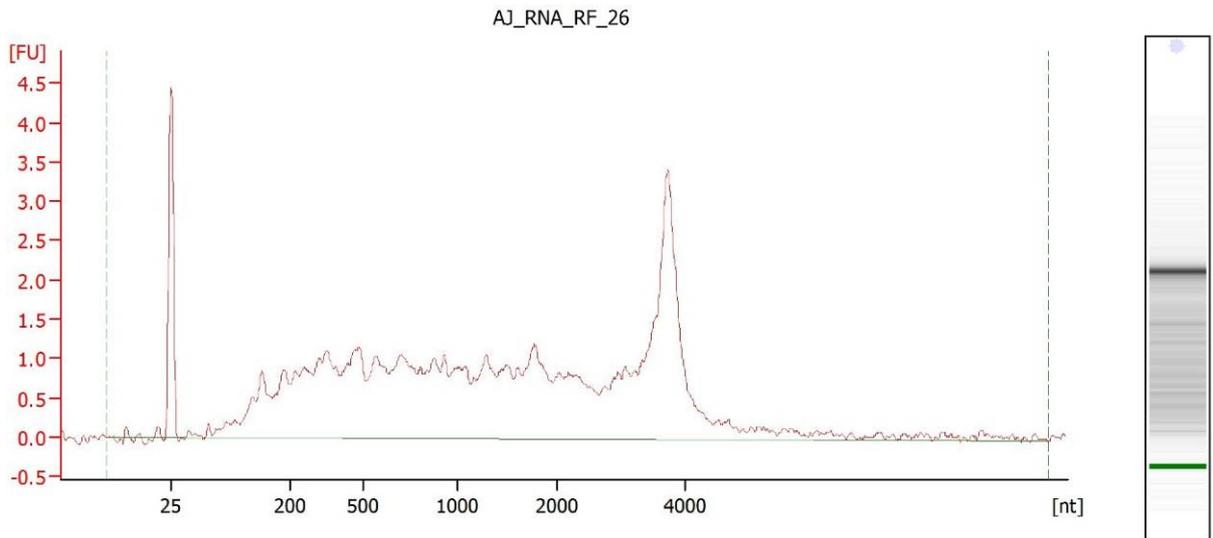
Overall Results for sample 8 : AnaJ_RF8_RNA

RNA Area:	209,4	RNA Integrity Number (RIN):	8.2 (B.02.08)
RNA Concentration:	99 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	3,8	Result Flagging Label:	RIN: 8.20



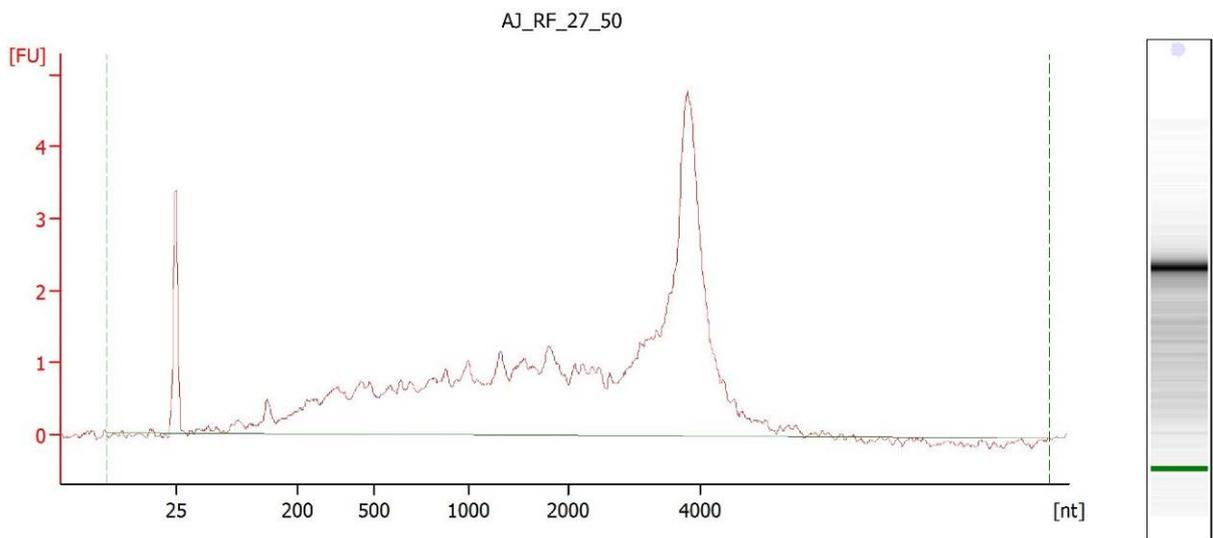
Overall Results for sample 11 : AnaJ_RF11_RNA

RNA Area:	261,5	RNA Integrity Number (RIN):	7.8 (B.02.08)
RNA Concentration:	124 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	4,5	Result Flagging Label:	RIN: 7.80



