

2. Material und Methoden

2.1 Mausmodell

Es wurden sechs bis acht Wochen alte männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 verwendet (Harlan Laboratories, Horst, Niederlande). Von den vierundzwanzig verwendeten Tieren hatten zwölf eine Deletion für das uPA-Gen (uPA^{-/-}-Mäuse) (Carmeliet et al., 1994). Die andere Hälfte zeigte den genetischen Wildtyp (WT-Mäuse). Am Tag 0 wurden jeweils 6 uPA^{-/-}-Mäuse und 6 WT-Mäuse mit CVB3 infiziert. Die jeweils 6 nicht infizierten uPA^{-/-}-Mäuse und WT-Mäuse dienten als Kontrollgruppe. Die Mäuse wurden am 7. Tag *p.i.* getötet. Die entnommenen Herzen wurden in flüssigem Stickstoff konserviert.

Alle Mäuse wogen 15-18 Gramm und wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten. Sie waren einem 12-stündigen hell-dunkel-Rhythmus ausgesetzt und hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Die Raumtemperatur lag konstant bei 22±2 °C. Die Haltung und die Virusinfektion der Tiere erfolgte durch die Arbeitsgruppe von PhD. Dr. med. S. Heymans (Experimentelle und Molekulare Kardiologie, CARIM, Universität Maastricht, Niederlande; Zentrum für transgene Technologien und Gen-Therapie, Universität Leuven, Belgien) an der Universität Leuven, Belgien. Die Haltung und die Verwendung der Mäuse erfolgte nach den Richtlinien der Institution für Tierschutz der Universität Leuven, Belgien.

2.1.1 Infektion der Mäuse mit CVB3

Die Infektion von 6 uPA^{-/-}-Mäusen und 6 WT-Mäusen erfolgte mit CVB3 (*nancy strain*). Das Virus wurde mit der Konzentration von 1×10⁷ einer 50%-Zellkultur-Infektionsdosis (CCID₅₀) in 0,2 ml NaCl (0,9%) gelöst und am Tag 0 intraperitoneal injiziert.

Mäuse des Stammes C57BL/6, die nach alleiniger CVB3-Infektion eine lediglich minimale kardiale Entzündung zeigen, entwickeln nach Immunmodulation mit Lipopolysaccharid (LPS) eine Myokarditis (Lane et al., 1991). Daher erfolgte am Tag 0 (2 h nach Virusinfektion) und am Tag 4 nach CVB3-Infektion eine zusätzliche intraperitoneale Verabreichung von 25 µg LPS gelöst in 0,2 ml NaCl (0,9%) (*Salmonella minnesota*, Sigma RE 595, St. Louis, MO, USA). Die Behandlung der Kontrollgruppen (6 WT-Mäuse und 6 uPA^{-/-}-Mäuse) erfolgte durch die Injektion von 25 µg LPS gelöst in 0,2 ml NaCl (0,9%) am Tag 0 und Tag 4.

2.1.2 Gruppeneinteilung

Zur weiteren Bearbeitung der entnommenen Herzen wurden jeweils drei Teile der linken Ventrikel in flüssigem Stickstoff eingebettet der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. M. Pauschinger, Medizinische Klinik II, Abteilung für Kardiologie und Pulmologie, Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin, zugesandt. Ein Stückchen war in *Tissue Tec*[®] (SLEE) eingebettet. Aus diesem wurden Gefrierschnitte für die histochemischen und immunhistochemischen Färbungen angefertigt. Die anderen zwei Teile wurden zur RNA- und Proteinextraktion verwendet.

Es wurden 4 Versuchsgruppen gebildet. Die Gruppengröße betrug $n = 6$.

Tab. 2.1 Versuchsgruppeneinteilung

Versuchsgruppen	Genotyp und Behandlung
K (n = 6)	Wildtyp, scheininfizierte Kontrollgruppe
K uPA ^{-/-} (n = 6)	uPA ^{-/-} , scheininfizierte Kontrollgruppe
I (n = 6)	Wildtyp, CVB3-infiziert
I uPA ^{-/-} (n = 6)	uPA ^{-/-} , CVB3-infiziert

2.2 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden mit sterilen, RNase-freien Materialien und Substanzen durchgeführt. Alle selbst hergestellten Substanzen wurden mit DEPC behandelt. Einmalhandschuhe und Arbeitsflächen wurden vor Gebrauch mit RNase-Zap behandelt. Glasbehälter wurden bei 250 °C für 5h ausgebacken. Die Homogenisierstäbchen wurden autoklaviert, Pinzetten wurden ausgeglüht. Alle Inkubationsschritte wurden in einem PCR-*Mastercycler gradient* (Eppendorf) durchgeführt.

2.2.1 RNA-Präparation

Um Unterschiede in der Transkriptionshäufigkeit eines Gens zwischen den Gruppen zu untersuchen, wurde die mRNA-Menge des jeweiligen Gens betrachtet. Die mRNA wurde zunächst aus den myokardialen Proben extrahiert.

2.2.1.1 RNA-Extraktion mit der TRIZOL[®]-Methode

TRIZOL[®]-Reagenz wurde durch die Firma GibcoBRL bezogen und die Extraktion anhand der beiliegenden Protokolle durchgeführt.

Jede Probe wurde einzeln aus dem Flüssigstickstofftank genommen. 400 µl Trizol und das entnommene Gewebestück wurden in einem Reaktionsgefäß gewogen und anschließend mit einem Homogenisierstäbchen vollständig homogenisiert. Danach wurde erneut 400 µl Trizol zugegeben und geschüttelt. Nach 5 min wurde 160 µl Chloroform zugegeben und der Ansatz sofort 15 sec lang kräftig geschüttelt. Es folgten 3 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur. In einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge wurden die Reaktionsgefäße bei 12.000 Upm 15 min lang zentrifugiert, wodurch sich drei Phasen trennten. In der oberen wässrigen Phase löste sich die RNA. Diese wurde abpipettiert, mit 400 µg Isopropanol versetzt und nach leichtem schwenken 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert, was zur Fällung der RNA führte. Anschließend wurde bei 4 °C mit 12.000 Upm 20 min lang zentrifugiert. Die RNA setzte sich als Pellet am Reaktionsgefäßboden ab. Der Überstand konnte verworfen werden, das Pellet wurde in 800 µl Ethanol-Lösung, bestehend aus 75% Ethanol und 25% DEPC-H₂O, erneut bei 7.500 Upm und 4 °C 20 min lang gewaschen. Der Überstand wurde verworfen.

Nach 20-minütigem Lufttrocknen des Pellets wurde es mit einer folgendermaßen errechneten Menge an DEPC-H₂O versetzt:

$$\text{Lösemenge in } \mu\text{l H}_2\text{O} = \text{Gewebemasse der Probe in mg} \times 1,6$$

Nach 10-minütiger Inkubation bei 55 °C löste sich das Pellet vollständig.

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde photometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte bei 260 nm und 280 nm. Das A_{260/280}-Verhältnis ist ein Maß für die Reinheit der

isolierten Nukleinsäuren. Eine $A_{260/280}$ -Ratio zwischen 1,6 und 1,8 spricht für eine qualitativ hochwertige RNA-Lösung mit lediglich minimaler Verunreinigung durch DNA (Sambrook & Russell, 2001).

2.2.1.2 DNA-Verdau

Um chromosomale DNA-Reste vollständig aus den RNA-Proben zu entfernen wurde ein Verdau mit DNase I[®] (Roche) durchgeführt.

Das Reaktionsgemisch bestand aus 5 µl 10 × DNase-Puffer (25 mM Tris-HCL, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7,2), 10 µg RNA in 40 µl DEPC-H₂O und 25 U DNase I (RNase-frei). Der Reaktionsansatz wurde 2 h lang bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurde anschließend 5 min lang bei 90 °C inkubiert und zuletzt 5 min lang auf Eis gekühlt.

Um die vollständige DNA-Eliminierung zu überprüfen, folgte eine Kontroll-PCR mit Primern spezifisch für chromosomales β-Actin. Bei verbleibender DNA-Kontamination wurde der Verdau mit 25 U DNase wiederholt. In den DNA-freien Proben wurde erneut photometrisch die Konzentration bestimmt.

