

II. Material und Methoden

A. Detektion

A. 1. RNA-Extraktion

A. 1.1. Extraktion von Myokardgewebe

Reagenzien: TRIZOL® Reagenz (GibcoBRL), Chlorophorm (Sigma), 95% Isopropanol (Sigma), DEPC-Wasser (Roth), 75% Ethanol (GibcoBRL), Zentrifuge (Eppendorf),

Durchführung: Es wurde größtmöglicher Wert darauf gelegt, die Proben bis zur Zellyse stets in gefrorenem Zustand zu verarbeiten. Mörser und Mikropistill wurden einige Minuten lang mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt, bevor das Gewebe damit pulverisiert wurde. Jeweils 40 mg Gewebe wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße eingewogen.

Auf 40 mg Gewebe wurde 1 ml TRIzol Reagenz gegeben, mechanisch homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Zusatz von 0,2 ml Chlorophorm wurden die Proben etwa 15 s mit der Hand geschüttelt und weitere 2-3 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15 min Zentrifugation (14 000 rpm, 4°C), die zu einer Phasentrennung führte, wobei die RNA in der oberen wässrigen Phase verbleibt. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die RNA mit 0,5 ml 95%igem Isopropanol 10 min präzipitiert und anschließend 10 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das RNA Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen erneut zentrifugiert (5', 7500 rpm, 4°C). Das Ethanol wurde dekantiert, dessen Reste durch Verdunstung aus den Proben entfernt und diese schließlich in 20 µl Aqua dest. aufgenommen.

Die Beziehung

$$1 \text{ OD} = \varepsilon \times 10^{-3} \text{ [mmol]}$$

erlaubt die Bestimmung der Konzentration:

$$k = \text{OD} \times \varepsilon \times 10^{-3} \times v$$

- k - Konzentration der Nukleinsäure in mmol
- OD - (optical density) Extinktion bei 260 nm
- ε - Extinktionskoeffizient NEW WASH-Reagenz
- v - Verdünnung der Probe

Die Qualität der isolierten RNA wurde fotometrisch über das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm und eine Begutachtung der 28s und 18s rRNA Banden in der Agarosegelelektrophorese bestimmt.

A. 1.2. Extraktion von neonatalen Kardiomyozyten

Material: 2-3 Tage alter Wistar-Ratten

Reagenzien: CMF-HBSS, ohne Ca^{2+} u. Mg^{2+} , DMEM, + 10% NBCS, +1% P/S; Fetales Kälberserum (NBCS); L-15 Medium; M 199 Medium (alles von Gibco BRL Life Technologies)

Durchführung: Die asservierten Herzen wurden nach Präparation der Vorhöfe, und einem Waschschrift in 40 ml eiskaltem HBSS in ca. 1mm³ große Stücke zerteilt und anschließend für 18-20 Stunden mit 50µg/ml Trypsin (1ml Trypsin-EDTA in 9 ml HBSS bei 10 Herzen) bei 4°C in einer Zellkulturschale inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Trypsin-Inhibitor und durch Inkubation für 5 Minuten bei 37°C abgestoppt. Nun wurden die Gewebestücke in 5 ml Kollagenase für 45 Minuten bei 37°C im Wasserschwenkbad weiter verdaut und durch anschließendes Auf- und Niederpipettieren weiter zerkleinert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Überstand mit den unverdauten Gewebsresten wurde mittels eines 70 µm Zellsieb filtriert. Die übrigen Gewebsreste wurden anschließend erneut in L-15 Medium resuspendiert und nochmals filtriert. Die Zellen wurden, nach einer 20 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, für 5 Minuten bei 700U/ min zentrifugiert und das Zellpellet in 25 ml Medium M199 mit 10% NBCS, 10µm Ara-C und Penicillin-Streptomycin resuspendiert. Die Separation der einzelnen Zelltypen wurde dadurch erreicht, dass die Zellsuspension in einer 750 ml Zellkulturflasche für 1 Stunde bei 37°C präplattiert wurde. Dabei reichern sich im Überstand die neonatalen Kardiomyozyten an, während sich andere Zelltypen, wie zum Beispiel die Fibroblasten, auf dem Boden der Zellkulturflasche absetzen. Der Anteil teilungsfähiger Zellen in der Kardiomyozytenkultur wurde im Folgenden durch die Zugabe des Spindelgifts Ara-C weiter reduziert. Der Überstand mit den Kardiomyozyten wurde anschließend abgenommen und die Zellzahl nach Anfärben mit Trypanblau in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Danach wurden die Zellen in Fibronectin-beschichtete Kulturschalen (six-well-Platte, 9,6 cm² Wachstumsfläche) mit einer Dichte von ca. 2000 Zellen/ mm² (1,5 x 10⁶/ well) ausplattiert.

A. 2. DNase Digestion

Reagenzien: (a) DNase I (GibcoBRL) (b) DNase I (Ambion):

Durchführung: Alle RNA- Präparationen wurden zunächst bei Raumtemperatur einem 15 min Verdau mit DNase I unterzogen. (a) Alle RNA- Präparationen, die mit konventioneller RT-PCR untersucht wurden, wurden zunächst bei Raumtemperatur einem 15 min Verdau mit DNase I unterzogen. Durch nachfolgenden Zusatz von 1 µl 25 mM EDTA erfolgte durch 15 min Inkubation bei 65°C und folgender Abkühlung auf Eis eine Hitzeinaktivierung der DNase I. (b) Folgendes

Reaktionsgemisch wurde für alle Proben, die mit der SYBR Green™ real-time RT-PCR untersucht wurden, bereit: Zu 1 µg RNA wurde 1 µl DNase I sowie 2 µl DNase Puffer (10 x) gegeben und mit der entsprechenden Menge RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde jedem Ansatz 2 µl DNase-Inactivation zugegeben und alles unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur nochmals 2 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes war die RNA gebrauchsfertig.

A. 3. Reverse Transkription

Material: RNA (s. A.1.), 2 mM Primer (BioTez Berlin-Buch), Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (GibcoBRL), dNTP Mix (GibcoBRL)

Durchführung: Hierfür wird eine aus Retroviren isolierte Reverse Transkriptase verwendet. Sie ist eine RNA-abhängige Polymerase, die mit sogn. Primern (s.u.) an RNA-Molekülen einen komplementären Strang cDNA synthetisiert. Dieser DNA-Strang wird auch als Erststrang bezeichnet. Er dient als Matrize für alle folgenden cDNA Transkripte. Folgende RNA/Primer Mischung wurde in einem sterilen und zuvor autoklavierten 0,5ml Eppendorfgefäß bereit:

- 2 µg RNA (in 11 µl DNase Reaktionsansatz)
- 1 µl 2 mM Primer (reverse für sense RNA, forward für antisense RNA)
- auf 25 µl mit sterilem Wasser auffüllen

In einem weiteren Gefäß wurden folgende Reaktionskomponenten zu einem Reaktionsmix vermengt:

- 5 µl 10x PCR-Puffer
- 5 µl DTT
- 2,5 µl 50mM MgCl₂
- 2,5 µl dNTP
- 10 µl H₂O

Die RNA/Primer Mischung jeder Probe wurde zehn Minuten bei 70°C denaturiert und anschließend die Temperatur auf 50°C gehalten. Zu jeder Probe wurden bei 50°C 25 µl des Reaktionsmixes und jeweils 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase zugegeben. Alle Komponenten wurden durch Vortexen homogenisiert, kurz anzentrifugiert und bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 50 min durch finales zwanzigminütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt und auf 4 °C abgekühlt. Es wird beschrieben, dass intakte mRNA templates nach Reverser Transkription mit der cDNA als template für die PCR konkurrieren können (Clontech RT-PCR, S7, Ref 10). Daher wurden alle Probenansätze vor der PCR einer RNase H Behandlung (RNase H, GibcoBRL) unterzogen, die der spezifischen Digestion des RNA-Strangs eines RNA-DNA-Hybrids dient.

