

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose MP	Roche, Mannheim
ϵ -Aminocapronsäure	Sigma, Steinheim
Ampicillin	Sigma, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Bacto Trypton	Roth, Karlsruhe
BD Microlance 3 Spritzenkanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Plastipak 1ml Einwegspritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
CDP-Star	Roche, Mannheim
Chromatographiepapier (3MM)	Whatman, Maidstone, GB
Claycomb Medium	JRH Biosciences, Amdover, GB
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
ECL-Detektionsreagenzien	Amersham, Braunschweig
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica, Nussloch
Entwickler für Röntgenfilme	Kodak GBX, Rochester, USA
Eosin G	Merck, Darmstadt
Eppendorff-Gefäße (1,5 μ l, 2 μ l)	Eppendorff, Hamburg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Falcon Einmalpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Fibronectin	Biochrom, Berlin
First strand buffer, 5x	Roche, Mannheim
Fixierer für Röntgenfilme	Kodak GBX, Rochester, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe

Gelatine	Biochrom, Berlin
Glutamin	Biochrom, Berlin
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hybond®-N Membran	Amersham, Braunschweig
Hybond®-P Membran	Amersham, Braunschweig
Hybridisationsbeutel	Roche, Mannheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kryo-Röhrchen	TPP, Trasadingen, CH
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Ligationspuffer, 10x	Roche, Mannheim
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Merck, Darmstadt
3-(N-morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
N-Lauroylsarcosin	Sigma, Steinheim
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumascorbat	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Norepinephrin-Bitartrat	Sigma, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Steinheim
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel, Braunschweig
Oligo d(T) ₁₅ -Primer	Promega, Madison, USA
Orange G	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Steinheim
PCR-Puffer, 10x	Roche, Mannheim
Penicillin	Biochrom, Berlin
Phenol	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Polaroid-Filme (3000 ASA)	Polaroid, St. Albans, GB
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Protease Inhibitor Complete	Roche, Mannheim
Röhrchen, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgen-Film	Amersham, Braunschweig

Roti [®] -Mark Prestained	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Biochrom, Berlin
Trichlormethan (Chloroform)	Roth, Karlsruhe
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Steinheim
TRIZOL [®]	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween20	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid (X-Gal)	Roche, Mannheim
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Biochrom, Berlin
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	Nunc, Dänemark
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, CH
Zellkultur-Testplatten	TPP, Trasadingen, CH

2.1.2 Geräte

Autoklav HiClave HV85	BPW, Süßen
Bühler-Schüttelinkubator KS15A	Johanna Otto GmbH, Hechingen
CO ₂ -Brutschrank HeraCell 150	Heraeus, Hanau
Digitalkamera DS6031	Canon, Tokyo, J
Elektrophoresekammer HU10 Mini-Plus Horizontal	Scie-Plas, Southam, GB
Elektrophoresekammer SE 260 Mighty Small II	Hoefer, San Francisco, USA
Feinwaage Scout Pro	Ohaus, Pine Brook, USA
<i>Firewire</i> -Kamera CC7	Inteq, Berlin
Gewebehomogenisierer Ultra Turrax [®] T8	IKA, Staufen
Heizblock BBA	Grant-Boekel, Cambridge, GB
Magnetrührer mit Heizplatte MR 3100	Heidolph, Schwabach
Kühlschrank (+4 bis -20°C)	Siemens, Berlin
Kühlzentrifuge 3K30	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Lichtmikroskop Axioskop 40	Zeiss, Jena
pH-Meter InLab [®] 410	Mettler Toledo, Gießen
PCR-Gerät Primus evolution 25/96	Clemens, Waldbüttelbrunn
Pipetten Eppendorff Research (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorff, Hamburg
Pipetten Eppendorff Reference (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorff, Hamburg
Scanner Scanjet 4070	Hewlett & Packard, Palo Alto, USA
Schüttelbad, beheizbar	Memmert, Schwabach
Schüttelmaschine LS10	Gerhardt, Bonn
Spektralphotometer Ultrospec [®] 2100 pro	Amersham, Braunschweig
Sterilbank LaminAir HB2448	Heraeus, Hanau

Stickstofftank GT40	Air Liquide, Marne La Vallée, F
Stromquelle E835	Consort, Turnhout, B
Stromquelle EPS301	Amersham, Braunschweig
Tiefkühlschrank HeraFreeze Alliance (-80°C)	Heraeus, Hanau
Umlaufwasserbad m. Thermostat DC1	Haake, Vreden
UV-Crosslinker BLX-E254	Bio-Budget, Krefeld
UV-Flächenstrahler N90	Benda, Wiesloch
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Biocel	Millipore, Schwalbach
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Minifuge 2	Heraeus Christ, Osterode

2.1.3 Wasser

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Wasser wurde standardmäßig mit der Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Biocel aufbereitet. Dieses Wasser wird in dieser Arbeit als *Aqua destillata* (*Aqua dest.*) bezeichnet. Wasser, das zusätzlich durch den Millipak-40 Endfilter gelaufen war, wird als *Aqua bidestillata* (*Aqua bidest.*) bezeichnet. Wasser, das für das Arbeiten mit RNA bestimmt war, wurde Diethylpyrocarbonat (DEPC) beigegeben, um eventuell enthaltene RNAsen zu inaktivieren. Dazu wurde *Aqua dest.* mit 0,1% (v/v) DEPC versetzt, mehrfach stark geschüttelt und mindestens 16h bei RT inkubiert. Anschließend wurde es zur Inaktivierung des DEPC autoklaviert. Dieses Wasser wird im Folgenden als DEPC-Wasser bezeichnet.

