

3 Ergebnisse

3.1 rt-PCR

Das Expressionsverhalten der Isoformen des Natrium-Protonen-Austauschers am Rattenmyokard im Vergleich Infarkt- und Kontrolltiere wurde mittels rt-PCR der Gesamt-RNA analysiert. Aus dem Infarkt- und Kontrollmyokard wurde die RNA zum gleichen Zeitpunkt isoliert und die jeweils gleiche Menge RNA eingesetzt. Als Kontrolle für die verschiedenen Isoformen diente die RNA aus den Geweben, in denen sie am stärksten exprimiert wurde (90).

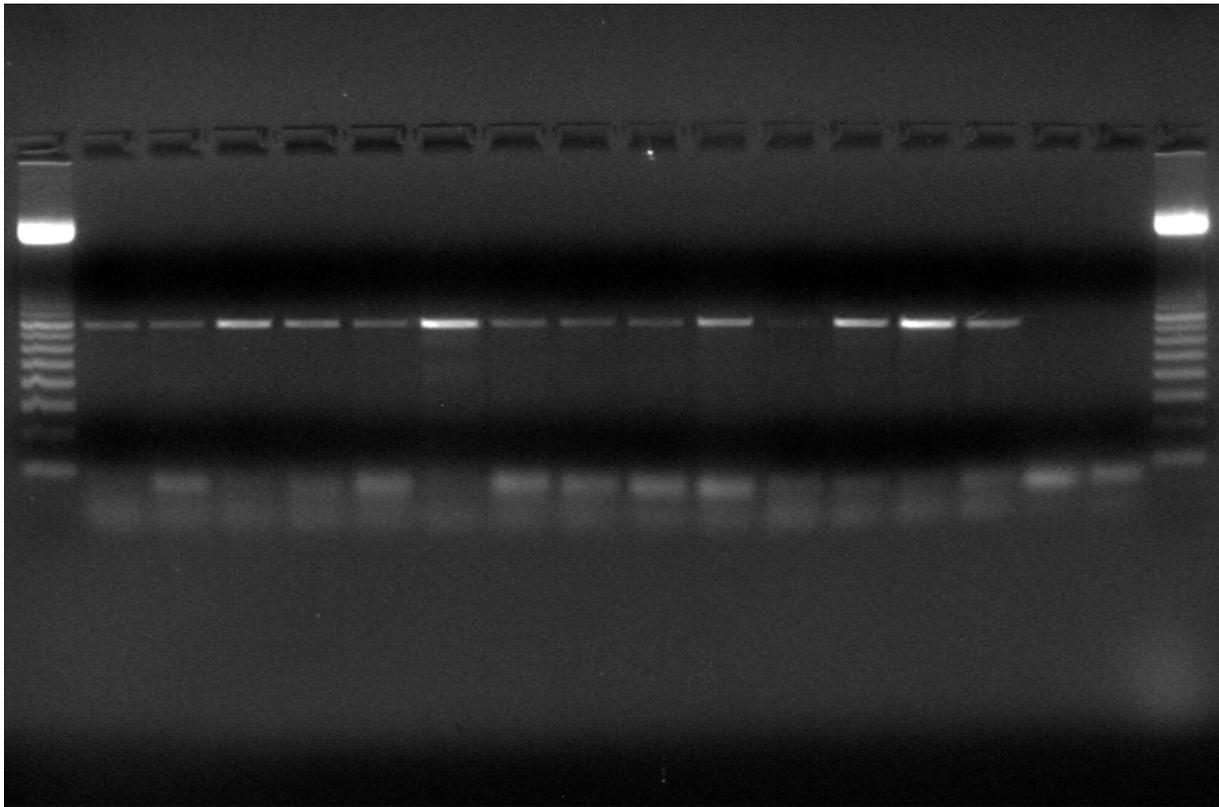
Die qualitative rt-PCR-Analyse diente dem, festzustellen, welche Isoformen des Natrium-Protonen-Austauschers im Myokard exprimiert werden. Bei jeder PCR gab es zwei positive Kontrollen und eine Wasserprobe. Nur bei positivem Signal in der Positiv-Kontrolle und negativem Signal in der Wasserprobe wurde die PCR ausgewertet. Die Größe der amplifizierten Fragmente wurde anhand einer 100 bp DNA-Leiter verifiziert.

Isoform	Kontrollgewebe
rNHE-1	überall vorkommend
rNHE-2	Gastrointestinaltrakt
rNHE-3	Niere
rNHE-4	Gehirn

3.1.1 rt-PCR von rNHE-1

Bei der qualitativen rt-PCR-Analyse von rNHE-1 wurde die Zyklenzahl von 36 Zyklen mit einem computergestützten Bildanalyseverfahren (*NIH-Image*) als optimal verifiziert. Die

Hybridisierungstemperatur von 62°C ergab spezifische Banden. Auf dem nachfolgenden Bild sind die 100 bp DNA-Leitern links und rechts außen zu sehen. Die Proben 1 bis 14 sind zwischen den Basenpaarleitern von links nach rechts dargestellt und entsprechen den Versuchstieren 1 bis 14. Das rNHE-1 hat eine Länge von 777 bp. Danach schließen sich noch 2 Wasserproben mit negativem Signal an.