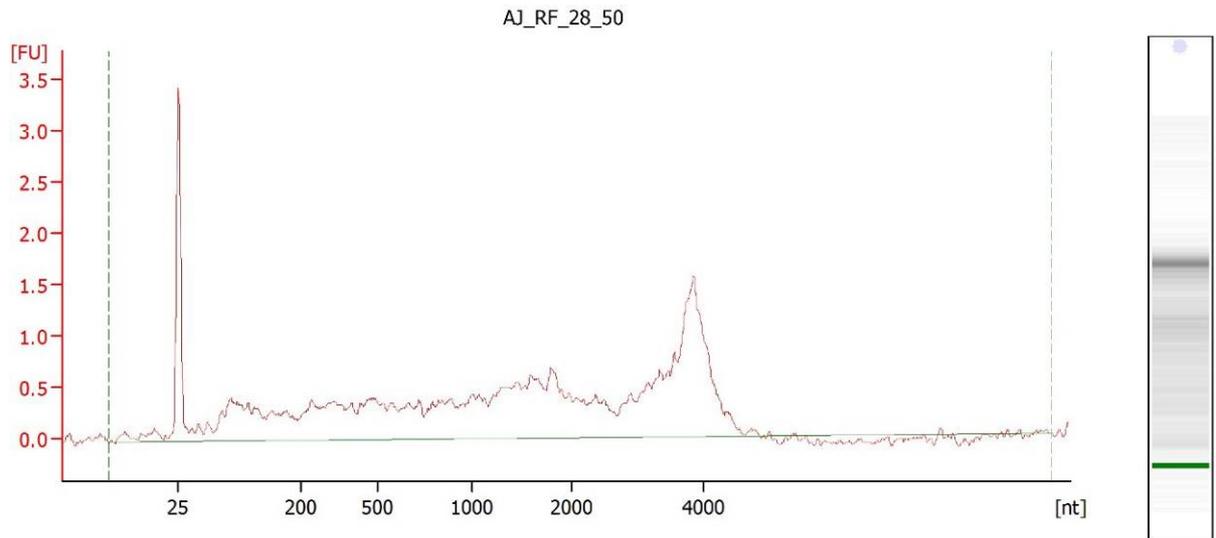
Overall Results for sample 11 : AJ RNA RF 26

RNA Area:	62,2	RNA Integrity Number (RIN):	2.2 (B.02.08)
RNA Concentration:	40 ng/ μ l	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,0	Result Flagging Label:	RIN: 2.20



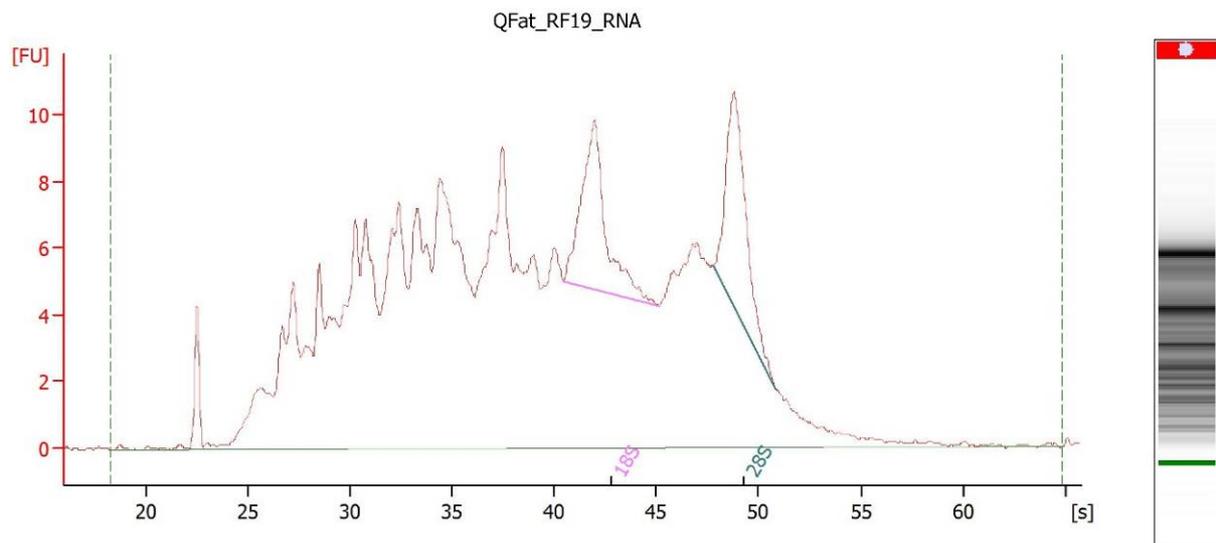
Overall Results for sample 3 : AJ RF 27 50

RNA Area:	60,5	RNA Integrity Number (RIN):	2.4 (B.02.08)
RNA Concentration:	52 ng/ μ l	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,0	Result Flagging Label:	RIN: 2.40



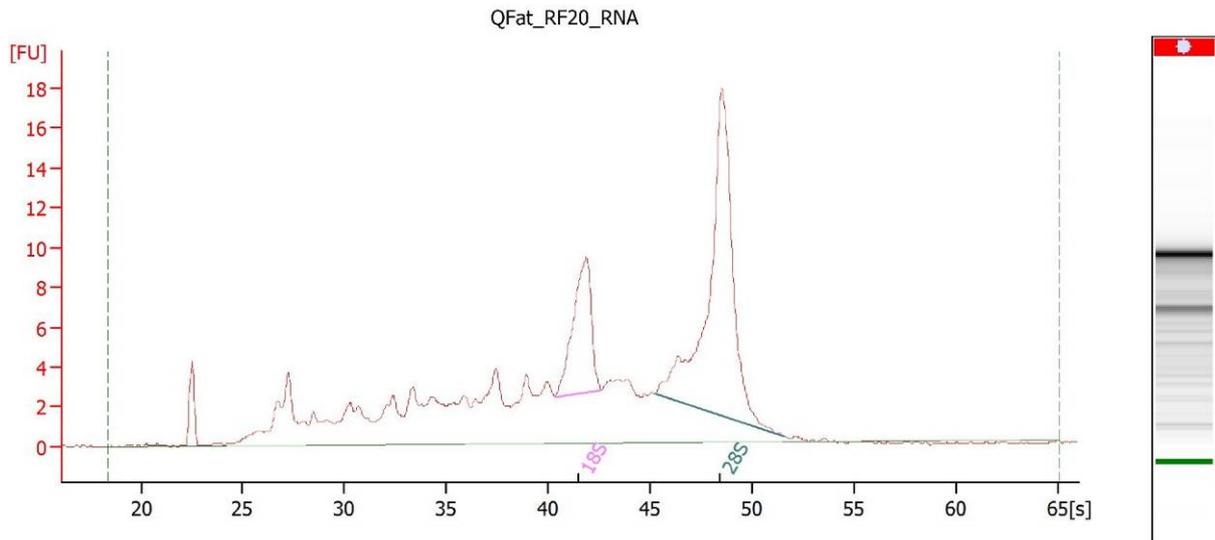
Overall Results for sample 4 : AJ RF 28 50

