

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten

#### 2.1.1 Versuchstiere

Für die Versuchsreihen wurden 2 - 3 Tage alte, männliche und weibliche Albino Wistar-Ratten (Charles-River Laboratorien Deutschland, Sulzfeld) bezogen. Die Tiere wurden am Morgen des Versuchstages von der Mutter isoliert und bis zur Tötung in einer warmen und abgedunkelten Räumlichkeit gehalten.

#### 2.1.2 Verwendete Materialien

- CMF-HBSS Hanks Balanced Salt Solution w/o Calcium and Magnesium, (Gibco BRL)
- Trypsin (TRLS) 0, 22 Filtered, 1 mg/ 2ml HBSS, (Cell Systems)
- Trypsin Inhibitor (SI), 2 mg/ ml HBSS, (Cell Systems)
- Medium 199 Earle (1x) with L-Glutamine w/ L-Amino Acids, (Biochrome)
- Kollagenase (215 U/ g), 70 mg in 50 ml Medium 199, (Cell Systems)
- Fibronectin (5mg/ ml), eingesetzte Verdünnung 10 µM/ ml, (Promocell)

#### 2.1.3 Durchführung

Die Isolation von neonatalen Rattenkardiomyozyten erfolgte nach einer an den Worthington Kit, Version 1.0.1, angelehnten, teilweise modifizierten Methode.

#### **Tag 1:**

Für die Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten wurden die zwei bis drei Tage alten Albino-Ratten vom Stamm Wistar vor Herzentnahme in einer großen Petrischale zunächst mit lauwarmem Wasser gewaschen.

Des weiteren wurde gewährleistet, daß das gesamte verwendete Instrumentarium gereinigt und sterilisiert war, bzw. die Glasmaterialien autoklaviert waren.

Die eingesetzten Pinzetten, Scheren und Klemmen wurden über den Zeitraum der Präparation in Bechergläsern mit 70%igem Ethanol gehalten.

#### Tötung des Tieres:

Die schnelle und sichere Tötung der Ratte wurde mit Hilfe einer großen Klemme, die im Genick des Tieres angesetzt wurde, durchgeführt. Nach kurzem Zug am Schwanz des Tieres und erfolgtem Genickbruch galt als sicheres Zeichen für den Tod die Ruhigstellung der vorderen Extremitäten bei reflexartigen Bewegungen der hinteren Läufe.

#### Herzentnahme:

Vor Entnahme des Herzens wurde das Tier in einem mit 96%-iger Ethanollösung gefülltem Becherglas desinfiziert. Anschließend wurde das Tier auf eine sterile Oberfläche gelegt und die Haut des Thorax zwischen den Branchen einer gebogenen Pinzette gespannt. Der untere Rippenbogen ist in diesem Zustand deutlich zu erkennen. Mit einer kleinen, spitzen Schere wurde nun das knorpelige Sternum von distal durchtrennt, anschließend wurden mit den Branchen der Schere die beiden Thoraxhälften gespreizt. Das dunkelrote, noch schlagende Herz ist deutlich von den zartrosa Lungenflügeln oder der weiter caudal liegenden Leber zu differenzieren. Im Idealfall stellte es sich einem durch die plötzliche Druckentlastung prominent, mit der Herzspitze nach oben, dar. Mit der Pinzette wurde nun das Herz unterhalb der Basis von den zarten afferenten und efferenten Gefäßen gezupft. Hierbei wurde vorsichtig vorgegangen, um zellschädigenden Drucktraumen vorzubeugen. Anschließend wurde das Herz in eine eisgekühlte Petrischale mit 40 ml steril abgefülltem Dulbecco's HBSS gegeben. Ein Kontakt der Pinzette mit der Flüssigkeit war hierbei zu vermeiden.

#### Entfernung der Vorhöfe:

Das frisch entnommene Herz wurde bis zu seinem vollständigen Stillstand in der Petrischale belassen um zu gewährleisten, daß ein möglichst effizientes Austreiben des noch in den Herzkammern und Vorhöfen befindlichen Blutes stattfand.

War keine Herzaktion mehr zu beobachten, wurden die beiden Vorhöfe mit Hilfe einer Pinzette entfernt. Sie ließen sich als etwas hellere, faserig erscheinende

Strukturen vom übrigen Herzgewebe unterscheiden. Die von den Vorhöfen freipräparierten Herzen wurden durch leichtes Schwenken gewaschen und in eine Petrischale mit 9 ml frischem HBSS überführt. Unter der Sterilbank wurden die Herzen mit zwei Skalpellens in ca. 1 mm<sup>3</sup> Würfel zerschnitten. Um die einzelnen Zellen im Gewebe weitgehend unbeschadet zu belassen wurde darauf geachtet, die Herzen möglichst wenig zu quetschen. Anschließend wurde 1 ml Trypsinlösung, entspricht 50 µg/ ml, zur Gewebelysierung in die Petrischale gegeben und die Herzstücke bei 4° C für über Nacht (ca. 16 Stunden) inkubiert.