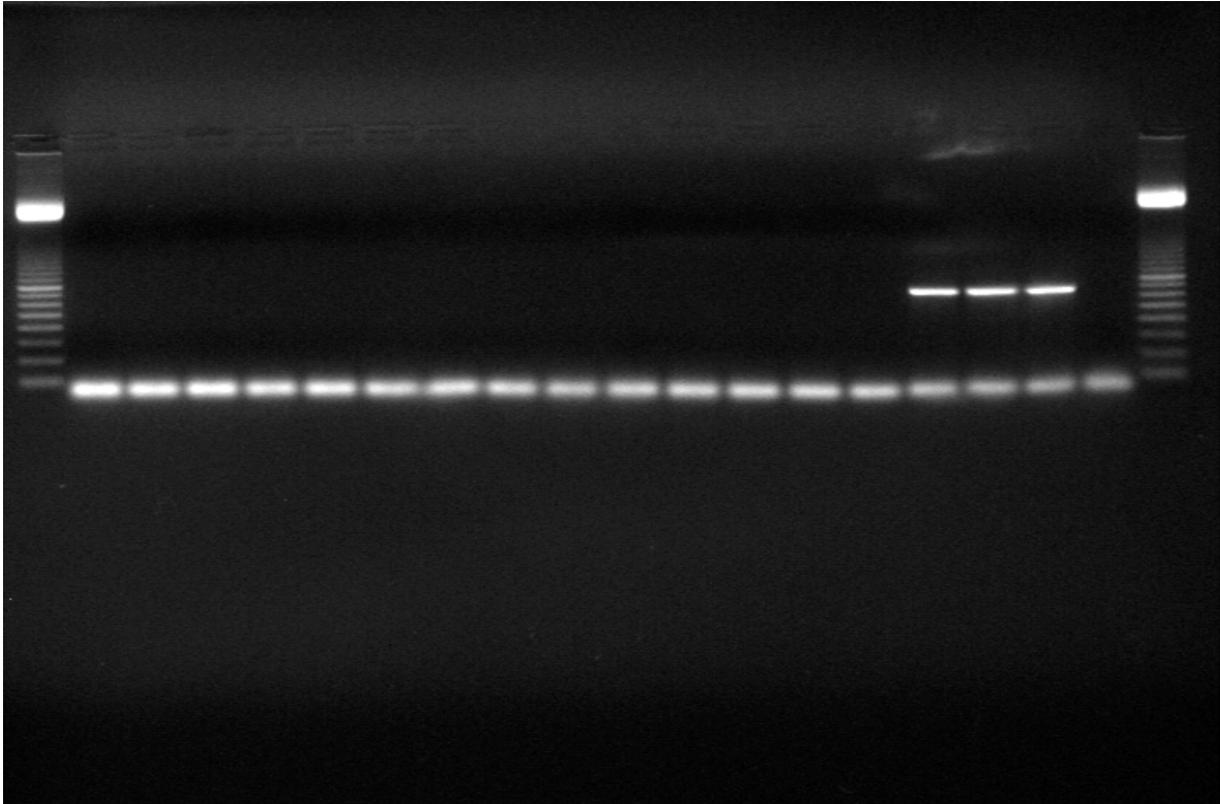


Die rt-PCR von rNHE-1 ergab, dass rNHE-1 sowohl im Infarktmyokard als auch im Kontrollmyokard exprimiert wird. Es ist nicht möglich, eine quantitative Aussage zu machen.

3.1.2 rt-PCR von rNHE-2

Die rt-PCR von rNHE-2 wurde mit 45 Zyklen durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur betrug 56°C. Die Proben 1 bis 14 sind zwischen den 100 bp Basenpaarleitern von links nach rechts dargestellt und entsprechen den Versuchstieren 1 bis 14. Die rNHE-2-Probe hat eine

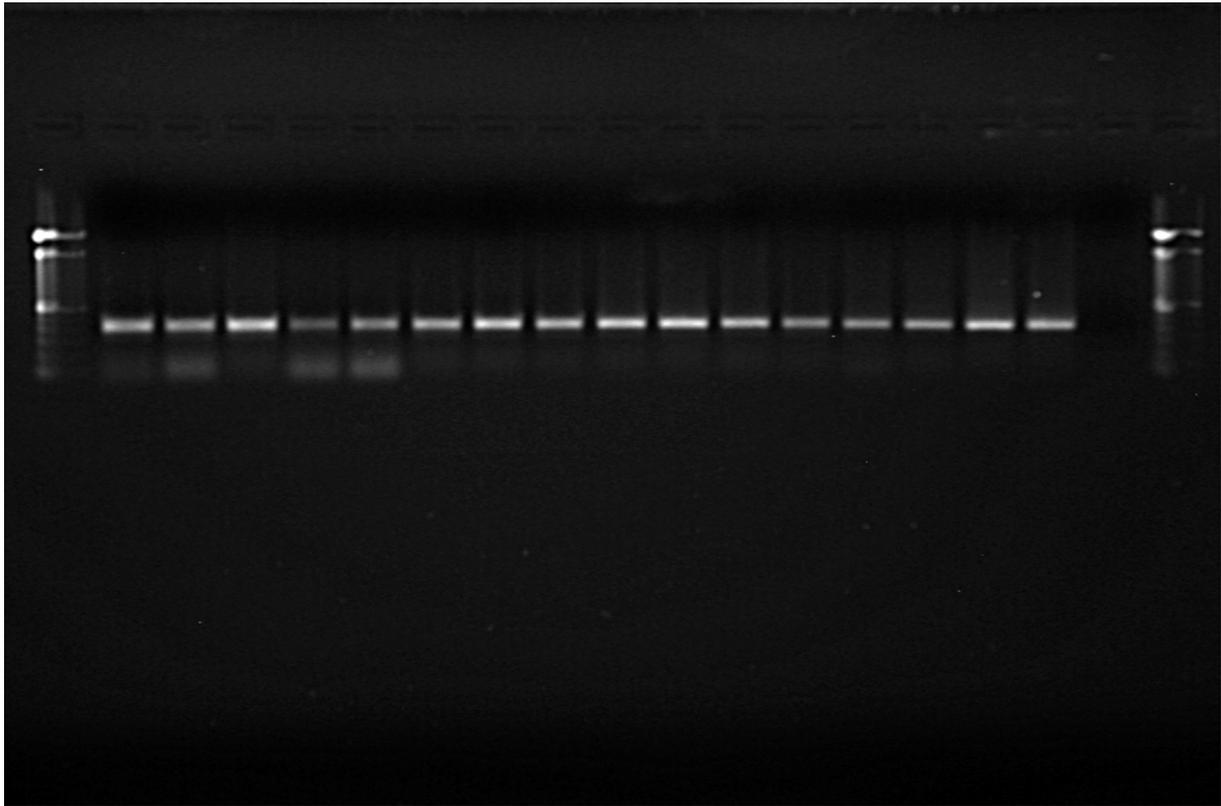
Länge von 704 bp. Als Positivkontrolle ist anschließend dreimal eine Probe aus Dünndarm-cDNA zu sehen, als Negativkontrolle H₂O.



