

## IV. Material und Methoden

### 4.1 Mausmodelle

Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Inhibition von NF- $\kappa$ B ( $\Delta N^{\text{MHC}}$ -Mäuse) wurden durch Kreuzung von  $c^{\text{loxPI}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}}$ -Mäusen mit  $\text{Cre}^{\text{MHC}}$  Mäusen unter Anwendung des Cre/loxP-Systems generiert. Die  $c^{\text{loxPI}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}}$ -Mäuse (genannt  $\Delta N^{\text{loxP}}$ ) wurden von Ruth Schmidt-Ullrich zur Verfügung gestellt, ebenso wie die  $c^{\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}}$ -Mäuse, die als Positivkontrolle für PCR und Westernblotexperimente dienten und als  $\Delta N^{\text{ubi}}$ -Mäuse bezeichnet wurden (128). Bei den  $c^{\text{loxPI}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}}$ -Mäusen wurde die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  cDNA, die für die Aminosäuren 71-317 von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  kodiert, durch homologe Rekombination in den  $\beta$ -Catenin-Locus eingefügt.  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  fehlen die Phosphorylierungs- und Ubiquitinierungsstellen, die für den Signal-induzierten Abbau von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  notwendig sind.  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  fungiert demnach als Superrepressor von NF- $\kappa$ B. Am Startcodon des  $\beta$ -Catenin-Gens befinden sich bei den  $c^{\text{loxPI}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}}$ -Mäusen zwei loxP-Sequenzen, die ein Stopcodon umrahmen. Die Translation von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  findet nur nach Entfernung des Stop-Codons durch die Cre-Recombinase statt. Die  $\text{Cre}^{\text{MHC}}$ -Mäuse, bei denen die Expression der Cre-Recombinase dem kardiomyozytenspezifischen Promotor des  $\alpha$ -myosin heavy chain ( $\alpha$ -MHC)-Gens unterliegt, wurden von Michael D. Schneider (Baylor College of Medicine, Houston) zur Verfügung gestellt. Alle Maussorten hatten zum Zeitpunkt der Versuche den C57/black6 Mausstamm als Hintergrund. Zur Überprüfung der herzspezifischen Expression von Cre wurden  $\text{Cre}^{\text{MHC}}$ -Mäuse mit  $\text{lacZ}^{\text{loxP}}$ -Mäusen (B6; 129S-Gtrosa26<sup>TM1sor</sup>, stock No. 003309, Jackson laboratories) gekreuzt. Alle Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten. Haltebedingungen und experimentelle Versuchsprotokolle wurden durch die Tierversuchsbehörde bestätigt (Reg. 0135/01).

### 4.2 Genotypisierung der Mäuse mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Durch die PCR werden definierte DNA-Abschnitte mit Hilfe einer DNA-Polymerase vervielfältigt. Im ersten Schritt wird die DNA zwecks Denaturierung erhitzt. Danach folgt die Bindung spezifischer Primer (Oligonucleotide) an ihre komplementäre DNA-Sequenz (sogenanntes annealing). In der Synthesephase addiert die Polymerase unter Verwendung des Gegenstrangs als Matrize die entsprechenden Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs: Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Invitrogen) an das 3'-Ende des Primers. Das Produkt dient in der nächsten Reaktionsrunde ebenfalls als Matrize, so dass ein exponentielles

Wachstum erfolgt. Die Aktivität der Polymerase wird durch den Denaturierungsschritt nicht beeinträchtigt, da sie aus dem hitzeresistenten Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert wird (sog. Taq-Polymerase). Das PCR-Produkt wird nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel mit Etidiumbromid (0,5 µg/ml, Roth) gefärbt, das sich in doppelsträngige DNA einlagert und bei Anregung durch UV-Licht fluoresziert. Die Identifizierung der Bande erfolgt anhand der zu erwartenden Größe, die durch einen Größenstandard ermittelt wird.

PCR-Ansatz:

|                                | <u>loxPIκBαΔN</u> | <u>α-MHC-Cre</u> | <u>β-Catenin</u> |
|--------------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)      | 1,8 µl            | 1,5 µl           | 1,5 µl           |
| dNTPs (10 mM)                  | 0,75 µl           | 0,5 µl           | 0,5 µl           |
| 10 x PCR Puffer                | 3 µl              | 2,5 µl           | 2,5 µl           |
| Primer vorwärts (100 pmol/µl)  | 0,4 µl            | 0,25 µl          | 0,4 µl           |
| Primer rückwärts (100 pmol/µl) | 0,4 µl            | 0,25 µl          | 0,4 µl           |
| Taq Polymerase (5 U/µl)        | 0,4 µl            | 0,2 µl           | 0,2 µl           |
| Aqua bidest                    | 19,25 µl          | 14,8 µl          | 15,5 µl          |
| DNA                            | 4 µl              | 5 µl             | 4 µl             |

PCR-Programm:

|                             | <u>loxPIκBαΔN</u> | <u>α-MHC-Cre</u> | <u>β-Catenin</u> |
|-----------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Zykluszahl (Schritte 2.-4.) | 37                | 38               | siehe α-MHC-Cre  |
| 1. Denaturierung            | 94°C, 5 min       | 94°C, 2 min      |                  |
| 2. Denaturierung            | 96°C, 6 sec       | 94°C, 30 sec     |                  |
| 3. Primerbindung            | 60°C, 20 sec      | 58°C, 30 sec     |                  |
| 4. DNA-Synthese             | 72°C, 20 sec      | 72°C, 30 sec     |                  |
| 4. DNA-Synthese             | 72°C, 10 min      | 72°C, 10 min     |                  |
| 5. Pause                    | 4°C, Pause        | 4°C, Pause       |                  |

PCR-Ansatz:LacZ

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)      | 1,8 µl  |
| dNTPs (10 mM)                  | 0,75 µl |
| 10 x PCR Puffer                | 3 µl    |
| Primer vorwärts (100 pmol/µl)  | 0,25 µl |
| Primer rückwärts (100 pmol/µl) | 0,25 µl |
| Taq Polymerase (5 U/µl)        | 0,4 µl  |
| Aqua bidest                    | 18,8 µl |
| DNA                            | 4 µl    |

**PCR-Programm:**

|                             |              |
|-----------------------------|--------------|
| Zykluszahl (Schritte 2.-4.) | 39           |
| 1. Denaturierung            | 94°C, 2 min  |
| 2. Denaturierung            | 96°C, 15 sec |
| 3. Primerbindung            | 66°C, 20 sec |
| 4. DNA-Synthese             | 72°C, 20 sec |
| 4. DNA-Synthese             | 72°C, 10 min |
| 5. Pause                    | 4°C, Pause   |

Die Taq-Polymerase und der 10x Puffer waren von Promega.

Die Sequenzen der Primer (Biotex) waren wie folgt:

loxPIkBαΔN: 5'-CGAGTCCCCGTCCTCGGTG-3' (forward, (pF), Abb. 5A) und 5'-AGAATCACGGTGACCTGGGTAAA-3' (reverse (pR), Abb. 5A).

α-MHC-Cre: 5'-GTTCGCAAGAACCTGATGGACA-3' (vorwärts) und 5'-CTAGAGCCTGTTTTGCACGTTT-3' (rückwärts).

β-Catenin: 5'-CATGGACAGGGGTGGCCTGA-3' (vorwärts) und 5'-AGAATCACGGTGACCTGGGTAAA-3' (rückwärts).

LacZ: 5'-TCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATG-3' (vorwärts) und 5'-ATATCCTGATCTTCCAGATAACTGCCG-3' (rückwärts).

Das Produktgrößen waren:

loxP1κBαΔN-PCR: 530 bp

α-MHC-Cre-PCR: 340 bp

β-Catenin-PCR: 285 bp

LacZ-PCR: 464 bp.