2.1.4 Standardpuffer und Lösungen

<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS):	140mM NaCl 30mM KCl 6,5mM Na ₂ HPO ₄ 1,4mM KH ₂ PO ₄
Tris-Acetat-EDTA (TAE)	0,04M Tris-Acetat 0,1mM EDTA
<i>Tris-buffered saline</i> + Tween 20 (TBS-T)	0,15M NaCl 10mM Tris-HCl pH 8,0 0,05M Tween20
20x <i>Saline-Sodium Citrate</i> (SSC)	3M NaCl 0,3M Na ₃ Citrat

2.1.5 Enzyme

Restriktionsenzyme und Puffer	Roche, Mannheim
Reverse Transkriptase	Roche, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
RNAse A	Roche, Mannheim

2.1.6 Antikörper

anti-Digoxigenin, Alkalische Phosphatase-gekoppelt	Roche, Mannheim
Kaninchen-anti-TIS11B	Orbigen, San Diego, USA
Esel-anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-gekoppelt	Amersham, Braunschweig

2.1.7 Wachstumsfaktoren und Zytokine

<i>Hepatocyte growth factor</i> (HGF)	Sigma, Steinheim
<i>Transforming growth factor-beta 1</i> (TGF- β 1)	Boehringer, Mannheim
<i>Tumor necrosis factor-alpha</i> (TNF- α)	Roche, Mannheim

2.1.8 Oligodesoxynukleotide

2.1.8.1 Primer zur Klonierung von *tis11*:

tis11, Maus; zur Klonierung eines 598bp-Fragments (38):

tis11(5'): 5'-CG GGATCC CCAGTCGATGAGCCATGACC-3'

tis11(3'): 5'-CG GAATTC GCTGGAAGGCGAAAAGGAAC-3'

2.1.8.2 Primer zur Klonierung von *tis11D*:

tis11D, Maus; zur Klonierung eines 587bp-Fragments (38):

tis11D(5'): 5'-CG GGATCC CCACACTTCTGTCCACCCTTC-3'

tis11D(3'): 5'-CG GAATTC CAGCTCTGTCTTGTACTTGG-3'

2.1.9 Plasmide

pBluescript SKII(-) (Transkriptionsvektor)	Stratagene, Heidelberg
pBluescript SKII(-)- <i>tis11B</i>	Melanie Busse 2007 (13)
pBluescript SKII(-)- <i>rpl32</i>	Ricarda Neu 2006 (98)
pBluescript SKII(-)- <i>myogenin</i>	Ricarda Neu 2006 (98)
pBluescript SKII(-)- <i>p21</i>	rzpd, Berlin

2.1.10 Kommerzielle Kits

BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche, Mannheim

Plasmid Maxi/Midi Kits
RNeasy Kit

Qiagen, Düsseldorf
Qiagen, Düsseldorf

2.1.11 Bakterienstämme

Escherichia coli XL1 Blue

Stratagene, Heidelberg

2.1.12 Eukaryontische Zelllinien

C2C12

Mäusemyoblasten (10)

C2F3

Mäusemyoblasten (10)

HL1

Mäusekardiomyozyten (28)

NIH/3T3

Mäusefibroblasten (53)

RD/12

Humane Rhabdomyosarkomzellen (78)

RD/18

Humane Rhabdomyosarkomzellen (78)

2.1.13 Tiere

Die Erhebung von *in vivo*-Daten erfolgte an insgesamt 8 Mäusen vom Zuchtstamm C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}nJ („*mdx*-Mäuse“) sowie 9 Kontrolltieren vom Zuchtstamm C57BL/10SnJ. Die Tiere wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) gezüchtet und im Alter von 4-5 Wochen geliefert. Bis zur Tötung wurden sie einzeln in gesäuberten und desinfizierten Käfigen bei ca. 20°C und einem automatischen Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12h gehalten. Sie erhielten Standarddiät und Wasser *ad libitum*. Weitere *in vivo*-Daten wurden an den Herzen von je 20 Mäusen der Zuchtstämme C57BL/6 und A.BY/SnL erhoben. Jeweils 10 Tiere jedes Zuchtstamms waren mit dem Coxsackie-Virus B3 infiziert. Aufzucht, Infizierung und Präparation der Tiere wurden von PD Dr. Karin Klingel an der Universität Tübingen durchgeführt, die mir das in geeigneter Weise aufbereitete Untersuchungsmaterial freundlicherweise zur Verfügung stellte.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung eukaryontischer Zellen

Die Aufzucht aller Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂.

War eine für die jeweilige Linie kritische Konfluenz erreicht, wurden die Zellen passagiert und ausgedünnt. Dazu wurde das jeweilige Kulturmedium (s. u.) abgenommen, und die Zellen mit reichlich sterilem PBS gewaschen. Um sie vom Boden der Flasche

abzulösen, folgte eine Inkubation mit Trypsin/EDTA für 5min im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, dekantiert, in geeignetem, frischem Medium aufgenommen und weiterkultiviert.

Trypsin/EDTA:

Trypsin (w/v)	0,05%
EDTA	0,02M
PBS	1x

2.2.1.1.1 Myoblasten der Linie C2

Skelettmuskelzellen der Linien C2C12 und C2F3 wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) kultiviert, das nach folgendem Schema modifiziert wurde:

C2-Proliferationsmedium:

DMEM	1x
FKS	20%
Penicillin/Streptomycin	je 100U/ml
L-Glutamin	2mM

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in DMSO-haltigem Einfriermedium aufgenommen und in speziellen Einfriergefäßen (Kryotubes) auf Eis langsam (ca. 1°C/min) abgekühlt. Anschließend wurden sie zunächst bei -80°C eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie bei -196°C für lange Zeit gelagert werden konnten.

Standard-Einfriermedium:

DMEM	1x
FKS	10%
DMSO	10%

Zur Reaktivierung wurden die Zellen schnell im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, mit viel PBS gewaschen, in geeignetem, frischem Medium aufgenommen und etwa 24 Stunden in Zellkulturflaschen in absoluter Ruhe belassen.