2.2.2 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Der Nachweis von Nukleotidsequenzen erfolgte mit der semiquantitativen Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., 1988). Das Prinzip der PCR ähnelt dem Reaktionsablauf bei der natürlichen Replikation. Eine hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend von Startermolekülen einen neuen DNA-Doppelstrang an einer einzelsträngigen DNA-Matrize. Als Startermoleküle werden synthetische DNA-Oligonukleotide, so genannte Primer verwendet, die an die Einzelstrangmatrize hybridisieren und vom 3'-Ende aus die Synthese initiieren. Durch einen zweiten, gegenläufig orientierten Primer kann gezielt eine DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern repliziert werden. Durch die zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte wird die Matrize exponentiell vervielfältigt.

Eine Abwandlung der PCR ist die Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) (Carding, Lu & Bottomly, 1992). Ausgehend von mRNA wird diese zunächst unter Verwendung des Enzyms reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) überführt (reverse Transkription).

Durch die Amlifikation von cDNA in weiteren Reaktionsschritten kann indirekt die ursprüngliche mRNA-Menge semiquantitativ erfasst werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zwei-Schritt-Ansatz gewählt. Im 1. Schritt erfolgte die Reverse Transkription der extrahierten mRNA unter Verwendung von Zufalls-Primern (*random primer*). Diese Primer binden dabei unspezifisch an mRNA-Sequenzen und überführen die gesamte mRNA in cDNA.

Die Amplifikation spezifischer Genprodukte erfolgte im 2. Schritt mittels semiquantitativer Polymerasekettenreaktion mit sequenzspezifischen Primern.

2.2.2.1 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription von RNA in cDNA erfolgte mit dem Reverse Transkription System der Firma Promega.

1,5 µg RNA wurden in 10 µl DEPC-H₂O gelöst und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Die dadurch denaturierte RNA wurde mit 10 µl eines Reaktionsgemisches aus 2 µl 10 × *reverse transcription buffer*, 2 µl 10 mM dNTPs, 4 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl Oligo (dt)₁₅-Primer, 0,5 µl RNAsin® und 0,5 µl AMV reverse Transkriptase bei 42 °C für 30 min transkribiert. Die Proben wurden anschließend 5 min lang bei 90 °C inkubiert und danach auf Eis gekühlt, um die reverse Transkriptase zu denaturieren.

Die gewonnene cDNA konnte direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt werden.

Die Transkription enteroviraler RNA erfolgte in leicht modifizierter Weise nach dem gleichen Schema. 500 ng RNA wurden in 10 µl DEPC-H₂O gelöst und mit 10 µl eines Reaktionsgemisches aus 2 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 10 × *reverse transcription buffer*, 1 µl 10mM dNTPs, 0,25 µl RNAsin®, 0,25 µl MMLV reverse Transkriptase, 0,5 µl *random primer* und 5 µl DEPC-H₂O transkribiert.

2.2.2.2 Semiquantitative Polymerasekettenreaktion mit sequenzspezifischen Primern

Der semiquantitative Nachweis von Nukleotidsequenzen erfolgte im 2. Schritt der RT-PCR mit sequenzspezifischen Primern. Die optimale Primeranlagerung erforderte eine spezifische Anlagerungstemperatur (*annealing-temperature*), die vorab ermittelt wurde (siehe Kap. 2.2.4). Jede PCR wurde mit 1,0 µl cDNA durchgeführt, die in 32,9 µl H₂O gelöst wurde. Es wurden 12,1 µl eines Reaktionsansatzes, bestehend aus 2 µl 50 mM dNTPs, 1,8 µl 25 mM MgCl₂, 4,5 µl 10 × PCR-Puffer, 1,8 µl 3'-Primer, 1,8 µl 5'-Primer (jeweils 50 ng/µl) und 0,5 µl Biotherm-Taq-Polymerase (2,5 U), zugegeben. Die Amplifikation erfolgte in einem PCR-*Mastercycler gradient* (Eppendorf) nach folgendem Schema:

1. Schritt: 5 min bei 94 °C Denaturierung
2. Schritt: 30 sec bei 94 °C Denaturierung
3. Schritt: 30 sec *annealing* bei primerspezifischer Temperatur
4. Schritt: 35 sec bei 72 °C DNA-Synthese
5. Schritt: 10 min bei 72 °C DNA-Synthese
6. Schritt: bei 4 °C Reaktionsstopp

Die Schritte 2, 3 und 4 liefen zyklisch mit der gewünschten Zahl an Durchgängen ab. Für jedes Transkript wurden jeweils zwei Reaktionen im Doppelansatz durchgeführt. Um die Reinheit des verwendeten Amplifikationsgemischs und des Wassers zu überprüfen, wurde jeweils ein Reaktionsgefäß ohne Zugabe von cDNA mitgeführt. Die cDNA-Proben wurden bezüglich der Transkriptions-*level* folgender mRNA-Transkripte untersucht:

- Zytokine: IL-1β, IL-6, IL-10, IL-15, TNF-α, INF-γ, TGF-β
- Proteasen: uPA, tPA, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MT-1-MMP, EMMPRIN
- Proteaseinhibitoren: PAI-1, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4
- ECM-Komponenten: Kollagen I, Kollagen III, Laminin, Fibronectin

Tab. 2.2 Amplifikate und Primersequenzen in der semiquantitativen RT-PCR

Amplifikat	Länge bp	Primersequenzen 5' → 3' S: sense, A: antisense	annealing- Temperatur	Zyklen- zahl
uPA	346	S: CAGTCTGAACCAAACGGAGCATCAGTAAAC A: CCATCTACCAGAAGAACAAGGGAGGAAGT	60 °C	39
tPA	314	S: TTTCTTTGTCATTGCTTCAT A: CATCGTCTCCATTCTTCTCT	55 °C	36
PAI-1	471	S: AGGAGGACGCCACTGTGCCGCTCTCGTTTA A: ACGCCTGGTGCTGGTGAATGCCCTCTACTT	60 °C	40
Kollagen I	607	S: CTGGAAGAGCGGAGAGTA A: TAAACTCCCTCCACCCCA	62 °C	33
Kollagen III	548	S: CCCAGAACATTACATACCACT A: CTTCAAAATGTCTCAATGGTG	59 °C	30
Laminin	230	S: TACCAGAGGCACCCGATTAC A: GCATGATACTGCCAGGTTT	55 °C	31
Fibronectin	281	S: TCCAGCCCCACCTACAAGT A: CCAGACCAAACCATAAGAAC	60 °C	32
IL-1 β	363	S: CCACTTTGCTCTTGACTTCT A: GGGATGATGATGATAACCTG	60 °C	39
IL-6	269	A: TCCACGATTTCCAGAGAAC A: AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	58 °C	36
IL-10	253	S: ACTCTTCACCTGCTCCACTGC A: ACATACTGCTAACCGACTCCT	58 °C	37
IL-15	212	S: GGCCTGTATTCCCCTTCTGT A: ATCCCGTCTTCGTCCAACCTCT	58 °C	37
INF- γ	456	S: AGCAACAGCAAGGCGAAAAAG A: GTTGATCTGGGGTGGGGGA	56 °C	37
TGF- β	346	S: CGGAAGCGCATCGAAGCCATC A: GCAAGCGCAGCTCTGCAC	59 °C	36
TNF- α	425	S: GTGGGGAGCAGAGGTTCAAGT A: CAAAGGGAGAGTGGTCAGGTT	60 °C	35
MMP-9	481	S: CGACAGCACCTCCACTATG A: CCCACCTTATCCAGACTCCT	62 °C	35
MMP-2	214	S: CGGGTCCATTTTCTTCTCA A: GGAGAAGGCTGTGTTCTTCG	51 °C	32
MMP-3	356	S: GGCTTCAGTACCTTCCCAGG A: GCAGCAACCAGGAATAGGTT	55 °C	32
MMP-8	350	S: GCAGGACTCCTTCTTCTTCTTCAAGT A: AAGGTAGTAAACGGCTTGTCTCTTGTG	59 °C	35
MMP-13	556	S: GAGTGCCTGATGTGGGTGAATA A: TCTGGTGTGTTTGGGATGCTTAG	59 °C	35
MT-1-MMP	362	S: TGTCCCCCTTTTACCAGTG A: GCCATCCTTCTTTTCATAG	55 °C	38
EMMPRIN	241	S: AAGGTCGGAAAGAAATCAGAG A: CGTAGGTGCCAGGGTCAACAT	55 °C	28

TIMP-1	307	S: ACGAATCAACGAGACCACCTTAT A: GCACACCCCACAGCCAGCACTAT	60 °C	30
TIMP-2	438	S: GTGAGCGAGAAGGAGGTGGATTCC A: CTTGATGCAGGCGAAGAAGCTTGGC	59 °C	33
TIMP-3	152	S: CAAGCTTCCAGCCAAACTTC A: AGCTGGCAAAGGCTTAAACA	51 °C	33
TIMP-4	399	S: CTCTTCCCTCTGTGGTGTGA A: GTGGTTCCTGGTCCCTACTA	60 °C	31
18S-RNA	429	S: CCGGTACAGTAAAAGTGGCA A: CGGGAGTGGGTAATTTGCG	58 °C	19

Die Primersequenzen wurden mit dem Programm Vector NTI (InforMax, Oxford, UK) abgeleitet, bearbeitet und analysiert. Die vollständigen Gensequenzen wurden aus der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) bezogen.