A. 3.1. Primer

Primer sind Startpunkte der Synthese bei Reverser-Transkription (RT) und Polymerasekettenreaktion (PCR). Es handelt sich um synthetisch hergestellte, einzelsträngige Oligonukleotidmoleküle, die während der Annealingphase über Wasserstoffbrückenbindungen komplementär an RNA oder DNA binden. Sie erzeugen ein freies 3'-Ende, das von Reverser Transkriptase oder DNA-Polymerase in 5' → 3' –Richtung verlängert werden kann. Primer spielen eine maßgebende Rolle für das Gelingen einer PCR. Relevant sind vor allem deren Struktur und Sequenz. Sie werden spezifisch für jede Aufgabenstellung entworfen.

Zum Nachweis von mRNA (sense RNA) wird in der Reversen Transkription der reverse Primer verwendet. Der reverse Primer ist ein in seiner Sequenz zur sense mRNA komplementäres Oligonukleotidmolekül. Der Nachweis von antisense RNA erfolgt analog mit Hilfe des forward Primers, dessen Sequenz komplementär zur antisense RNA ist.

Die Konstruktion der Primer erfolgte gemäß folgenden Richtlinien:

- Vermeidung intramolekularer Duplex- oder Schleifenbildung durch Vermeidung palindromischer Sequenzen
- Anteil der Basen Guanin und Cytosin im Vergleich zu Adenin und Thymin etwa 50%
- Primerlänge mindestens eine Länge von 17 Basen
- AT/GC-Verhältnis um 50 %
- keine „ungewöhnlichen“ Basenabfolgen wie Poly-A oder lange GC-Bereiche, um Fehlhybridisierungen (Mispriming) und Leserasterverschiebungen (Frameshifts) zu vermeiden.
- ähnliche Schmelztemperatur beider Primer, Unterschied nicht mehr als 4° C
- Die Sequenz sollte möglichst spezifisch für das gesuchte Amplikon sein, um die Amplifikation von Artefakten zu vermeiden.
- Am 3`-Ende sollten ein bis zwei GC-Basen sitzen, um eine bessere Bindung und Elongation zu erreichen.
- Primer dürfen nicht miteinander hybridisieren (Primerdimer), daher sollten sie gerade am 3`-Ende möglichst geringe Komplementarität besitzen.
- Je reiner der Primer, desto besser ist er für die Amplifikation geeignet (HPLC- oder PAGE-Aufreinigung).
- Im Falle einer RT-PCR in genomischer DNA ist es erforderlich, die Primer so zu wählen, dass sie die Exon-Intron-Grenzen überspannen, damit die Amplifikation genomischer DNA aufgrund des längeren Intron-beinhaltenen Fragmentes erkannt wird.

A. 3.2. Konstruktion RNA-spezifischer Primer

Da die Sequenz des β_1 -Adrenorezeptors keine Introns enthält, konnten für diesen keine RNA-spezifischen Primer konstruiert werden. Eine mögliche Methode sicherzustellen, dass ausschließlich RNA als Quelle für die RT-PCR diene, erfolgt über die Verwendung RNA-spezifischer Primer. Um prinzipiell die Effektivität der DNase Behandlung der RNA Präparation nachzuweisen, wurde ein Intron enthaltendes Referenzgen untersucht (Troponin I). Die Sequenz der Primer wird aus Genabschnitten innerhalb von Exons gewählt, die durch mindestens ein Intron getrennt sind. DNA-spezifische Primer lassen sich analog durch Verwendung von Sequenzen innerhalb zweier Introns, die durch ein Exon getrennt sind, konstruieren. Da die Sequenz des Introns bei der RNA-Synthese gespliced wird, ist das DNA-Produkt in der Agarosegelelektrophorese größer als das RNA Produkt dieses Primerpaars.

A. 3.3. Primer

Ziel der Untersuchung war es, möglichst entlang der gesamten Gensequenz Primer zu identifizieren, mit denen sich zum einen überhaupt Produkte für den β_1 -adrenergen Rezeptor nachweisen lassen. Zum anderen sollte auf diese Weise ein Primerpaar identifiziert werden, welches zu einer besonders effektiven Amplifikation des Produkts in der PCR führt. Dieses Primerpaar (vgl. Tabelle 1) sollte dann für weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der antisense RNA eingesetzt werden.

Bezeichnung	Sequenz	Position [*]	Position **]	Länge [bp]	GC [%]	T _A [°C]
β_1 AR for 0707	caa gtg ctg cga ctt cgt cac c	707	725	22	59	70
β_1 AR rev 0863	gaa gcg gcg ctc gca gct gtc g	863	877	22	73	76

Tabelle 1 Primer für den β_1 -adrenergen Rezeptor, Position in Sequenz bei der Ratte * [Machida, 1990], Position in Sequenz beim Menschen ** [Frielle, 1987]

Ein erster Schritt bei der Etablierung einer PCR ist der Test verschiedener Primerpaare. Entlang der Gensequenz des β_1 -adrenergen Rezeptors wurde eine Reihe von Primern ausgewählt und in verschiedenen Kombinationen miteinander getestet. Die Untersuchungen wurden zunächst an Rattenmyokard durchgeführt. Konnte mit einem Primerpaar ein Produkt bei der Ratte detektiert werden, wurde es im zweiten Schritt beim Menschen eingesetzt.

Mit den in Tabelle 2 (Seite 25) gelisteten Primern konnten jeweils Produkte für den β_1 -adrenergen Rezeptor nachgewiesen werden. Für weitere Analysen wurde aufgrund der größten Signalintensität das Primerpaar β_1AR rev 0863 und β_1AR for 707 ausgewählt. Für dieses Primerpaar erfolgte im nächsten Schritt die Optimierung der PCR-Reaktionsbedingungen. Welche Primerpaare jeweils ein Produkt ergaben, wird in Abschnitt darlegt VI.B.1. dargelegt.