Zur Induktion der Differenzierung wurden die Zellen mit einem Kulturmedium inkubiert, das 2% Pferdeserum anstelle von 20% FKS enthielt:

Differenzierungsmedium:

DMEM	1x
Pferdeserum	2%
Penicillin/Streptomycin	je 100U/ml
L-Glutamin	2mM

2.2.1.1.2 Rhabdomyosarkomzellen der Linie RD

Rhabdomyosarkomzellen der Linien RD12 und RD18 wurden in DMEM kultiviert, das nach folgendem Schema modifiziert wurde:

Standard-Proliferationsmedium:

DMEM	1x
FKS	10%
Penicillin/Streptomycin	je 100U/ml
L-Glutamin	2mM

Die Induktion der Differenzierung erfolgte mit Differenzierungsmedium, wie es bei C2-Zellen verwendet wurde.

Auch Einfrieren und Reaktivierung wurden wie mit C2-Zellen durchgeführt.

2.2.1.1.3 Fibroblasten der Linie NIH/3T3

Fibroblasten der Linie NIH/3T3 wurden wie RD-Zellen in Standard-Proliferationsmedium kultiviert. Einfrieren und Reaktivierung wurden wie bei C2-Zellen durchgeführt.

Für Versuche mit quieszenten Fibroblasten wurden die Zellen für 16h in Medium mit nur 0,5% FKS inkubiert und so in einen Ruhezustand (Quieszenz) versetzt:

Fibroblasten-Hungermedium:

DMEM	1x
FKS	0,5%
Penicillin/Streptomycin	je 100U/ml
L-Glutamin	2mM

2.2.1.1.4 Kardiomyozyten der Linie HL-1

Kardiomyozyten der Linie HL-1 wurden in *Claycomb Medium* kultiviert, das nach folgendem Schema modifiziert wurde:

HL-1-Proliferationsmedium:

Claycomb Medium	1x
FKS	10%
Norepinephrin	100µM
Penicillin/Streptomycin	je 100U/ml
L-Glutamin	4mM

Das Norepinephrin wurde in Form einer Stammlösung (80 mg Norepinephrin-Bitartrat auf 25ml einer 30mM Natriumascorbat-Lösung) zugegeben.

Die Kultivierung fand in speziell beschichteten 50ml-Kulturflaschen statt. Dazu wurden die Böden der Flaschen mit je 25µg Fibronectin in 2ml einer 0,005% Gelatine-Wasserlösung überschichtet, und die Flaschen über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die restliche Flüssigkeit abgesaugt, und die Flaschenböden mit sterilem PBS gespült. Die Kulturflaschen konnten dann sofort verwendet werden oder bei -20°C bis zu einen Monat gelagert werden.

Da die HL-1-Zellen auf den beschichteten Flaschenböden außerordentlich stark hafteten, musste beim Passagieren (siehe 2.2.1.1) die Inkubation mit Trypsin/EDTA häufig ein zweites Mal durchgeführt werden, um die Ablösung möglichst aller Zellen zu erreichen.

Einfrieren und Rekultivierung von HL-1-Zellen wurden prinzipiell wie bei C2-Zellen durchgeführt, es wurde jedoch ein anderes Einfriermedium verwendet:

HL-1-Einfriermedium:

Claycomb Medium	1x
FKS	10%
DMSO	5%

Für die Durchführung von Induktionsversuchen mit Zytokinen an Kardiomyozyten wurden diese bis zum Erreichen der kritischen Konfluenz in 10cm bzw. 6cm Schalen kultiviert. Um eine eventuelle Störung durch im Serum vorhandene Zytokine und Wachstumsfaktoren zu verhindern, wurden die Zellen während des Versuchs in serumfreiem Medium kultiviert. Die jeweiligen Zytokine wurden diesem Medium in geeigneter Konzentration zugesetzt.

HL-1-Hungermedium:

Claycomb Medium	1x
BSA	0,5%
Penicillin/Streptomycin	je 100U/ml
L-Glutamin	4mM

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Anzucht und Aufbewahrung von *E. coli*-Stämmen

Escherichia (E.) coli-Flüssigkulturen in *Luria-Bertani*-Medium (LB-Medium), ggf. mit Antibiotika versetzt, wurden über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

LB-Medium:

Bacto Trypton (w/v)	1%
Hefeextrakt (w/v)	0,5%
NaCl (w/v)	1%

Auch *E. coli*-Kulturen auf Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Herstellung der Agarplatten wurde LB-Flüssigmedium mit Agar-Agar (1,5% w/v) versetzt und autoklaviert. Anschließend wurde es auf ca. 50°C abgekühlt, mit 100µg/ml Ampicillin versetzt und in sterile Petrischalen gegossen. Die Platten wurden nach dem Erkalten bei 4°C aufbewahrt. Vor dem Ausstreichen der Bakterien wurden zunächst 100µl X-Gal-Stammlösung [2% X-Gal in 100% DMF (w/v)] und 40µl IPTG-Lösung (0,1M IPTG in *Aqua dest.*) pro LB-Ampicillin-Platte aufgetragen, um ein „Blau/Weiß-Screening“ zur Überprüfung der Klonierungseffizienz zu ermöglichen (siehe 2.2.2.3). Zur langfristigen Lagerung der *E. coli*-Zellen wurden 2,5ml einer frischen Übernachtskultur mit 0,8ml steriler Glycerin-Stammlösung (ca. 87%) versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *E. coli*-Zellen des Stammes XL1 *Blue* verwendet, um gezielt bestimmte DNA-Fragmente mittels rekombinanter Plasmide zu amplifizieren. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien, welche Plasmide aus ihrer Umgebung aufnehmen konnten, wurde eine frische Übernachtskultur 1:100 mit LB-Medium verdünnt und bei 37°C unter Schütteln so lange inkubiert, bis photometrisch eine Absorption von 0,4-0,5 bei 620nm erreicht war. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert

(10min bei 4°C und 2500 Upm), dekantiert und vorsichtig in einem Viertel des ursprünglichen Volumens an kalter, steriler 0,1M Magnesiumchloridlösung resuspendiert. Nach 30min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert (wie oben), dekantiert, und das Sediment in einem Fünzigstel des ursprünglichen Volumens an kalter, steriler 0,1M Calciumchloridlösung resuspendiert. Nach 3-4h Inkubation auf Eis wurde sterile Glycerin-Stammlösung (ca. 87%) zugegeben, bis die Bakteriensuspension eine Endkonzentration von 30% Glycerin erreicht hatte. Anschließend wurden Aliquots hergestellt. Die transformationskompetenten Bakterien konnten so mehrere Monate lang bei -80°C gelagert werden.