Die rt-PCR von rNHE-2 ergab, dass rNHE-2 weder im Infarktmyokard noch im Kontrollmyokard exprimiert wird. Die zum gleichen Zeitpunkt durchgeführte rt-PCR vom Kontrollgewebe (Dünndarm) zeigte jeweils eine deutliche Bande. Somit lässt sich feststellen, dass die Isoform rNHE-2 im Rattenmyokard nicht exprimiert wird.

3.1.3 rt-PCR von rNHE-3

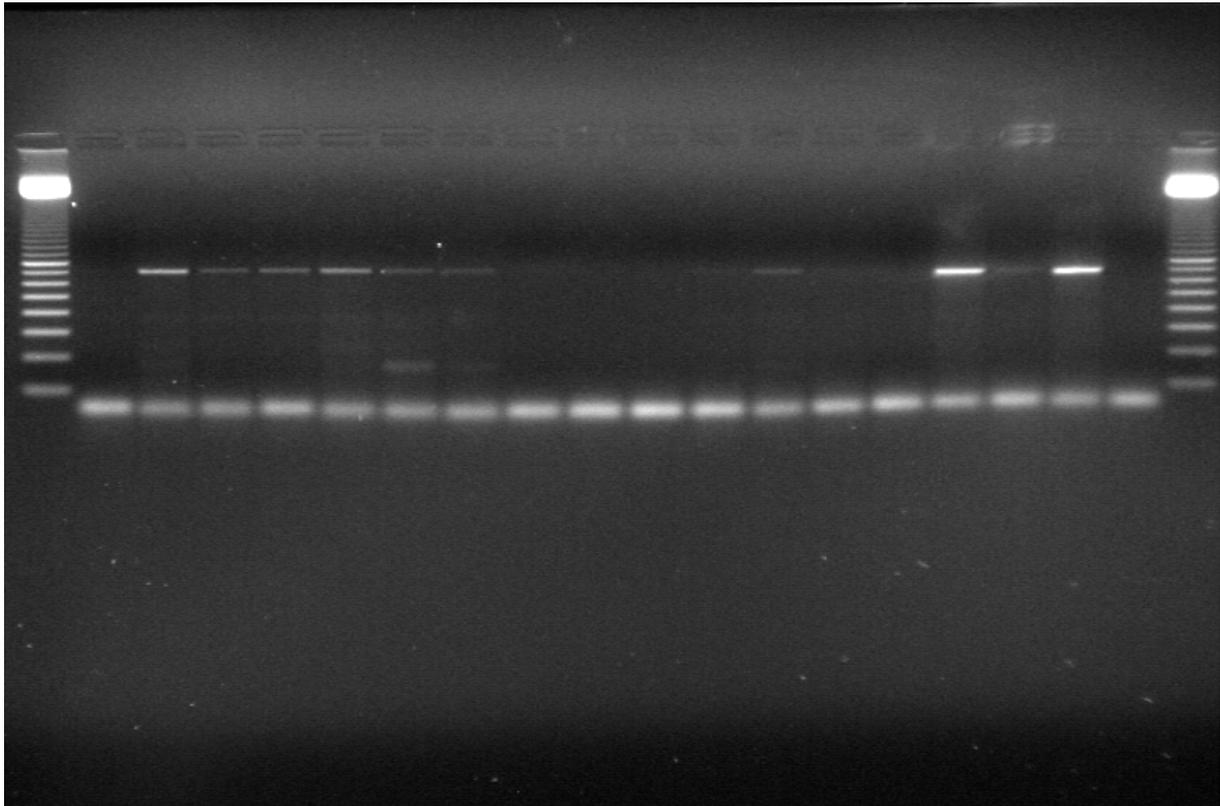
Die rt-PCR von rNHE-3 wurde mit 45 Zyklen durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur betrug 60°C. Die Proben 1 bis 14 sind zwischen den 100 bp Basenpaarleitern von links nach rechts dargestellt und entsprechen den Versuchstieren 1 bis 14. Das rNHE-3-Amplifikat hat eine Länge von 408 bp. Als positive Kontrolle ist anschließend zweimal die Nieren-cDNA zu sehen, als Negativkontrolle H₂O.