## **2. Tag:**

Am folgenden Tag wurden die Trypsin-lysierten Gewebestückchen unter der Sterilbank mit einer 25 ml Pipette aufgenommen und in ein 50 ml Falcon<sup>®</sup>-Röhrchen (Zentrifugenröhrchen) überführt. Zur Beendigung des Verdauungsprozesses wurden 2 ml Trypsininhibitor zu der Lösung gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken des Röhrchens, wurde die Zelllösung für ca. 1 Minute oxygeniert und anschließend im Wasserbad auf 37° C erwärmt. Danach wurden dem Inhalt des Röhrchens 5 mg Kollagenase zur weiteren Lösung des Zellverbandes zugegeben und unter leichtem Schwenken bei 37° C für 30-45 Minuten inkubiert. Nach Beendigung des Kollagenaseverdaus wurde die Gewebelösung unter der Sterilbank mit einer 10 ml Pipette ca. 10mal auf- und abpipettiert. Um ein optimales Lösen der Zellen aus dem Gewebeverband und gleichzeitig eine möglichst geringe Schädigung der einzelnen Zelle zu erreichen, wurde darauf geachtet, den Pipettiervorgang möglichst langsam und unter Vermeidung von Luftblasenbildung durchzuführen. Anschließend wurde die Zelllösung für 3 - 4 Minuten im Falcon<sup>®</sup>-Röhrchen unter der Sterilbank belassen, um ein Absetzen der nichtlysierten Gewebeteilchen von denen sich in Lösung befindlichen Zellen zu gewährleisten. Der zellhaltige Überstand wurde mit der Pipette entnommen und durch ein, mit Medium 199 (M 199) befeuchtetes, 70 µm Nylon-Zellsieb in ein frisches Falcon<sup>®</sup>-Röhrchen übergeben.

Um die Ausbeute an Zellen möglichst groß zu halten wurden erneut 5 ml M 199 zu dem verbliebenen Zellpellet gegeben und der Vorgang des Repipettierens und der Zellüberstandabnahme bis zu 5 mal wiederholt.

Abschließend wurde das Sieb mit 2 ml M 199 gewaschen und die Zellen zum Präplattieren in eine Kulturflasche (Falcon® 175 cm<sup>2</sup>) übergeben. Nach ca. 1 Stunde im Brutschrank (bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wurden nach Kontrolle der Adhärenz der restlichen Nichtmyozyten am Boden der Kulturflasche, die nicht-adhärenenten neonatalen Rattenkardiomyozyten in M 199 aufgenommen und wiederum in ein steriles Falcon®-Röhrchen übergeben.

900 µl Zellsuspension wurden mit 100 µl Trypan-Blau (0,4%, Sigma T8154 steril) versehen und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Eine optimale Zellausbeute ergab sich bei einer Zellzahl von 2 - 3 x 10<sup>6</sup> Zellen pro präpariertem Herz. Nach dem Zählen wurden die Zellen mit Medium auf das Endvolumen von 3 ml verdünnt und mit einer Dichte von 5 x 10<sup>6</sup> Zellen auf fibronectinbeschichteten Zellkulturschalen (Falcon® 60x15 mm) ausplattiert. Anschließend wurden die Kulturgefäße über 24 Stunden im Brutschrank belassen, um eine Adhärenz der intakten Kardiomyozyten zu gewährleisten. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit vorgewärmten Medium drei mal gewaschen. Hierbei wurden defekte, nicht adhärenente Zellen und Zelltrümmer entfernt.

## 2.2 Zellkultur und Stimulation mit Proteasom-Inhibitor MG132

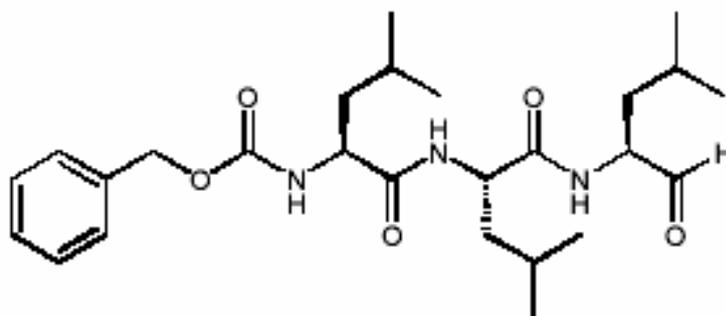
### 2.2.1 Verwendete Materialien

Standard Kulturmedium:

- 440 ml Medium 199 mod. Earle's Salts with 1, 25 mg/ NaHOC<sup>3</sup> with L-Glutamine w/ L-Amino Acids, (GibcoBRL)
- 50 ml Newborn Calf Serum (NBCS), (GibcoBRL)
- 5 ml Penicillin/ Streptomycin (10.000 U/ ml bzw. 10.000 µg/ ml), (GibcoBRL)
- 500 µl Cytosine-β-arabinofuranoside (Ara-C), 100 mg in 41 ml M1, (Sigma)

Konzentration und Lösung des Proteasom-Inhibitors MG132 (**Abb. 5**):

5 mg gelöst in 1 ml sterilem DMSO (Dimethylsulfoxid). Dies ergab eine Stammlösung des Proteasom-Inhibitors mit einer Endkonzentration von 1mM.



**Abb. 5:** Strukturformel MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CO<sub>2</sub>H), C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

### 2.2.2 Durchführung der Zellstimulation

Die Stimulation umfasste die folgenden **6** Gruppen:

**1. Kontrolle:**

Die in der Petrischale ausplattierten Zellen wurden über den gesamten Zeitraum der Stimulation ohne weitere Intervention im Brutschrank belassen. Durchgeführte Medienwechsel der anderen Gruppen wurden jedoch entsprechend vorgenommen.

**2. Kontrolle + DMSO**

Die Zellen dieser Gruppe wurden mit einer Menge DMSO bezogen auf die Menge der PI-DMSO-Lösung in Gruppe 4-6 inkubiert (3 µl DMSO/ 3 ml M199).