2.2.2.3 Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

200µl transformationskompetenter *E. coli*-Zellen (siehe 2.2.2.2) wurden auf Eis langsam aufgetaut, mit einer geringen Menge gereinigter Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz (siehe 2.2.3.5.3) versetzt und vorsichtig gemischt. Nach 30min Inkubation auf Eis erfolgte ein Wärmeschock bei 42°C für 90s. Danach wurde der Transformationsansatz sofort wieder auf Eis gebracht und für weitere 5min inkubiert. Nach Zugabe von 600µl LB-Medium wurde der Ansatz nun für 30min bei 37°C unter Schütteln inkubiert und dann auf mit X-Gal und IPTG behandelte LB-Ampicillin-Platten (siehe 2.2.2.1) ausgestrichen.

Nach 16-20h Inkubation bei 37°C waren auf den Platten einzelne Bakterienkolonien zu erkennen, wobei jede Kolonie ursprünglich einer einzelnen Zelle entstammte. Das zur Transformation verwendete Plasmid pBluescript SK II (-) enthält ein Gen für Ampicillinresistenz, so dass die ursprünglich ampicillinsensitiven Bakterien nur nach Aufnahme des Plasmids auf der Agarplatte wachsen können. Ferner bietet pBluescript SK II (-) die Möglichkeit eines „Blau/Weiß-Screenings“ zur Überprüfung der Klonierungseffizienz, wenn die Platten zuvor mit X-Gal und IPTG behandelt werden. Kolonien, die Plasmide ohne *Insert* (siehe 2.2.3.5.3) enthalten, verfärben sich dabei blau.

Es wurden nun von einzelnen, nicht verfärbten Kolonien Flüssigkulturen in LB-Medium mit Ampicillin (1:1000) angesetzt, und diese über Nacht für 16h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Aus diesen Kulturen konnten die Plasmide wie unter 2.2.3.3 beschrieben isoliert werden.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 *Reinigung von in Wasser gelösten Nukleinsäuren über Phenolextraktion und Ethanol fällung*

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch (s. u.) versetzt und nach sehr gründlichem Vortexen zur Phasentrennung zentrifugiert (13.000U_{pm}, 1min, RT). Die wässrige Phase wurde abgenommen, und die darin gelösten Nukleinsäuren mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol (100%) sowie dem 0,1-fachen Volumen 3M Natriumacetatlösung bei -80°C über 60min gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13.000U_{pm}, 20min, 4°C) wurde das Sediment mit Ethanol (70%) gewaschen und nach kurzem Trocknen in 10µl Tris-Lösung (10mM, pH 8,0) aufgenommen.

Phenol/Chloroform-Gemisch, pH 7,5:

Phenol	4,5 Volumina
Chloroform	4,5 Volumina
1M Tris-HCl pH 9,5	1 Volumen

2.2.3.2 *Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren*

Die Konzentration von DNA und RNA in wässriger Lösung wurde mit dem Spektralphotometer *Ultrospec[®] 2100 pro* (Amersham, Braunschweig) durch Messung der Absorption bei 260nm bestimmt. Es wurde in wieder verwendbaren Quarzküvetten gegen DEPC-Wasser als Referenzwert gemessen. Das Verhältnis der Absorption bei 260nm zur Absorption bei 280nm (A_{260}/A_{280}) wurde als Maßstab für die Reinheit der Nukleinsäuren herangezogen, wobei die Werte 1,7 (RNA) bzw. 2,0 (DNA) als optimal betrachtet wurden.

2.2.3.3 *DNA-Präparation*

2.2.3.3.1 *Plasmid-Schnellpräparation*

Diese Methode diente der schnellen Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken. Dazu wurden die Puffer des *Plasmid Midi* bzw. *Maxi Kits* der Firma Qiagen (Düsseldorf) verwendet.

1800µl einer frischen LB-Übernachtskultur wurden zentrifugiert (13.000U_{pm}, 30s, RT), dekantiert und in 100µl Puffer P1 resuspendiert. Nun wurden 100µl Puffer P2 zuge-

geben und der Ansatz vorsichtig gemischt. Nach Inkubation für 5min bei RT wurden 100µl Puffer P3 hinzugefügt. Während der anschließenden Inkubation für 5min auf Eis fielen chromosomale DNA, Proteine und Lipide zu einem unlöslichen Präzipitat aus, während die Plasmid-DNA aufgrund ihrer *supercoiled*-Struktur in Lösung verblieb. Nach erneuter Zentrifugation (13.000Upm, 5min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Sediment verworfen. Nach Zugabe von Ethanol (100%) fiel die Plasmid-DNA aus. Sie wurde abzentrifugiert (13.000Upm, 15min, 4°C), dekantiert und nach kurzem Trocknen in 100µl wässriger RNase A-Lösung (1:200) aufgenommen.

2.2.3.3.2 *Plasmidpräparation mit dem Qiagen-Plasmidkit*

Die Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA erfolgte aus 100ml einer frischen *E. coli*-Übernachtskultur. Mit Hilfe des *Plasmid purification Maxi Kits* der Firma Qiagen (Düsseldorf) wurde die DNA entsprechend den Angaben des Herstellers aufbereitet.