Die rt-PCR von rNHE-3 ergab, dass rNHE-3 sowohl im Infarktmyokard als auch im Kontrollmyokard exprimiert wird. Mit Hilfe der rt-PCR ist es nicht möglich, eine Aussage über eine unterschiedliche Expression zu machen.

3.1.4 rt-PCR von rNHE-4

Bei der rt-PCR von rNHE-4 wurde die Zyklenzahl von 40 Zyklen als optimal erruiert. Die Hybridisierungstemperatur betrug 56°C. Die Proben 1 bis 14 sind zwischen den 100 bp Basenpaarleitern von links nach rechts dargestellt und entsprechen den Versuchstieren 1 bis 14. Das rNHE-4 hat eine Länge von 704 bp. Als Positivkontrolle diente die Gehirn-cDNA, als Negativkontrolle H₂O.



Die diagnostische rt-PCR von rNHE-4 ergab, dass rNHE-4 sowohl im Infarktmyokard als auch im Kontrollmyokard exprimiert wird. Es scheint, dass die Expression von rNHE-4 im Infarktmyokard höher ist, als im Kontrollmyokard. Eine definitive quantitative Aussage ist mit Hilfe der qualitativen rt-PCR nicht möglich.

3.2 Klonierung der Sonden für die *in situ* Hybridisierung

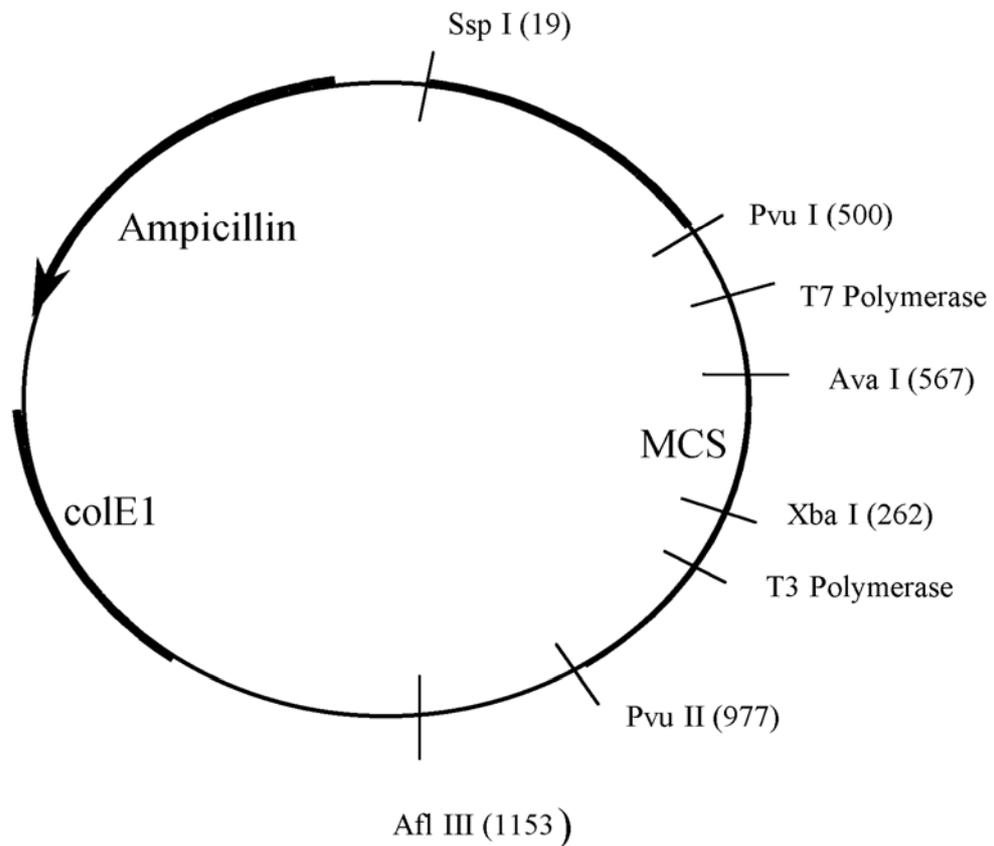
Die cDNAs wurden durch rt-PCR amplifiziert. Dafür wurde die pfu-Polymerase, eine sogenannte high-fidelity-Polymerase mit sehr geringen Amplifikationsfehlern, benutzt. Das PCR-Produkt wurde anschließend in einen Plasmidvektor (pCR-Script Amp SK + Plasmid) subkloniert. Der Vektor enthält neben dem Resistenzgen für Ampicillin, das eine Selektion auf dem ampicillinhaltigen Nährböden erlaubt, eine *multiple cloning site* (MCS), die mehrere Schnittstellen für Restriktionsenzyme aufweist sowie die Bindungsstellen für die T3- und die T7-Polymerase. Das Plasmid hat, ohne das Insert, eine Länge von 2961 bp. Die Schnittstellen

der Restriktionsenzyme, die in den Karten eingezeichnet sind, helfen bei der Feststellung, ob es sich um die Sense- oder die Antisense-Sonde handelt.