RNA Area:	30,6	RNA Integrity Number (RIN):	2 (B.02.08)
RNA Concentration:	26 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,0	Result Flagging Label:	RIN:2



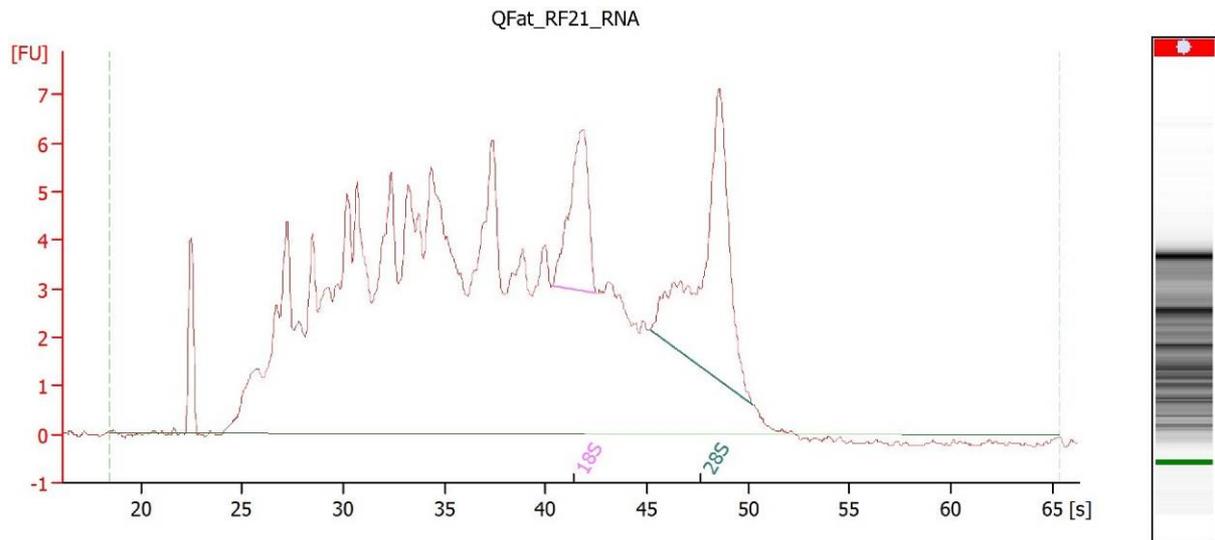
Overall Results for sample 7 : QFat RF19 RNA

RNA Area:	379,2	RNA Integrity Number (RIN):	4.4 (B.02.08)
RNA Concentration:	242 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,9	Result Flagging Label:	RIN: 4.40



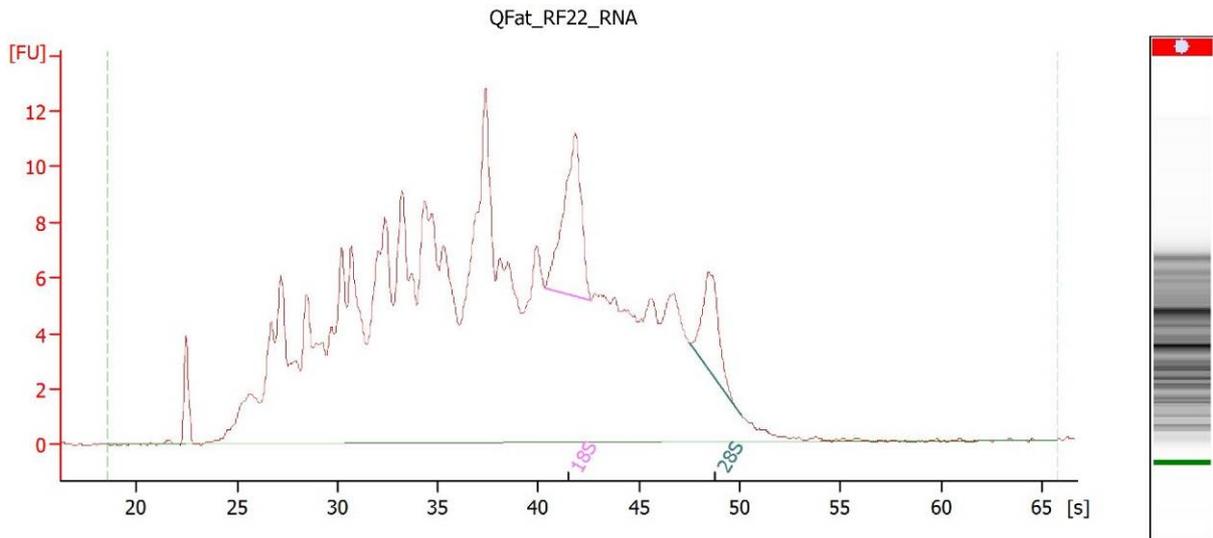
Overall Results for sample 8 : QFat_RF20_RNA