2.2.2.3 Nachweis enteroviralen Genoms

Zur Verifizierung der CVB3-Infektion erfolgte bei jeder infizierten Maus der qualitative Nachweis enteroviralen Genoms. Es wurde das oben beschriebene PCR-Programm verwendet. 50 µl Reaktionsansatz bestand aus 5 µl cDNA, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 0,4 µM Primer, 0,2 mM dNTPs, 0,01% Gelatine und 5 U Ampli Taq DNA-Polymerase. Zur Steigerung der Sensitivität wurde das Reaktionsprodukt aus der primären PCR in einer *nested*-PCR erneut eingesetzt (Pauschinger et al., 1999). 2 µl des PCR-Produktes wurden mit 98 µl TE-Puffer (1 mM EDTA pH 8,0, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, mit HCl pH 7,6 eingestellt) versetzt. Hiervon wurden 2 µl in die sekundäre PCR eingesetzt. Als Positivkontrolle diente klonierte DNA von CVB3.

Der Nachweis viralen Genoms erfolgte unter Verwendung CVB3-spezifischer Primer, die mit dem Programm Vector NTI (InforMax, Oxford, UK) abgeleitet wurden und in Tab 2.3 aufgelistet sind.

Aus dem *The Institute for Genomic Research* (TIGR, www.tigr.org) wurde die vollständige Sequenz von CVB3 bezogen.

Tab. 2.3 Primer für den Nachweis von CVB3-Genom

Amplifikat	Länge bp	Primersequenzen 5' → 3' S: sense, A: antisense	annealing- Temperatur	Zyklen- zahl
CVB3 (1) Primär-PCR	314	S: CGGTAGCTTTGTGCGCCTGT A: CAGGCCGCCAACGCAGCC	60 °C	30
CVB3 (2) Sekundär-PCR	195	S: CCCACTGAGTATCAATA A: GGCCGCCAACGCAGCCACCG	55 °C	35

2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die horizontale Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Bestimmung und Sichtbarmachung der amplifizierten Nukleotidfragmente (Sambrook & Russell, 2001). Die PCR-Produkte werden in einer physikalischen Agarosegel-Matrix durch ihre Wanderung in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe, Ladung und Konformation aufgetrennt. Die Nukleinsäuren wandern als Polyanionen zur Anode. Entsprechend ihrer Eigenschaften, wie Größe, Ladung und Konformation wandern sie unterschiedlich schnell. Anhand eines Fragmentlängenstandards lassen sich die amplifizierten Fragmente entsprechend ihrer definierten Länge bestimmen.

Die Visualisierung der DNA erfolgte mit Hilfe der DNA-interkalierenden Substanzen Ethidiumbromid, die dem Gel beigemischt wurde. Unter UV-Licht stellte sich das Amplifikat als fluoreszierende DNA-Bande dar.

Das Gel bestand aus 2% Agarose in einem 0,5 × TBE-Puffer (1 mM EDTA, 45 mM Trisborat, pH 8,0) und 0,4 µg/ml 1%igem Ethidiumbromid. Der Laufpuffer bestand ebenfalls aus 0,5 × TBE.

Die Geltaschen wurden mit 10 µl der jeweiligen DNA-Probe in 1 × Gelbeladungspuffer (40% Sucrose, 0,25% Bromphenolblau) beladen.

Die Elektrophorese lief für 20 min bei 120 V. Es wurden jeweils ein Fragmentlängenstandard (Marker VIII, Roche) und die Negativkontrolle mitgeführt.

Die anschließende Visualisierung der DNA-Banden erfolgte in einem UV-Transilluminator (*Bio doc analyse system*, Biometra) bei einer Wellenlänge von 254 nm (Blende: 4,0, Beleuchtungszeit: 1000 ms, Vergrößerung: 20fach).

2.2.4 Optimierung der PCR-Bedingungen

Die optimale Primeranlagerungstemperatur wurde in einem PCR-*Mastercycler gradient* (Eppendorf) ermittelt. Es wurden für jedes Primerpaar Probeläufe mit unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen bei 40 Zyklen durchgeführt. Für die semiquantitative PCR wurde die Anlagerungstemperatur gewählt, die eine maximale Bandenstärke ergab.

Die folgende Abbildung zeigt eine Optimierungs-PCR für MMP-13. Die Anlagerungstemperatur wurde anschließend bei 59 °C gewählt.

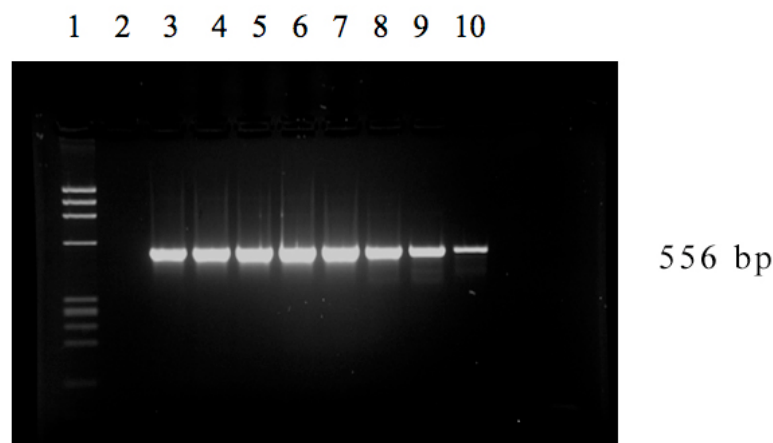


Abb. 2.1 Optimierung von MMP-13, Spur 1: Längenstandard, 2: Negativkontrolle, 3: 54,0 °C, 4: 55,9 °C, 5: 57,3 °C, 6: 58,9 °C, 7: 60,5 °C, 8: 62,2 °C, 9: 63,7 °C, 10: 65,0 °C

In der ersten Phase der Amplifikation ist die Anzahl der DNA-Kopien begrenzt. Die Bedingungen für die DNA-Synthese sind suboptimal, da die Wahrscheinlichkeit, dass sich DNA-Einzelstrang, Polymerase und Primer treffen, gering ist. In der Spätphase steigt die Anzahl der PCR-Produkte derart an, dass häufig Produktfragmente miteinander hybridisieren und sich dadurch gegenseitig hemmen. Letztlich werden die Substrate langsam verbraucht und die Polymerase durch die Hitze zersetzt. Eine exponentielle Amplifikation findet nur in

der Phase dazwischen statt. Die Auswertung einer PCR-Bande (siehe Kap. 2.2.5) erfolgte elektronisch über die Berechnung der Pixelwerte (OD-Werte, Optische Dichte-Werte). In einem Koordinatensystem zeigt der OD-Wert folgende Abhängigkeit von der Anzahl der Zyklen:

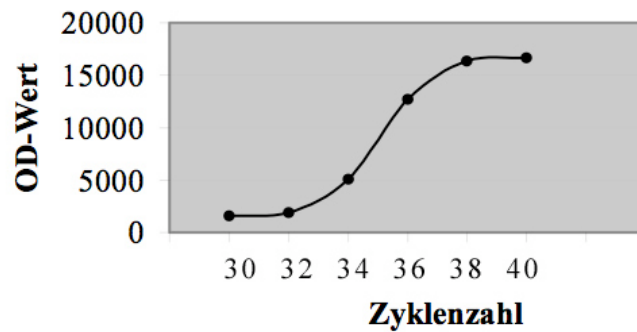


Abb. 2.2 Replikationskurve am Beispiel von MMP-13

Bei der semiquantitativen PCR lassen sich keine Aussagen über die absolute Anzahl amplifizierter Kopien treffen. Umso wichtiger ist es, dass der Vergleich der DNA-Banden im linearen Bereich der Amplifikationskurve stattfindet, um Unterschiede in der Genexpression möglichst genau zu erfassen. Es wurden deshalb probatorisch für jedes Transkript mehrere PCRs mit steigenden Zyklenzahlen durchgeführt und anschließend eine Amplifikationskurve erstellt. Die Zyklenzahl wurde für die semiquantitative PCR im linearen Bereich der Kurve gewählt.