A. 4. Konventionelle PCR

Reagenzien: Taq DNA Polymerase, recombinant (Gibco BRL), cDNA, 10 mM Primer (BioTez Berlin-Buch), dNTP Mix (GibcoBRL), PCR-Puffer (GibcoBRL), MgCl₂ (GibcoBRL), PCR-Gerät, Personal Cycler (Biometra)

Durchführung: Je nach Anzahl der Proben wurde ein Vielfaches des folgenden 50 μ l PCR-Ansatzes in einem sterilen und zuvor autoklavierten 0,5 ml Eppendorfgefäß bereitet:

15 μ l Aqua dest.	1 μ l 10 mM Forward Primer
5 μ l 10 x PCR Puffer	1 μ l 10 mM Reverse Primer
1,5 μ l 50 mM MgCl ₂	25 μ l cDNA(RTAnsatz)
1 μ l 10 mM dNTP-Mix	0,5 μ l Taq

Zu jeweils 24 μ l RT-Ansatz (cDNA) wurden 24 μ l dieses Reaktionsmixes gegeben. Die Probe wurde mit 75 μ l Mineralöl überschichtet, drei Minuten bei 94 °C denaturiert und bei 80 °C mit 0,5 μ l Taq DNA Polymerase versetzt. Die Amplifikation erfolgte durch zyklische Abfolge von

- Denaturierung: 1 min, 94 °C
- Annealing: 1 min
- Extention: 1 min, 74 °C

unter Verwendung eines Thermal-PCR-Cycler Gerätes. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei 72°C inkubiert und abschließend auf 4°C gekühlt. Die Annealingtemperatur richtet sich nach den chemischen Eigenschaften der verwendeten Primer, z.B. Basenverhältnis und Molekulargewicht [Linz *et al.* 1990] und lässt sich theoretisch errechnen. Zum Nachweis von Produkten über die Kombination verschiedener Primerpaare wurden je nach Schmelzpunkten der Primer Annealingtemperaturen zwischen 56°C und 66°C verwendet. Für das Primerpaar β_1AR for 707/ β_1AR rev 863 (Position 725/877 beim Mensch, wurde eine Annealingtemperatur von 62°C und 33 Zyklen verwendet.

Qualitätssicherung: Beim Einsatz von Primern mit unterschiedlich errechneter Annealingtemperatur wurde die optimale Annealingtemperatur experimentell überprüft. Um sicher zu stellen, dass die PCR-Signale nicht auf Artefakte durch genomische DNA zurückzuführen sind, wurde dem Versuchsansatz der RT-PCR kein Enzym Reverse Transkriptase zugesetzt. So kann in der

Reversen Transkription keine Umschrift in cDNA erfolgen. Der DNA-Polymerase fehlt somit im folgenden Schritt das Substrat. Eine Produktamplifikation kann nur stattfinden, sofern Reste genomischer DNA in der Präparation verblieben sind.

A. 5. Agarosegelelektrophorese

Material: Agarose (Sigma), Erlenmeyerkolben, TBE-Puffer, Ethidiumbromid (Sigma), Gelkammer mit Gelschlitten, Taschenformer, DNA-Loading Buffer (GibcoBRL), UV-Tisch, Horizontales Elektrophoresesystem, Easy-Cast (Owl Scientific, Inc.)

Durchführung: Für ein 1 % iges Agarosegel wurden 0,5 g Agarose im Erlenmeyerkolben abgewogen, in 50 ml TBE-Puffer (s.u.) unter Rühren zum Kochen gebracht bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Dann wurden 5 µl EtBr-Lösung (10 mg/ml) hinzugeben. Die Gellösung wurde in den vorbereiteten Gelschlitten gegossen, ein Kamm (Taschenformer) eingesetzt und etwa 15 Minuten erstarren lassen. Anschließend wurde der Kamm entfernt und das Gel in die mit 0.5x TBE-Puffer gefüllte horizontale Gelkammer eingesetzt. Ein Größenstandard sowie 10 µl der zu analysierenden DNA-Proben wurden nach Zugabe von 3µl DNA-Loading Buffer in die Geltaschen eingebracht. Nach dem Einlaufen der Proben bei reduziertem Strom erfolgte die Auftrennung bei konstant 10 V/cm.

B. Struktur

B. 1. Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte am Max Planck Institut für Infektiologie, Monbijoustr. 2, 10117 Berlin.

B. 2. Transkriptgröße

Material: Myokardgewebe

Reagenzien: Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma BioTez in Berlin-Buch. Übrige PCR-RT-Reagenzien wie unter A.3. und A.4.

Durchführung: Zur Bestimmung der Größe der antisense RNA wurden entlang der gesamten Sequenz des β 1-adrenergen Rezeptors sowohl bei der Ratte als auch beim Mensch mehrere forward- und reverse Primer ausgewählt und in verschiedenen Kombinationen in konventionellen RT-PCR Reaktionen (vgl. A.3. und A.4) getestet. Eine Übersicht der verwendeten Primer zeigt Tabelle 2 Seite 25.

Bezeichnung	Sequenz	Position [*]	Position [**]	Länge [bp]	GC [%]	T _A [°C]
β1AR for 0008	gtg ctt ccc agg cgc ggc cca gtc	8	-	24	75	84
β1AR for 0014	cgg gct tct ggg gtg ttc	-	14	18	67	60
β1AR for 0269	cat cgt gct gct cat cgt ag	269	287	20	55	62
β1AR for 0342	gct gca gac gct cac caa cc	342	360	20	76	66
β1AR for 0472	tct tct gcg agc tgt gga cct ca	-	472	23	57	72
β1AR for 0707	caa gtg ctg cga ctt cgt cac c	707	725	22	59	70
β1AR for 1035	cta cgc gag cag aag gcg ctc	-	1035	21	67	70
β1AR for 1148	ctt caa ccc cat cat cta ctg	1148	1199	21	48	62
β1AR for 1179	gac ttc cgc aag gct ttc cag	1179	1230	21	57	66
β1AR for 1397	gac cac tgt gga cag cga ttc gag	1397	-	24	58	76
β1AR for 1448	ggc ggc ggc gga cag cga ctc gag	-	1448	24	79	86
β1AR rev 0311	cac gat cac caa cac gtt gcc cac	311	-	24	58	76
β1AR rev 0337	gcg atg gcc acg atc acc	319	337	18	67	60
β1AR rev 374	gaa gag gtt ggt gag cgt ctg	356	374	21	57	66
β1AR rev 0543	caa tga cac aca ggg tct cga tgc	455	543	24	54	74
β1AR rev 0863	gaa gcg gcg ctc gca gct gtc g	863	877	22	73	76
β1AR rev 1250	ctg gaa ggc ctt gcg gaa gtc	1199	1250	21	62	68
β1AR rev 1335	cat cgt cgt cgt cgt ccg aag	1335	1386	21	62	68
β1AR rev 1552	ctc tct tcc tct agg gat gca g	1552	-	22	54	68
β1AR rev 1621	gat tgt ggg ctt cga gtt cac ctg	1644	1621	24	54	74
β1AR rev 1642	ctg tgg gct tcg cat tca cct g	1642	1619	22	59	70

Tabelle 2 Übersicht der Primer für den β1-adrenergen Rezeptor, Position in Sequenz bei der Ratte * [Machida, 1990], Position in Sequenz beim Menschen ** [Frielle, 1987]

B. 3. Extraktion von Poly(A)-RNA

Material: Myokardgewebe Wistar Ratten

Reagenzien: QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech)

Durchführung: Das Prinzip der Methode beruht auf der Bindung des poly(A)⁺Endes der RNA an Oligo(dt)-Zellulose, welche nach mehreren Waschschrinen, in denen nicht-polyadenylierte RNA

entfernt wird, durch spezifische Elution extrahiert wird. Die Präparation erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Das RNA-Pellet wurde am Ende der Isolation in 15 µl Elutionspuffer aufgenommen. Die so gewonnene RNA wurde nach spezifischer Reverser Transkription (Mensch: sense Primer R877, antisense Primer F725. Ratte: sense Primer R863, antisense Primer F707) mittels konventioneller PCR (62°C Annealingtemperatur, 33 Zyklen) und anschließender Agarosegelelektrophorese (2%iges Gel) untersucht.