### 4.3 *In vivo* Experimente mit Mäusen

#### 4.3.1 Die Induktion von kardialer Hypertrophie im Tiermodell mittels microosmotischer Pumpen

Um kardiale Hypertrophie in Mäusen zu induzieren, wurden osmotische Minipumpen (Model 1002, Durect) verwendet. Die Pumpen bestehen aus einer semipermeablen äußeren Membran, einem Salzmantel und einer inneren, impermeablen Membran, die den Füllraum umschließt.

Osmose bewirkt den Fluß von Körperflüssigkeit durch die semipermeable Membran zum Salzmantel, der durch kontinuierliche Volumenzunahme die im Füllraum vorhandene Flüssigkeit über den Flussregulator nach aussen drückt. Die Pumpen haben ein Fassungsvermögen von ca. 100 µl und setzen während maximal 14 Tagen 0,25 µl Flüssigkeit pro Stunde frei. Die Füllung erfolgte mittels einer Kanüle mit AngII (Sigma, 1.4 µg/kg/min, gelöst in 0.9% NaCl/0.01 N Essigsäure) oder mit Iso (Sigma, 60mg/kg/Tag, gelöst in 0.9% NaCl). Die erfolgreiche Füllung wurde durch Wiegen der Pumpe vor und nach der Füllung kontrolliert. Zur subkutanen Implantierung wurden die Tiere mit Ketamin (30 mg/kg, Merial)/Xylazin (10 mg/kg, Bayer) intraperitoneal betäubt. Im Nackenbereich wurde ein kleiner Schnitt durch die Haut gemacht und die Haut von dem darunterliegenden Muskelgewebe vorsichtig durch Öffnen einer stumpfen Schere getrennt. Die Pumpe wurde mit dem Flussregulator voran durch die Öffnung unter die Haut geschoben und die Schnittstelle vernäht. Kontrollmäuse wurden nur scheinoperiert, da bei echographischen Voruntersuchungen mit nur mit Lösungsmittel gefüllten Pumpen keinerlei Veränderungen bezüglich der gemessenen Parameter festgestellt werden konnten. Für die Hypertrophieversuche wurden ungefähr gleichalte Tiere (12-14 Wochen) gewählt und ausschliesslich Männchen, um empfängnisbedingte hormonelle Schwankungen zu vermeiden. Die Pumpdauer betrug für AngII 14 Tage und für Isoproterenol 7 Tage.

### **4.3.2 Die Induktion von Hypertrophie im Tiermodell mittels partieller Aortenligatur (transaortic constriction, TAC)**

Die partielle Aortenligatur ist eine Standardmethode zur Induktion von Hypertrophie durch Drucküberbelastung des linken Ventrikels. Die partielle Aortenligatur wurde von R. van der Nagel (Hubrecht Institute, Utrecht, NL) durchgeführt. Zunächst wurden die Mäuse mit Hilfe einer Isofluranmaske, die an ein Beatmungsgerät (Hugo Sachs, 220 ml Luft/min, 160 Atemzüge/ min, Atemvolumen: 200  $\mu$ l) angeschlossen war, betäubt (2,1 % Isofluran, Baxter). Der Rasur im Brustbereich folgte die Intubation der Luftröhre mit einer mit dem Beatmungsgerät verbundenen, abgestumpften 20 G Kanüle. Die Operation erfolgte auf einer Wärmeplatte (37°C, Effenberger). Zunächst wurde die Haut ca. 0.5 cm unterhalb des Brustbeins einen cm eingeschnitten. Der Zugang zur Aorta wurde durch Schaffung einer kleinen Öffnung im Muskelgewebe zwischen erster und zweiter Rippe hergestellt. Die Loben des darunterliegenden, zweigeteilten Thymus wurden zur Seite geschoben und der Aortenbogen freigelegt. Die Ligatur (6,0 Seidenfaden, Fine Science Tools) erfolgte zwischen dem Truncus brachiocephalicus und linker Halsschlagader (s. Abb. 12A). Die Ligation wurde durch Anlegen einer Kanüle parallel zur Aorta auf den Kanüledurchmesser (0,5 mm) begrenzt. Nach Anbringen der Ligatur wurde die Kanüle entfernt und der Thorax geschlossen. Nach der Operation erhielt die Maus eine intraperitoneale Injektion von 0,5 ml NaCl (0,9%) zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes.

### **4.3.3 Echokardiographie**

Die Echokardiographie ist eine nichtinvasive Methode zur Untersuchung von Organen mittels Ultraschall. Beim Herzen können u. a. die Ausmaße der Wände/Lumina als auch Parameter der Herzfunktion bestimmt werden. Die Echokardiographie der Mäuse erfolgte mit einem Accuson Sequoia Instrument (Siemens) und einem 13-Megahertz-Schallkopf. Nach der Narkotisierung (s.o.) wurde das Fell im linken Brustbereich mit einer Enhaarungscreme (Rossmann) entfernt und Kontaktgel (Elefant-Chemie) aufgetragen. Die Ventrikel-Untersuchungen wurden vor der Implantierung und 12 Tage (AngII) bzw. 6 Tage (Iso) danach im M-Modus mit mindestens 3 Messungen pro Maus durchgeführt, ohne dass der Durchführende Kenntnis vom Genotyp und der Behandlung der Mäuse hatte.

## 4.4 Präparation von Primärzellen und Zellkultur

### 4.4.1 Präparation adulter linksventrikulärer Kardiomyozyten und Nichtmyozyten aus der Ratte

Adulte Kardiomyozyten und Nichtmyozyten wurden aus 12-14 Wochen alten, männlichen Wistar-Ratten (Schönwalde) mit maximal 250g Körpergewicht in Anlehnung an die von Powell et. al. beschriebene Methode isoliert (190). Die Tiere wurden nach einer Inhalationsnarkose mit Isofluran (1% v/v, Baxter) mittels Ketamin (185mg/kg, Merial) / Xylazin (30 mg/ kg, Bayer; jeweils in die Oberschenkelmuskulatur) anesthesiert. Zur Vermeidung der Blutgerinnung wurde Heparin (6000 I. E./ kg, Roche) intraperitoneal gespritzt. Nach 15 min wurde der Brustkorb geöffnet, das Herz entnommen und in eiskalte, physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0.9%) überführt. Die Isolation der Zellen erfolgte durch retrograde (entgegen der Blutflussrichtung) Perfusion mit Kollagenase mit Hilfe einer Langendorff-Apparatur. Dazu wurde die Glaskanüle ( $\varnothing$  2,5 mm) der Perfusionsapparatur in die Aorta oberhalb der Aortenklappe eingeführt und mit einem Faden fixiert. Die geschlossene Aortenklappe gewährleistete die Perfusion des Herzens über die hinter der Klappe abgehenden Koronargefäße, die den gesamten Herzmuskel als Netzwerk umspannen. Das Herz wurde 3 min mit 1,7 mM  $\text{CaCl}_2$ /Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) perfundiert, um das restliche Blut durch Kontraktionen auszuspülen. Danach folgte eine ca. 5 minütige Perfusion mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem 0,5 % FAFBSA (fatty acid free bovine serum albumin, Fettsäure-freies Rinderserumalbumin, Sigma)/KHP. Der Mangel an Kalzium bewirkte die für den Verdau wichtige Arretierung der Kontraktionen sowie die Dissoziation der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Desmosomenstrukturen zwischen den Zellen. Der sich anschließende 25 minütige Verdau erfolgte mit 0,04% Kollagenase II (CellSystem)/0,23% FAFBSA/KHP mittels zirkulärer Perfusion. Alle Perfusionslösungen wurden konstant auf 38°C temperiert und mit 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$  (Linde) oxigeniert. Dem durch den Verdau aufgequollenen Herzen wurden nach Abnahme von der Kanüle die Atrien sowie der dünnere, rechte Ventrikel mit einem Skalpell entfernt. Nach grober Zerkleinerung wurde der linke Ventrikel für 5 min in der Verdauungslösung mittels eingeleitetem  $\text{O}_2$ / $\text{CO}_2$  umgewälzt, was zu einem schonenden Herauslösen der Zellen aus dem Gewebeverband führte. Die Zellsuspension wurde nach Filtrierung durch Siebgewebe (Maschenweite: 200  $\mu\text{m}$ , Neolab) und Zugabe eines Volumens 0,5 % FAFBSA/KHP für 2 min zentrifugiert (ca. 38 x g, Raumtemperatur, Heraeus). Die im Pellet enthaltenen Kardiomyozyten wurden erneut in 0,5 % FAFBSA/KHP resuspendiert, zentrifugiert und in 30 ml 1% BSA (Sigma)/KHP resuspendiert. Es folgte die schrittweise Einstellung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 1 mM durch Zugabe von 20, 80, 100 und 100  $\mu\text{l}$  einer