**3. Hitze-Schock (HS):**

Die Petrischalen wurden mit Folie (Parafilm<sup>®</sup>) wasserdicht verschlossen und für 30 Minuten in einem 42°C warmen Wasserbad gehalten. Danach erfolgte eine weitere Inkubation für 30 Minuten im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), damit ein Gesamtstimulationszeitraum von einer Stunde eingehalten wurde.

**4. 0,1 µM MG132:**

Die Stimulation mit MG132 erfolgte über den Zeitraum von einer Stunde. Nach Ablauf der Stimulation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

**5. 1 µM MG132:**

Die Stimulation erfolgte analog zur Gruppe 4 mit einer Konzentration des Proteasom-Inhibitors von 1 µM.

**6. 10 µM MG132:**

Die Stimulation erfolgte analog zur Gruppe 4 mit einer Konzentration des Proteasom-Inhibitors von 10 µM.

Um beurteilen zu können, ob der Proteasom-Inhibitor MG132 eine Hochregulation von Heat-Schock-Proteinen in neonatalen Rattenkardiomyozyten bewirkt und ob sich die Expressionsraten der HSP auf mRNA- sowie Proteinebene über den zeitlichen Verlauf verändern, wurden nach einstündiger Stimulation verschiedene Nachinkubationszeiträume gewählt. Diese umfassten nach Mediumwechsel 1, 2 und 4 Stunden. Nach Ablauf der Zeitintervalle wurden die entsprechenden Zellen abtrypsinisiert und für die anschließenden Versuchsdurchführungen aufbereitet.

## 2.3 Gesamt-RNA Isolation

### 2.3.1 Verwendete Materialien

- Phosphate Buffered Saline (PBS)
- TRIzol<sup>®</sup> Reagent, (GibcoBRL)
- Chloroform, (J.T.Baker)
- 2-Propanol, (J.T.Baker)
- Ethanol, (J.T.Baker)

### 2.3.2 Durchführung

Für die RNA-Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten wurden diese in 6-Well Platten (Fläche: ca. 9,8 cm<sup>2</sup>/ Well) ausplattiert. Nach erfolgter Stimulation wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen und zur Beendigung der Adhärenz an dem Kulturschalenboden erfolgte die Zugabe von 1 ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent pro Well. Anschließend wurde die Zelllösung in ein 1,5 ml Eppendorf-Reagenzgefäß überführt und zur vollständigen Dissoziation der Nucleoproteinkomplexe für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 200 µl Chloroform pro ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent erfolgte eine weitere Inkubation von 3 Minuten.

Im folgenden Schritt wurden die Zellproben für 15 Minuten bei 12.000 x g und 4° C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation trennte sich die Probe in 3 deutlich voneinander zu differenzierende Phasen: A) eine untere rote Phenol-Chloroform Phase, B) eine Interphase und C) eine, die RNA enthaltende, obere wässrige Phase. Hierbei machte die wässrige Phase in etwa 60% des Gesamtvolumens aus. Mit einer Pipette wurde die RNA-haltige Phase nun vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eine Verunreinigung der RNA durch Inhalte der Interphase war hierbei strengstens zu vermeiden.

Um die RNA zu fällen wurde, entsprechend der eingesetzten Milliliter TRIzol<sup>®</sup>Reagent, je 0,5 ml Isopropanol hinzugefügt und mit der Lösung vermischt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur folgte erneut eine Zentrifugation bei 12.000 x g und 4° C für 10 Minuten. Nach Verwerfung des Überstandes und waschen der RNA mit 75%igem Ethanol (1 ml/ ml TRIzol<sup>®</sup>Reagent) wurde erneut für 5 Minuten bei 4° C und 5.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und das verbliebene RNA-Pellet kurz an der Luft getrocknet. Anschließend wurde dieses in 20 µl Aqua bidest. aufgenommen und die RNA im Photometer vermessen. Die Bestimmung der Extinktion bei 260nm und 280nm erfolgte nach Verdünnung von 1 µl RNA 1:50 in Aqua bidest. Abschließend wurden die Proben bei -80° C eingefroren.

Die RNA-Konzentration der jeweiligen Proben wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$C (\mu\text{g/ ml}) = \text{Absorption}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times K$$

(K = Konstante für optische Dichte, sie beträgt für RNA 40 µg/ ml)

Ein Maß für die Reinheit der RNA ist der Quotient  $A_{260}/ A_{280}$ . Er sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

## 2.4 Reverse Transkriptase

### 2.4.1 Verwendete Materialien

- 5x First Strand Buffer, (GibcoBRL)
- 0,1 M DTT, (GibcoBRL)
- Ultrapure dNTP Set 2'- Desoxynucleoside 5'- Triphosphate, (Stocklösung je 100 mM; Pharmacia Biotech)
- RNasin<sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor, (Promega)
- M-MLV Reverse Transcriptase, (GibcoBRL)
- DN6 Hexamer (0,5 µg/ µl; TIBMolbiol)

### 2.4.2 Durchführung

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion dient dazu, RNA in DNA umzuschreiben, welche als Ausgangspunkt für die PCR verwendet werden kann. Die hierbei entstehende DNA ist komplementär zur RNA weshalb sie auch als cDNA (c = complementary) bezeichnet wird. Im Unterschied zur genomischen DNA enthält sie jedoch ausschließlich Exon-Abschnitte, also nur codierende Sequenzen. Für die Reverse Transkription wurden 1 µg Total-RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Als Transkriptionsenzym wurde eine M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase verwendet. Als Primer diente ein dN6-Oligonucleotid einer zufälligen Sequenz, ein sogenannter Random-Hexamer Primer.