RNA Area:	199,1	RNA Integrity Number (RIN):	7.8 (B.02.08)
RNA Concentration:	127 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2,7	Result Flagging Label:	RIN: 7.80



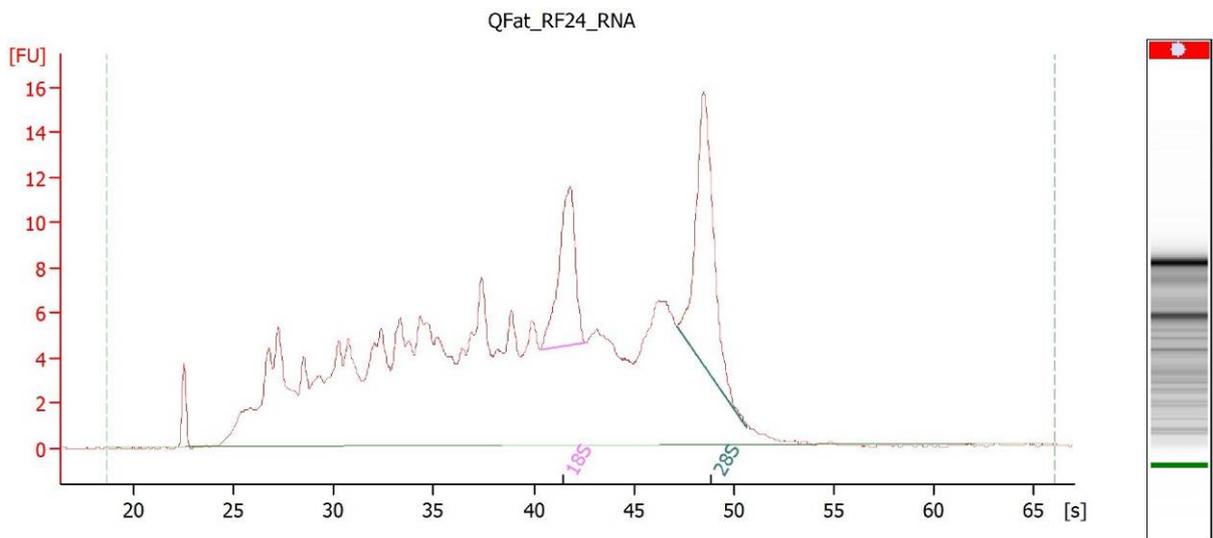
Overall Results for sample 9 : QFat_RF21_RNA

RNA Area:	232,7	RNA Integrity Number (RIN):	5.4 (B.02.08)
RNA Concentration:	148 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2,3	Result Flagging Label:	RIN: 5.40



Overall Results for sample 10 : QFat_RF22_RNA

RNA Area:	362,2	RNA Integrity Number (RIN):	3.7 (B.02.08)
RNA Concentration:	231 ng/ μ l	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0,5	Result Flagging Label:	RIN: 3.70



Overall Results for sample 12 : QFat_RF24_RNA

RNA Area:	322,6	RNA Integrity Number (RIN):	5.4 (B.02.08)
RNA Concentration:	206 ng/ μ l	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,6	Result Flagging Label:	RIN: 5.40

7 Literaturverzeichnis

- Agilent Technologies. (2018). *Agilent 2100 Bioanalyzer System: 2100 Expert Software User's Guide*. Abgerufen am 18. September 2019 von https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/2100_Bioanalyzer_Expert_USR.pdf
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., . . . Horstmann, C. (2011). *Molekularbiologie der Zelle*. New York: John Wiley & Sons.
- Albrektsson, T., & Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal*, 10(2), S. 96-101.
- Analytik Jena. (2018). *Instructions for Use: innuPREP RNA Mini Kit 2.0*. Abgerufen am 17. September 2019 von https://www.analytik-jena.de/fileadmin/content/products/02_Kits/innuPREP_RNA_Mini_Kit_2_0/Manual_innuPREP_RNA_Mini_Kit_2_0_en.pdf
- Balmayor, E. R., & van Griensven, M. (2015). Gene therapy for bone engineering. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, S. 9.
- Bates, P., & Ramachandran, M. (2006). Bone injury, healing and grafting. In M. Ramachandran, *Basic Orthopaedic Sciences. The Stanmore Guide*. London: CRC Press.
- Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I., & Pfaffl, M. W. (2010). mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, 50(4), S. 237-243.
- Berg, J., Tymoczko, J., Gatto jr., G., & Stryer, L. (2018). DNA, RNA und der Fluss der genetischen Information. In J. Berg, J. Tymoczko, G. Gatto jr., & L. Stryer, *Stryer Biochemie*. Berlin: Springer.
- Bettin, D., Dethloff, M., Steinbeck, J., & Polster, J. (1994). Organisation einer Knochen- und Gewebebank. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*, 132(6), S. 453-458.
- Betz, O. B., Betz, V. M., Abdulazim, A., Penzkofer, R., Schmitt, B., Schröder, C., . . . Müller, P. E. (2009). Healing of large segmental bone defects induced by expedited bone morphogenetic protein-2 gene-activated, syngeneic muscle grafts. *Human gene therapy*, 20(12), S. 1589-1596.