100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung in einem Zeitraum von 5 min. Bei Einstellung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in einem Schritt würden die Zellen durch Superkontraktionen zugrunde gehen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in Kardiomyozytenmedium (M199 mit Earl's Salzen und  $\text{NaHCO}_3$ , Biochrom) resuspendiert und in Laminin(Roche)-beschichtete Kulturgefäße (TPP) ausgesät (100000-200000 Zellen pro  $\varnothing$  6 cm Kulturschale). Aus einem Herz konnten im Schnitt 1-1,5 Millionen Kardiomyozyten gewonnen werden. Die in den Überständen der ersten beiden Zentrifugationen enthaltenen Nichtmyozyten wurden gepoolt, 2 min zentrifugiert (ca. 120 x g), ohne Angleich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in 5% FCS (fetal calf serum, fötales Kälberserum, Biochrom)/Kardiomyozytenmedium resuspendiert und in unbeschichteten Zellkulturschalen ( $\varnothing$  10 cm) ausgesät.

Die Beschichtung der Kulturgefäße für Kardiomyozyten wurde mit Laminin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 1ml für  $\varnothing$  6 cm)/PBS (Biochrom) für mindestens 2h bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei war es wichtig, dass die Oberflächen der Kulturgefäße ständig benetzt waren. Dann wurde die Lamininlösung abgenommen und die Aussaat der Zellen erfolgte ohne Waschen der Kulturgefäße.

Die übrigen Zutaten für die Isolation/Kultur von adulten Kardiomyozyten kamen von Sigma (Natriumpyruvat, Kreatin, Taurin, Karnithin, Insulin) und von Gibco (Medium, Penicillin, Streptomycin).

#### **4.4.2 Präparation adulter, linksventrikulärer Mauskardiomyozyten**

Die Präparation adulter Mauskardiomyozyten erfolgte anhand der Anleitung unter [www.signaling-gateway.org](http://www.signaling-gateway.org). Die Mäuse wurden wie unter „Die Induktion von kardialer Hypertrophie im Tiermodell“ beschrieben narkotisiert. Prinzipiell ähnelt die Methode der zur Isolation von Rattenkardiomyozyten. Die wichtigsten Modifikationen sind: Die Perfusion des Herzens erfolgte durch eine abgestumpfte 20 G Kanüle ohne Oxygenierung der Perfusionslösungen. Für den 8-10minütigen Verdau des Gewebes wurde ein fertiges Gemisch aus Kollagenase und Protease (Liberase 1, Roche) verwendet. Die Liberaselösung kann für den Verdau von bis zu fünf Herzen wieder verwendet werden. Die Zellkultur in Laminin-beschichteten Kulturgefäßen (s.o.) erfolgte in Minimum essential medium (MEM) mit Hanks' Salzen/Glutamin (Invitrogen), dem BSA (0.1 mg/ml) Penicillin/Streptomycin (100U/ml/100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Invitrogen) zugesetzt wurde. Da Mauskardiomyozyten im Unterschied zu Rattenkardiomyozyten in Kultur nur sehr begrenzt haltbar sind, erfolgte die Stimulation und Aufbereitung noch am selben Tag der Isolation.

#### 4.4.3 Präparation neonataler Kardiomyozyten aus der Ratte

Für eine Präparation neonataler Kardiomyozyten wurden 40-60 Wistar-Ratten (2-3 Tage alt, Schönwalde) verwendet. Nach der Dekapitierung wurden die Herzen in eisgekühlten Puffer A überführt. Es folgte die Entfernung der Vorhöfe, ein Waschschrift mit eisgekühltem Puffer A sowie die Zerkleinerung der Ventrikel zu einer homogenen Masse mittels einem Skalpell. Der erste Verdau erfolgte in einem Glaskolben mit 25 ml Enzymlösung (0,14 mg/ml Kollagenase/0,12 mg/ml Pankreatin in Puffer A) während 5 min im Wasserbad (37°C) bei konstanter Agitation mittels zweier Magnetrührer (600 U/min). Nach einer kurzen Sedimentation wurde der Überstand verworfen und ein weiterer Verdau mit 25 ml Enzymlösung durchgeführt. Der Überstand wurde zu 2,5 ml eisgekühltem Pferdeserum (Gibco) gegeben und zentrifugiert (4 min, 210 x g, 4°C, Heraeus). Das Pellet wurde in Medium/20 % Pferdeserum aufgenommen und auf Eis gelagert. Nach 8-12 Verdauen war das Gewebe vollständig aufgelöst. Die auf Eis gelagerten Zellfraktionen wurden vereinigt und zentrifugiert (s.o.), einmal mit PBS (RT) gewaschen und in 8 ml PBS (RT) aufgenommen. Die Aufreinigung der Zellen erfolgte in 4 Aliquots mittels Zentrifugation (30 min, 1300 x g, 20°C) durch einen Percollgradienten (Amersham). Nach einmaligem Waschen mit PBS (Zentrifugation: 5 min, 210 x g, 20°C) wurden die Kardiomyozyten in 10 ml Medium (37°C) aufgenommen, die Anzahl bestimmt (Neubauer-Kammer) und in Gelatine-beschichtete Kulturschalen mit Medium/5 % Pferdeserum (Biochrom)/100 µM Cytosin arabinoside hydrochloride (Sigma) ausgesät (ca.  $2,5 \times 10^6$  Zellen pro Ø 6 cm Kulturschale). Nach 24 h wurden die Zellen mit Medium/0,5 % Pferdeserum gewaschen und in diesem Medium 12h bis zur Stimulation kultiviert. Zum Beschichten wurde eine 1%ige, autoklavierte Gelatinelösung (Sigma, w/v, in Aqua bidest) auf die Kulturschalen gegeben und diese für 2-3 h im Brutschrank aufbewahrt. Nach Abnahme der Lösung wurden die Schalen im Abzug unter UV-Bestrahlung getrocknet.

Die übrigen Zutaten zur Isolation und Kultur der neonatalen Kardiomyozyten stammten von Gibco (DMEM/F12 Medium, Natriumpyruvat, L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin), Sigma (Ascorbinsäure, ITS, BSA, Pankreatin) und CellSystem (Kollagenase).

#### 4.4.4 Zellkultur und Infektion mit Adenovirus

Zwei Stunden nach Aussaat wurden Kardiomyocyten oder Nichtmyocyten mit Medium gewaschen. Ab diesem Zeitpunkt enthielt das Medium zusätzlich 100 µg/ml Gentamycin (Gibco).

Zur Bestimmung der Anzahl adulter Kardiomyozyten konnte wegen der Zellgröße keine

übliche Zählkammer eingesetzt werden. Stattdessen wurde ein Okular mit integriertem Zählgitter verwendet, dessen Fläche bei 20facher Vergrößerung definiert war. Über die Fläche des Kulturgefäss liess sich somit die Gesamtzahl an Zellen berechnen. Die Infektion mit Adenoviren fand mit 50 Viruspartikeln/Zelle über Nacht statt. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen und weitere 24h ohne Eingriff kultiviert. Das für den NF- $\kappa$ B-Superrepressor I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N kodierende Virus (Ad5<sup>I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N</sup>) bzw. das Leervirus (Ad5<sup>Kontrolle</sup>) wurden bereits beschrieben (116). Die Viren wurden von P. Löser (Hepaveg) zur Verfügung gestellt.