B. 4. Detektion von RNA-Duplexen

Material: Aus Kardiomyozyten wurde bei der RNA-Präparation einerseits Kern-RNA, andererseits zytoplasmatische RNA angereichert (vgl. Kapitel IV.C.2.) sowie zur Kontrolle parallel eine gesamt-RNA-Präparation vorgenommen (vgl. Kapitel IV.A.1.).

Reagenzien: RNase A (Boehringer), Reaktionspuffer: 20µl 10mM Tris-HCL, pH 7,5; 20 mM EDTA.

Durchführung: Zum Nachweis der RNA-Duplexe wird ein modifiziertes RNase-Protection Essay durchgeführt. Alle RNA-Präparationen werden einer standardgemäßen DNase Digestion unterzogen. Jeweils die Hälfte der Proben wird zusätzlich einer RNase A Behandlung ausgesetzt. RNA A degradiert selektiv einzelsträngige RNA, nicht jedoch doppelsträngige RNA. In einer anschließenden RT-PCR konnten nur noch Produkte nachgewiesen werden, sofern diese während der RNase A Behandlung in doppelsträngiger Form vorgelegen haben.

Durchführung: Die RNase A Behandlung erfolgte nach der DNase Behandlung durch Vermengung folgender Reagenzien:

1,5 µg RNA

2 µl Puffer

1 µl RNase A

auf 20 µl mit Aqua dest. auffüllen

Alles wurde 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Reaktion anschließend mit EDTA gestoppt. Die nachfolgende Reverse Transkription von antisense RNA-Transkripten erfolgte mit dem forward Primer, die der sense Transkripte mit dem reverse Primer. Die c-DNA wurde bei 62 °C (Annealing) in 33 PCR-Zyklen amplifiziert, elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und optodensitometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte rein qualitativ durch visuelle Begutachtung der detektierten Banden im Agarosegel.

C. Lokalisation

C. 1. Extraktion zytoplasmatischer RNA

Material: Neonatale Kardiomyocytenzellkultur

Reagenzien: Puffer 1: 50 mM Tris-HCL, pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,5 % Igepal (Nonidet P-40). Der Puffer wurde vor dem Einsatz autoklaviert.

Durchführung: Die Zellen einer Kulturplatte werden vor der Isolierung dreimal mit kaltem PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) gewaschen und dann mechanisch, mit Hilfe eines Kunststoffschabers in einem kleinen Volumen PBS geerntet. Jeweils 6 wells werden gepoolt, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (5', 300 x g, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wird verworfen. Der Aufschluss der Zellen erfolgt durch vorsichtige Zugabe von 125 µl eiskaltem Lysispuffer (Puffer 1) zum Pellet, welches unter Vermeidung von Schaumbildung aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert wird. Durch Zentrifugation (2 min, 4°C) werden die Zellkerne sedimentiert und verworfen. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1,3 µl 20 % SDS versetzt und sofort gevortext. Nachfolgend werden 0,85 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugesetzt und alles 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol und starkem Mischen wird erneut zentrifugiert (maximal 1 min, 4°C). Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Extraktion mit 400 µl Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol, starkem Mischen und Zentrifugation (maximal 1 min, 4°C) wiederholt. Daraufhin erfolgt die Ethanolfällung. Dazu wird wiederum die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und das Volumen bestimmt. Es folgt die Zugabe von 500 µl 100% Ethanol und 3M Natriumacetat, pH 5,2, dessen Menge etwa einem Zehntel des zuvor bestimmten Volumens betragen sollte. Alles wird 30min auf Eis inkubiert, nachfolgend zentrifugieren (15 min, 4°C) und das Pellet mit 75 % Ethanol/ 25 % 0,1 M Natriumacetat, pH 5,2 gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (15 min, 4°C) und dem Trocknen des Pellets (5', Raumtemperatur) erfolgt schließlich die Aufnahme des Pellets in 30 µl Wasser.

C. 2. Extraktion von Kern RNA

Material: Neonatale Kardiomyocytenzellkultur

Reagenzien: Puffer 2: 10 mM Tris-HCL, pH 7,4, 3 mM CaCl, 2 mM MgCl₂, 0,5 % Igepal (Nonidet P-40)

Durchführung: Die Zellen einer Kulturplatte werden vor der Isolierung dreimal mit kaltem PBS

(ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) gewaschen. Zunächst wurde das PBS aus der Kulturplatte entfernt. Dann wurden die Zellen mit 200 μ l eiskaltem Puffer 2 homogenisiert, zentrifugiert (10', 500 x g, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser wurde mit einer entsprechenden Menge Proteinase K (20 mg/ml) versetzt, so dass die Endkonzentration 50 μ g/ μ l (1:400) betrug, und 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 μ l Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol und starkem Mischen wurde erneut zentrifugiert (maximal 1', 4°C). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Extraktion durch Zugabe von 200 μ l Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol, starkem Mischen und Zentrifugation (maximal 1', 4°C) wiederholt. Die obere Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 400 μ l eiskaltem Isopropanol versetzt und 30 min auf Eis gestellt, dann zentrifugiert (15 min, 4°C) und anschließend das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets (5', Raumtemperatur) erfolgt schließlich dessen Aufnahme in 30 μ l Wasser.

D. Quantität

D. 1. SYBR Green™ real-time RT-PCR

D. 1.1. RT-PCR

Material: Für die realtime Analyse quantitativer PCR-Assays wurde das GeneAmp® 5700 Sequence Detection System von Applied Biosystems verwendet.

Durchführung: Die Synthese der cDNA erfolgte in einem 25 μ l Reaktionsansatz in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen. Für die SYBR Green™ PCR wurde je nach Anzahl der Proben ein Vielfaches des folgenden 26 μ l PCR-Ansatzes in einem sterilen und zuvor autoklavierten Eppendorfgefäß bereitet: 1 μ l der synthetisierten cDNA wurde mit 12,5 μ l des zweifach konzentrierten Mastermixes, sowie 1,25 μ l des forward Primers (10 pmol) und 1,75 μ l des reverse Primers, 8,5 μ l steriles Wasser sowie 0,5 μ l AmpliTaq-Polymerase vorsichtig in einem 0,5 μ l PCR Reaktionsgefäß gemischt. Der Mastermix beinhaltete dabei folgende Ionen: $MgCl_2$, dNTPs, Tris-HCl, KCl, Taq-Polymerase. Angaben zur Konzentration dieser Ionen wurden vom Hersteller nicht gemacht. Nach der Mischung aller Reaktionskomponenten wurde das Reaktionsgefäß in das real-time PCR Gerät überführt und folgendes Programm gestartet:

- Denaturierung: 30 sec, 94 °C;
- Annealing: 60 sec; 65 °C
- Extention: t60 sec, 74 °C.

Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei 72°C inkubiert und abschließend auf 4°C

gekühlt. Die Anregung des SYBR GreensTM Farbstoffs erfolgte automatisch bei 497 nm. Die emittierte Fluoreszenz wurde jeweils während des Annealingschritts bei 520 nm gemessen. Nach Abschluss der Reaktion erfolgte eine Schmelzpunktanalyse. Dazu wurde das PCR-Produkt von 50 °C auf 95 °C erhitzt und kontinuierlich die Fluoreszenz in 1 °C Schritten (Dauer je 1 °C jeweils 30 sec) gemessen.