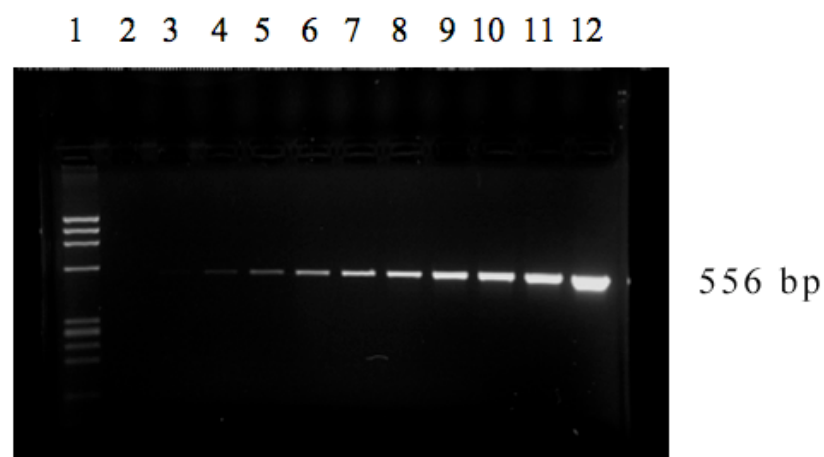


Abb. 2.3 Amplifikation von MMP-13 bei ansteigenden Zyklenzahlen:

Spur 1: DNA-Längenstandard, Spur 2: Negativkontrolle, Spur 3-12: ansteigende Zyklenzahlen mit 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 Zyklen

2.2.5 Auswertung der PCR-Banden

Die Auswertung der Bandenstärke erfolgte mit dem Programm *Scion Image*[®] 2000 (Scion Corporation). Die Signalstärke einer Bande wurde in einen OD-Wert umgerechnet. Die Ergebnisse der im Doppelansatz durchgeführten PCRs wurden gemittelt.

Der Abgleich der Werte erfolgte mit einer PCR für das 18S-RNA-Transkript der jeweiligen Probe. 18S-RNA ist Bestandteil der kleinen 40S-Untereinheit in den Ribosomen von Eukaryonten. Es wird in Zellen als so genanntes *housekeeping gene* weitgehend unabhängig von äußeren Einflüssen konstitutiv exprimiert. Die Expression bleibt auch bei Virusinfektion und Verabreichung von bakteriellen Zelloberflächenbestandteilen wie LPS unverändert.

Die folgende Abbildung zeigt die Auswertung einer IL-15-PCR mit dem *Scion Image*[®]-Programm. Dargestellt ist die Gelbande für IL-15 mit den als Säulen abgebildeten OD-Werten. Der Abgleich erfolgte an den OD-Werten für 18S-RNA (untere Gelbande).

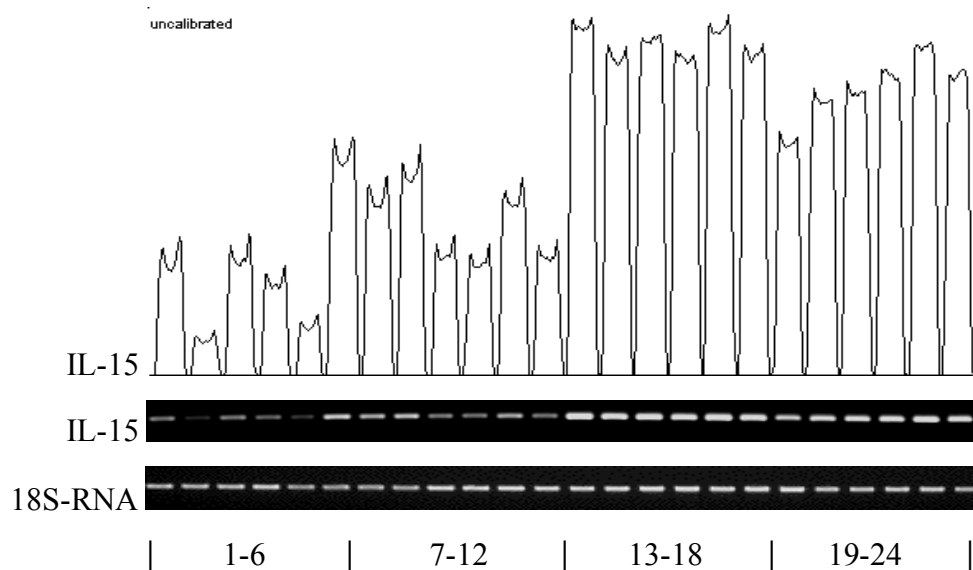


Abb. 2.4 Auswertung einer PCR am Beispiel von IL-15 mit *Scion Image*[®], Abgleich an 18S-RNA, Spur 1-6: K, Spur 7-12: K uPA^{-/-}, Spur 13-18: I, Spur 19-24: I uPA^{-/-}

2.2.6 Proteinchemische Methoden

2.2.6.1 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Die Proteinextraktion erfolgte mit RIPA-Puffer, bestehend aus 250 ml 1 × PBS, 5 ml Nonidet P-40, 2,5 g Natriumdeoxycholsäure und 2,5 ml 20% SDS. Um endogene Proteasen zu hemmen, mussten Proteasehemmer vor Gebrauch frisch dazugegeben werden. Für 10 ml RIPA-Puffer wurden 10 µl 0,2 M PMSF in EtOH, 10 µl Aprotinin (1µg/µl), 2 µl Leupeptin (5µg/µl) und 2 µl Pepstatin (5 µg/µl) in MetOH zugegeben.

Das Gewicht jeder Probe wurde ermittelt. Die zugegebene RIPA-Puffermenge in µl ergab sich aus der errechneten Gewebsmasse in mg × 10,

Das Gewebe wurde mit dem Stabhomogenisierer auf Eis homogenisiert. Die Proben wurden anschließend 15 min lang im Thermomixer bei 600 Upm und 4 °C geschüttelt und zuletzt 15 min lang bei 4 °C und 16.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in kleinen Mengen aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem *BCA-Protein-assay-kit* (Pierce) in der Mikrotiterplatte (96 Reaktionsgefäße). Die Bestimmung wurde anhand der dazugehörigen Protokolle durchgeführt.

Zunächst wurde die BCA-Arbeitslösung aus den Reagenzien A und B im Verhältnis 50 + 1 zusammengesetzt. Für jedes Reaktionsgefäß benötigte man 200 µl der Arbeitslösung. Die BCA-Lösung bildete mit den Proteinen einen Farbkomplex, dessen Intensität zu der Proteinkonzentration proportional war. Anschließend wurde mit der mitgelieferten BSA-Ampulle eine Protein-Standardreihe hergestellt (Konzentrationen von 1000-, 750-, 500-, 250-, 125-, 50-, 25-, 5 µg/ml). Bei der anschließenden Messung wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer die Probenkonzentrationen bestimmt werden konnten.

Die zu bestimmenden Proteinproben wurden 1:50 und 1:100 verdünnt und dann jeweils 10 µl eingesetzt. 200 µl BCA-Lösung und jeweils 10 µl der Proteinprobe bzw. der Standardprobe wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und gut geschüttelt. Es folgten 30 min Inkubation bei 60 °C im Wasserbad, um den Farbkomplex auszubilden. Nach dem Abkühlen wurde die Proteinkonzentration binnen 30 min mit einem ELISA-Meßgerät (*Sunrise absorbance reader*, Tecan) bei 560 nm gemessen.