#### **Ansatz 1:**

- 1 µg Total-RNA
- 2 µl Hexamer Primer (0,5 µg/ µl)
- Aqua bidest. ad 11,5 ml

Um eine möglichst vollständige Anlagerung des Primers zu ermöglichen wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 70° C inkubiert.

**Ansatz 2:**

- 4 µl 5 x First Strand Buffer
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl 10mM dNTP
- 0,5 µl RNasin® (ca. 40 U/ µl)
- 1 µl M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/ µl)

Um eine Vergleichbarkeit der RT-Ansätze zu ermöglichen ist es unabdingbar gleiche Reaktionsbedingungen für alle Proben zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurde zunächst ein Master Mix für alle zu messenden Proben angesetzt und davon je 8,5 µl zu dem jeweiligen RT-Ansatz (1) hinzugegeben. Nach einer fünfminütigen Annealing – Reaktion bei 25° C erfolgte die Elongationsreaktion für 60 Minuten bei 37° C. Um einer Renaturierung der cDNA vorzubeugen, wurde der Ansatz im Anschluss an die Reverse Transkriptase Reaktion sofort auf Eis gelagert.

2.4.3 DNase Verdau

Die fertig umgeschriebene cDNA wurde im Anschluss an die Reverse Transkriptase Reaktion mit dem Enzym DNase 1 (Ambion) verdaut, um eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden. Dazu wurden 0,5 µl DNase 1 (2 U/ µl; Ambion) pro 20 µl RT Ansatz zum Einsatz gebracht. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37° C für 15 Minuten. Durch eine anschließend zehninütige Inkubation bei 75° C wurde das Enzym hitzeinaktiviert und stellte somit keinen möglichen Störfaktor mehr für die nachfolgende PCR dar. Nach dem DNase Verdau wurde die cDNA 1:5 in Aqua bidest. verdünnt und in dieser Konzentration in der RT-PCR eingesetzt.

## 2.5 Real-Time PCR (RT-PCR)

### 2.5.1 Verwendete Materialien

Sybr<sup>®</sup> Green PCR Reagents enthalten:

- AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase (5 U/ µl)
- AmpErase<sup>®</sup> UNG
- dNTP (je 2,5 mM) Mix with dUTP (5 mM)
- 10 x Sybr<sup>®</sup> Green PCR Buffer
- 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- Oligonukleotide (TIBMolbiol)

### 2.5.2 Durchführung

Mit der Real-Time PCR wurde ein homogenes Assay entwickelt, bei dem Amplifikation und Nachweis der PCR-Produkte simultan in einem Reaktionsgefäß möglich sind. Neben dem Einsatz von TaqMan<sup>®</sup>-Sonden und Erfassung von 5'3'-Exonucleasaktivität kann man zur Real-Time Quantifizierung von PCR-Produkten auch Doppelstrang-DNA-bindende Farbstoffe verwenden. In den vorliegenden Experimenten wurde der Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green 1 benutzt, der auf Grund seiner hohen Sensitivität und Spezifität für Doppelstrang-DNA besonders geeignet ist. Man nimmt an, daß SYBR<sup>®</sup> Green in eine kleine Furche der DNA interkaliert und in gebundenem Zustand fluoresziert. Dieses Fluoreszenzsignal wird genutzt, um den Amplifikationsprozess im Laufe der PCR darzustellen. Genauso wie im ursprünglichen 5'-Exonucleaseassay wird die Fluoreszenz über den Verlauf der Reaktion aufgezeichnet. Außerdem wird ein im PCR Buffer zusätzlich enthaltener Farbstoff, ROX, als interne Passivreferenz verwendet, auf den das SYBR<sup>®</sup> Green Signal während der Datenaufzeichnung abgeglichen werden kann. Die Normalisierung ist notwendig, um Volumen- und Konzentrationsschwankungen, z.B. durch Pipettierungenauigkeiten, auszugleichen.

Aufgrund der Tatsache, daß im SYBR<sup>®</sup> Green Assay jede doppelsträngige DNA zu einem Fluoreszenzsignal führt, dient als weitere Spezifitätskontrolle, neben der sorgfältigen Primerauswahl, die Schmelzkurvenanalyse. Nach jedem PCR-Lauf werden die Dissoziationskurven der entstandenen Produkte aufgezeichnet. Auf diese Weise kann das Vorliegen von Primerdimeren und unspezifischen Nebenprodukten, die ein verfälschtes Fluoreszenzsignal generieren würden, beurteilt werden.

Die PCRs in dieser Arbeit wurden mit dem ABI PRISM 5700 Sequenz Detector System durchgeführt. Eine PCR teilte sich in folgende Schritte auf:

**Schritt 1: 50°C, 2 Minuten (AmpErase<sup>®</sup> UNG)**

Dieser Schritt dient dem Schutz vor carry-over-Kontaminationen durch Produkte aus vorherigen PCRs. Der im SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix enthaltene dNTP-Mix arbeitet mit dTTPs statt dUTPs. Daher werden im Laufe der PCR Produkte mit Uracil statt Thymin synthetisiert. Die AmpErase verhindert eine Amplifikation von carry-over-Produkten, indem sie dUracil aus der DNA ausbaut. dUTP enthaltene DNA wird somit abasisch und vulnerabel gemacht. Auf RNA oder d-thyminhaltige DNA hat das Enzym keinen Einfluss.