Nichtkardiomyocyten wurden bis zur Konfluenz kultiviert, mit PBS (Biochrom) gewaschen und 5 min mit Trypsin/EDTA (Gibco) bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Trypsinreaktion mit Medium wurden die Zellen zentrifugiert, in 5% FCS/Kardiomyocytenmedium resuspendiert und erneut ausgesät. Nach Erreichen von 70% Konfluenz wurden die Zellen über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert und dann stimuliert.

#### **4.5 Isolation von DNA und RNA**

##### **4.5.1 Isolation von genomischer DNA aus Mausorganen**

###### **a) Isolation der genomischen DNA aus Mausschwanzbiopsien**

0,5 cm Mausschwanz wurden mit 500  $\mu$ l Lysepuffer (100 mM Tris, pH 8,5; 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM NaCl) und Proteinase K (100  $\mu$ g/ml, Roche) über Nacht bei 55 °C auf dem Rüttler inkubiert. Das verdaute Gewebe wurde anschließend kräftig gevortext und für 10 min zentrifugiert (15000 x g, RT). Der Überstand wurde vorsichtig auf 500  $\mu$ l Isopropanol pipettiert und die DNA durch Schwenken präzipitiert. Die fädige DNA wurde in 200  $\mu$ l Tris/EDTA-Puffer (10 mM Tris, pH 7,5; 0,1 mM EDTA) aufgenommen, während einer Stunde bei 40°C auf dem Rüttler gelöst und bei 4°C gelagert. Für die PCR wurde 1: 10 verdünnte DNA (mit Aqua bidest) eingesetzt, die zuvor 10 min auf 100°C erhitzt worden war.

###### **b) Isolation von genomischer DNA aus Mausherz und -leber**

Die DNA-Isolation aus Mausorganen erfolgte mittels des DNeasy Kits (Qiagen). 25 mg tiefgefrorenes Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff mittels Mörser und Pistill fein zerrieben und das pulverisierte Gewebe in 270  $\mu$ l ATL-Puffer und 30  $\mu$ l Proteinase K (600 mAU/ml, Qiagen) über Nacht bei 55°C auf dem Rüttler inkubiert. Die weiteren Schritte wurden nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Die eluierte DNA (200  $\mu$ l) wurde bei 4°C gelagert.

#### **4.5.2 Isolation von genomischer DNA aus isolierten Mauskardiomyozyten**

Die einer 6 cm-Kulturschale ausgesäten Zellen (ca. 100000) wurden in 1 ml PBS zusammengeschaubt und 5 min zentrifugiert (RT, 15000 x g, Heraeus). Das Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und 20 µl Proteinase K (600 mAU/ml, Qiagen) sowie 200 µl Puffer AL (DNeasy Kit, Qiagen) zugegeben. Der Proteinverdau erfolgte für 10 min bei 70°C. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol wurde wie im DNeasy Kit (Qiagen) angegeben weiterverfahren. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte in 100 µl Elutionspuffer aus dem Kit. Für die PCR wurden 4 µl DNA (unverdünnt) eingesetzt, die zuvor 5 min auf 100°C erhitzt worden war.

#### **4.5.3 Isolation von Gesamt-RNA aus Mausherzen oder isolierten Kardiomyozyten**

Isolierte RNA dient als Matritze zur Synthese von cDNA, die für die Realtime RT-PCR (s.u.) eingesetzt wird. Gesamt-RNA wurde aus Mausherzen mit Hilfe des RNeasy-Kit (Qiagen) isoliert. Bei dieser Methode wird die RNA mit Hochsalzpuffer an eine einer Plastiksäule befindlichen Silikagelmembran gebunden, gewaschen und schließlich eluiert. Alle Schritte müssen zügig bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Das bei -80°C gefrorene Gewebe wurde zunächst in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill grob zerkleinert. Ein maximal 30 mg schweres Stück wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 300 µl Puffer RLT versetzt. Die Homogenisierung erfolgte während 30 sec mit dem Ultraturrax (15000 U/min, neoLab). Danach wurde die Probe kurz herunterzentrifugiert (Heraeus). Nach Überführung in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde das Lysat zur weiteren Homogenisation 10x mit einer 20 G Kanüle aufgezogen. Im nächsten Schritt folgte nach der Zugabe von 590 µl bidestilliertem Wasser ein 10 minütiger Verdau mit 10 µl Proteinase K (Qiagen) bei 55 °C. Die Proben wurden anschließend für 3 min zentrifugiert (15000 x g). Der Überstand wurde ohne den aufliegenden Fettfilm in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Die übrigen Schritte folgten den Angaben des Herstellers.

Auch die Isolation von Gesamt-RNA aus isolierten Kardiomyozyten wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) durchgeführt. Die kultivierten Zellen wurden nach Abnahme des Mediums in 600 µl Puffer RLT (Kulturschale mit Ø 6 cm) zusammengeschaubt und in einem Reaktionsgefäß schockgefroren. Nach Erwärmen des Lysats (10 min, 37°C) folgte die Homogenisation durch Aufziehen durch eine 20 G Nadel (Ø 0,9 mm). Nach Zugabe von einem Volumen Ethanol (70%) wurde wie im Herstellerprotokoll angegeben weiterverfahren.

Bei Gewinnung der RNA für realtime-RT-PCR Analysen wurde ein Verdau mit DNase (Qiagen) zum Abbau genomischer DNA durchgeführt, um die Amplifikation genomischer Sequenzen zu vermeiden.

## **4.6 Herstellung von Proteinextrakten**

### **4.6.1 Herstellung zytoplasmatischer und nukleärer Extrakte aus Kardiomyozyten**

Am Stimulationsende wurden die Kardiomyozyten einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann in 1 ml PBS ( $\varnothing$  6 cm Kulturschale) zusammengeschaßt. Nach Zentrifugation in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (40 sec, 2000 x g, 4°C, Heraeus) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100-150  $\mu$ l hypotonem Puffer inklusive Inhibitoren mit einer 1000  $\mu$ l Pipette resuspendiert. Das Anschwellen der Zellen erfolgte während 15 min auf Eis. Nach Zugaben von 1 % Nonidet P-40 (Roche) wurden die Zellen 45 sec maximal gevortext (Scientific Industries), um die zytoplasmatische Membran aufzubrechen. Es folgte eine einminütige Zentrifugation (15000 x g, 4°C). Der Überstand mit den zytoplasmatischen Bestandteilen wurde abgenommen und bei -80°C gelagert. Das Pellet mit den Kernen wurde in 30-40  $\mu$ l hypertonem Puffer inklusive Inhibitoren resuspendiert und für 45 min bei 4°C auf dem Rüttler (1400 U/min, Ika Labortechnik) gerüttelt. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation (15000 x g, 4°C). Der Überstand mit den nukleären Proteinen wurde aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

### **4.6.2 Herstellung zytoplasmatischer und nukleärer Extrakte aus Mausorganen**

Die bei -80°C gelagerten Organe wurden in gefrorenem Zustand mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver zerrieben und in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Evaporation des Stickstoffs auf Trockeneis wurde 1,5 ml PBS mit Inhibitoren (s. Hypotonischer Puffer) zugefügt. Die aufgetaute Suspension wurde nach Überführung in ein 2 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert (5 min, 4°C, 1500 x g, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 Volumina hypotonem Puffer A mit einer 1000  $\mu$ l Pipette resuspendiert. Das Anschwellen der Zellen erfolgte während 5 min auf Eis. Nach Zugabe von 0,1% Nonidet NP-40 wurde die Suspension 3 sec kräftig gevortext und anschliessend noch mal 2 min auf Eis gestellt. Dem bei der 5minütigen Zentrifugation (4°C, 1500 x g) erhaltenen Überstand (zytoplasmatische Bestandteile) wurde 1/10 Volumen Glycerin zugefügt. Der Überstand wurde bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde in 1,5 Volumina hypertonem Puffer B inklusive Inhibitoren resuspendiert und für 30 min auf einem Rüttler (1400 U/min) bei 4 °C gerüttelt. Der Zugabe von 1% Nonidet folgten weitere 15 min auf dem Rüttler und eine

Zentrifugation (15 min, 4°C, 15000 x g) bei 4°C. Der Überstand (Kernextrakt) wurde 10 mal mit einer 25 x g Kanüle aufgezogen, wie beschrieben zentrifugiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### **4.6.3 Herstellung von Gesamtorganextrakten und Immunopräzipitation**

Die Immunopräzipitation dient zur Anreicherung von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper. Die Protein-Antikörperkomplexe können durch Bindung an Sepharose-Kügelchen isoliert werden.