Die die ermittelten Prozentzahlen (vgl. Abschnitt IV.D.1.c.) für die relativen RNA Mengen sind mit Standardfehlern (S.E.M.) und Fallzahlen in den Diagrammen dargestellt. Die angegebenen p-Werte wurden mit dem Wilcoxon Scores Test ermittelt. p<0.05 gilt als statistisch signifikant.

D. 1.2. Primer

Die optimalen Primerkonzentrationen wurden empirisch bestimmt. Hierbei wurden sowohl verschiedene absolute als auch relative (d.h. nicht im Verhältnis 1:1) Primerkonzentrationen untersucht. Die Primer β_1 AR for 472 und β_1 AR rev 543 wurden jeweils in den Konzentrationen 100, 300, 500 und 700 nM in jeder möglichen Kombination eingesetzt. Jede Reaktion wurde in einem Doppelansatz untersucht. Die Standardkurve wurde durch eine RNA-Verdünnungsreihe automatisch vom System erstellt. Zur Detektion der antisense RNA wurde in der Reversen Transkription der forward Primer (β_1 AR for 472) eingesetzt. Tabelle 3 zeigt jeweils die Sequenz, die Position, die Länge und die Schmelztemperatur der verwendeten genspezifischen Primer.

Bezeichnung	Sequenz	Position ¹	bp	T _A in °C	nM
β_1 AR rev 543	5' tct tct gcg agc tgt gga cct ca	543	23	72	700
β_1 AR for 472	5' caa tga cac aca ggg tct cga tgc	472	24	74	500

Tabelle 3 SYBR GreenTM real-time RT-PCR Primer zum Nachweis von sense und antisense RNA mittels SYBR GreenTM real-time RT-PCR (H. sapiens)

Im Ergebnis erbrachte eine Endkonzentration von 700 nM für den reverse bzw. 500 nM für den forward Primer und damit ein Verhältnis von 7:5 die höchste Signalintensität (1,75 µl 10mM R543 und 1,25 µl 10mM F472 in einem 25 ml Ansatz) in der SYBR GreenTM real-time RT-PCR.

D. 1.3. Quantifizierung

Die Normalisierung auf das Referenzgen (housekeeping gen) erfolgt durch Subtraktion der C_T

¹ nach Frielle et al []

Werte. Damit erhält man einen Wert, der angibt, wie viele RNA Moleküle des untersuchten RNA-Abschnitts pro RNA Molekül des Referenzgens vorhanden waren. Somit werden Artefakte aufgrund unterschiedlich eingesetzter RNA Mengen und variierender Qualität der RNA minimiert. Als Standard wurde die RNA der 18S ribosomalen Untereinheit, im Falle der Bestimmung der Ratio von sense und antisense RNA, das Signal der sense RNA verwendet. Nach Ermittlung der Differenz der C_T Werte aller antisense RNA Signale und den Standardsignalen der zugehörigen Probe (18S), erfolgte eine Mittelwertbestimmung der C_T Werte. Darauf wurde die Differenz der C_T -Mittelwerte von Patienten und Kontrollen gebildet. Die Werte für die herzgesunden Kontrollen wurden als 100% definiert und darauf die Werte für die Patienten bezogen.

Um die vergleichende C_T -Methode anwenden zu können, muss die Effizienz der Zielsequenz- und der Referenzreaktion nahezu identisch sein. Hierzu erfolgt ein Vergleich der ΔC_T Werte bei verschiedenen Verdünnungsstufen der Matrizen. Die durchschnittlichen ΔC_T Werte von Ziel- und Referenzgen werden über den log der Startkonzentration aufgetragen. Sind die Effizienzen für beide Amplikons ungefähr gleich, so nähert sich die Steigung der Geraden dem Wert Null. Auf diese Weise wurde für alle untersuchten Zielsequenzen gezeigt, dass die Effizienzen der Reaktionen der jeweiligen Ziel- und Referenzsequenz ungefähr gleich sind und somit die $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung angewandt werden kann.

Die Spezifität jeder SYBR Green™ real-time PCR wurde über die Schmelzpunktanalyse bestimmt.

D. 2. Westernblot

Material: 1 große Glasplatte, auf welche die Gele gestellt werden; 2 Gelglasplatten („normal“); 2 Gelglasplatten (mit „Ohren“); 4 Spacer (Dicke je nach Anwendung; 0,75 mm für das spätere Gel trocknen; 1 mm für das Blotting), 2 Käbme (müssen genauso dick sein, wie die Spacer), 4 große Metallklammern; 4 kleine Metallklammern, Whatmanpapier, PVDF-Membran, Hyperprocessor, Filmentwicklung (Amersham)

Reagenzien:

- Probenpuffer (3X) (-80°C): 30 % Glycerin (3 ml); 0,3 M DTT 6 % SDS (0,6 g); 4,8 ml Sammelgelpuffer; 0,01 % Bromphenolblau (1 mg), 10 ml aqua dest.
- Trenngelpuffer (4X) (4 °C): 1,5 M Tris (45,4 g); 0,6 % SDS (1,5 g); pH 8,8 mit HCl; ad 250 ml aqua dest.
- Sammelgelpuffer (4X) (4 °C): 0,5 M Tris (6,055 g); 0,6 % SDS (0,6 g), pH 6,8 mit HCl, ad 100 ml aqua dest.
- Laufpuffer (10X) (4 °C): 25 mM Tris (30,3 g); 192 mM Glycin (144,2 g); 0,15 % SDS (15 g);

ad 1 Liter aqua dest.

- Transferpuffer: 20 mM Tris-Base (2,42 g); 160 mM Glycin (12 g); 0,15 % SDS (1,5 g); 20 % Methanol (200 ml); ad 1 Liter aqua dest
 - Coomassie-Färbelösung: 0,04 % Brilliant Blue R (0,2 g); 40 % (v/v) Methanol (200 ml); 10 % Essigsäure (50 ml); ad 500 ml aqua dest. mind. 30min rühren und danach filtrieren
 - TBS (pH 7,6): 20 mM Tris Base (2,42 g); 137 mM NaCl (8 g); 3,8 ml 1 M HCl; ad 1 Liter aqua dest.-Wert überprüfen
 - BSA (Albumin): 2,5g auf 50 ml TBS, bei Raumtemperatur lösen
 - TBS-Tween (TBST): 0,1 % Tween-20 in TBS = 1 ml Tween / L TBS
 - ECL-Lösung: 1 Teil Lsg. 1 + 1 Teil Lsg. 2 (0,125 ml/ cm²) von Fa. Roche oder Roche Chemilumineszens Blot-POD-Substrat: Lsg.1 (2,5ml) mit Lsg.2 (25µl) 1:100 eine Minute mischen
- Das Rezept für zwei Gele zeigt Tabelle 4:

Stammlösungen	Fußgel	Trenngel	Sammelgel
% AA im Gel	5	12,5	4
Acrylamid (ml)	1,55	6,66	1
Trenngelpuffer (ml)	1,35	4	-
Sammelgelpuffer (ml)	-	-	1,8
Aqua dest. (ml)	1,95	5,33	4,7
APS (10%) (µl)	80	80	24
TEMED (ml)	20	20	9

Tabelle 4 Rezept für zwei Gele (Westernblot)

Gelgießvorgang: Die Materialien für die Gele (Glasplatten, Spacer, Kämmen) müssen gelfrei (gut mit Wasser reinigen) und fettfrei sein. Die Gele wurden wie folgt zusammengesetzt: Die Glasplatte, der Spacer und wieder eine Glasplatte wurden mit zwei großen und mit zwei kleinen Metallklammern fixiert. Die Gele wurden auf die große Glasplatte gestellt. Etwa 1 ml Fußgel wurde von unten zwischen die Glasplatten gegeben. Darauf wurde das Trenngel in der Mitte bis ca. 2,5 cm unterhalb der Geloberkante gegeben und an der Seite mit ca. 2 mm Methanol vorsichtig überschichtet. Zum Schluss wurde das Sammelgel eingefüllt und der Kamm gerade eingesteckt.