**Schritt 2: 95°C, 10 Minuten (Denaturierung)**

Dieser Schritt hat mehrere Funktionen. Zum einen werden die nach dem UNG Verdau abasischen carry-over-Moleküle zerstört, zum anderen wird das Enzym hitzeinaktiviert. Außerdem wird in diesem Denaturierungsschritt die Ausgangs-DNA denaturiert und aufgefaltet. Die inaktiv vorliegende DNA-Polymerase AmpliTaq<sup>®</sup>, eine spezielle DNA-Polymerase, wird erst durch die 10-minütige Inkubation bei 95°C irreversibel aktiviert.

### **Schritt 3: 95°C, 0,25 Minuten, 65°C, 1 Minute, 40 Zyklen (Annealing und Extension)**

Die AmpliTaq<sup>®</sup> Gold Polymerase ist bereits bei Temperaturen von >55°C signifikant aktiv. Aus diesem Grund kann man Annealing und Extension zu einem Schritt zusammenfassen, eine sogenannte 2-Schritt PCR. Das hat u. a. den Vorteil, daß mit höheren Annealing-Temperaturen (> 55°C) generell sehr spezifische Produkte generiert werden können.

#### 2.5.3 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielfrequenz relativ auf die Expression einer anderen, nicht verwandten Sequenz, eines sogenannten Housekeeping-Gens, bezogen. Housekeeping-Gene sind Gene, deren Expression relativ konstant bleibt. Ihre Expression ist z.B. unabhängig von der Art der Behandlung der Zelllinie. In den vorliegenden Experimenten wurde hierfür das Ribosomale Protein 20 (RP20) verwendet. Der ABI PRISM SDS gibt nach Ablauf einer PCR für jede Probe den entsprechenden C<sub>T</sub>-Wert an. Dieser sogenannte ‚Threshold Cycle‘ bezeichnet die Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal über die Grundlinie (baseline) ansteigt. Diese Zykluszahl wird auf die Zykluszahl des zugehörigen Housekeeping-Genes abgeglichen ( $\Delta C_T$ ) und graphisch als  $2^{-\Delta C_T}$  dargestellt. Diese Darstellung ist sinnvoll, weil es pro Zyklus der PCR theoretisch zu einer exponentiellen Verdopplung der DNA-Produktmenge kommt.

#### 2.5.4 Primerdesign

Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe der ‚Primer Express‘ Software der Firma PE Applied Biosystems ausgesucht. Die gewünschten Sequenzen wurden den gängigen Datenbanken entnommen. Bei der Auswahl der Primer sind einige Kriterien zu beachten:

- Länge: 18 – 30 Basen
- G+C Gehalt ca. 20 – 60%

- möglichst keine Poly(T)-Abschnitte (unspezifische Bindungen)
- möglichst keine palindromischen Sequenzabschnitte
- keine 3'-Komplementarität der Primer (Primer Dimere)
- Amplicon-Länge idealerweise zwischen 50 und 150 Basenpaaren

Die Primer wurden vorzugsweise aus der jeweiligen mRNA-Sequenz, also exonspezifisch und unter Auslassung der Intron-Strukturen gewählt, um möglichst keine genomische DNA, sondern ausschließlich cDNA zu amplifizieren.

**Hitze-Schock-Protein 27 (HSP 27):**

Fw. Primer: 5'-CTT-CAG-CCG-GGC-GCT-CAA-3'

Rev. Primer: 5'-CCA-GTG-TGC-TAA-GAG-CTT-CTC-CAT-CAA-C-3'

Amplicon: 62 bp

**Hitze-Schock-Protein 70 (HSP 70):**

Fw. Primer: 5'-GCT-GCC-AAG-AAT-GCG-CTC-GA-3'

Rev. Primer: 5'-GCT-GAT-CTT-GCC-CTT-GAG-ACC-CTC-3'

Amplicon: 71 bp

**Hitze-Schock-Protein 90 (HSP 90):**

Fw. Primer: 5'-TCC-AAT-AGG-CTT-GTG-TCT-TCC-CCC-3'

Rev. Primer: 5'-AAT-CCG-TTC-CAT-GTT-GGC-TGT-CC-3'

Amplicon: 75 bp

**Ribosomal Protein 29 (RP 29):**

Fw. Primer: 5'-AAG-ATG-GGT-CAC-CAG-CTC-TAC-TG-3'

Rev. Primer: 5'-AGA-CGC-GGC-AAG-AGC-GAG-AA-3'

Amplicon: 73 bp

### 2.5.5 Primermatrix

Die beiden zusammengehörenden Primer können sich bezüglich ihres Hybridisierungsverhaltens unterscheiden. Daher ist es notwendig, zunächst das optimale Konzentrationsverhältnis von Primer fw/ Primer rev zu bestimmen. Zu diesem Zweck werden verschiedene Konzentrationskombinationen der beiden Primer getestet und ermittelt welche Kombination die niedrigsten  $C_T$  – Werte ergibt. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse kann die Bildung von Primerdimeren und Nebenprodukten bestimmt werden.