Die Standardreihe wurde als Doppelbestimmung-, die Proben als Dreifachbestimmung angesetzt und gemessen.

2.2.6.2 Zymographie

Die Zymographie ist eine proteinchemische Methode zur Aktivitätsbestimmung proteolytischer Enzyme. Das Prinzip beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel, das mit einem Substrat des gesuchten Enzyms polymerisiert ist. So können beispielsweise Gelatinasen wie MMP-2 oder MMP-9 ein Gelatinegel verdauen. Die verdaute Stelle lässt sich im Gel durch eine Gegenfärbung als Bande sichtbar machen. Die Stärke der Bande im Gel ist ein direkter Indikator für das Aktivitätsniveau der Protease.

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen im elektrischen Feld hängt von deren Gewicht, Ladung und Konformation ab. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert Proteine, indem es nicht kovalente Bindungen aufhebt. SDS lagert an Proteine an und verleiht ihnen dadurch eine Anzahl negativer Ladungen, die proportional zur Molekülgröße sind. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist nach Denaturierung nur noch vom Molekulargewicht des Proteins und von der Porengröße der Gelmatrix abhängig. Die Zymographie basiert auf der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Renaturierung der Proteine erfolgt nach deren Auftrennung durch das nicht-ionische Detergens Triton® X-100.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Gelatinezymographie durchgeführt, bei der ein Gelatinegel als Substrat verwendet wird. Sie diente zum Nachweis der Enzymaktivitäten der Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9). Bei der murinen CVB3-Myokarditis ist dies eine gängige Methode, um im Myokard die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 zu bestimmen (Cheung et al., 2006; Li et al., 2006).

Es wurde ein 10%iges Gelatinegel (BioRad) mit 12 Proteintaschen verwendet. Jeweils 10 µg Protein wurden *ad* 10 µl *aqua dest.* gegeben und mit 10 µl 2 × *sample*-Puffer 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Elektrophoresekammer (BioRad) wurde mit 1 × Laufpuffer (pH 8,3) befüllt und auf Eis gestellt. Je 20 µl der vorbereiteten Proben wurden in die Geltasche pipettiert und die Elektrophorese bei 125 V für 120 min durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für 3 × 20 min in 1 × Renaturierungspuffer auf dem Schüttler inkubiert. Der Substratverdau erfolgte in 1 × Entwicklungspuffer für 24 Stunden bei 37 °C im Inkubator.

Die Färbung erfolgte mit 0,5% *Coomassie*[®] *brilliant blue* für 3 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Zuletzt wurde mit Entfärbelösung entfärbt. Die Stellen wo die Gelatine verdaut wurde entfärbten sich vollständig.

Tab. 2.4 Gebrauchslösungen für die Gelatinezymographie

Pufferlösung	Zusammensetzung
<i>sample</i> -Puffer	2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2,0 ml Glycerol, 4 ml 10% SDS (w/v), 0,5 ml 0,1% Bromphenolblau <i>ad</i> 10 ml <i>aqua dest.</i>
Laufpuffer	2,9 g Tris-Base, 14,4 g Glycin, 1,0 g SDS <i>ad</i> 1000 ml <i>aqua dest.</i>
Renaturierungspuffer	2,5 ml Triton [®] X 100 in 100 ml <i>aqua dest.</i>
Entwicklungspuffer	1,21 g Tris-Base, 63,0 g Tris-HCl, 11,7 g NaCl, 2,0 ml Brij 35, 0,74 g CaCl ₂ , 50 µl MgCl <i>ad</i> 1000 ml <i>aqua dest.</i>
<i>Coomassie</i> [®] <i>brilliant blue</i> , 0,5%	2,5 g <i>Coomassie G 250</i> in 500 ml <i>aqua dest.</i>
Entfärbelösung	70 ml Eisessig, 350 ml Methanol, 600 ml <i>aqua dest.</i>

2.2.6.3 Auswertung der Gelatinase-Banden

Die Gele wurden auf dem Transilluminator (*Bio doc analyse system*, Biometra) mit Unterlicht fotografiert (Blende: 4,0, Belichtungszeit: 1000 ms) und die Daten elektronisch gespeichert.

Die Auswertung der Gelinasen-Bandenstärke erfolgte mit dem Programm *Scion Image*[®] 2000 (Scion Corporation) durch Umrechnung der Pixelwerte in OD-Werte.

Pro Gel wurden jeweils zwei Proben aus den vier Versuchsgruppen aufgetragen. Um Helligkeitsschwankungen zwischen den Gelen zu relativieren, wurde auf jedem Gel eine gleich bleibende Kontrollprobe (WT, infiziert) mitgeführt und alle Werte daran abgeglichen. Als Längenstandard wurde 7B-Marker (Roche) aufgetragen.

Jede Zymographie wurde zweimal durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

Die in der Zymographie einzusetzende Proteinmenge wurde in Vorversuchen bestimmt. Es wurden probatorisch Proteinmengen von 5-, 10-, 15-, 20-, 25 µg aufgetragen.

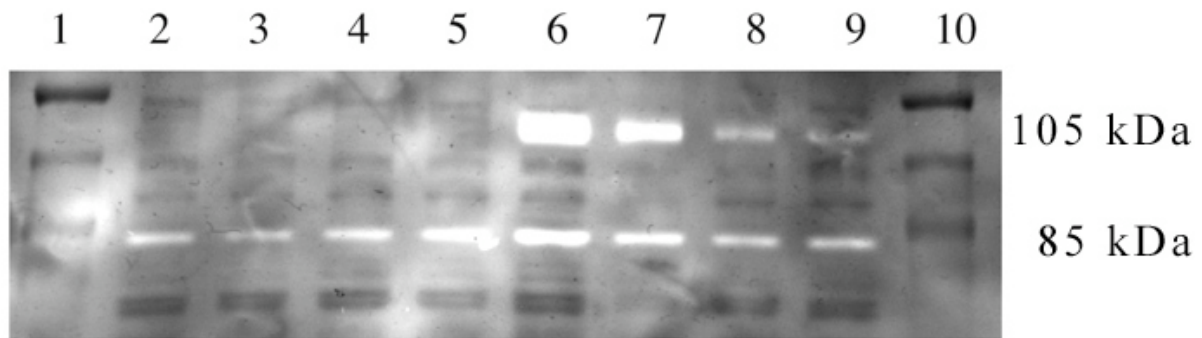


Abb. 2.5 Exemplarische Gelatinezymographie (10% Gelatinegel) mit jeweils 10 µg Protein
85 kDa-Bande: MMP-2, 105 kDa-Bande: MMP-9
Spur 1: Marker 7B, Spur 2, 3: WT nicht infiziert (K), Spur 4, 5: uPA^{-/-} nicht infiziert (K uPA^{-/-}), Spur 6, 7: WT infiziert (I), Spur 8, 9: uPA^{-/-} infiziert (I uPA^{-/-}), Spur 10: Marker 7B

2.3 Immunhistochemische und histochemische Methoden an Gefrierschnitten

Die Konservierung von Gewebeproben erfolgt in der Immunhistochemie entweder durch die Einbettung in eine konservierende Substanz, meist Paraffin, oder durch Fixierung als Gefrierschnitt (Kryostatschnitt).

Kryostatschnitte bieten in der Immunhistochemie eine bessere Erhaltung der Antigenität als Paraffinschnitte. Als Nachteil muss man dafür bei Kryostatschnitten eine schlechtere Erhaltung von morphologischen Details in Kauf nehmen.

Von einem Teil der linken Ventrikel der Versuchstiere wurden Kryostatschnitte angefertigt. Es wurden an einem Kryostaten 5 µm dicke Gefrierschnitte geschnitten, auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufgetragen und anschließend in Aceton fixiert. Sie wurden bei -20 °C gelagert.

Zur Charakterisierung der kardialen Inflammation wurde angestrebt die Infiltration des Myokards durch verschiedene Immunzellen zu erfassen. Es wurden Immunfärbungen für CD-4⁺- und CD-8⁺-Zellen durchgeführt, um T-Lymphozyten und CTLs zu erfassen.