Zur Herstellung von Organextrakten wurden Mausorgane in 500 µl Lysepuffer mit einem Pistill zerkleinert. Nach 15 min auf dem Drehrad bei 4°C wurden die Extrakte zentrifugiert (10 min, 4°C, 15000 x g, Heraeus). Der Überstand wurde zur Immunopräzipitation eingesetzt. 1mg Organlysat wurde mit 25 µl Protein A-Sepharose-Kügelchen (Pharmacia Biotech) in einem Volumen von 500 µl Lysepuffer für 1h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Sepharose-Kügelchen und unspezifisch gebundene Proteine wurden nach einer zweiminütigen Zentrifugation (4°C, 5000 x g) verworfen. Der Überstand wurde mit 25 µl frischen Protein A-Sepharose-Kügelchen sowie 1,5 µg Antikörper auf dem Drehrad bei 4 °C über Nacht inkubiert. Es folgten vier Waschungen mit Lysepuffer. Nach Abnahme des Waschpuffers wurden die Sepharosekügelchen-Antikörper-Proteinkomplexe mit 20 µl 2x Lämmli-puffer versetzt und 5 min auf 100 °C erhitzt. 20 µl des Überstandes wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. SDS-PAGE und Westernblot erfolgten wie beschrieben. Für die Detektion des Proteins im Westernblot wurde derselbe Primärantikörper wie zur Immunopräzipitation eingesetzt (sc-109, Santa Cruz).

#### **4.6.4 Proteinquantifizierung**

Bei der sauren Lösung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue verschiebt sich durch die Bindung von Proteinen das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Dies wird zur quantitativen Proteinbestimmung genutzt. Zur Bestimmung des Proteingehaltes von Zell- oder Organextrakten wurden 2-3 µl Extrakt mit 1ml Biorad-Färbereagenz (1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt) gemischt. Nach Messung der Absorption bei 595 nm erfolgte die Berechnung der Proteinkonzentration mit Hilfe einer Eichgeraden, die mit BSA (cell signaling) erstellt worden war. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen erstellt.

#### 4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot

Beim Westernblot werden denaturierte und in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch nach Größe getrennte Proteine auf eine Membran transferiert und mittels spezifischer Antikörper detektiert. 10-30 µg Protein wurden mit 4x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min auf 100 °C erhitzt. Die denaturierten Proteine wurden mittels 7 cm x 10 cm großen und 0,75 mm dicken, selbstgegossenen Minigelen (Mini-Protean II System, Biorad) aufgetrennt, die je nach Proteingröße einen Polyacrylamidanteil (Fluka) von 7,5-15 % hatten. Dem Gel zur Separierung war ein sogenanntes Sammelgel mit einem Polyacrylamidanteil von 4% vorgeschaltet, das einen Kamm mit 10-15 Taschen enthielt. Bei der Elektrophorese in SDS-Laufpuffer erfolgte zunächst die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel für 20 min bei 60 mA und 70 V und anschließend ihre Separation bei 60 mA und 150-200 V, bis das im Lämmli-Puffer enthaltene Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteine wurden vorgefärbte Molekulargewichtsstandards (Amersham) aufgetragen. Vor dem Transfer wurde das Gel für 5 min in SDS-Transferpuffer äquilibriert.

Die PVDF-Membranen (Roth) wurden zunächst 2 sec mit Methanol aktiviert und nach 2 min in Aqua bidest ebenfalls 5 min in SDS-Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer wurden auf die Kathodenfläche des Transferapparates (semi-dry blotter, Sigma) in Folge vier Lagen mit SDS-Transferpuffer befeuchtetes Whatman Papier, die Membran, das Gel sowie vier weitere Lagen befeuchtetes Papier aufgelegt und mit der Anodenfläche bedeckt. Der Transfer erfolgte bei 140 mA während 90 min. Zur Fixierung der Proteine wurde die Membran 2 sec in Methanol getaucht und im Anschluss für 15 min bei RT getrocknet. Nach Reaktivierung für 2 sec in Methanol und 2 min in Aqua bidest folgte die Blockierung von nicht mit Proteinen bedeckter Membranflächen mittels Milchprotein (Roth, 5 % in Tris-NaCl-Puffer) auf einem Rüttler (Biometra) für 1 h bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Verdünnung nach Angabe des Herstellers 1:1000 bis 1:2000) erfolgte in Tris-NaCl-Puffer mit 5 % Milchprotein oder 5 % Rinderserumalbumin (PAA) auf einem Rüttler über Nacht bei 4°C. Die Primärantikörperlösungen waren in der Regel nach Lagerung bei -20°C wieder verwendbar. Nach Waschen der Membranen (3 x 5 min in Tris-NaCl-Puffer) erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Dako) in Blockierungslösung auf einem Rüttler für 30-45 min bei RT. Dieser gegen den Primärantikörper gerichtete zweite Antikörper war mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt. Nach erneutem Waschen wurde die Membran für 5 min mit 1,5 ml Substratlösung (ECL-Plus System, Amersham) inkubiert. Die durch die

enzymatische Reaktion entstehende Fluoreszenz wurde mittels Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak) detektiert.

Die Primärantikörper waren von Santa Cruz (I $\kappa$ B $\alpha$  C-21, NF- $\kappa$ B-p65, NF- $\kappa$ B-p50, gp 130), cell signaling (p-ERK, ERK, p-STAT, CREB, p-CREB) oder ImmunoChemical (GAPDH).

## 4.8 Nachweis der DNA-Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren

### 4.8.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotidsonden

Bei dieser Reaktion füllt eine verkürzte Form der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) 5'-überhängende Enden doppelsträngiger DNA auf. 200 ng doppelsträngiges Oligonukleotid wurden in 20  $\mu$ l Reaktionsvolumen mit je 450  $\mu$ M CTP, GTP und TTP sowie 0,01  $\mu$ M [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP (30  $\mu$ Ci, NEN) und 4 U Klenow Enzym in Klenow Puffer (jeweils Amersham) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung des markierten Oligonukleotides erfolgte mit Hilfe des QIAquick Nucleotide Removal Kits (Qiagen). 1  $\mu$ l des markierten Oligonucleotides (insgesamt 60  $\mu$ l) wurden zur Messung der radioaktiven Zerfälle mittels eines Szintillationszählers (Beckman) eingesetzt. Die Sequenzen der Oligonucleotide zur Bindung der verschiedenen Transkriptionsfaktoren waren wie folgt:

H<sub>2</sub>K aus dem MHC I-Promotor für NF- $\kappa$ B:

5'-GATCCAGGGCTGGGGATTCCCCATCTCCACAGG-3'

3'-GTCCCGACCCCTAAGGGGTAGAGGTGTCCCTAG-5

Oct-1:

5'-GATCCTATAGAATCGCTTATGCAAATAAGTGAAGAGTTGG-3

3'-GATATCTTAGCGAATACGTTTATTCACTTCTCAACCCTAG-5

### 4.8.2 Nachweis der DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren mittels Gelelektrophorese (EMSA: electrophoresis mobility shift assay)

Bei dieser Methode bewirkt die Bindung des Transkriptionsfaktors an die radioaktiv markierte Oligonukleotidsonde eine Verlangsamung der Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zur ungebundenen Sonde, was sich im Autoradiogramm durch das Auftreten von Banden zeigt. Die Identifizierung der entsprechenden Protein-DNA-Komplexe geschieht mit Hilfe von gegen den Transkriptionsfaktor gerichteten Antikörpern, die entweder die Bildung des Komplexes verhindern oder die Migration verlangsamen (Supershift).