	Forward Primer (nM)		
Reverse Primer (nM)	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	300/50	300/300	900/300
900	900/50	300/900	900/900

**Tab. 3:** Primer-Matrix; Konzentrationskombinationen der Forward- und Reverse-Primer.

### 2.5.6 Primereffizienz

Wenn die optimale Konzentrationskombination eines Primerpaares ermittelt worden ist, muss noch die Effizienz des Primers bestimmt werden. Dazu wird für jedes Primerpaar eine Standardkurve erstellt. Es werden verschiedene Verdünnungen der Ausgangs – DNA in die PCR eingesetzt (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, jeweils 3-fach Bestimmungen). Unter Annahme einer 100%igen Effizienz sollte pro Zyklus eine Verdopplung der Reaktionsprodukte aus dem vorherigen Zyklus erfolgen. Hierfür gilt folgende Formel:

$$Y = X (1 + E)^n$$

(Y = hergestelltes Amplifikat, X = Startkopienzahl, E = Effizienz der Reaktion, n = Anzahl der Zyklen)

Zur Erstellung der Standardkurve muss diese Gleichung logarithmiert werden:

$$\log Y = X + n \log (1 + E)$$

Graphisch wird der  $C_T$  – Wert über dem log der Startkopienzahl aufgetragen:

Daraus leitet sich die Steigung der Geraden ab:

$$S = -1/ (\log 1 + E)$$

Aus dieser Gleichung errechnet sich mittels der SDS-Software die Effizienz der Reaktion:

$$\log (1 + E) = 1/ s$$

$$1 + E = 10^{1/s}$$

$$E = 10^{-1/s} - 1$$

Die Effizienz sollte zwischen 0,8 und 1,0 liegen, um einen möglichst optimalen Ablauf der Reaktion zu gewährleisten. Sie liegt umso höher, je kürzer das generierte Amplicon ist. Daher sind Amplicons mit einer Länge zwischen 50 und 75 bp wünschenswert. Zusätzlich ist darauf zu achten, daß sich die Effizienz eines Primers nicht zu sehr von der des eingesetzten Housekeeping-Gens unterscheidet, um sicher zu gehen, daß eine relative Quantifizierung möglich ist.

### 2.5.7 Ansetzen der PCR

Um Pipettierungenauigkeiten zu vermeiden und Konzentrationsunterschiede auszugleichen, ist es sinnvoll, so wenig Pipettierschritte wie möglich durchzuführen. Es ist hilfreich zunächst einen Mastermix für alle Proben anzulegen.

#### **Ansatz 1:**

- Primerpaar in der vorher durch Optimierung bestimmten Konzentration
- Auffüllen mit Aqua bidest. auf 11, 5 µl je Reaktion  
gesamt: 11, 5 µl x Anzahl der Proben

**Ansatz 2:**

- 1  $\mu$ l cDNA pro Primer
- je 12,5  $\mu$ l SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix  
gesamt: 13,5  $\mu$ l x Anzahl der Gene

Pro Well einer 96-Well Mikrotiterplatte wurden abschließend 11,5  $\mu$ l aus Ansatz 1 und 13,5  $\mu$ l aus Ansatz 2 pipettiert. Dieses ergab ein Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l je Reaktion.

## 2.6 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

### 2.6.1 Verwendete Materialien

- Protein Assay Reagent, (BioRad)
- Bovines Serumalbumin (BSA), (Sigma)

### 2.6.2 Durchführung

Um für die SDS-Gelelektrophorese der Proben eine gleiche Ausgangskonzentration an eingesetztem Protein zu gewährleisten, wurde der Gesamtproteingehalt der einzelnen Lysate quantitativ nach Bradford bestimmt. Das Prinzip beruht auf einer spezifischen Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau an Proteine. In saurer Lösung liegt Coomassie G in seiner kationischen Form vor, mit einem Absorptionsmaximum im roten Spektrum (470 nm). Kommt es zu der Bildung des Protein-Farbstoff-Komplexes, so findet eine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung der anionischen Form statt. Das Absorptionsmaximum liegt dann im blauen Spektralbereich bei 595 nm.

Zur Gesamtproteinbestimmung wurde die Bradford-Reagenzlösung zunächst 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Anschließend wurde der Leerwert in einer Plastikkuvette im Photometer (Beckmann DU 640 Spectrophotometer) bei 595 nm bestimmt. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde dann je 1 µl Probe zu 1 ml Reagenz gegeben und vorsichtig mit der Pipette vermischt. Hierbei wurde darauf geachtet die Bildung von Luftblasen zu vermeiden. Nach Bestimmung der Extinktion konnten die Werte anhand einer mit BSA ermittelten Eichgerade in die jeweilige Proteinmenge umgerechnet werden.

## 2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

### 2.7.1 Einführung

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen nach Laemmli beruht auf einer Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Durch das bestehende hydrophobe Milieu findet eine Auffaltung der Polypeptidketten und Dissoziation von Proteinaggregaten statt. Vor Einbringung in das Sammelgel werden bestehende Disulfidbrücken durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol getrennt, anschließend findet eine Denaturierung durch kurzes Aufkochen (5 Minuten bei 95°C) statt. SDS bewirkt, daß alle Proteine eine einheitliche positive Ladung tragen und sich nach Anlegen einer elektrischen Spannung entsprechend ihres Molekulargewichtes im gitterartigen Polyacrylamidgel in Richtung Anode anordnen.

### 2.7.2 Verwendete Materialien

	Trenngel (10%)	Sammelgel (4%)
Acrylamid/ Bisacrylamid (40%) (Roth)	6,25 ml	2,5 ml
1,5 M Tris pH 8,8 (Serva)	6,25 ml	/
dH <sub>2</sub> O	12 ml	14,6 ml
10% SDS ( Serva)	0,25 ml	0,2 ml
10% APS (Sigma)	0,2 ml	0,2 ml
TEMED (Sigma)	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l
1M Tris pH 6,8 (Serva)	/	2,5 ml

**Tab. 4:** Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.

- Isopropanol, (J.T.Baker)
- Laufpuffer 1x SDS, (Serva)
- Prestained Proteinmarker, Broad Range (Bio Labs)
- 5x SDS-Ladepuffer :        250 mM Tris-Cl (pH 6,8) (Serva)  
                                      500 mM Dithiothreitol (Serva)  
                                      10% SDS (Serva)  
                                      0,5% Bromphenolblau (Serva)  
                                      50% Glycerol (Serva)