Die Immunfärbung für myeloide Zellen und NK-Zellen erfolgte mit anti-CD-11b⁺-Antikörper und für neutrophile Granulozyten mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper.

Tab. 2.5 Verwendete Antikörper

1. Antikörper	Spezies	Verdünnung	2. Antikörper	Spezies	Verdünnung
CD-4 (Pharmingen)	Ratte <i>anti</i> Maus	1:50	Dako EO 468, biotinyliert	Kaninchen <i>anti</i> Ratte	1:100
CD-8a (Pharmingen)	Ratte <i>anti</i> Maus	1:50	Dako EO 468, biotinyliert	Kaninchen <i>anti</i> Ratte	1:100
CD-11b (Pharmingen)	Ratte <i>anti</i> Maus	1:50	Dako EO 468, biotinyliert	Kaninchen <i>anti</i> Ratte	1:100
Monoklonal Neutrophile (NIMP-R 14) (Abcam)	Ratte <i>anti</i> Maus	1:50	Dako EO 468, biotinyliert	Kaninchen <i>anti</i> Ratte	1:100

Die Färbung erfolgte nach den Protokollen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Pauschinger, Medizinische Klinik II, Abteilung für Kardiologie und Pulmologie, Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin. Die Beschreibung der Zusammensetzung und Verdünnung der verwendeten Lösungen erfolgt in einer separaten Tabelle. Alle Inkubationsschritte (außer Inkubation des ABC-Komplexes, bei 37 °C) wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.1 Immunhistochemische Färbungen nach der ABC-Methode

Die Färbungen wurden nach der ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Methode durchgeführt. Die Methode basiert auf der hohen Affinität von Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin. Das Glycoprotein Avidin bindet bei physiologischem pH an negativ geladene lectin-ähnliche Gewebsbestandteile, vor allem Biotin (Boenisch et al., 2001). Die ABC-Methode ist eine Zwei-Schritt Methode mit indirektem Nachweis des Antigens. Zuerst bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das gesuchte Antigen. Anschließend bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper, der jetzt als Antigen fungiert. Zuletzt bindet Peroxidase-markiertes Avidin an den Sekundärantikörper und führt zur Sichtbarmachung des ABC-Komplexes. Die hohe Sensitivität wird dadurch bedingt, dass mit

hoher Wahrscheinlichkeit mehrere Zweitantikörper an unterschiedliche Epitope des Erstantikörpers binden, wodurch das Signal am Ort des Antigens verstärkt wird. Da sich außerdem ein biotinylierter Zweitantikörper über ein Avidinmolekül mit mehreren Biotin-Peroxidase-Komplexen verbinden kann, wird die Färbintensität und damit die Sensitivität weiter erhöht (Boenisch et al., 2001).

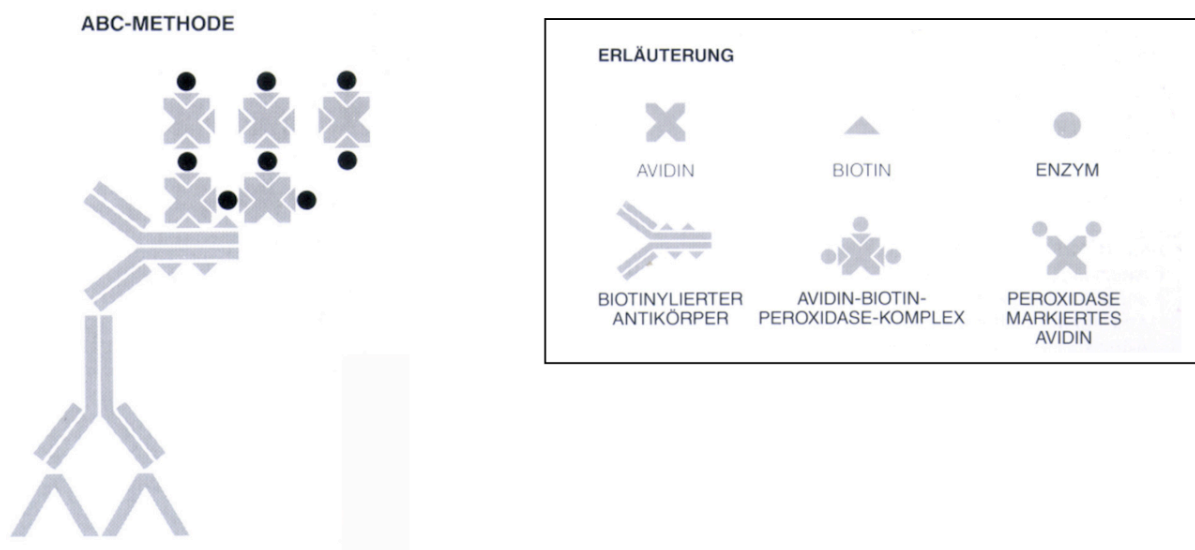


Abb. 2.6 Reaktionsschema bei der ABC-Methode (nach Boenisch et al., 2001)

Die Schnitte wurden aufgetaut und 2×5 min in $1 \times$ TBS equilibriert. Danach wurde kurz in destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde die endogene Peroxidase blockiert, indem die Schnitte mit 0,9% H_2O_2 in destilliertem Wasser gewaschen wurden (auf dem Schüttler). Dies ist notwendig um eine unspezifische Umsetzung des Chromogens Carbazol zu verhindern. Nach 15 min wurde das H_2O_2 mit $1 \times$ TBS für 2×5 min ausgewaschen.

Die Absättigung elektrostatischer Ladungen der Proteine und die Blockierung des endogenen Avidin erfolgte durch eine Lösung aus 10% Normalserum, 1% BSA und 4 Tropfen/ml Avidin in $1 \times$ TBS. 100 μ l der Lösung wurden auf jedes Färbefeld pipettiert und anschließend für 30 min inkubiert. Danach wurde die Lösung vorsichtig abgekippt, die Schnitte jedoch nicht gewaschen.

Es folgte die 60-minütige Inkubation mit dem Erstantikörper, gelöst in 1% BSA und $1 \times$ TBS und 4 Tropfen/ml Biotin, zur Blockierung von endogenem Biotin. Pro Färbefeld wurden

100 µl der Antikörperlösung aufgetragen. Anschließend wurde für 2 × 5 min mit 1 × TBS gewaschen.

Der folgende Schritt war die 60-minütige Inkubation mit dem biotinylierten Zweitantikörper, gelöst in 1% BSA und 1 × TBS. In dieser Zeit band der Zweitantikörper mit hoher Affinität an den Erstantikörper. Die Schnitte wurden danach erneut für 2 × 5 min in 1 × TBS gewaschen.

Zur Bildung des ABC-Komplexes wurden die Schnitte für 30 min mit dem ABC-Reagenz inkubiert. Das ABC-Reagenz musste 30 min vor Gebrauch hergestellt und bei 37 °C inkubiert werden. Anschließend wurde für 2 × 5 min mit 1 × TBS gewaschen.

Die Sichtbarmachung der Peroxidase des Zweitantikörpers erfolgte durch 12-minütiges Waschen der Schnitte in Carbazol (auf dem Schüttler). Erneut folgte 2 × 5-minütiges Waschen mit 1 × TBS.

Als letzter Färbeschritt folgte die Kernfärbung in filtriertem Hämalaun für 15 sek und das Bläuen der Kerne durch Spülen unter Leitungswasser. Die Spezifität der Färbung wurde überprüft, indem zwei Schnitte nur mit dem Zweitantikörper behandelt wurden.

Die Schnitte wurden unter Verwendung von vorgewärmter Glyceringelatine eingedeckt.