5-10  $\mu$ g nukleäres oder aus Gesamtzellextrakten gewonnenes Protein wurden in 20  $\mu$ l Reaktionsvolumen mit 10  $\mu$ l 2x shift Puffer, 0,5 mg/ml BSA, 5 mM DTT, 100  $\mu$ M poly(dI-dC) (Roche) und ca. 30000 cpm der radioaktiv markierten Oligonukleotidsonde für 30 min

bei RT inkubiert. Die Proben wurden auf ein 20 cm x 20 cm grosses und 1,5 mm dickes Polyacrylamid(Roth)gel (5% in Tris-Borsäure-EDTA (TBE)-Puffer) aufgetragen und in TBE-Puffer bei 50 mA und unter Wasserkühlung aufgetrennt. Die Lauffront wurde durch Zugabe der Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol in einer zusätzlichen Spur verfolgt. Nach Trocknung auf einem Filterpapier bei 80°C unter Vakuum (Hofer Gelrockner) während 1h wurde das Gel über Nacht oder länger mit einem Film und Verstärkerfolie bei -80°C exponiert (Autoradiogramm). Bei Supershiftexperimenten wurde der nukleäre Extrakt mit dem Antikörper 30 min bei 4°C präinkubiert.

## 4.9 Histologie

### 4.9.1 Masson's Trichrome, PAS und H/E-Färbung

Paraffinschnitte wurden zur Färbung mit Masson's Trichrome oder Mc Mannus'periodic acid schiff's glycogen (PAS) angefertigt. Dazu wurden die Organe nach kurzem Spülen mit PBS über Nacht bei 4°C in Bouin's Fixierlösung auf dem Drehrad inkubiert. Es folgte eine Alkoholreihe: 70% Ethanol (3 x 1 Tag), 80% Ethanol (30 min), 90 % Ethanol (30 min), 96 % Ethanol (1 h), 96 % Ethanol (30 min), 100 % Ethanol (1h) 100 % Ethanol (30 min), Toluol: Ethanol (1:1, 15 min), Toluol, (1h) , Toluol (30 min). Nach der Inkubation in Paraffin bei 60°C über Nacht wurde von den bei 4°C ausgehärteten Paraffinblöcken 4 µm dünne Schnitte angefertigt (Microm, Walldorf). Die Färbung mit Masson's Trichrome wurde laut Vorschrift des Herstellers durchgeführt (Accustain Trichrom-Färbung, Sigma). Bei der Trichrom-Färbung erscheinen die Kerne schwarz, das Cytoplasma, Muskel und Erythrocyten in rot und Kollagen in blau. Durch die PAS-Färbung (Roth) wird vor allem Glykogen gefärbt; es erscheint in rot, die Kerne dagegen in blau. Die Hematoxylin/ Eosin-Färbung (Merck, Darmstadt) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Hematoxylin färbt Zellkerne und Zytoplasmaanteile, die reich an rauhem Endoplasmatischem Retikulum sind, bläulich. Eosin färbt andere Zytoplasmaanteile rot.

Für die Cryoschnitte wurden die Herzen mit Cryomatrix (Thermo Shandon, Pittsburgh, USA) überschichtet und in mit Trockeneis gekühltem Aceton eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 4.9.2 $\beta$ -Galactosidase-Farbreaktion (X-Gal Test)

Die  $\beta$ -Galactosidase katalysiert die Hydrolyse von Zuckermolekülen. Wird X-Gal als Substrat eingesetzt, entsteht als Produkt ein blaues Präzipitat. Zum Nachweis der herzspezifischen Expression von Cre wurden Cre<sup>MHC</sup> Mäuse mit lacZ<sup>loxP</sup> Mäusen gekreuzt. Die entnommenen

Organe wurden längs geschnitten und dreimal kurz mit eiskaltem PBS gewaschen. Es folgte die Fixierung in X-Gal-Fixierungslösung für 30min bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (je 5 min, bei RT mit moderater Agitation) wurden die Organe über Nacht bei 37°C mit dem Substratmix inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (s.o.) wurden die Organe fotografiert (Binokular, Leica) und anschließend in 2.5% Glutaraldehyd (Serva)/PBS für 2h bei RT postfixiert. Die Aufbewahrung erfolgte in PBS bei 4°C.

#### **4.9.3 TUNEL-Test**

Der TUNEL-Test dient zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen, die charakteristisch für apoptotische Zellen sind. In einer enzymatischen Reaktion werden an die freien 3'-OH Enden der DNA modifizierte Nukleotide durch die Terminale Deoxynucleotidyltransferase angehängt. Diese können mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper spezifisch detektiert werden. Der TUNEL-Test mit Cryoschnitten von Mausherzen oder isolierten Kardiomyozyten wurde mit dem ApopTag Plus Fluorescein Kit (Intergen Company) laut Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein Cryoschnitt nach der Permeabilisierung für 30 min bei 37°C mit DNase I (10 µg/ml, Roche) in DNase-Puffer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde wie im Kit angegeben mit dem Äquilibrierungspuffer fortgefahren. Bei den adulten Kardiomyozyten betrug die Inkubationszeit für TNF-α (20 ng/ml, Biomol) und Doxorubicin (2 µM, Sigma) jeweils 20 h.

#### **4.9.4 Immunhistochemischer Nachweis von NF-κB-p65 oder Myomesin in adulten Mauskardiomyozyten**

Durch Immunhistochemie kann die Lokalisation von Proteinen in der Zelle mittels Farbstoffmarkierter Antikörper nachgewiesen werden. Die Mauskardiomyozyten wurden zu diesem Zweck auf Laminin-beschichtete, runde Deckgläschen (Ø 12 mm, Roth), die sich in 24-well Platten (TPP) befanden, ausgesät. Die Zellen wurden 4 Stunden nach dem Wechsel vom Plattier- zum Kulturmedium für 30 min mit TNF-α (20 ng/ml) stimuliert, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und für 25 min mit 4 % Paraformaldehyd (Sigma)/PBS bei 4°C fixiert. Nach zweimaligem Waschen (PBS, 4°C) erfolgte die 10 minütige Permeabilisierung mit 0,5% Triton/PBS bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen gewaschen (3 x 5 min, 0,1% BSA (PAA)/PBS, 4°C) und für ca. 3 Stunden mit 10% Ziegenserum/PBS bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Santa Cruz, α-p65, 1:100 in 1,5% Ziegenserum/PBS) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach den Waschschritten (3 x 5 min, 0,1% BSA/PBS, 4°C) wurden der Sekundärantikörper (Jackson, TRITC-markierter Ziege α-

Kaninchen-Antikörper, 1:150 in in 1,5% Ziegenserum/PBS) für 2,5 h bei RT zugegeben. Es folgten drei Waschschritte (s.o.), wobei dem letzten Waschpuffer zur Färbung der Kerne DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid, 0,5 µg/ml, Sigma) zugefügt wurde. Zuletzt wurden die Deckgläschen kurz mit Aqua bidest gewaschen und mit Mowiol (Calbiochem) auf Objektträgern fixiert. Das Mikroskop war von Zeiss und die Abbildungen wurden bei einer 40fachen Vergrößerung mit dem Programm AxioVision (Zeiss, Hallbergmoos) erstellt.

Der Antikörper gegen Myomesin war von H.M. Eppenberger (Zürich) und wurde 1:100 verdünnt.