### 2.7.3 Durchführung

Zwei mit 70%-igem Ethanol gereinigte Glasplatten (10 x 8 cm) wurden in einem, durch zwei randständig angebrachte Abstandshalter aus Teflon gewährleistetem, Abstand von 1 mm zueinander befestigt. Dieses erfolgte durch zwei starke Metallklemmen. Trenn- und Sammelgel wurden entsprechend Tabelle 1 vorbereitet, wobei der Initiator der Polymerisation, TEMED, erst kurz vor dem Gießen des entsprechenden Gels hinzugegeben wurde. Ab diesem Zeitpunkt mußte zügig gearbeitet werden. Als Fußgel wurde vom Trenngel ein Aliquot von 5 ml entnommen, mit 5 µl TEMED die Polymerisation eingeleitet und ein ca. 5 mm hoher Spiegel gegossen. Als Kontrolle diente der im Becherglas verbleibende Rest der Gelflüssigkeit. War dieser auspolymerisiert, so konnte mit dem nächsten Schritt begonnen werden.

Das Trenngel wurde auf gewünschte Höhe zwischen die Glasplatten gegeben und mit Isopropanol überschichtet. Der Alkohol dient dem Sauerstoffabschluss und begünstigt somit die Polymerisation, außerdem gewährleistet er die Bildung eines geraden Oberrandes. Das Trenngel sollte ungefähr eine Stunde auspolymerisieren, um eine möglichst gleichmäßige Vernetzung innerhalb des Gels zu erhalten. Nach Abgießen des Alkohols, Ausspülen mit aqua dest. und anschließender Trocknung wurde das Sammelgel gegossen in welches, um die Bildung der für den Proteinauftrag notwendigen Taschen sicherzustellen, ein Plastikkamm gesteckt wurde. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Kamm vorsichtig entfernt, die Klemmen von den Glasplatten gelöst und Selbige in die mit Laufpuffer gefüllte und

vorgekühlte Gelkammer eingebracht. Hierbei war darauf zu achten, daß sich am unteren Rand der Glasplatten keine Luftblasen befanden, da diese einen diskontinuierlichen Stromfluß begünstigt hätten. Anschließend wurde das obere Reservoir der Gelkammer ebenso mit Laufpuffer gefüllt und die nun unterhalb des Pufferspiegels liegenden Geltaschen mit einer 200 µl Pipette vorsichtig gespült. Die Proben, zuvor nach berechnetem Schema zusammenpipettiert und bei 95°C für 5 min. denaturiert, wurden nun mit einer Hamiltonpipette aufgetragen und die Elektrophorese wurde gestartet.

Es wurde pro Gel eine Spannung von 20 mA angelegt. Die Bildung von feinen Luftblasen im oberen Teil der Elektrophoresekammer wurde als visuelle Kontrolle für den bestehenden Stromfluß angesehen. Die Dauer der Elektrophorese betrug 1-2 h und war anhand des im Lämmli-puffer enthaltenen Bromphenolblaus abzulesen. Die Elektrophorese wurde meist kurz nach Austreten der Bromphenolblaufront aus dem Gel gestoppt.

## 2.8 Western Blot

### 2.8.1 Verwendete Materialien

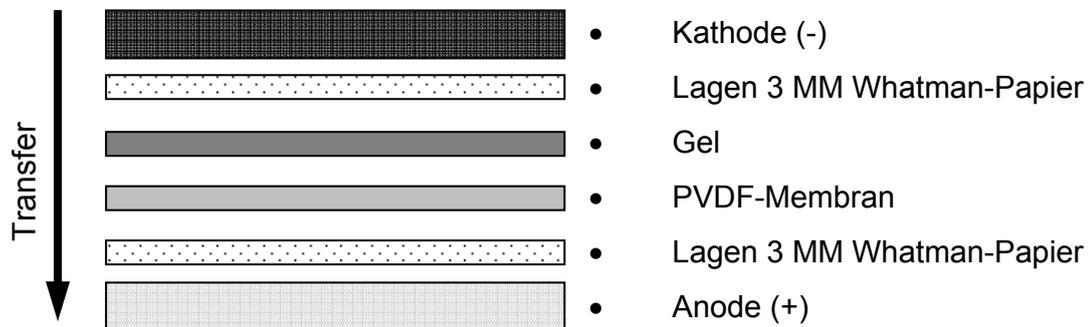
- 10 x Blotpuffer:
  - 20% Methanol
  - 10 x SDS Laufpuffer
  - Aqua bidest. ad 5 l
  - 151,25 g Tris (Serva)
  - 703,75 g Glycin (Sigma)
  
- Blocklösung (100 ml):
  - 5% Trockenmilch (DIFCO)                    5 g
  - 0,01% Gelatine (Merck)                    500 µl (2%)
  - 1% BSA (Fraktion V) (Sigma)            1 g
  - 10% Tween20 (Aldrich)                    200 µl
  - 20 x TBS (Serva)                            5 ml

- Waschpuffer:

20 x TBS (Serva)	100 ml
10% Tween20 (Aldrich)	4 ml
Aqua bidest. ad 2 l	
  
- Blotting Membran IMMOBILON-P (PVDF), (Millipore)
- 3 MM Filterpapier, (Whatman)
- Prestained Protein Marker, Broad Range, (BioLabs)
- Roney Kandahar Black India Ink
- ECL Plus Western Blot Detection System, (Amersham Pharmacia)
  