Gellauf: Das Gel wurde mit der Kammseite nach innen in die Laufkammer eingespannt und der Laufpuffer (1x) in die obere und untere Pufferkammer gefüllt. Dann wurde der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen. Die Proben wurden mit dem Probenpuffer (3X) versetzt und eine Minute bei 94°C gleichzeitig mit dem Proteinmarker erwärmt. Die Proben und der Marker wurden so schnell wie möglich aufgetragen. Die Proben wurden sodann bei 70 Volt ca. 20 Minuten einlau-

fen gelassen und dann bei 110 Volt aufgetrennt. Sobald die untere blaue Lauffront aus dem Gel gelaufen war, wurde das Spannungsgerät ausgestellt, das Gel ausgespannt und die Glasplatten vorsichtig auseinandergehoben. Das Trenn- und Fußgel wurden entfernt und verworfen und das Sammelgel wie folgt geblottet.

Blotten (Semidry): Eine PVDF-Membran wurde mit Methanol benetzt, mit dest. Wasser gespült und 30 Minuten im Transferpuffer äquilibriert. Nach dem Gellauf wurde das Gel ebenfalls im Transferpuffer für 15 Minuten äquilibriert. Auf die untere Semidryplatte wurde zuerst ein in Transferpuffer getränktes dickes Filterpapier, dann die PVDF-Membran, das Gel und zuletzt noch ein getränktes Filterpapier platziert. Dann wurde die obere Semidryplatte befestigt, der Deckel aufgelegt und mit $2,5 \text{ mA/cm}^2$ eine Stunde lang geblottet. Nach dem Blotten wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceaurot eine Minute gefärbt und die Membran fotokopiert. Anschließend wurde die Membran vor der Detektion mit Wasser entfärbt. Das geblottete Gel wurde mit Coomassielösung angefärbt.

Blot Detektion: Nach dem Entfärben wird die Membran eine Stunde in 5% BSA/TBST geblockt. Danach wurde der Blot zweimal zehn Minuten mit TBST gewaschen und nachfolgend mit dem primären Antikörper in 5% BSA/TBST eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf wurde der Blot erneut zweimal zehn Minuten mit TBST gewaschen und eine Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit TBST (je 10 min) und einmaligem Waschen mit TBS für zehn Minuten wurde der Blot mit der vorbereiteten ECL-Lösung ($0,125 \text{ ml/cm}^2$) eine Minute inkubiert, dann mit Filterpapier trockengetupft, in eine Folie gelegt und in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm für 15 Minuten aufgelegt.

E. Funktion

E. 1. Klonierung von DNA für in vitro Transkriptions- Translations-Essay

E. 1.1. Elution von Insert-DNA aus einem Agarose-Gel

Material: (Qiagen GmbH) Elutionspuffer, Glasmilch, New Wash-Reagenz, ein Skalpell; UV-Tisch

Durchführung: Zunächst wird unter UV-Bestrahlung das DNA-Fragment aus dem präparativen Gel mit einem Skalpel isoliert und die überflüssige Agarose bestmöglich entfernt. Das DNA-haltige Gelstück wurde mechanisch zerkleinert, in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und mit NaJ aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$, bis die Agarose vollständig gelöst war. Darauf erfolgte ein Zusatz von 20 – 30 μl Glasmilch, die vorher gut homogenisiert wurde.

Alles wurde gut vermischt und zehn Minuten auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung durch mehrmaliges kurzes Zentrifugieren (1', 13000 U/min) und Verwerfen des Überstandes sedimentiert. Darauf wurden zunächst 200 µl kalte New Wash-Reagenz zugegeben, gut gemischt und dann das ganze Cup mit New Wash-Reagenz aufgefüllt. Durch mehrmalige Zentrifugation (1', 13000 U/min) und Verwerfen der flüssigen Phase wurde das Sediment vom Überstand getrennt und in 30 µl Wasser aufgenommen.

E. 1.2. Kompetente Bakterienzellkultur

Material: Bakteriensuspension, CaCl₂

Um DNA in E.coli Zellen einzubringen, muss die Zellmembran für Makromoleküle permeabel gemacht werden. Dazu inkubiert man die Bakterienzellen mit Kalziumchlorid (CaCl₂) bei 0 °C. Aus nicht vollständig bekannten Gründen werden die so behandelten Zellen "kompetent", d.h. sie nehmen bei 0 Grad Celsius cDNA auf.

Eine Bakteriensuspension wurde auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und jeweils zentrifugiert (4000 min⁻¹, 10 min, 4 °C); die Flüssigkeit wurde abgossen und die Flaschen verkehrt herum auf Papier gestellt, um Reste der Flüssigkeit herauslaufen zu lassen. Nachfolgend wurden 12 ml CaCl₂ (4 °C, 100 mM) zugeben, alles gut mit der Pipette gemischt (nicht stark vortexen) und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert (4000 min⁻¹, 10 min, 4 °C) und die Flüssigkeit abgossen. Zwischen 500 µl und 1000 µl CaCl₂ (100 mM) wurden in eine Flasche gegeben und mit der Pipette gelöst. Schließlich wurde der Inhalt der beiden Flaschen zusammengeführt und bei 6 °C gekühlt und innerhalb von zwei Tagen für die Untersuchungen verwendet oder weggefroren.

E. 1.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Material: Es wurden die Restriktionsendonukleasen EcoR1 und BamH1 (Biolabs), Restriktionspuffer B (Roche), pGEM®-3Z Vector (Promega),

Durchführung: Folgende Reagenzien wurden in ein steriles und autoklaviertes Eppendorfgesäß pipettiert, jeweils mit Aqua dest. auf 100 µl aufgefüllt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert:

50 µl Probe	20 µl pGEM3Z
10 µl Puffer B (10x)	10 µl Puffer B (10x)
5 µl EcoR1	5 µl EcoR1
5 µl Bamh1	5 µl Bamh1

30 µl Aqua dest. 60 µl Aqua dest.