2.2.3.4 **Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

2.2.3.4.1 *Analytische Agarose-Gelelektrophorese*

Die Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten erfolgte mittels Elektrophorese in Gelen aus Agarose (je nach erwarteter Größe der Fragmente 1-2,5%; zumeist 1,5%) in TAE-Puffer. Um eine Visualisierung der Banden durch UV-Licht zu ermöglichen, wurde den Gelen standardmäßig Ethidiumbromid (1µg/ml Gel) hinzugefügt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit einer geeigneten Menge 10xLadepuffer E versetzt. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer; die Elektrophorese erfolgte bei 100V und 100mA. Anschließend wurden die Gele im UV-Durchlicht (256nm) betrachtet und gegebenenfalls mit einer Polaroidkamera (Polaroid, St. Albans, UK) fotografiert (Blende 16; Belichtungszeit 0,5s; Rotfilter; 3000 ASA).

10xLadepuffer E:

Saccharose	40% (w/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylencyanol	0,25% (w/v)
Orange G	0,25% (w/v)

2.2.3.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde standardmäßig das QIAexII-Kit der Firma Qiagen (Düsseldorf) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.3.5 *In vitro*-Reaktionen an DNA

2.2.3.5.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur selektiven Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente aus einer DNA-Matrize. Man bedient sich dabei der thermostabilen DNA-Polymerase des Archaeobakteriums *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase). Sie erlaubt es, den Reaktionsansatz zur Denaturierung der DNA zunächst auf 94°C zu erhitzen. Bei der anschließenden Abkühlung auf 40-60°C können sich die *Primer*, spezifische Oligonukleotide, die zu den Enden der gewünschten Sequenz komplementär sind, an den einzelsträngigen DNA-Molekülen anlagern. Die optimale Temperatur in dieser Phase ist abhängig von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer.

Nach der Anlagerungsphase wird der Ansatz auf 72°C erhitzt, was knapp unterhalb des Temperaturoptimums der *Taq*-Polymerase liegt. Diese kann nun über die *Primer* an den DNA-Strang binden und mit Hilfe der ebenfalls im Ansatz vorhandenen Mononukleotide die Sequenz zwischen den *Primern* synthetisieren. Wird dieser Temperaturzyklus mehrfach durchlaufen, kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Fragments (111).

Reaktionsansatz:

Aqua bidest.	33,8 µl
10xPCR-Puffer	5,0 µl
dNTP-Mix (2,5 mM)	8,0 µl
5'-Primer (20 µM)	2,5 µl
3'-Primer (20 µM)	2,5 µl
cDNA	2,0 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (1U)	0,2 µl

Die Reaktion erfolgte in sterilen, verschließbaren Reaktionsgefäßen in einem Ansatz von 50 µl. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. cDNA und *Taq*-Polymerase wurden zuletzt, unmittelbar vor dem Erhitzen, hinzugefügt. Um eventuelle Verunreini-

gungen ausschließen zu können, wurde immer auch ein Kontrollansatz mitgeführt, der alle oben aufgeführten Komponenten außer der DNA-Matrize enthielt.

Die Reaktion wurde mit dem PCR-Gerät *Primus evolution 25/96* der Firma Clemens (Waldbüttelbrunn) nach folgendem Schema durchgeführt, wobei die erste Denaturierungsphase 4min dauerte.

1min	bei	94°C	(Denaturierung)
2min	bei	40-60°C	(Anlagerung)
30s - 2min	bei	72°C	(Synthese)

Die Dauer der Synthesephase richtete sich nach der Länge des zu erwartenden Produkts; pro 1kb zu synthetisierender DNA wurde etwa 1min berechnet. Standardmäßig wurden 30 Zyklen durchlaufen. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für weitere 10min bei 72°C inkubiert.

2.2.3.5.2 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde den Empfehlungen des Herstellers gefolgt. Üblicherweise wurden 0,5-1U Restriktionsenzym pro µg DNA eingesetzt.

2.2.3.5.3 Ligation

Die mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigten DNA-Fragmente („*Inserts*“) wurden durch Ligation in einen Vektor eingebracht. Die in dieser Arbeit verwendeten *Inserts* und der Vektor pBluescript SK II (-) wiesen so genannte *sticky ends* auf, überhängende, ungepaarte Nukleotide am Ende der Moleküle, die eine Ligation erleichtern. Hierbei war ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:3 bis 1:4 zwischen Vektor und *Insert* optimal.

Es wurde ein 20µl-Ansatz aus entsprechenden Mengen Vektor und *Insert* sowie 1,5-2µl 10xLigationspuffer und 1U T4-DNA-Ligase auf Eis pipettiert. Die Ligation erfolgte bei RT über 2-20h.

2.2.3.6 RNA-Techniken

2.2.3.6.1 Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit RNA

Beim Arbeiten mit RNA ist jede Verunreinigung durch RNAsen, die zur Degradierung der RNA führen, strikt zu vermeiden. Deshalb wurden dabei ausschließlich sterile

Plastik- oder gebackene Glasgefäße (200°C, 8h) verwendet, und bei allen Arbeitsschritten Einmalhandschuhe getragen. Allen Lösungen, die für das Arbeiten mit RNA bestimmt waren, wurde DEPC beigegeben, das eventuell enthaltene RNAsen inaktiviert. Dazu wurden die Lösungen mit 0,1% (v/v) DEPC versetzt, mehrfach stark geschüttelt und mindestens 16h bei RT inkubiert. Zur anschließenden Inaktivierung des DEPC wurden die Lösungen autoklaviert. Lösungen, die Tris enthalten, dürfen nicht mit aktivem DEPC in Berührung kommen und wurden daher in gebackenen Gefäßen mit DEPC-Wasser angesetzt.

2.2.3.6.2 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Zelllysaten

Die Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus Zelllysaten wurde mit dem Rneasy Kit der Firma Qiagen (Düsseldorf) durchgeführt. Es wurde dem Herstellerprotokoll gefolgt.

2.2.3.6.3 Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Gewebe

Die Mäuse wurden per zervikaler Dislokation getötet, und die gewünschten Organe sofort präpariert. Der größte Teil der Gewebepräparate wurde direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Ein kleinerer Teil wurde zur histologischen Analyse in entsprechendes Medium eingebettet (siehe 2.2.5.1). Zur Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus Gewebe wurden bis zu 100mg gefrorenes Gewebe in 1ml TRIzol[®]-Reagenz bei RT mit dem Ultra Turrax[®] T8 der Firma IKA (Staufen) zügig homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll des TRIzol[®]-Reagenz für die Isolierung von RNA aus Gewebe.