- Betz, O. B., Betz, V. M., Abdulazim, A., Penzkofer, R., Schmitt, B., Schröder, C., . . . Müller, P. E. (2010). The repair of critical-sized bone defects using expedited, autologous BMP-2 gene-activated fat implants. *Tissue Engineering Part A*, *16*(3), S. 1093-1101.
- Betz, V. M., Betz, O. B., Harris, M. B., Vrahas, M. S., & Evans, C. H. (2008). Bone tissue engineering and repair by gene therapy. *Frontiers in Bioscience*, *13*(13), S. 833-841.
- Betz, V. M., Kochanek, S., Rammelt, S., Müller, P. E., Betz, O. B., & Messmer, C. (2018). Recent advances in gene-enhanced bone tissue engineering. *The Journal of Gene Medicine*, *20*(6), S. e3018.
- Bio-Rad Laboratories. (o. D.a). *Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit: Instruction Manual*. Abgerufen am 17. September 2019 von <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10001298.pdf>
- Bio-Rad Laboratories. (o. D.b). *Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit: Spin Format Protocol Overview*. Abgerufen am 17. September 2019 von https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5257.pdf
- Boom, R. C., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & Van der Noordaa, J. P. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, *28*(3), S. 495-503.
- Bozo, I. Y., Deev, R. V., Drobyshev, A. Y., Isaev, A. A., & Eremin, I. I. (2016). World's first clinical case of gene-activated bone substitute application. *Case Reports in Dentistry*.
- Brown, R. A., Epis, M. R., Horsham, J. L., Kabir, T. D., Richardson, K. L., & Leedman, P. J. (2018). Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis: not all kits are created equal. *BMC Biotechnology*, *18*(1), S. 16.
- Brydone, A. S., Meek, D., & Maclaine, S. (2010). Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, *224*(12), S. 1329–1343.

- Campana, V., Milano, G., Pagano, E., Barba, M., Cicione, C., Salonna, G., . . .
Logroscino, G. (2014). Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(10), S. 2445-2461.
- Chen, D. I., Zhao, M., & Mundy, G. R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22(4), S. 233-241.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., & Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18(24), S. 5294-5299.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15(3), S. 532-4.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), S. 156-159.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), S. 581.
- Cirera, S. (2013). Highly efficient method for isolation of total RNA from adipose tissue. *BMC Research Notes*, 6(1), S. 472.
- Copois, V., Bibeau, F., Bascoul-Molleivi, C., Salvetat, N., Chalbos, P., Bareil, C., . . .
Del Rio, M. (2007). Impact of RNA degradation on gene expression profiles: assessment of different methods to reliably determine RNA quality. *Journal of Biotechnology*, 127(4), S. 549-559.
- Cornell, C. N., & Lane, J. M. (1998). Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 355, S. 267-273.
- Damm, K., Bach, S., Müller, K. M., Klug, G., Burenina, O. Y., Kubareva, E. A., . . .
Hartmann, R. K. (2015). Impact of RNA isolation protocols on RNA detection by Northern blotting. In M. Rederstorff (Hrsg.), *Small Non-Coding RNAs*. New York: Humana Press.

- De Ugarte, D. A., Ashjian, P. H., Elbarbary, A., & Hedrick, M. H. (2003). Future of fat as raw material for tissue regeneration. *Annals of Plastic Surgery*, 50(2), S. 215-219.
- De Ugarte, D. A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Zhu, M., . . . Hedrick, M. H. (2003). Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*, 174(3), S. 101-109.
- Dilworth, D. D., & McCarrey, J. R. (1992). Single-step elimination of contaminating DNA prior to reverse transcriptase PCR. *Genome Research*, 1(4), S. 279-282.
- Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., & Giannoudis, P. V. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 9(1), S. 66.
- Drenckhahn, D. (2008). Allgemeine Gewebelehre. In A. Benninghoff, & D. Drenckhahn, *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1: Zelle, Gewebe, Entwicklung, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), S. 126-139.
- Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z., & Hedrick, M. H. (2006). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 24(4), S. 150-154.
- García-Gareta, E., Coathup, M. J., & Blunn, G. W. (2015). Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*, 81, S. 112-121.
- Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., & Einhorn, T. A. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(5), S. 873-884.
- Grayson, W. L., Bhumiratana, S., Cannizzaro, C., & Vunjak-Novakovic, G. (2011). Bioreactor cultivation of functional bone grafts. In M. Vemuri, L. G. Chase, & M. S. Rao (Hrsg.), *Mesenchymal stem cell assays and applications*. Totowa: Humana Press.