## **4.10 Expressionsanalysen**

### **4.10.1 Gen-Chip Analyse**

Bei der Gen-Chip Analyse kann die Expression von einer großen Anzahl von Genen ausgehend von der mRNA gemessen werden. Der verwendete Rattenchip (230A, Affymetrix) besitzt an definierten Stellen vielfache Oligonukleotidkopien von jedem der ca. 29000 Gene. Die aus der mRNA synthetisierte, biotinylierte RNA hybridisiert mit dem jeweiligen, komplementären Oligonukleotid. Es folgt die Färbung mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat, wobei Streptavidin an Biotin bindet. Bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm emittiert Phycoerythrin Licht einer Wellenlänge von 570 nm, das durch einen Scanner detektiert wird. Die Intensität des emittiertem Lichtes ist proportional zur Menge an hybridisierter RNA. Für den Versuch wurde die Gesamt-RNA aus Kardiomyozyten von drei Rattenherzen gepoolt, da nur so die Mindestmenge von 5 µg erreicht werden konnte. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen) isoliert. Die cDNA-Synthese sowie die Aufreinigung und die Fragmentierung der biotinylierten RNA erfolgte nach Angaben von Affymetrix. Die Synthese von biotinylierter RNA wurde mit dem MEGAScript T7 Kit (Ambion) mit Biotin-CTP und UTP (PerkinElmer) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Hybridisierung und Detektion des Signals wurde von Dr. Westermann (MDC) realisiert.

### **4.10.2 Realtime Reverse Transkriptase (RT)-PCR**

Die realtime RT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung der Genexpression ausgehend von der mRNA. Die mRNA wird zunächst durch die reverse Transkriptase in eine cDNA umgeschrieben. Für die PCR verwendet man einen fluoreszierenden Farbstoff (SYBR-green), der nur doppelsträngige DNA-Moleküle färbt. Im Gegensatz zu semiquantitativen PCR, bei

der am Ende die Menge des amplifizierten Produktes gemessen wird, misst man bei der real-time RT-PCR die Fluoreszenz, die *während* der Reaktion freigesetzt wird und detektiert somit die Menge an PCR-Produkt bei jedem PCR-Zyklus (= real-time). Der Schwellenwertzyklus (threshold cycle, CT) ist der PCR-Zyklus, bei dem die erste signifikante Zunahme der Fluoreszenz stattfindet und wird für bei der Analyse für den Vergleich der verschiedenen Proben verwendet. Von der Gesamt-RNA wurde mit der reversen Transcriptase (Superscript II, Invitrogen) die cDNA nach dem Protokoll des Herstellers synthetisiert. Für die realtime RT-PCR wurden das QuantiTect SYBR Green-System (Qiagen) und der iCycler (Biorad) verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 20  $\mu$ l. Alle Proben wurden in Doppel- oder Dreifachausführung bestimmt. Die Primer für die Analyse der Mausgene waren wie zuvor beschrieben (191). Die Primer für die Analyse der Rattengene wurden mit Hilfe des Programms Beacon Designer (Premier Biosoft) wie folgt erstellt: I $\kappa$ B $\alpha$  (5'-CAGCATCTCCACTCCGTCCT-3', vorwärts und 5'-GCGTTGACATCAGCACCCAA-3', rückwärts),

gp130 (5'-CAAGCACCGTGCAGTACTCC-3', vorwärts und 5'-TGTCACACTATCCACCAGCT-3', rückwärts).

Glycerinaldehyd 3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', vorwärts und 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3', rückwärts, Clonotech) diente als Kontrollgen zur Normalisierung.

Da SYBR-green jegliche, doppelsträngige DNA unspezifisch färbt, wurde nach Abschluss der realtime-PCR eine Schmelzkurve gefahren sowie eine Elektrophorese durchgeführt, bei denen jedoch keine Primer-Dimere oder unspezifische Produkte detektierbar waren. Zunächst wurde für die Auswertung der CT-Wert zu Rate gezogen (Mausproben). Für die Rattengenanalyse wurde das jeweilige PCR-Produkt in einen Vektor kloniert und vermehrt. Nach Bestimmung der Kopienzahl wurden verschiedenen Verdünnungen angefertigt, mit deren Hilfe für jedes Gen bei jeder realtime RT-PCR-Reaktion eine Eichgerade erstellt wurde.

#### PCR-Programm:

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Zykluszahl (Schritte 2.-4.) | 40  |
| 1. Heißstart                | 95°C, 15 min                                  |
| 2. Denaturierung            | 95°C, 15 sec                                  |
| 3. Primerbindung            | 60°C, 30 sec                                  |
| 4. DNA-Synthese             | 72°C, 20 sec                                  |
| 5. Schmelzkurve             | 55°C-95°C, in 0,5°C-Schritten, jeweils 10 sec |

#### **4.10.3 Klonierung des PCR-Fragmentes**

Das PCR-Fragment wurde über ein Gel gereinigt und in einen pGEM-T-Vektor (Promega) ligiert. Die Transformation erfolgte mit *E. coli* DH5 $\alpha$ -CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen. Die DNA positiver Klone wurde mittels des Miniprep-Kit (Qiagen) isoliert und die Kopienzahl aus der spektrometrisch bestimmten Konzentration berechnet.

#### **4.11 Messung der Proteinsynthese von adulten Kardiomyozyten mittels <sup>3</sup>H Leucin-Einbau**

Bei dieser Methode bauen die Zellen Tritium (<sup>3</sup>H)-markiertes Leucin in ihre Proteine ein. Die zellulären Proteine werden daraufhin präzipitiert, gewaschen und schließlich aufgelöst. Die Radioaktivität wird mit dem DNA-Gehalt der Probe normalisiert.

Bei der 48stündigen Stimulation wurde <sup>3</sup>H-markiertes Leucin (2,5  $\mu$ Ci/ml, Amersham Pharmacia) während der letzten 12 Stunden zum Kulturmedium gegeben. Am Versuchsende wurden die Zellen zweimal mit eisgekühltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber (TPP) in 1ml PBS zusammengeschabt. Einer zweiminütigen Zentrifugation (2000 x g, Heraeus) folgte die Abnahme des Überstandes bis auf ein Restvolumen von 50  $\mu$ l, in dem die Zellen resuspendiert wurden. Die Präzipitation der Proteine erfolgte durch Zugabe von 500  $\mu$ l eisgekühlter Trichloressigsäure (TCA, 5%, Roth) und kräftigem Mischen für eine Stunde auf Eis. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation (15000 x g, Heraeus) wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat zweimal mit TCA gewaschen (Zentrifugation wie zuvor). Schliesslich wurde das Präzipitat einmal mit 500  $\mu$ l eisgekühltem Ethanol (99%) gewaschen, das Ethanol verworfen und das Präzipitat unter dem Abzug kurz getrocknet. Anschließend wurde das Präzipitat in 200  $\mu$ l 0,5 N NaOH gelöst und die Lösung mit 200  $\mu$ l 0,5 N HCl neutralisiert. 300  $\mu$ l Proteinlösung wurden mit 5ml Szintillationsflüssigkeit (Roth) gemischt und die Radioaktivität mit einem Szintillationszähler (Packard) bestimmt. Der DNA-Gehalt der Lösung wurde bei 260 nm in einem Spektrophotometer (Beckman) gemessen.

#### **4.12 Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorter, FACS)**

Bei der Durchflusszytometrie befinden sich Zellen in einem Flüssigkeitsstrom und passieren einzeln durch einen fokussierten Laser, der Farbmoleküle zur Emission von Licht veranlasst. Die Lichtemission jeder Zelle wird durch das Durchflußzytometer registriert. Der Farbstoff entsteht beispielsweise durch eine enzymatische Reaktion oder ist Bestandteil von Molekülenkomplexen, die an Zellstrukturen binden. Die Durchflußzytometrie wurde auf

zweierlei Weise zur Quantifizierung von apoptotischen Kardiomyozyten eingesetzt. Die Messung der Aktivität der Apoptose-aktivierten Protease Caspase-3 wurde mit dem D<sub>2</sub>R-Substrat (Alexis) durchgeführt. Die Spaltung des Substrates innerhalb der Zelle führt zu einem fluoreszierenden Produkt. Daneben wurde die Apoptose-aktivierte Translokation des Membranpeptides Phosphatidylserin durch Bindung von Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Annexin-V nachgewiesen (Apoptest-FITC kit, Nexins Research). Beide Tests wurden laut Angaben der Hersteller realisiert. Das Durchflußzytometer war von Becton Dickinson.

#### 4.13 Statistik

Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen wurden mittels Student's t Test oder one-way ANOVA und Bonferroni's post-Test untersucht. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$ SEM (standard error of the mean) dargestellt. P-Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant bewertet.