Tab. 2.6 Immunhistochemische Gebrauchslösungen

Gebrauchslösung	Zusammensetzung
10 × TBS pH 7,6 – 7,8	60,6 g Trizma-HCl, 13,9 g Trizma-Base, 87,7 g NaCl <i>ad</i> 1000 ml <i>aqua dest.</i>
0,9% H ₂ O ₂	6 ml 30% H ₂ O ₂ <i>ad</i> 200 ml <i>aqua dest.</i>
1. Antikörper (1:50), 1 × TBS, 1% BSA mit Biotinblock	100 µl 10% BSA, 880 µl 1 × TBS, 20 µl 1. Antikörper, 4 Tropfen Biotin aus dem <i>Blocking kit</i>
2. Antikörper (1:100), 1 × TBS, 1% BSA	100 µl 10% BSA, 890 µl 1 × TBS, 10 µl 2. Antikörper
ABC-Reagenz	1 ml 1 × TBS, 4 Tropfen Reagenz A aus ABC-Kit, 4 Tropfen Reagenz B aus dem <i>ABC-Kit</i> , 30 min bei 37 °C
10% Normalserum, 1 × TBS, 1% BSA mit Avidinblock (für 2. Antikörper Dako EO 468)	100 µl 100% Normalserum (Kaninchen), 100 µl 10% BSA, 800 µl 1 × TBS, 4 Tropfen Avidin aus dem <i>Blocking kit</i>

Carbazol-Färbelösung	50 mg 3-Amino-9-Ethylkarbazol (AEC) und 10 ml N, N-Dimethylformamid mischen. 15 ml 0,2 M Essigsäure und 35 ml 0,2 M Natriumacetat <i>ad</i> 200 ml <i>aqua dest.</i> Beide Lösungen mischen. Zuletzt 100 µl H ₂ O ₂ dazugeben.
----------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.3.2 Digitale Auswertung der immunhistochemischen Präparate

Die Quantifizierung der Entzündungszellinfiltrate erfolgte nach der von Noutsias beschriebenen Methode an einem Leica DMRD Mikroskop bei 200facher Vergrößerung (Noutsias et al., 2002). Die Bildübertragung erfolgte mit einer Sony 3 CCD Farb-Videokamera (Sony), die über einen Leica-Adapter (C-Fassung, 0,35 Vergrößerung) mit dem Mikroskop verbunden war. Die Digitalisierung der Bilder erfolgte durch eine Matrox Comet Farb-Graphikkarte an einem Intel Pentium MMX-PC mit dem digitalen Bildverarbeitungsprogramm LUCIA G[®] (Version 3.52ab, Nikon).

Das Mikroskop wurde nach Köhler zentriert. Die Beleuchtungsstärke wurde bei allen Schnitten konstant gehalten (Wert 11,0 auf der Skala des Mikroskops). Das digitalisierte Bild wurde in standardisierter Weise automatisch kontrastiert und scharf gestellt. Der maximale Bildausschnitt betrug bei 200facher Vergrößerung 0,29 mm².

Die Bildverarbeitung erfolgte schrittweise durch das Erfassen des Gesamtbildes, Erkennen von gewebefreiem Hintergrund und Erkennen des konvertierten Chromogens 3-amino-9-Ethylkarbazol als Marker der Entzündungszellinfiltrate. Gewebefreier Hintergrund wurde von der gemessenen Gesamtfläche subtrahiert. Der extrazelluläre Raum wurde als Gewebeteil erkannt. Kleinste unspezifische Färbeartefakte wurden unterhalb eines Schwellenwertes (10 µm²) nicht verrechnet. Zusätzlich konnten Artefakte mit einer Schablone markiert und von der Messung ausgeschlossen werden. Entzündungszellkonglomerate wurden durch ein Makro erkannt und separiert. Ein Algorithmus erkannte die Zytoplasmamembran zusammenhaftender Entzündungszellen.

Ein Microsoft Excel 97 Datenverarbeitungsmakro errechnete die gemessene Myokardgewebefläche in mm² und die Anzahl an Entzündungszellen pro mm² Gewebefläche.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte, indem das Gewebe vollständig systematisch durchfahren und abgebildet wurde. Je nach Größe des Schnittes wurden von jeder Probe 15 bis 25 Gesichtsfelder verrechnet.

Jede Probe wurde zweimal vollständig mikroskopiert und ausgewertet. Aus den Werten jeder Probe wurde der Mittelwert ermittelt.

2.3.3 Histochemische Färbung von Kollagen

Die Beurteilung des Gesamtkollagengehaltes im Myokardgewebe erfolgte durch Färbung von Kryostatschnitten mit *Sirius red* (Pauschinger et al., 1999). Die Schnitte wurden, wie bereits beschrieben, angefertigt und aufbewahrt (siehe Kap. 2.3). Die Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien ist separat aufgelistet. Alle Färbeschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

2.3.3.1 Färbung mit *Sirius red*

Die Schnitte wurden aufgetaut und für 2×5 min in destilliertes Wasser gelegt. Danach erfolgte die Färbung mit *Picrosirius red* in 1,2%-wässriger Picrinsäurelösung für 1 h auf dem Schüttler. Danach wurden die Schnitte zur Entfernung überschüssiger Farbe für 2 min in 0,01 N HCl (pH 2) gewaschen. Es folgte die Entwässerung der Schnitte durch 2-minütiges Waschen in 90%igem Ethanol und danach für 2×2 min in reinem Ethanol. Der Alkohol wurde durch 2×5 -minütiges Waschen in gebrauchsfertigem Xylol entfernt.

Die Schnitte wurden mit Xylol-löslichem Corbit-Balsam eingedeckt.

Tab. 2.7 Zusammensetzung der Gebrauchslösungen für die Färbung mit *Sirius red*

Gebrauchslösung	Zusammensetzung
90% Ethanol	450 ml 100% Ethanol, 50 ml <i>aqua dest.</i>
<i>Sirius red</i> -Färbelösung	12 g gesättigte Picrinsäure in 1000 ml <i>aqua dest.</i> auflösen, pH auf 2,0 einstellen. 1,0 g <i>Picrosirius red</i> zugeben, 1,5 h unter rühren auflösen. Sättigung der Lösung mit einer Spatelspitze Picrinsäure.
0,01 N HCl	5 ml 1 N HCl, 495 ml <i>aqua dest.</i>

2.3.3.2 Digitale Auswertung der *Sirius red*-Färbung

Der Gesamtkollagengehalt der Präparate wurde an einem Polarisationsmikroskop Eclipse E 600 Pol (Nikon) unter zirkulär polarisiertem Licht bestimmt (Whittaker et al., 1994). Die Auswertung erfolgte mit dem LUCIA G[®]-Softwareprogramm (siehe Kap. 2.3.2). Bei 200facher Vergrößerung wurden jeweils 10 Gesichtsfelder pro Präparat ausgewertet. Unter polarisiertem Licht leuchteten die gefärbten Kollagenfasern grell auf. Der Kontrast der Fasern zum restlichen Gewebe ließ sich durch drehen der Beleuchtungsebene maximieren.

Der Kollagengehalt wurde bestimmt, indem die gemessene Fläche der gefärbten Fasern in ein Verhältnis zur Gesamtfläche des Präparates gesetzt wurde (Kollagen mm²/Gesamtfläche mm²). Jeder Schnitt wurde zweimal ausgewertet und anschließend der Mittelwert bestimmt.

2.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistischen Berechnungen und die Darstellung der Boxplots erfolgte mit SPSS[®] 10.0 für Windows[®] (SPSS Inc.).

Für die statistische Auswertung wurden nichtparametrische Tests verwendet.

Als Voraussetzung um Einzelvergleiche durchführen zu können, wurde mit dem H-Test nach Kruskal-Wallis geprüft, ob die vier Gruppen aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammten.

Bei $p < 0,05$ wurde die Nullhypothese, Gleichheit zwischen den beobachteten Gruppen, verworfen. Einzelvergleiche wurden mit dem U-Test nach Mann-Whitney durchgeführt.

p-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant erachtet (p^*).