- Hale, A. D., Green, J., & Brown, D. W. (1996). Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. *Journal of Virological Methods*, 57(2), S. 195-201.
- Harder, L., & Kuster, M. (2011). Frakturen, Gelenk- und Weichteilverletzungen. In J. Grifka, & M. Kuster (Hrsg.), *Orthopädie und Unfallchirurgie*. Berlin: Springer.
- Heiple, K. G., Chase, S. W., & Herndon, C. H. (1963). A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 45(8), S. 1593-1616.
- Hong, Y. H., Martin, L. A., Mulvaney, J. M., Burhans, M. S., Blaxall, B. C., & Hinton, R. B. (2015). RNA extraction from healthy and failing human myocardium: a comparative evaluation. *Biopreservation and Biobanking*, 13(2), S. 123-130.
- Huang, Z., Fasco, M. J., & Kaminsky, L. S. (1996). Optimization of DNase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR. *Biotechniques*, 20(6), S. 1012-1020.
- Hummon, A. B., Lim, S. R., Difilippantonio, M. J., & Ried, T. (2007). Isolation and solubilization of proteins after TRIzol® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *Biotechniques*, 42(4), S. 467-472.
- Imbeaud, S., Graudens, E., Boulanger, V., Barlet, X., Zaborski, P., Eveno, E., . . . Auffray, C. (2005). Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Research*, 33(6), S. e56-e56.
- Jahn, C. E., Charkowski, A. O., & Willis, D. K. (2008). Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), S. 318-324.
- Janke, J., Engeli, S., Gorzelniak, K., & Sharma, A. M. (2001). Extraction of total RNA from adipocytes. *Hormone and Metabolic Research*, 33(4), S. 213-215.
- Jeffries, M. K., Kiss, A. J., Smith, A. W., & Oris, J. T. (2014). A comparison of commercially-available automated and manual extraction kits for the isolation of total RNA from small tissue samples. *BMC Biotechnology*, 14(1), S. 94.
- Kakudo, N., Shimotsuma, A., Miyake, S., Kushida, S., & Kusumoto, K. (2008). Bone tissue engineering using human adipose-derived stem cells and honeycomb

- collagen scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84(1), S. 191-197.
- Kapinas, K., & Delany, A. M. (2011). MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Research & Therapy*, 13(3), S. 220.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., . . . Suda, T. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *The Journal of Cell Biology*, 127(6), S. 1755-1766.
- Kuang, J., Yan, X., Genders, A. J., Granata, C., & Bishop, D. J. (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLOS ONE*, 13(5), S. e0196438.
- Lee, J. Y., Peng, H., Usas, A., Musgrave, D., Cummins, J., Pelinkovic, D., . . . Huard, J. (2002). Enhancement of bone healing based on ex vivo gene therapy using human muscle-derived cells expressing bone morphogenetic protein 2. *Human Gene Therapy*, 13(10), S. 1201-1211.
- Lian, J. B., Stein, G. S., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Hassan, M. Q., Gaur, T., & Zhang, Y. (2012). MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology*, 8(4), S. 212.
- Liang, P., & Pardee, A. (1993). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Research*, 21(14), S. 3269-3275.
- Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2019). Knochen. In R. Lüllmann-Rauch, & E. Asan, *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Thieme.
- Malizos, K. N., & Papatheodorou, L. K. (2005). The healing potential of the periosteum: molecular aspects. *Injury*, 36(3), S. 13-19.
- Miron, R. J., & Zhang, Y. F. (2012). Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *Journal of Dental Research*, 91(8), S. 736-744.
- Mueller, O., Lightfoot, S., & Schroeder, A. (2004). RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control. *Agilent application note, publication*, 1, S. 1-8.

- Mundy, G. R. (1996). Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 324, S. 24-27.
- Naegele, G. (2013). Gesundheitliche Versorgung in einer alternden Gesellschaft. In M. Hüther, & G. Naegele, *Demografiepolitik*. Wiesbaden: Springer VS.
- Netzker, R. (2016). Zellzyklus und molekulare Genetik. In J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker, & R. Deutzmann, *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart: Thieme.
- Niethard, F., Pfeil, J., & Biberthaler, P. (2014). Grundlagen der Unfallchirurgie. In F. Niethard, J. Pfeil, & P. Biberthaler, *Orthopädie und Unfallchirurgie*. Stuttgart: Thieme.
- Pisani, P., Renna, M. D., Conversano, F., Casciaro, E., Di Paola, M., Quarta, E., . . . Casciaro, S. (2016). Major osteoporotic fragility fractures: Risk factor updates and societal impact. *World Journal of Orthopedics*, 7(3), S. 171.
- Pruß, A., & Katthagen, B. D. (2008). Muskuloskelettale Gewebebanken. *Der Orthopäde*, 37(8), S. 749-755.
- Qiagen. (2018a). *RNeasy® Fibrous Tissue Mini Handbook: For purification of total RNA from heart, skeletal muscle, aorta and other fiber-rich tissues*. Abgerufen am 17. September 2019 von <https://www.qiagen.com/au/resources/resourcedetail?id=8039840d-4815-4375-8933-bc09247e47c0&lang=en>
- Qiagen. (2018b). *RNeasy® Lipid Tissue Mini Handbook: For purification of total RNA from fatty tissues and all other types of tissue*. Abgerufen am 17. September 2019 von <https://www.qiagen.com/ch/resources/resourcedetail?id=7f13ac1a-841d-4e9b-b39d-42fe71b3d585&lang=en>
- Ren, B., Betz, V. M., Thirion, C., Salomon, M., Klar, R. M., Jansson, V., . . . Betz, O. B. (2019). Gene activated adipose tissue fragments as advanced autologous biomaterials for bone regeneration: osteogenic differentiation within the tissue and implications for clinical translation. *Scientific Reports*, 9(1), S. 224.
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA by SDS solubilization and phenol extraction. *Cold Spring Harbor Protocols*, S. pdb-prot5438.