- Primärantikörper:
  - a) HSP 60 (K-20) goat polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology)
  - b) HSP 70 (N-20) goat polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology)
  
- Sekundärantikörper:
  - c) anti Peroxidase conjugated donkey IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)

### 2.8.2 Durchführung

Beim Western Blot (Towbin 1979) werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine durch eine senkrecht zur Gellaufrichtung angelegte Spannung in einem basischen Milieu auf eine Filtermembran, hier Polyvinylidenfluorid (PVDF), transferiert. Der Transfer erfolgte mit Hilfe des Semi-Dry Blots (Biometra<sup>®</sup> 10 W, 16x20 cm) unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems nach Kyse-Andersen (1984). Nach kurzer Equilibrierung und Aktivierung der PVDF-Membran in Methanol und Blotpuffer wurde nach folgendem Schichtungsschema vorgegangen:



**Abb. 6:** Western Blot, schematischer Aufbau.

Die Übertragung der Proteine in Richtung Anode erfolgte über 2 Stunden bei 400 mA. Als Stromquelle diente ein Electrophoresis Power Supply-EPS 600 von Pharmacia Biotech<sup>®</sup>. Nach Beenden des Blotvorgangs und erfolgter Proteinübertragung wurde die PVDF-Membran für 20 Minuten bei Raumtemperatur in ein Färbebad übergeben:

- India Ink                    100 µl
- 10% Tween20                200 µl
- 20 x TBS                     5 ml
- Aqua dest.                    ad 100 ml

Anschließend wurde in 1 x TBS gewaschen und die Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungen für 2 Stunden in Blocklösung gegeben. Dann folgte die Inkubation des Primärantikörpers in gewünschter Konzentration und in einem Verhältnis von 1:1000 in Blocklösung bei 4°C über Nacht.

Am nächsten Tag wurde die Inkubation beendet und mehrfach in Western Wash (1 x TBS und 0,02% Tween20) gewaschen. Die Inkubation der Blotting-Membran mit dem Sekundärantikörper erfolgte über 2 Stunden bei Raumtemperatur. Der Antikörper wurde im Verhältnis 1:10000 in Blocklösung gelöst. Anschließend wurde nach oben beschriebenem Verfahren gewaschen.

## 2.9 ECL („Enhanced Chemiluminescent Reaction“)

In der Chemilumineszenz wird in einer durch HRP (Horseradish Peroxidase) katalysierten Oxidation von Luminol „kaltes“ Licht emittiert. Die auf der Blotting-Membran fixierten Proteine wurden über den Sekundärantikörper mit HRP markiert, in einem 1:40 Gemisch der beiden Reagentien des ECL-Kits angeregt und in der Dunkelkammer auf Röntgenfilm (Kodak<sup>®</sup>, Xomat, AR 5) belichtet und standardmäßig entwickelt.

## 2.10 XTT-Test (Zellproliferationstest)

Der XTT-Test dient dem Nachweis der intrazellulären mitochondrialen Stoffwechselaktivität. Das Messprinzip bei diesem Test beruht auf der durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysierten Spaltung des gelben Tetrazoliums Salzes XTT (Natrium 3´-[1(phenylamino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) BenzenSulfonsäure Hydrat) zu orangem Formazan. Diese Umsetzung findet nur durch lebende Zellen statt und kann somit als Marker für die zelluläre Vitalität angesehen werden. Formazan ist wasserlöslich und mit einem Spektralphotometer zwischen 450 und 500 nm im ELISA-Readers messbar und quantifizierbar.. Der XTT-Test wurde in dieser Arbeit benutzt um die Zellvitalität nach hyperthermem (2 Stunden im Wasserbad bei 46°C) sowie oxidativem (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Stress zu bestimmen. Verwendet wurde der XTT-Kit<sup>®</sup>, Boeringer Mannheim Nr. 1465015.

Der Kit besteht aus:

- XTT Labeling Reagent (Reagenz 1)
- Electron-Coupling Reagent (Reagenz 2)

Testablauf:

Für die Testdurchführung wurden je 2,5 ml Reagenz 1 und 50 µl Reagenz 2 aufgetaut und vereinigt. Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^4$  Zellen pro Well in 96-Well Platten ausgesät und nach Erlangen des adhärenen Stadiums entsprechend dem beschriebenen Versuchsprotokoll stimuliert. Für die Testinitialisierung wurden aus jedem Well von den insgesamt 220 µl Flüssigkeit 70 µl Medium entnommen und

anschließend 50 µl XTT-Reagenz zugegeben. Die Farbreaktion in den Wells wurde nach zwei Stunden Reaktionszeit bei Raumtemperatur mittels eines ELISA-Reader gemessen. Für die Messung im ELISA-Reader wurde eine Mess-Wellenlänge von 492 nm und eine Referenzlänge von 620 nm bestimmt. Die erhaltenen Messdaten in Zahlenwerten wurden anschliessend tabellarisch aufgeführt und statistisch ausgewertet.

### **2.11 Auswertung und Statistik**

Die tabellarische Zusammenstellung und Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel. Für die Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichungen und der Standardfehler (SEM) der einzelnen Versuchsreihen sowie zur Erstellung einzelner Abbildungen wurde Origin 5.0G verwendet. Einzelne Diagramme sowie die Überprüfung auf Signifikanz wurde mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 12.0 unter Einsatz des Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Werte  $p < 0,05$  angesehen. Die dargestellten Balkendiagramme repräsentieren Mittelwerte (Mean), zusätzlich angegeben ist der entsprechende Standardfehler ( $\pm$ SEM).