2.2.3.6.4 Northern Blot-Analyse

Die *Northern Blot*-Analyse ist ein Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis spezifischer Sequenzen in gesamtzellulärer RNA. Dazu wird die RNA zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und dann auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (2, 133).

RNA liegt normalerweise als Einzelstrang vor und kann daher Sekundärstrukturen ausbilden. Da diese die größenabhängige Auftrennung bei der Gelelektrophorese beeinflussen, wurde für die *Northern Blot*-Analyse ein denaturierendes Elektrophoreseverfahren gewählt.

In DEPC-Wasser gelöste gesamtzelluläre RNA wurde auf eine einheitliche Menge von 2-4µg und ein einheitliches Volumen (meist 10µl) aliquotiert. Die Proben wurden mit

10µl Ladepuffer N versetzt und im Heizblock für 1min auf 85°C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA zu zerstören.

Sie wurden dann auf ein horizontales Agarosegel (1% in MOPS) aufgetragen, welches mit Formaldehyd versetzt war. Mit MOPS als Laufpuffer wurde bei 100V und 40-60mA für 60-90min eine Elektrophorese durchgeführt.

Anschließend wurde das Gel kurz in 20xSSC geschwenkt und mittels eines vertikalen Kapillarblotverfahrens über Nacht auf eine zuvor mit 20xSSC äquilibrierte Nitrozellulosemembran (Hybond[®]-N) transferiert. Dazu wurde 20xSSC als Trägersubstanz verwendet; die Kapillarwirkung wurde mit einer geeigneten Menge Chromatographiepapier erzielt.

Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in 2xSSC gewaschen, und die RNA durch Bestrahlung mit 120mJ/cm² UV-Licht darauf fixiert. Nun wurde durch Schwenken der Membran in Methylenblau-Lösung und anschließendes Spülen mit DEPC-Wasser die RNA angefärbt. Bei intakter RNA sollten dabei eine 28S-rRNA-Bande bei einer Transkriptgröße von ca. 4800 bp und eine 18S-rRNA-Bande bei ca. 1900 bp sichtbar werden.

Die Membran wurde nun fotokopiert oder gescannt (Scanjet 4070 von Hewlett & Packard, Palo Alto, USA), um die angefärbten Banden als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Spuren verwenden zu können. Beide Banden wurden außerdem auf der Membran mit einem Bleistift markiert, um später gegebenenfalls einen Größenvergleich mit anderen spezifischen Banden zu ermöglichen. Die Membran konnte dann getrocknet und bei RT gelagert oder direkt hybridisiert werden.

Der Hybridisierung ging zunächst eine Prähybridisierung zur Absättigung unspezifischer RNA-Bindungsstellen voraus. Dazu wurde die Membran mit Hybridisationslösung in einem dichten Hybridisationsbeutel für 1h bei 68°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die eigentliche Hybridisierung mit einer Gensonde, indem 1-4µl (je nach Größe der Membran) einer mit Digoxigenin markierten, spezifischen *antisense*-RNA-Sonde in 100µl Hybridisationslösung im Heizblock für 10min auf 68°C erhitzt und dann in den Beutel zur bereits vorhandenen Hybridisationslösung gegeben wurde. Gelegentlich wurde mit mehreren Sonden gleichzeitig hybridisiert. Die Hybridisierung fand über Nacht und ebenfalls bei 68°C im Wasserbad unter Schütteln statt. Anschließend wurde die Membran nach folgendem Schema weiterbehandelt. Alle Schritte fanden, wenn nicht anders angegeben, unter Schütteln und bei RT statt.

3x Waschlösung Nr.1	je 5min
2x Waschlösung Nr.2 bei 68°C im Wasserbad	je 20min
Puffer 1	5min
1% <i>blocking buffer</i>	1h

Nachdem die Membran zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 1% *blocking buffer* behandelt worden war, wurde diesem nun ein mit Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelter Anti-Digoxigenin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:15.000 zugegeben. Es folgten die Schritte:

1% <i>blocking buffer</i> + 1:15.000 Anti-Digoxigenin-AK	30min
Puffer 1 + 0,3% Tween 20	5min
2x Puffer 1 + 0,3% Tween 20	je 15min
Puffer 3	5min

Die Membran in Puffer 3 wurde nun vom Schüttler genommen, kurz abgetropft, in Klar-sichtfolie eingeschlagen und darin mit einem Chemilumineszenzsubstrat für AP (CDP-Star[®], 1:100 in Puffer 3 verdünnt) für 5min inkubiert. Die dabei entstehende Licht-emission konnte durch Auflegen eines Röntgenfilms nachgewiesen werden. Je nach Signalstärke betrug die Belichtungsdauer 10s bis 1h.

Die Filme und gegebenenfalls die Kopien der Methylenblau-Färbungen wurden mit dem HP Scanjet 4070 gescannt, und die Bilder mit einer Bildbearbeitungssoftware (Photo-shop[®] CS v8.0.1 von Adobe Systems, San Jose, USA) gespeichert.