E. 1.4. Ligation von DNA in Plasmide

Material: pGEM®-3Z Vector (Promega), T4-Ligase (Roche), T4-Puffer (Roche), geschnittenes PCR-Produkt

Der pGEM®-3Z Vector ist für die in vitro RNA Synthese bestimmt und enthält sowohl einen SP6- als auch einen T7-RNA-Polymerase Promotor, welche jeweils die Klonierungsregion flankieren, außerdem die Polylinkerregionen des pUC18 und eine Sequenz für das lacZ alpha-Peptid. Letzteres ermöglicht die Produktion eines funktionellen alpha-Peptids, das zum Ergänzen des Produktes des Gens lacZDeltaM15 fähig ist, und damit funktionsfähige BetaGalaktosidase produziert. Zellen mit dem Genotypus lacZDeltaM15, die den pGEM®-3Z Vector enthalten, sind blau, wenn sie auf einem IPTG- und X-Gal-haltigen Indikatormedium plattiert wurden. Wurde jedoch das lacZ-alpha-Peptid beim Klonen gespalten, tritt keine Komplementierung des Produktes des lacZDeltaM15 Gens auf und Beta-Galaktosidaseaktivität bleibt aus. Folglich bleiben diese Bakterienkolonien weiß. Die T7-RNA-Polymerase benutzt die klonierte DNA als Template und synthetisiert in Gegenwart von Ribonukleotidtriphosphaten und Mg^{2+} die komplementäre RNA. Spermidin stimuliert die Enzymaktivitäten.

In ein Eppendorfgefäß wurde mit einer Eppendorf- Pipette 7 µl geschnittenes PCR-Produkt, 1µl geschnittenes pGEM3Z, 1µl T4-Ligase sowie 1µl T4-Puffer gegeben. Bei anschließender zwei-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Ligation des DNA-Fragments in den Vektor.

E. 1.5. Transformation

Material: LB-Medium für 1 l: 10g bacto-tryptone (Casein), 5 g Hefe, 10g NaCl und 15 Agar+ Ampicillin: auf 1l Medium 1ml von 100mg/ml). SOC- Medium für 1 l: 20g bacto-tryptone (Casein), 5 g Hefe und 0,5g NaCl gelöst, 10 ml von 250 mM KCl zugeben und den pH mit 5 n NaOH auf 7 einstellen mit Wasser auf einen Liter auffüllen und für 20min autoklaviert.

Ein 50 µl Ligationsansatz wurde 30 min auf Eis gestellt, danach 45 s bei 42°C in ein Wasserbad gestellt und sofort erneut für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 500 µl SOC- Medium zugegeben, alles zwei Stunden bei 37 °C schütteln gelassen und danach abzentrifugiert. Die Platte wurde mit je 100 µl IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside50) und XGAI (5-Bromo-4choro-3indolyl-β-galactosid) bestrichen, kurz antrocknen gelassen und dann die Zellen auf der Platte verteilt. Über Nacht wurden die Zellen bei 37 °C wachsen gelassen.

E. 1.6. Agar-Platten

Material: Zur Anfertigung von Agar-Platten werden ein Wasserbad, eine Sterilbox, eine Mikrowelle und ein großes Gefäß mit großer Öffnung benötigt, da in der Mikrowelle die Gefahr des Überkochens besteht. Als Reagenzien wurden Agar, LB-Medium und ein Antibiotikum (Ampicillin) verwendet.

Zu einem Liter LB-Medium (vgl. IV.E.1.h.) wurden 5 g Agar gegeben und so lange in der Mikrowelle gekocht, bis sich der gesamte Agar gelöst hatte. Danach wurde die Lösung im Wasserbad unter leichtem Schwenken, um Verklumpungen zu umgehen, und unter Vermeidung von Blasenbildung auf ca. 50 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurde das Antibiotikum zugegeben. Die Platten wurden unter der Sterilbox gegossen und durften nicht länger als 5 Minuten trocknen, um nicht einzureißen.

E. 1.7. Miniprep

Die weißen positiven Klone wurden von der Agar-Platte selektiert ("gepickt"), in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (Ampicillin: auf 1 l Medium 1 ml von 100 mg/ml) über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Danach wurde 1 ml der Kultur in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, zentrifugiert (5000 rpm, 5 min, 24°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl Resuspensionslösung (Lösung I, s.o.), welche mit 2 µl RNase A versetzt wurde, durch vortexen resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lysierungslösung (Lösung II, s.o.) zugegeben und alles genau 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und gelegentlich vorsichtig geschwenkt. Darauf wurden 200 µl von Lösung III (s.o.) zugesetzt, die Probe etwa zehn Minuten bei 4 °C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert und danach erneut zentrifugiert (14000 rpm, 15 min, 4 °C). Der Überstand, welcher nun die DNA enthält wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch Zusatz von 420 µl Isopropanol, fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (14000 rpm, 20 min, 4 °C) wurde die DNA gefällt. Das Pellet wurde mit 75 %igem Ethanol gewaschen, fünf Minuten abzentrifugiert (14000 rpm, 4 °C) und bei Raumtemperatur maximal zehn Minuten getrocknet. Im letzten Schritt der Aufreinigung der Mini-Präparation wurde die DNA in 30 µl Aqua dest. aufgenommen. Zur Kontrolle wurde bei einem Aliquot jedes der präparierten Plasmide erneut eine Restriktionsspaltung mit EcoR1 und BamH1 (2 µg DNA in 10 µl Ansatz) durchgeführt und die Produkte auf einem 1,5 %igem Agarosegel begutachtet.

Weitere Materialien, Lösungen und Puffer:

Resuspensionslösung / Lösung I (Lagerung bei 4 °C):

	Stock	Ansatz
20 mM Tris	1 M Tris HCl pH 8	20 ml
50 mM Glukose	1 M Glukose	50 ml
10 mM EDTA	0,5 M EDTA pH 8	20 ml
Aqua dest.		ad 1000 ml

Lysierungslösung / Lösung II (immer frisch ansetzen):

	Stock	Ansatz
200 mM	10 % NaOH	2 ml
1 %	10 % SDS	10 ml
Aqua dest.		ad 100 ml

Neutralisationslösung / Lösung III (Lagerung bei 4 °C):

	Stock	Ansatz
3 M K-Acetat pH 5,5	5 M K-Acetat pH 10	600 ml
Essigsäure	Eisessig	115 ml
Aqua dest.		ad 1000 ml

E. 2. In vitro Transkriptions- Translations-Essay

Material: Die in vitro Transkription/Translation wurde mit dem TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System mit T7 RNA Polymerase Promotor nach den Angaben von Promega durchgeführt. Nicht im Kit enthalten waren nukleasefreies Wasser und radioaktiv markierte Aminosäuren (L-[³⁵S] Methionin, NEN™ Life Science Products, Inc.).

Durchführung: Ethanolreste wurden zunächst sorgfältig von der DNA Präparation entfernt. Der TNT® Quick Master Mix wurde wie vom Hersteller empfohlen, rasch in der Hand aufgetaut und sogleich auf Eis gelagert. Zu ein 20 µl Aliquot TNT® Quick Master Mix wurde 1,0 µg zirkuläre Plasmid DNA, 1 µl L-[³⁵S] Methionin (1175 Ci/mmol, 7,9 mCi/ml) sowie verschiedene Mengen (0,25- 2 µl) von 200 µM antisense und nonsense Primer gegeben. Der Reaktionsansatz wird vorsichtig durch auf- und abpipettieren homogenisiert, mit nukleasefreiem Wasser auf 25 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt und bei 30°C 60-90 Minuten inkubiert. Das synthetisierte Protein wird dann mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Autoradiographie detektiert.

E. 3. Nachweis des β 1-adrenergen Rezeptor-Proteins

Chemikalien: Acrylamid, Bisacrylamid, Glycerin, Glycin, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Rinderalbumin (BSA), SDS, Temed, Tris, Tween 20, Aprotinin, EDTA, Natrium Orthovanadat, Äthanol, Methanol.