2.5 Materialien

Arbeitsgerät	Bezeichnung/Typ	Hersteller
Autoklaviergerät		Hartmann, Magdeburg, D
Betriebssystem	Windows 2000 Professional	Microsoft, Unterschleißheim, D
Brutschrank 37 °C		Heraeus-Christ, Osterode, D
Computer	Pentium III	Asus, Ratingen, D
Digitaler Graphikdrucker	<i>Digital graphic printer UP-D 890</i>	Biometra, Göttingen, D
Eismaschine	AF 10	Scotsman, Giessen, D
ELISA-Meßgerät	<i>Sunrise absorbance reader</i>	TECAN, Crailsheim, D
Elektronische Waage	DMS 580	Kern, Balingen-Frommern, D
Elektrophoresekammer	<i>Mini protean 3 cell</i>	BioRad, München, D
Feuchtraumkammer		CBF, Berlin, D
Gelelektrophorese- Auswertungssoftware	<i>Scion image 2000</i>	Scion Corporation, Maryland, USA
Gellaufkammer		Biometra, Göttingen, D
Gelschlitten		CBF, Berlin, D
Homogenisiergerät	<i>Pellet pestle monitor</i>	Sigma, Taufkirchen, D
Kryostat	CM 3000 Jung	Leica, Bensheim, D
Kühlschrank -20 °C	<i>Economic super</i>	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, D
Kühlschrank 4 °C	<i>Cooler</i>	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, D
Kühlschrank -80 °C	<i>Ultralow freezer</i>	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Magnetrührplatte	Ikamag RCT	IKA-Labortechnik, Littau, D
Mikrowelle	<i>Microwave 800</i>	Severin, Sundern, D
Mikroskop	Leica DMRD	Leica, Bensheim, D
Mikroskopadapter	C-Adapter, 0,35 Vergr.	Leica, Bensheim, D

Mikroskop-Videokamera	Sony 3 CCD	Sony, Tokio, J
Mikroskop- Auswertungssoftware	LUCIA G 3.52ab	Nikon, Düsseldorf, D
Netzgerät	<i>Standard power pack P 25</i>	Biometra, Göttingen, D
PCR-Maschine	<i>Mastercycler gradient</i>	Eppendorf, Hamburg, D
pH-Meter	Digital pH-Meter 646	Knick, Berlin, D
Photometer	Spektrophotometer DU 640i	Beckmann, München, D
Pipetten	<i>Reference</i>	Eppendorf, Hamburg, D
Polarisationsmikroskop	Eclipse E 600 Pol	Nikon, Düsseldorf, D
Präzisionswaage	TE 214 S	Sartorius, Göttingen, D
Schüttler	3015 (ISH)	GFL, Burgwedel, D
Statistik- Auswertungssoftware	SPSS 10.0 für Windows	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
Thermomixer	<i>Comfort</i>	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge	<i>Centrifuge 5415 R</i>	Eppendorf, Hamburg, D
UV-Transilluminator	<i>Bio doc analyse system</i>	Biometra, Göttingen, D
Vortexgerät	VF 2	IKA-Labortechnik, Littau, D

Verbrauchsartikel	Bezeichnung/Besonderheit	Hersteller
0,2 ml Reaktionsgefäß		Biozym, Oldendorf, D
0,5 ml Reaktionsgefäß	RNase-frei	Eppendorf, Hamburg, D
1,5 ml Reaktionsgefäß	RNase-frei	Eppendorf, Hamburg, D
15 ml Reaktionsgefäß	Falcon Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, D
Deckgläschen	21 × 26 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Einmalhandschuhe		Ansell, Brüssel, B
Homogenisierstäbchen	<i>Pellet pestles</i>	Sigma, Taufkirchen, D
Objektträger	76 × 26 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Pipettenspitzen 10-, 100-, 1000 µl	unsteril	Eppendorf, Hamburg, D

Pipettenspitzen 10-, 20-, 100-, 200-, 100 µl	mit Filtertip, RNase-frei	Biozym, Oldendorf, D
Polyacrylamidgel	10% Gelatinegel	BioRad, München, D

Reagenzien	Erläuterung/Besonderheit	Hersteller
Aceton	<i>pro analysi</i>	Merck, Darmstadt, D
Agarose	SeaKem LE Agarose	Biowhittaker, Valensbaek Strand, DK
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma, Taufkirchen, D
1. Antikörper, <i>anti</i> CD-4	Ratte <i>anti</i> Maus	Pharmingen, Heidelberg, D
1. Antikörper, <i>anti</i> CD-8a	Ratte <i>anti</i> Maus	Pharmingen, Heidelberg, D
1. Antikörper, <i>anti</i> CD-11b	Ratte <i>anti</i> Maus	Pharmingen, Heidelberg, D
1. Antikörper, monoklonal <i>anti</i> neutr. Granulozyten	Ratte <i>anti</i> Maus, NIMP R-14	Abcam, Camebridge, UK
2. Antikörper EO 468	Kaninchen <i>anti</i> Ratte, biotinyliert	Dako, Hamburg, D
Aprotinin	Proteaseinhibitor	Bio Pur, Bubendorf, CH
<i>Aqua bidest.</i>	Spüllösung	Delta Pharma, Pfullingen, D
<i>BCA-Protein assay kit</i>	Proteinextraktion	Pierce, Rockford, IL, USA
Biotherm-Taqpolymerase	DNA-Polymerase	Rapidozym, Berlin, D
Bromphenolblau		Sigma, Taufkirchen, D
Borsäure		Merck, Darmstadt, D
Brij 35		Merck, Darmstadt, D
CaCl ₂	Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Chloroform		Merck, Darmstadt, D
<i>Coomassie®-brilliant blue G 250</i>	Färbelösung	Merck, Darmstadt, D
Corbit-Balsam	Xylol-löslich	Merck, Darmstadt, D
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Sigma, Taufkirchen, D
DEPC-H ₂ O	RNase-freies Wasser	Ambion, Austin, TX, USA
Dimethylformamid		Merck, Darmstadt, D

DNase I	RNase-frei	Roche, Mannheim, D
dNTPs	ATP, GTP, CTP, TTP	ABGene, Hamburg, D
DMSO	Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt, D
EDTA-Dihydrat	Ethylendiamintetraaceticssäure	Merck, Darmstadt, D
Eisessig	<i>pro analysi</i>	Merck, Darmstadt, D
Essigsäure	<i>pro analysi</i>	Merck, Darmstadt, D
Essigsäureanhydrid	<i>pro analysi</i>	Merck, Darmstadt, D
Ethanol absolut	<i>pro analysi</i>	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid		Merck, Darmstadt, D
Glycerol		Merck, Darmstadt, D
Glycin		Merck, Darmstadt, D
Hämalaun		Sigma, Taufkirchen, D
HCl	Salzsäure	Merck, Darmstadt, D
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol		Merck, Darmstadt, D
Kaiser`s Glyceringelatine		Merck, Darmstadt, D
KCl	Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Leupeptin	Proteaseinhibitor	PeptaNova, Sandhausen, D
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	Rapidozym, Berlin, D
Marker VIII	DNA-Längenstandard	Roche, Mannheim, D
Marker 7B	Protein-Längenstandard	Roche, Mannheim, D
Methanol	<i>pro analysi</i>	Merck, Darmstadt, D
Natriumacetat		Merck, Darmstadt, D
Natriumacetat-Trihydrat		Merck, Darmstadt, D
NaCl	Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumdeoxycholsäure		Roche, Mannheim, D
NaOH-Plätzchen	Natriumhydroxid-Herstellung	Merck, Darmstadt, D
Nonidet P-40	für RIPA-Puffer	Roche, Mannheim, D
Pepstatin	Proteaseinhibitor	Sigma, Taufkirchen, D
PCV-B3-Typ	CVB3-Nachweis, Positivkontrolle	Prof. Kandolf, Institut für Pathologie, Tübingen
Picrinsäure		Merck, Darmstadt, D

PMSF in EtOH		Sigma, Taufkirchen, D
Sequenzspezifische Primer	siehe Tab. 2.2	Tib Molbiol, Berlin, D
RNase A	RNA-Inaktivierung	Roche, Mannheim, D
RNase-Zap	RNase-Inaktivierung	Ambion, Austin, TX, USA
Reverse Transkription System	Oligo (dt) ₁₅ -Primer, RNAsin, 10 mM dNTPs, AMV-Reverse Transkriptase, Puffer, MgCl ₂ , <i>random</i> -Primer, H ₂ O-RNase-frei	Promega, Mannheim, D
RNAsin	RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim, D
RQ1, RNase-freie DNase		Promega, Mannheim, D
SDS	Natriumdodecylsulfat	Sigma, Taufkirchen, D
<i>Sirius red</i>		Polysciences Inc., Eppelheim, D
Sucrose		Sigma, Taufkirchen, D
Tris-Base		Merck, Darmstadt, D
Tris-HCl		Merck, Darmstadt, D
Triton X-100	nicht-ionisches Detergens	Roche, Mannheim, D
TRIZOL-Reagenz	zur Gewebeextraktion	GibcoBRL, Carlsbad, CA, USA
Xylol		J.T. Baker, Phillipsburg, NY, USA