Agarosegel 1% (100ml):

Agarose	1g
DEPC-Wasser	84,6ml
10xMOPS	10ml
Formaldehyd	5,4ml

Ladepuffer N (15ml):

Formamid	7,2ml
Formaldehyd	2,6ml
DEPC-Wasser	1,8ml
10xMOPS	1,6ml
80% Glycerin	1ml
Bromphenolblau-Lösung, wässrig, gesättigt	0,8ml

RNA-Hybridisationslösung (50ml):

Formamid 100%	25ml
20xSSC	12,5ml
10% Blocking-Lösung	10ml
20% N-Lauroylsarcosin	0,25ml
10% SDS	0,1ml
DEPC-Wasser	2,15ml

Waschlösung Nr.1 (500ml):

20xSSC	10ml
10% SDS	5ml
DEPC-Wasser	445ml

Waschlösung Nr.2 (500ml):

20xSSC	2,5ml
10% SDS	5ml
DEPC-Wasser	492,5ml

Puffer 1 (1l):

Maleinsäure	11,6g
Natriumchlorid	8,75g
Natriumhydroxid	auf pH 7,5 einstellen
DEPC-Wasser	auf 1 Liter auffüllen

Puffer 3 (50ml, immer frisch angesetzt):

1M Tris pH 9,5	5ml
5M Natriumchlorid	1ml
5M Magnesiumchlorid	0,5ml
DEPC-Wasser	43,5ml

2.2.3.6.5 Herstellung von RNA-Sonden aus rekombinanten Plasmiden

Alle in dieser Arbeit verwendeten digoxigeninmarkierten *antisense*-RNA-Sonden wurden mit dem DIG RNA Labeling Kit (Roche, Mannheim) hergestellt.

Dazu wurde ein rekombinantes Plasmid, welches das jeweils gewünschte *Insert* enthielt (siehe 2.2.3.5.3), mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert (siehe 2.2.3.5.2). Anschließend wurde der Ansatz zur Aufreinigung der DNA-Matrize einer Phenol/Chloroformextraktion mit nachfolgender Ethanolfällung (siehe 2.2.3.1) unterzogen.

Es folgte eine *in vitro*-Transkription mit dem DIG RNA Labeling Kit nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden 0,5-2µg der DNA-Matrize verwendet, die zuvor für 10min bei 65°C denaturiert worden war. Abhängig von der Orientierung der Sequenz innerhalb des Plasmids wurde eine geeignete RNA-Polymerase (T7, T3, SP6) eingesetzt. Die weiteren Schritte wurden den Empfehlungen des Herstellers entsprechend durchgeführt.

2.2.3.6.6 Umschreiben von RNA in cDNA mittels reverser Transkription

Die aus gesamtzellulärer RNA transkribierte, einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) diente als Matrize bei der Polymerasekettenreaktion (siehe 2.2.3.5.1). Für die reverse Transkription wurden 5µg RNA in 7µl DEPC-Wasser gelöst und mit 0,5µl Oligo d(T)₁₅-Primer (0,5µg) gemischt. Nach Inkubation für 10min bei 70°C wurde der Ansatz auf Eis gebracht. Anschließend wurde der Reverse Transkriptase-Mix zugegeben, für 60min bei 37°C inkubiert und danach für 5min auf 95°C erhitzt.

Reverse Transkriptase-Mix:

5xPuffer (<i>first strand buffer</i>)	4µl
RNAse Inhibitor	1µl
dNTP-Mix (je 2,5mM)	4µl
Reverse Transkriptase (200U)	0,5µl

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellkulturen

Nach Abnahme des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 100-200µl eisgekühltem Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren (2,5ml Lysispuffer mit 100µl 25xProtease Inhibitor Complete) überschichtet und für 10min unter leichtem Schwenken auf Eis inkubiert. Die Behandlung zerstörte die Zellmembran, nicht jedoch die Kernmembran. Das entstandene Zytosollysate wurde mit einer Pipette aufgenommen, in ein geeignetes Gefäß überführt und bei -80°C zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Lysispuffer:

Triton X-100 (v/v)	1%
Tris-HCl pH 8,0	200mM
Natriumchlorid	37mM
Glycerin (v/v)	10%
EDTA	2mM

2.2.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die relative Konzentrationsbestimmung wurde mit dem *BCA™ Protein assay Kit* der Firma Pierce (Rockford, USA) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Absorption wurde im Spektralphotometer *Ultrospec® 2100 pro* (Amersham, Braunschweig) bei 562nm gemessen.

2.2.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in vertikaler Richtung in Polyacrylamidgelen von ca. 1,5mm Dicke durchgeführt. Dabei wurde mit dem Puffersystem nach Laemmli (65) gearbeitet. Die Gele bestanden im oberen Bereich aus einem ca. 1,5cm breiten Sammelgel, in dem sich die Taschen zum Auftragen der Proben befanden; daran schloss sich ein ca. 5cm breites Trenngel an, dessen Polyacrylamidkonzentration und die sich dadurch ergebende Porengröße in Abhängigkeit von der Größe des zu untersuchenden Proteins zwischen 7,5% und 15% variiert werden konnte. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit einer geeigneten Menge 5xLadepuffer P versetzt, im Heizblock für 5min bei 95°C erhitzt und dann sofort auf das Gel aufgetragen. Ferner wurde der Größenmarker Roti®-Mark Prestained (Roth,

Karlsruhe) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V und 40mA, bis die Lauf-front (sichtbar durch das im Ladepuffer P enthaltene Bromphenolblau) das untere Ende des Gels erreicht hatte (ca. 1-2h).

Sammelgel:

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	5,0ml
1M Tris-HCl pH 6,8	3,75ml
10% (w/v) SDS	0,3ml
<i>Aqua bidest.</i>	20,7ml
10% (w/v) APS	0,3ml
TEMED	20µl

Trenngel:

<u>Acrylamid-Endkonzentration</u>	<u>7,5%</u>	<u>10%</u>	<u>15%</u>
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	10ml	13,3ml	20ml
1M Tris-HCl pH 8,8	15ml	15ml	15ml
10% (w/v) SDS	0,4ml	0,4ml	0,4ml
87% (v/v) Glycerin	4,5ml	4,5ml	4,5ml
<i>Aqua bidest.</i>	10ml	6,7ml	–
10% (w/v) APS	0,4ml	0,4ml	0,4ml
TEMED	20µl	20µl	20µl

5xLadepuffer P:

Glycerin	50%
SDS	7,5g/l
Tris-HCl pH 8,0	250mM
Bromphenolblau	0,5mg/ml
B-Mercaptoethanol	12,5%

SDS-PAGE-Laufpuffer:

Tris	25mM
Glycin	192mM
SDS	0,1%

2.2.4.4 Immunologische Methoden

2.2.4.4.1 Western Blot

Die *Western Blot*-Analyse ist ein Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis spezifischer Proteine mit Hilfe von Antikörpern. Dafür muss das zu untersuchende Proteinlysate zunächst mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.4.3) aufgetrennt werden (12).