- Safwani, W. K., Makpol, S., Sathapan, S., & Chua, K. H. (2013). Alteration of gene expression levels during osteogenic induction of human adipose derived stem cells in long-term culture. *Cell and Tissue Banking*, 14(2), S. 289-301.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). Extraction, Purification, and Analysis of mRNA from Eukaryotic Cells. In J. Sambrook, & D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Volume 1)*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., & Little, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in cell & developmental biology*, 19(5), S. 459-466.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., . . . Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7(1), S. 3.
- Seebach, C., & Marzi, I. (2011). Pathophysiologie des Knochens. In H.-P. Scharf, A. Rüter, T. Pohlemann, I. Marzi, D. Kohn, & K.-P. Günther, *Orthopädie und Unfallchirurgie: Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung*. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Sela, M., Anfinsen, C. B., & Harrington, W. F. (1957). The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 26(3), S. 502-512.
- Shapiro, F. (2008). Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *European Cells and Materials*, 15(53), S. e76.
- Sharma, D., Golla, N., Singh, D., & Onteru, S. K. (2018). A highly efficient method for extracting next-generation sequencing quality RNA from adipose tissue of recalcitrant animal species. *Journal of Cellular Physiology*, 233(3), S. 1971-1974.
- Shrivats, A. R., McDermott, M. C., & Hollinger, J. O. (2014). Bone tissue engineering: state of the union. *Drug Discovery Today*, 19(6), S. 781-786.
- Simms, D., Cizdziel, P. E., & Chomczynski, P. (1993). TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*, 15(4), S. 532-535.

- Simões, A. E., Pereira, D. M., Amaral, J. D., Nunes, A. F., Gomes, S. E., Rodrigues, P. M., . . . Rodrigues, C. M. (2013). Efficient recovery of proteins from multiple source samples after trizol® or trizol® LS RNA extraction and long-term storage. *BMC Genomics*, 14(1), S. 181.
- Sinitsky, M. Y., Matveeva, V. G., Asanov, M. A., & Ponasenko, A. V. (2018). Modifications in routine protocol of RNA isolation can improve quality of RNA purified from adipocytes. *Analytical Biochemistry*, 543, S. 128-131.
- Squidonius. (o. D.). *PhOH-CHCl3 extraction*. Abgerufen am 20. November 2019 von https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PhOH-CHCl3_extraction.svg
- Statistisches Bundesamt. (2019). *Bevölkerung im Erwerbsalter sinkt bis 2035 voraussichtlich um 4 bis 6 Millionen*. Abgerufen am 18. August 2019 von https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2019/06/PD19_242_12411.html;jsessionid=B6D30D436EFC469FDCF0431A0D8F777A.internet741
- Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, 11(5), S. 18-25.
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *BioMed Research International*.
- Thermo Fisher Scientific. (2012). *NanoDrop Lite: User Guide*. Abgerufen am 18. September 2019 von <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/User-Guide-2752-NanoDrop-Lite-UG.pdf>
- Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150(3698), S. 893-899.
- Van de Putte, K. A., & Urist, M. R. (1965). Osteogenesis in the Interior of Intramuscular Implants of Decalcified Bone Matrix. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 43, S. 257-270.
- Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, K. H., & Kim, S. K. (2015). Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, S. 269-281.
- Virk, M. S., Sugiyama, O., Park, S. H., Gambhir, S. S., Adams, D. J., Drissi, H., & Lieberman, J. R. (2011). "Same day" ex-vivo regional gene therapy: a novel strategy to enhance bone repair. *Molecular Therapy*, 19(5), S. 960-968.

- Wagner, A., Roth, A., & Venbrocks, R. A. (2010). Knochenbank. In K. M. Peters, & D. P. König (Hrsg.), *Fortbildung Osteologie*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Welsch, U., & Kummer, W. (2018). Bindegewebe. In T. Deller, U. Welsch, & W. Kummer (Hrsg.), *Histologie: Das Lehrbuch*. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Wieggers, U., & Hiltz, H. (1971). A new method using 'proteinase K' to prevent mRNA degradation during isolation from HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 44(2), S. 513-519.
- Wosczyzna, M. N., Biswas, A. A., Cogswell, C. A., & Goldhamer, D. J. (2012). Multipotent progenitors resident in the skeletal muscle interstitium exhibit robust BMP-dependent osteogenic activity and mediate heterotopic ossification. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(5), S. 1004-1017.
- Yousefi, A. M., James, P. F., Akbarzadeh, R., Subramanian, A., Flavin, C., & Oudadesse, H. (2016). Prospect of stem cells in bone tissue engineering: a review. *Stem Cells International*, 2016.
- Zuk, P. A., Zhu, M. I., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., . . . Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), S. 211-228.