3.2.1 rNHE-1

pCR-Script Amp SK(+) Plasmid

Länge 2961bp



rNHE-1, basen 353-1107 (777 bp)

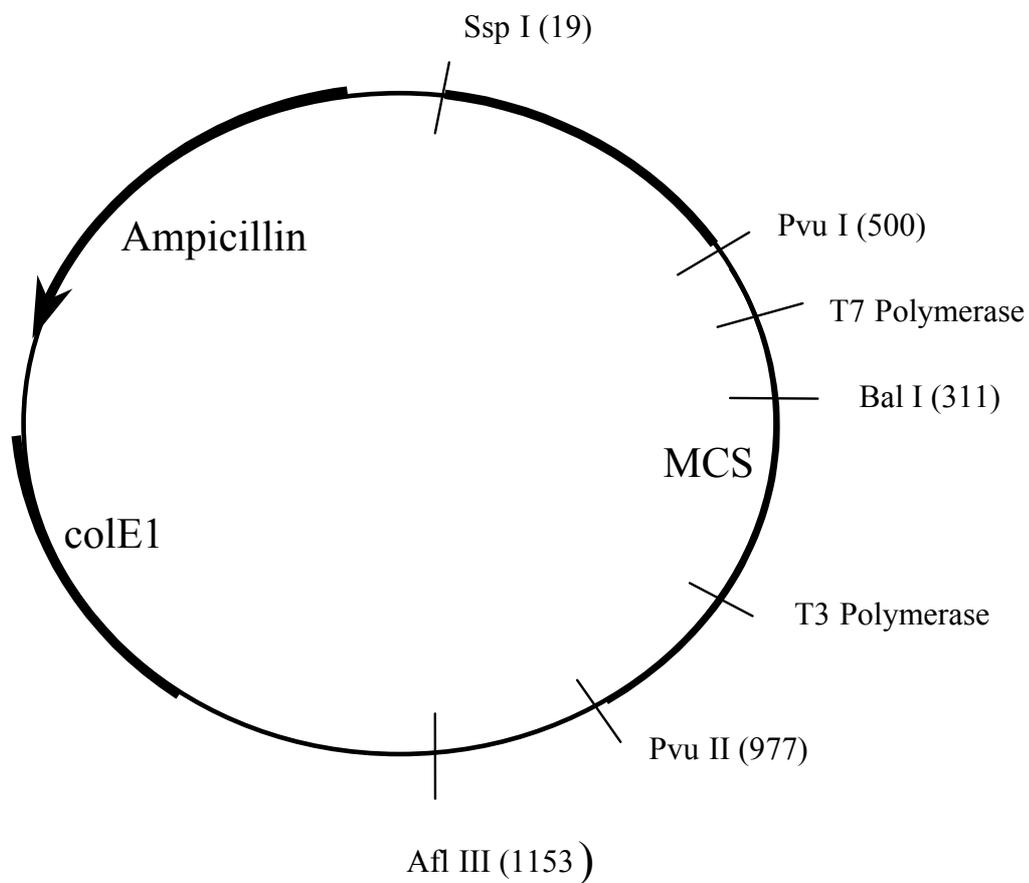
Sense: Eco R I + T3 Polymerase

Antisense: Sac I + T7 Polymerase

3.2.2 rNHE-3

pCR-Script Amp SK(+) Plasmid

Länge 2961bp

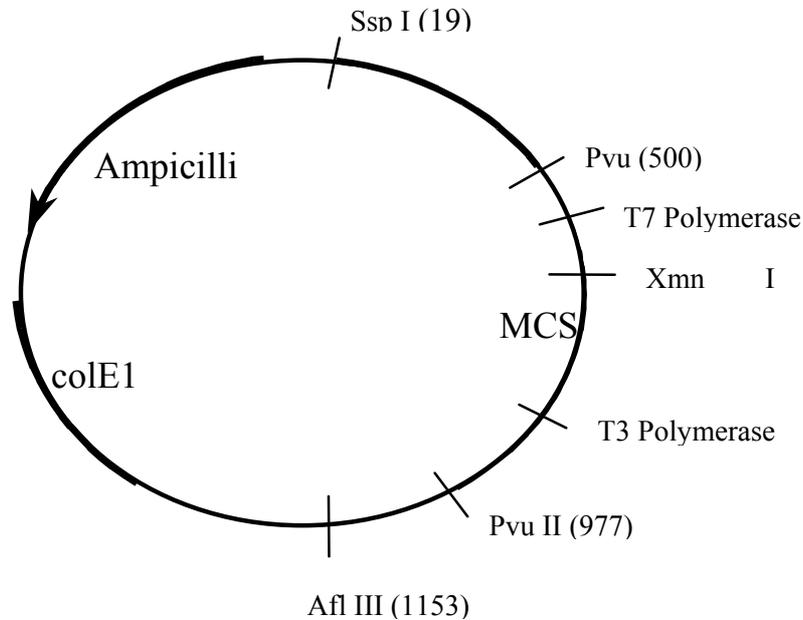


rNHE-3, basen 699-1107 (408 bp)

Sense: EcoR I + T3 Polymerase**Antisense: Sac I + T7 Polymerase**

3.2.3 rNHE-4

pCR-Skript Amp SK (+)
Länge 2961bp



rNHE-4, basen 1766-2469 (704 bp)
Sense: Sac I + T7 Polymerase
Antisense: EcoR I + T3 Polymerase

3.3 In situ Hybridisierung

Mit Hilfe der in situ Hybridisierung kann die Expression der mRNA des Natrium-Protonen-Austauschers direkt auf dem zu untersuchenden Gewebe dargestellt werden. Hierfür wurden Gefrierschnitte des Rattenmyokards verwendet.