Gewebeprobe: Untersucht wurden Gewebeprobe von acht Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie sieben herzgesunde Patienten (Kontrollen).

E. 3.1. Proteinisolation

Chemikalien: RIPA-Puffer: PBS (9,1 mM NaH_2PO_4 , 1,7 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH 7,4), 1% NP40, 0,5% Natrium Deoxycholat, 0,1% SDS. Folgende Proteaseinhibitoren wurden frisch zugesetzt: 10 $\mu\text{l/ml}$ PMSF (10mg/ml Stammlösung), 30 $\mu\text{l/ml}$ Aprotinin, 10 $\mu\text{l/ml}$ Natrium Orthovanadat (100 mM Stammlösung).

Durchführung: Die Gewebeprobe wurden bei -80°C gelagert, so dass die Isolation der Proteine ausschließlich aus gefrorenem Material erfolgte. Die Gewebestücke wurden mit einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser pulverisiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Homogenisation erfolgte in 3 ml/g Gewebe RIPA-Puffer. Die Proben wurden homogenisiert und 3 Stunden auf Eis inkubiert. Zur Solubilisierung der Proteine wurden die Proben eine Stunde auf Eis stehen gelassen und anschließend in einer Mikrofuge für 30 Minuten bei 14 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

E. 3.2. Proteinbestimmung

Chemikalien: 2% Na_2CO_3 in 0,1% NaOH, 1% CuSO_4 , 2% K-Na-Tartat

Durchführung: Je 1 ml 1% CuSO_4 und 1ml K-Na-Tartat wurden vor der Bestimmung mit 100 ml 2% Na_2CO_3 in 0,1% NaOH versetzt (Lösung A). 200 μl Probelösung wurden mit 1 ml Lösung A versetzt, gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1 ml SDS und 100 μl 2:1 mit Wasser verdünntes Folin, Ciocalteus-Phenol-Reagenz (Sigma) zugeführt, gut vermischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 585 nm photometrisch bestimmt [modifizierte Methode nach Lowry, 1951].

E. 3.3. SDS-Gelelektrophorese

Chemikalien: Zur Zusammensetzung der Lösungen und Puffer vgl. II.D.2.

Durchführung: a) Gelherstellung: Jedes Proteingel besteht aus drei verschiedenen Gelfractionen, einem Fußgel, einem Trenngel und einem Sammelgel. Die Zusammensetzung für zwei Gele zeigt Tabelle 5.

Stammlösung	Fußgel	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid im Gel	5 %	12,5 %	4 %
Acrylamid	795 µl	6,66 ml	1 ml
Trenngelpuffer	675 µl	4 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	1,8 ml
Aqua dest.	975 µl	5,33 ml	4,7 ml
APS (10 %)	40 µl	80 µl	24 µl
TEMED	10 ml	20 ml	9 ml

Tabelle 5 Rezept für Polyacrylamidgel

b) Gelgießvorgang: Jeweils eine Glasplatte und die Spacer wurden mit zwei großen und zwei kleinen Metallklammern fixiert und auf die große Glasplatte platziert. Etwa 1 ml Fußgel wurde von unten in die Apparatur einziehen gelassen. Nach dessen Aushärten (5-10 min) wurde das Trenngel bis ca. 2,5 cm unterhalb der Geloberkante einlaufen gelassen und mit ca. 2 mm Methanol (an der Seite) vorsichtig überschichtet. Das Aushärten des Trenngels dauerte ca. 30 Minuten. Zum Schluss wurde das Sammelgel bis zum Überlaufen eingefüllt und der Kamm gerade eingesteckt. Es musste alle 15 Minuten neues Gel an den Seiten des Kamms nachpipettiert werden. Das Aushärten dauerte ca. 1-1,5 Stunden.

c) Gellauf: Das Gel wurde mit der Kammseite nach innen in die Laufkammer eingespannt. Der Laufpuffer (1X) wurde in die obere und untere Pufferkammer gefüllt und anschließend der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen. Ein Aliquot von 5 µl der Translationsreaktion wurde zu 20 µl SDS-Probenpuffer und Mercaptoethanol gegeben. Der Rest des Reaktionsprodukts wurde bei -20 °C aufbewahrt. Die Proteine im Reaktionsgefäß und der Proteinmarker wurden bei fest verschlossen Deckel bei 95°C 2 Minuten denaturiert. Beides sollte so schnell als möglich aufgetragen werden. Das Polyacrylamidgel wurde mit einem 5 µl Aliquot der denaturierten Probe be-

laden und die Elektrophorese bei 30 mA vollführt. Wenn die Proben weit genug aufgetrennt waren (etwa zu dem Zeitpunkt, wenn der Bromphenolfarbstoff aus dem Gel gelaufen ist), wird das Gel ausgespannt und die Glasplatten vorsichtig auseinandergehoben. Trenn- und Fußgel wurden vom Sammelgel getrennt.

d) Autoradiographie: Nun wurde das Gel in eine Plastikbox gegeben, mit Fixierungslösung bedeckt und 30 min auf einem Shaker bewegt. Die Fixierungslösung wurde verworfen und das Gel wie folgt getrocknet: Zunächst wurde es 5 min in ein Gemisch von 7% Essigsäure, 7% Methanol und 1% Glycerol geweicht, um es vor dem Brechen beim Trocknen zu bewahren. Danach wurde es auf ein Blatt Whatman® 1CHR Filterpapier platziert, mit Plastikfolie bedeckt und bei 80 °C 2-3 Stunden auf einem Wärmetisch unter Vakuum getrocknet. Im letzten Schritt wurde ein Film mit dem Gel autoradiographisch für 6-15 Stunden bei Raumtemperatur exponiert.

E. 3.4. Immunoblotting

Chemikalien: Zur Herstellung von Transferpuffer, 10-fach TBS und TBST vgl. II.D.2.

Durchführung: Das Immunoblotting der SDS-Gele wurde mit einer "semidry" Blotapparatur (Biometra) durchgeführt. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 6 mA/cm² für 45 Minuten. Anschließend wurden die freien Proteinbindungsstellen mit 5% Milchpulver in TBST für eine Stunde geblockt. Die Inkubation der Blots erfolgte mit 1 µg/ml Anti-β₁-AR polyklonalen Antikörpern (Santa Cruz) in 5% Milchpulver in TBST über Nacht bei 4°C auf einem Rollschüttler. Die polyklonalen Antikörper waren gegen das Peptid 456-475 des C-terminalen Endes des humanen β₁-adrenergen Rezeptors gerichtet. Nach zweimaligem Waschen mit TBST für 7 Minuten wurde die Nitrozellulose mit einem Peroxidase konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova) in einer Verdünnung von 1:10000 für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt. Die Detektion der Probe erfolgte mit dem ECL-Kit (Amersham) gemäß den Instruktionen des Herstellers. Die optische Dichte der Signale wurde densitometrisch gemessen. Die Spezifität der erhaltenen Signale wurde in der Arbeitsgruppe bereits an anderer Stelle verifiziert. Hierzu wurden die polyklonalen primären Antikörper mit dem Peptid 456-475 (10 µg/ml) für 4 h bei Raumtemperatur neutralisiert [Podlowski, 1997].