8 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** Schematischer Aufbau des Knochens und seiner Abschnitte am Beispiel des menschlichen Femurs (proximaler Teil). Die trajektorielle Verlaufsrichtung der Knochentrabekel ist farblich markiert. Quelle: adaptiert von Niethard, Pfeil & Biberthaler (2014). 2
- Abbildung 2** Verlauf der Kollagenfibrillen im Lamellenknochen. Die Lamellen sind zirkulär um das zentrale Haversgefäß (G) angeordnet. Die Kollagenfibrillen jeder Lamelle verlaufen parallel zueinander. Quelle: adaptiert von Lüllmann-Rauch & Asan (2019). 3
- Abbildung 3** Histologische Struktur des Geflecht- (G) und Lamellenknochens (L) im Vergleich (polarisationsoptische Darstellung, Kompakta des Unterkiefers, Schwein). H = Haverskanal, als Zentrum eines Osteons und Merkmal des Lamellenknochens. Quelle: adaptiert von Lüllmann-Rauch & Asan (2019). 5
- Abbildung 4** Osteon (Goldner-Färbung). Zentral liegt der Haverskanal, bestehend aus einem Havers-Gefäß (G) und dem Endost (EO). Die Osteozyten (Oz) synthetisieren die Speziallamellen (hier Orange) zirkulär um den Havers-Kanal. Quelle: adaptiert von Lüllmann-Rauch & Asan (2019). 6
- Abbildung 5** Schematische Darstellung der indirekten Frakturheilung. A) Bildung des Hämatoms, Einwanderung von Thrombozyten und Entzündungszellen. B) Bildung des Knorpelkallus und dessen Ossifikation im weiteren Verlauf. C) Remodeling. Quelle: adaptiert von Seebach & Marzi (2011). 9
- Abbildung 6** Aufbau eines Nukleotids. Quelle: adaptiert von Netzker (2016). 14
- Abbildung 7** Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Chomczynski & Sacchi (1987). Links wird die Trennung des Lysats in verschiedene Phasen gezeigt. Es schließt sich die RNA-Fällung mit Isopropanol an, bei der sich ein Pellet bildet. Quelle: adaptiert von Squidonius (n.d.). 17
- Abbildung 8** Übersicht der Arbeitsschritte des Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit. Quelle: adaptiert von Bio-Rad Laboratories (n.d.). 28
- Abbildung 9** Übersicht der Arbeitsschritte des innuPREP RNA Mini Kit. Quelle: adaptiert von Analytik Jena (2018). 31

Abbildung 10 Übersicht der Arbeitsschritte des RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit. Quelle: adaptiert von Qiagen (2018).....	34
Abbildung 11 Übersicht der Arbeitsschritte des RNeasy® Lipid Tissue kit. Quelle: adaptiert von Qiagen (2018).....	37
Abbildung 12 Aussagekräftige Punkte eines Elektropherogramms über die Integrität der RNA. Quelle: adaptiert von Mueller et al. (2004).....	42
Abbildung 13 Beispielhafte Elektropherogramme für RNA-Proben verschiedener Integrität. Quelle: adaptiert von Mueller et al. (2004).....	42
Abbildung 14 Gewicht der Muskelgewebeproben (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.....	44
Abbildung 15 Gewicht der Fettgewebeproben (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.....	45
Abbildung 16 RNA-Konzentration der Isolate aus dem Muskelgewebe (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.....	46
Abbildung 17 260/280-Quotient der Isolate aus dem Muskelgewebe (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Mit der gestrichelten Linie wird der für Folgeexperimente minimal geforderte 260/280-Quotient von 1,80 markiert.	47
Abbildung 18 RNA-Konzentration der Isolate aus dem Fettgewebe (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.....	48
Abbildung 19 260/280-Quotient der Isolate aus dem Fettgewebe (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Mit der gestrichelten Linie wird der für Folgeexperimente minimal geforderte 260/280-Quotient von 1,80 markiert.	49
Abbildung 20 RNA Integrity Number (RIN) der Isolate aus dem Muskelgewebe (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Mit der gestrichelten Linie wird die für Folgeexperimente minimal geforderte RIN von 7 markiert.....	50
Abbildung 21 RNA Integrity Number (RIN) der Isolate aus dem Fettgewebe (n = 5 pro Methode). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Mit der	

gestrichelten Linie wird die für Folgeexperimente minimal geforderte RIN von 7
markiert..... 51

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Ein Überblick über die Hauptklassen zellulärer RNAs. Es handelt sich nicht um eine vollständige Aufzählung aller RNA-Typen. Quelle: adaptiert von Alberts et al. (2011). 15

10 Abkürzungsverzeichnis

°C	<i>Grad Celsius</i>
µg	<i>Mikrogramm</i>
µl	<i>Mikroliter</i>
µm	<i>Mikrometer</i>
EZM	<i>Extrazelluläre Matrix</i>
g	<i>Einheit der g-Kraft</i>
I.E.	<i>Internationale Einheiten</i>
ml	<i>Milliliter</i>
mm	<i>Millimeter</i>
mM	<i>Millimolar</i>
ng	<i>Nanogramm</i>
nm	<i>Nanometer</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)</i>

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die das Entstehen dieser Dissertation ermöglicht haben.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Peter Müller, danke ich für die Überlassung des Themas und die organisatorische Hilfe beim Verfassen meiner Dissertation. Vor allem bedanke ich mich aber für die lehrreiche Kritik und Rückmeldung bezüglich meiner Arbeit.

Ebenfalls bedanke ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Ph.D. Roland Klar, der mir bei Fragen jederzeit behilflich sein konnte und meine Tätigkeit im Labor stets unterstützte. Auch die gemeinsamen Diskussionen gaben mir immer wieder neue und wertvolle Denkanstöße.

Außerdem gilt besonderer Dank allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Labors für Biomechanik und experimentelle Orthopädie der Orthopädischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Universität München, die mich bei der Durchführung meines Experiments unterstützt haben. Allen voran seien hier Frau Julia Redeker und Frau Bärbel Schmitt genannt.

Zu guter Letzt bedanke ich mich herzlichst bei meiner Familie und meinen engen Freunden für die zahlreichen Diskussionen und konstruktive Kritik nicht nur im Rahmen meiner Arbeit, sondern auch darüber hinaus. Vor allem bedanke ich mich aber für die Motivation und Aufmunterung in den vergangenen Jahren, die dazu geführt haben, dass ich nun meine Dissertation fertig gestellt habe.

12 Eidesstattliche Erklärung

Notkamp, Pascal

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Quantitativer und qualitativer Vergleich verschiedener
RNA-Extraktionsmethoden an osteogen induzierbaren Geweben der Ratte**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 26.04.2022

Pascal Notkamp