Die Proteine wurden aus dem Polyacrylamidgel elektrisch mit Hilfe einer halbtrockenen *Blot*-Apparatur auf eine Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) transferiert. Dazu wurden auf die angefeuchtete Anodenplatte der *Blot*-Apparatur zuerst sechs Lagen in Anodenpuffer 1, und darauf vier Lagen in Anodenpuffer 2 getränktes Chromatographiepapier gelegt. Nun wurde die ebenfalls in Anodenpuffer 2 getränkte PVDF-Membran (Hybond[®]-P) und anschließend das Trenngel aufgelegt. Zuerst folgten sechs Lagen in Kathodenpuffer getränktes Chromatographiepapier. Nun wurde die ebenfalls angefeuchtete Kathode auf den Stapel gelegt. Der Transfer erfolgte mit einer Stromstärke von 1mA/cm^2 für 1-2h.

Anschließend wurden die Banden in Ponceau S-Lösung angefärbt und die Membran mit 0,1% Essigsäure gespült, um den erfolgreichen Transfer und die Güte der Proteine überprüfen zu können. Sie wurde nun fotokopiert oder gescannt, um die angefärbten Banden als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Spuren verwenden zu können. Nun konnte die Membran getrocknet und bei RT gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

Anodenpuffer 1:

Tris	300mM
Ethanol (v/v)	20%

Anodenpuffer 2:

Tris	25mM
Methanol (v/v)	20%

Kathodenpuffer:

Tris	25mM
Methanol (v/v)	20%
ϵ -Aminocapronsäure	40mM

Alle folgenden Schritte bis zur Entwicklung erfolgten unter leichtem Schwenken bei RT. Die Inkubation mit Antikörpern konnte auch über Nacht bei 4°C durchgeführt werden. Zunächst musste die Membran jedoch für 30min mit 3% Milchpulver in TBS-T inkubiert werden, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen das nachzuweisende Protein. Dazu wurde der Antikörper in die bereits vorhandene Milchpulver/TBS-T-Lösung im Verhältnis 1:1000 gegeben, und die Membran so für mindestens 1h oder über Nacht inkubiert.

Danach wurde sie dreimal in TBS-T für je 5min gewaschen. Es erfolgte nun die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der sich gegen den primären Antikörper richtete und mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Der Antikörper wurde in 3% Milchpulver in TBS-T im Verhältnis 1:5000 verdünnt, die Inkubation erfolgte für 30-50min. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal in TBS-T für je 5min gewaschen.

Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (3-Aminophthalhydrazid) durch Wasserstoffperoxyd, wodurch 3-Aminophthalsäure und Stickstoff entstehen. Bei dieser Reaktion wird Energie in Form von Licht mit einer Wellenlänge von 425nm freigesetzt (Lumineszenz).

Diese Reaktion wurde auf der Membran mit dem ECL-Kit (Amersham, Braunschweig) durchgeführt. Die Lichtemission konnte durch Auflegen eines Röntgenfilms nachgewiesen werden. Je nach Signalstärke betrug die Belichtungsdauer 30s bis 24h.

Die Filme und gegebenenfalls die Kopien der Ponceau S-Färbungen wurden mit dem HP Scanjet 4070 gescannt, und die Bilder mit einer Bildbearbeitungssoftware (Photoshop® CS v8.0.1) gespeichert.

2.2.5 Histologische Methoden

2.2.5.1 Anfertigen von Gefrierschnitten

Für die histologische Untersuchung von Muskelgewebe wurden unfixierte Gefrierschnitte verwendet. Das Gewebe wurde sofort nach der Entnahme auf Trockeneis in Einbettmedium für Gefrierschnitte eingebettet. Am Kryostat (Jung CM 3000 von Leica, Nussloch) wurden bei einer Objekttemperatur von -11 bis -13°C und einer Kammer-temperatur von -28 bis -30°C Schnitte von 10µm Dicke hergestellt und auf adhäsiv beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach dem Trocknen bei RT wurden die Schnitte direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 Fixierung

Die getrockneten oder aufgetauten Schnitte wurden bei RT für 10min in Paraformaldehyd (4% in PBS) fixiert und dann dreimal hintereinander für je 5min in PBS gespült. Anschließend wurden sie sofort gefärbt.

2.2.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist ein Standardverfahren in der Lichtmikroskopie, bei dem die basophilen Zell- und Gewebestrukturen (z.B. das Chromatin der Zellkerne) blau-violett, alle azidophilen Bestandteile (z.B. Zytoplasma und die meisten Interzellulärsubstanzen) rot angefärbt werden (114). Die Schnitte wurden nach folgendem Schema gefärbt und entwässert:

Hämatoxylin-Lösung (4g/l)	60s
3x Aqua dest.	je 10s
Leitungswasser	30s
Eosin G-Lösung (0,5% wässrig)	10s
Aqua dest.	10s
70% Ethanol	10s
2x 80% Ethanol	je 10s
2x 95% Ethanol	je 10s
2x 100% Ethanol	je 10s
2x Xylol	je 10min

Nach kurzem Trocknen wurden die Schnitte mit 10% Glycerin in PBS als Einschlussmittel eingedeckt und versiegelt.

2.2.5.4 Histologische Analyse

Die histologischen Präparate wurden mit Hilfe des Lichtmikroskops Axioskop 40 der Firma Zeiss (Jena) begutachtet. Sie wurden dann mit einer Digitalkamera (DS6031 von Canon, Tokyo) fotografiert, und die Bilder mit einer Bildbearbeitungssoftware (Photoshop® CS v8.0.1) gespeichert.