#### 4.14 Lösungen/Puffer

|  | <u>Endkonzentration</u> |
|--|-------------------------|
| <u>Krebs-Henseleit-Puffer (KHP):</u>           |                         |
| NaCl   | 127 mM                  |
| KCl  | 4,6 mM                  |
| MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O          | 1,1 mM                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                | 1,2 mM                  |
| D-Glucose                                      | 8,3 mM                  |
| NaPyruvat                                      | 2 mM                    |
| Kreatin  | 10 mM                   |
| Taurin   | 20 mM                   |
| NaHCO <sub>3</sub>                             | 24,8 mM                 |
| <br><u>Puffer A, Neonatale Kardiomyozyten:</u> |                         |
| NaCl   | 116 mM                  |
| Hepes  | 20 mM                   |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>               | 1 mM                    |
| Glucose  | 5 mM                    |
| KCl  | 5,4 mM                  |

MgSO<sub>4</sub> 0,4 mM  
 pH 7,35 mit 10 N NaOH

Enzymlösung Neonatale Kardiomyozyten:

Puffer A 1 x  
 Kollagenase (Typ II) 0,14 mg/ml  
 Pankreatin 0,12 mg/ml

Hypotonischer Puffer:

Hepes pH 7,9 10 mM  
 KCl 10 mM  
 Glycerin 5%  
 MgCl<sub>2</sub> 1 mM  
 EDTA pH 8,0 0,5 mM  
 EGTA pH 8,0 0,1 mM  
 Inhibitoren  
 NaVanadat 1mM  
 NaFluorid 5 mM  
 DTT 0,5 mM  
 Proteaseinhibitoren Minicomplete (Roche)

Hypertonischer Puffer:

Hepes pH 7,9 20 mM  
 NaCl 420 mM  
 Glycerin 20 %  
 MgCl<sub>2</sub> 1 mM  
 KCl 10 mM  
 EDTA pH 8,0 0,5 mM  
 EGTA pH 8,0 0,1 mM  
 Inhibitoren s. Hypotonischer Puffer

Hypotonischer Puffer A (Mausorgane):

Hepes pH 7,5 10 mM  
 KCl 10 mM  
 EDTA 0,1 mM

|  |        |
|--|--------|
| EGTA                                     | 0,1 mM |
| Inhibitoren                              |        |
| DTT                                      | 1mM    |
| $\beta$ -Glycerophosphat                 | 1mM    |
| Na-Pyrophosphat                          | 1mM    |
| NaVanadat                                | 1mM    |
| NaFluorid                                | 5 mM   |
| Proteaseinhibitoren Minicomplete (Roche) |        |

Hypertonischer Puffer B (Mausorgane):

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| Hepes pH 7,5                         | 20 mM  |
| NaCl                                 | 400 mM |
| Glycerin                             | 20 %   |
| EDTA                                 | 1mM    |
| EGTA                                 | 1mM    |
| Inhibitoren s. Hypertonischer Puffer |        |

Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (EMSA):

|           |         |
|-----------|---------|
| Tris Base | 44,5 mM |
| Borsäure  | 44,5 mM |
| EDTA      | 1 mM    |

Shift Puffer (EMSA):

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| Hepes pH 7,9                | 40 mM     |
| KCl                         | 120 mM    |
| Ficoll (Amersham Pharmacia) | 8 % (w/v) |

6x Lauffrontmarker (EMSA):

|                |        |
|----------------|--------|
| Bromphenolblau | 0,25 % |
| Xylencyanol    | 0,25 % |
| Glyzerin       | 30 %   |

SDS-Laufpuffer (SDS-PAGE):

|           |        |
|-----------|--------|
| Tris Base | 25 mM  |
| Glycin    | 190 mM |
| SDS       | 3,5 mM |
| pH 8,6    |        |

SDS-Transferpuffer (Westernblot):

|           |         |
|-----------|---------|
| Tris Base | 62,5 mM |
| Glycin    | 100 mM  |
| SDS       | 5,2 mM  |
| Methanol  | 20 %    |
| pH 9,2    |         |

Tris-NaCl Puffer (Westernblot):

|             |        |
|-------------|--------|
| Tris pH 7,6 | 20 mM  |
| NaCl        | 165 mM |
| Tween-20    | 0,1%   |

4x Lämmli-Puffer (SDS-PAGE):

|                 |         |
|-----------------|---------|
| Tris HCl pH 6,8 | 0,1 M   |
| Bromphenolblau  | 0,025 % |
| SDS             | 8 %     |
| Glyzerin        | 10 %    |
| Mercaptoethanol | 10 %    |

Lysepuffer (Mausorganextrakte):

|  |        |
|--|--------|
| Tris HCl pH 7,5                          | 20 mM  |
| NaCl                                     | 150 mM |
| NP-40                                    | 0,5 %  |
| Glyzerin                                 | 10 %   |
| EDTA                                     | 1 mM   |
| NaFluorid                                | 5 mM   |
| DTT                                      | 1 mM   |
| Proteaseinhibitoren Minicomplete (Roche) |        |

X-Gal Fixierlösung:

|                       |      |
|-----------------------|------|
| Formaldehyd (Fluka)   | 1%   |
| Glutaraldehyd (Serva) | 0.2% |
| PBS                   | 1x   |

X-Gal Substratmix:

|                           |                |
|---------------------------|----------------|
| $K_3Fe(CN)_6$             | 4 mM           |
| $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ | 4 mM           |
| $MgCl_2$                  | 2 mM           |
| X-Gal                     | 400 $\mu$ g/ml |

X-Gal (Sigma) Stammlösung: 40 mg/ml in DMSO (Serva)

Bouin's Fixierlösung:

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Pikrinsäure (gesättigt, Sigma) | 150 ml |
| Formaldehyd (37 %, Fluka)      | 50 ml  |
| Essigsäure (100 %)             | 10 ml  |

DNase I-Puffer:

|                  |        |
|------------------|--------|
| Tris-HCl, pH 7,4 | 10 mM  |
| NaCl             | 10 mM  |
| $MgCl_2$         | 5 mM   |
| $CaCl_2$         | 0,5 mM |
| KCl              | 25 mM  |

**4.15 Zellkulturmedien**Kulturmedium für adulte Kardiomyozyten:

M199 mit Earl's Salzen und  $NaHCO_3$

|             |          |
|-------------|----------|
| Insulin     | 15 mg/ml |
| Kreatin     | 5 mM     |
| L-Carnithin | 2 mM     |
| Taurin      | 5 mM     |

|              |           |
|--------------|-----------|
| Penicillin   | 100 U/ml  |
| Streptomycin | 100 µg/ml |

Kulturmedium für Neonatale Kardiomyocyten:

DMEM/F12

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| Natriumpyruvat            | 3 mM      |
| L-Glutamin                | 20 µM     |
| Penicillin                | 100 U/ml  |
| Streptomycin              | 100 µg/ml |
| Ascorbinsäure             | 100 µM    |
| ITS * (5 ml Voratslösung) | 1:100     |
| BSA                       | 5 %       |

\* Insulin-transferrin-sodium selenite media supplement

#### 4.16 Gele

Sammelgel (SDS-PAGE):

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Acrylamid/Bisacrylamid (37,5/1) | 4 %     |
| Tris Base pH 6,8                | 125 mM  |
| SDS                             | 0,1 %   |
| APS (Biorad)                    | 0,075 % |
| Temed                           | 0,14 %  |

Trenngel (SDS-PAGE):

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) | 7,5-15 % |
| Tris Base pH 8,8                | 375 mM   |
| SDS                             | 0,1 %    |
| APS                             | 0,075 %  |
| Temed                           | 0,075 %  |

EMSA-Gel:

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) | 5 %     |
| Tris-Borsäure-EDTA-Puffer       | 1x      |
| APS                             | 0,075 % |
| Temed                           | 0,075 % |

Die zur Herstellung der Lösungen benötigten Salze stammten von Roth, Merck und Sigma.