Die Auswertung erfolgte durch Zählung der Silberkörner und der Zellkerne. Es wurden 5-10 zufällig ausgewählte Ausschnitte bei 800 facher Vergrößerung analysiert. Angegeben wurde die Anzahl der Silberkörner pro Zellkern, wobei das Sense-Signal als unspezifischer Hintergrund vom Antisense-Signal subtrahiert wurde. Die Expression der Kontrolle wurde 100% gesetzt. * = $p < 0,05$.

3.3.1 Fotografische Darstellung der rNHE-1-Ergebnisse

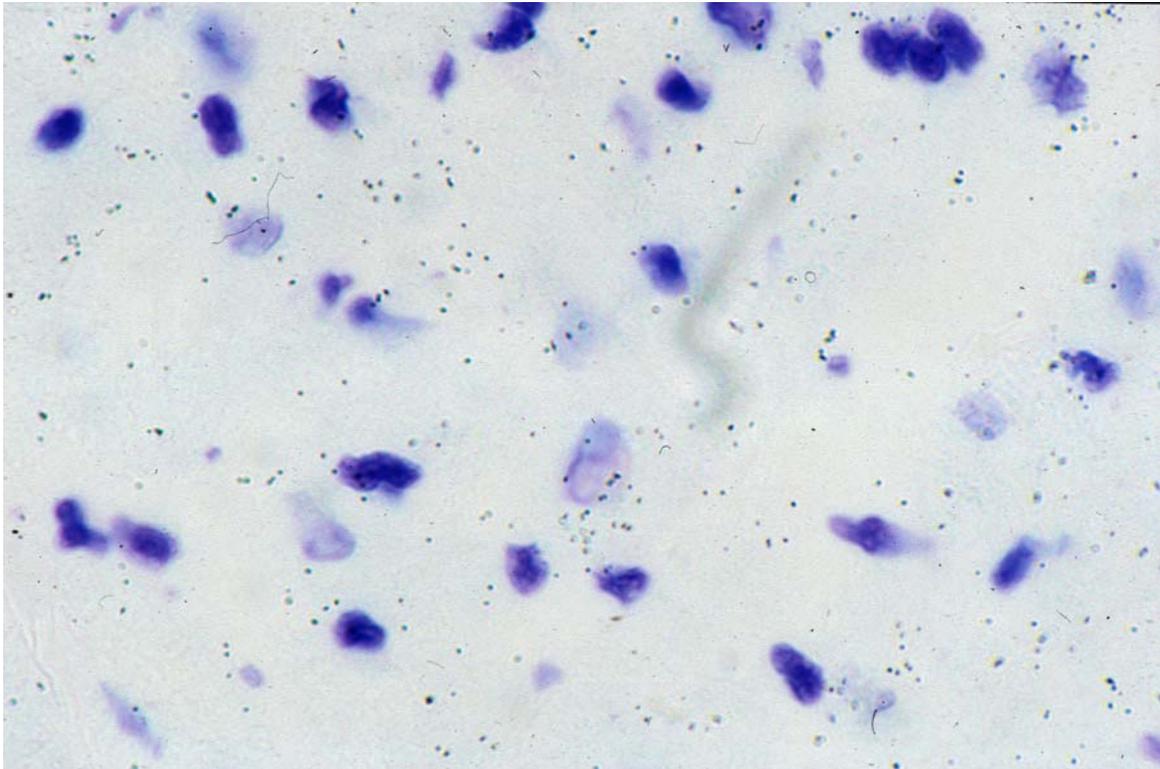


Abb. 6: rNHE-1, Myokardinfarkt, 3 h post OP

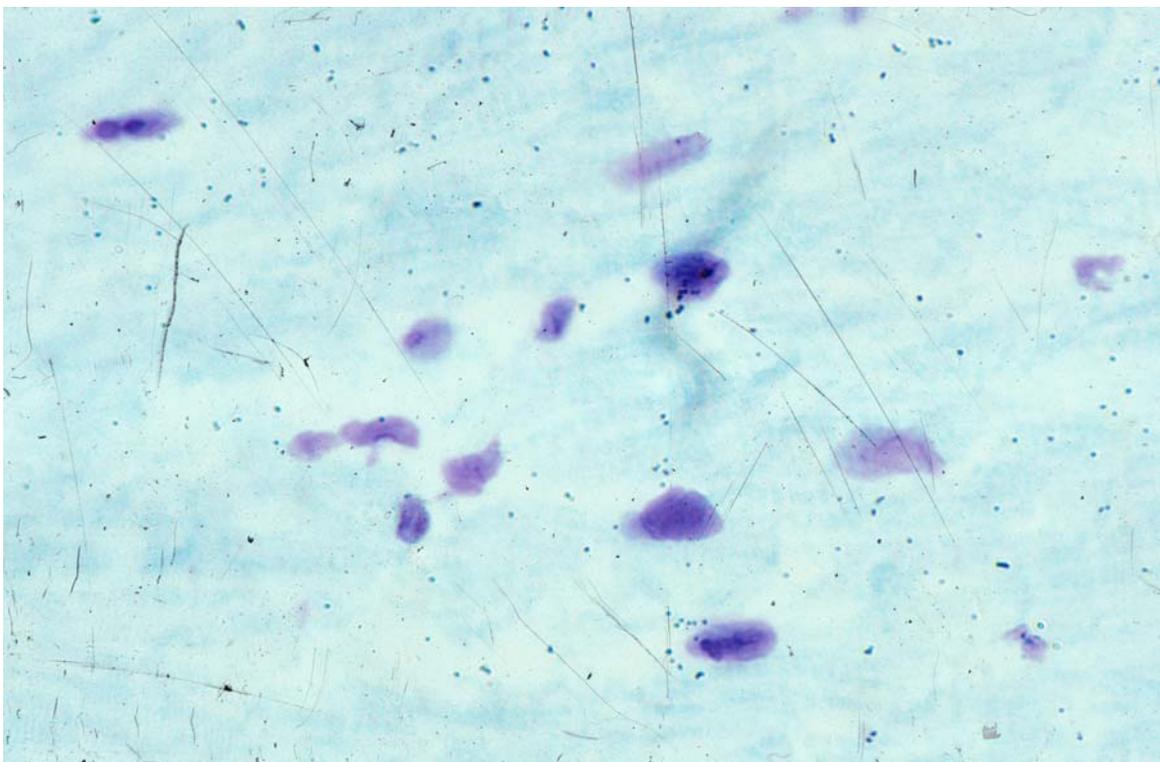


Abb. 7: rNHE-1, Kontrolltier, 3 h post OP

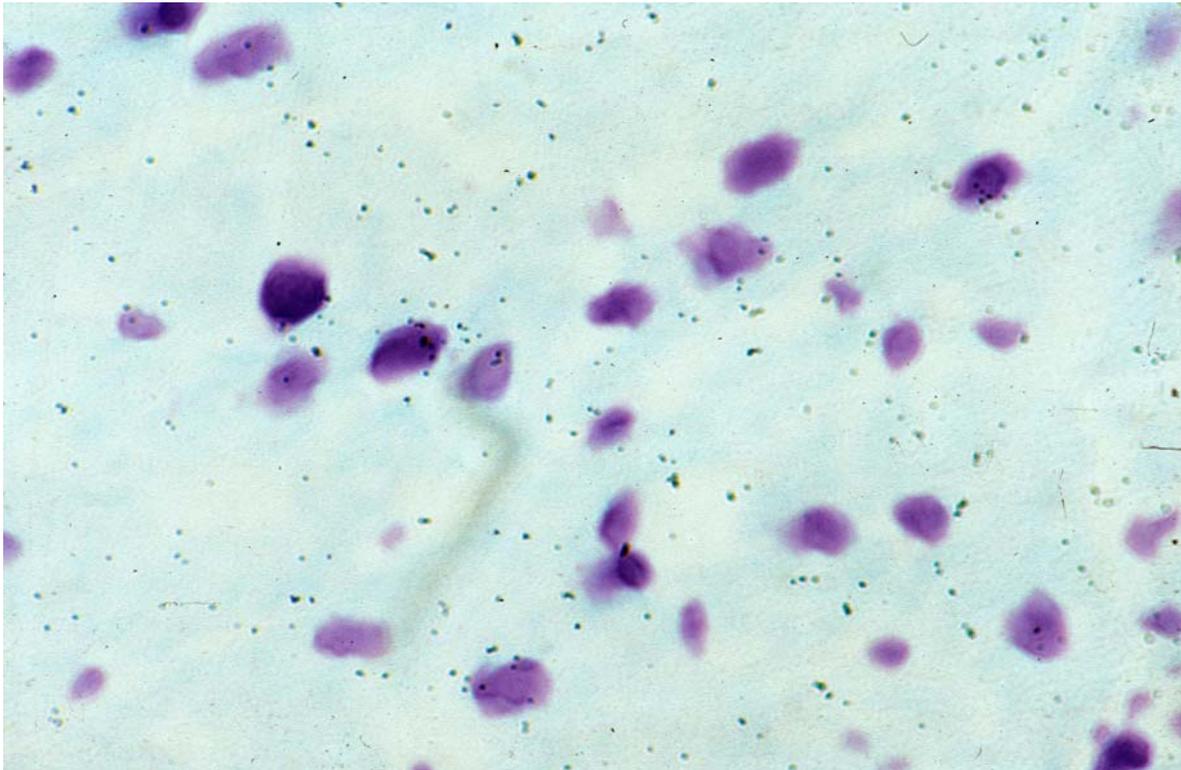


Abb. 8: rNHE-1, Myokardinfarkt, 6 h post OP

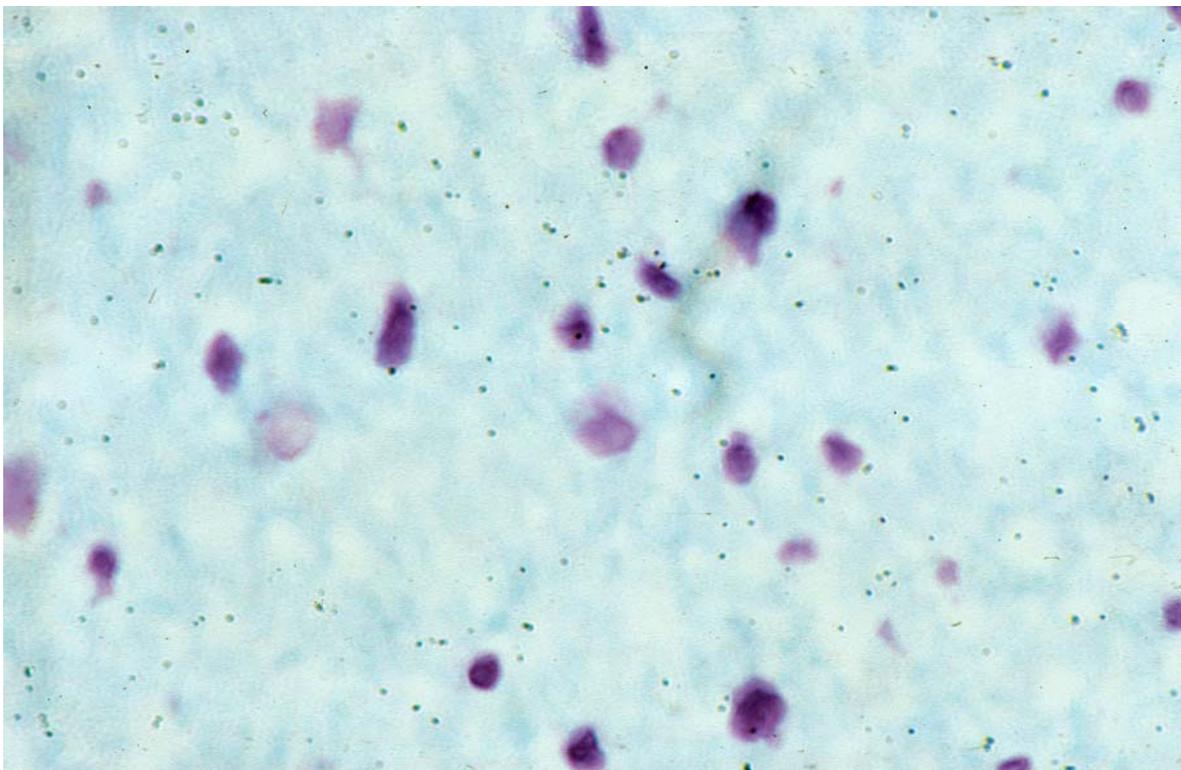


Abb. 9: rNHE-1, Kontrolltier, 6 h post OP

3.3.2 Fotografische Darstellung der rNHE-3-Ergebnisse

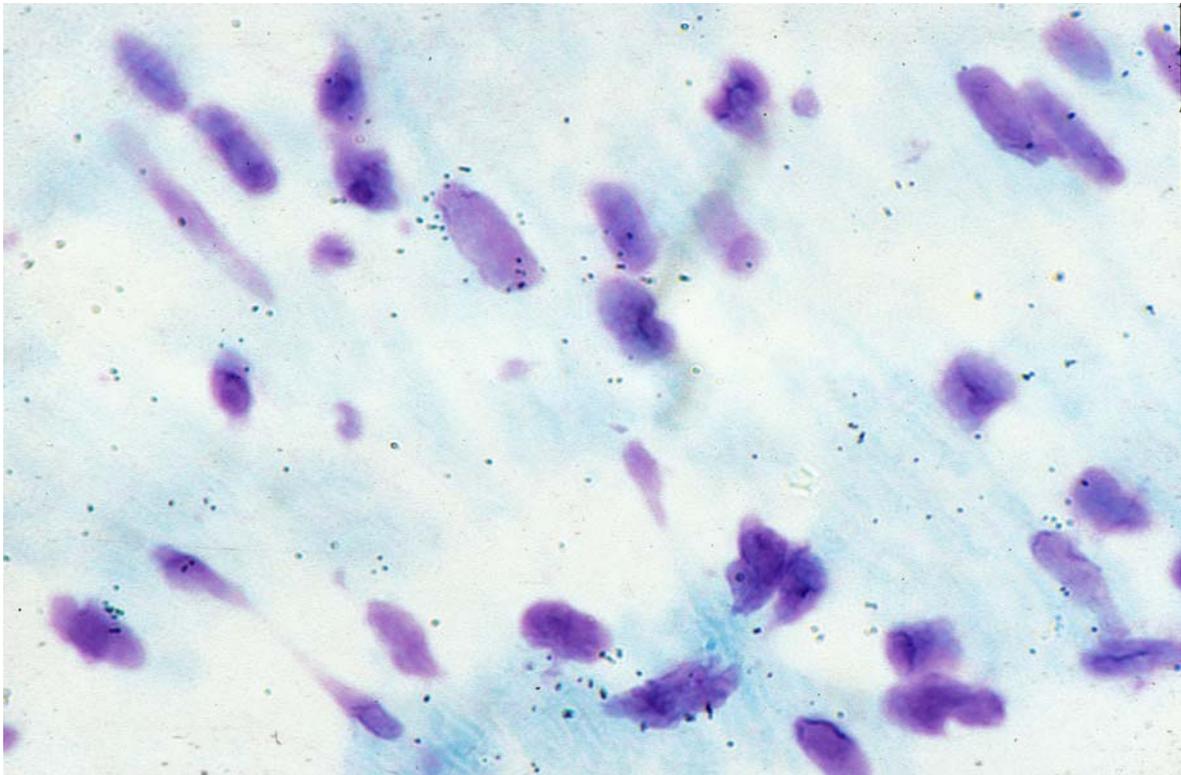


Abb. 10: rNHE-3, Myokardinfarkt, 30 min post OP

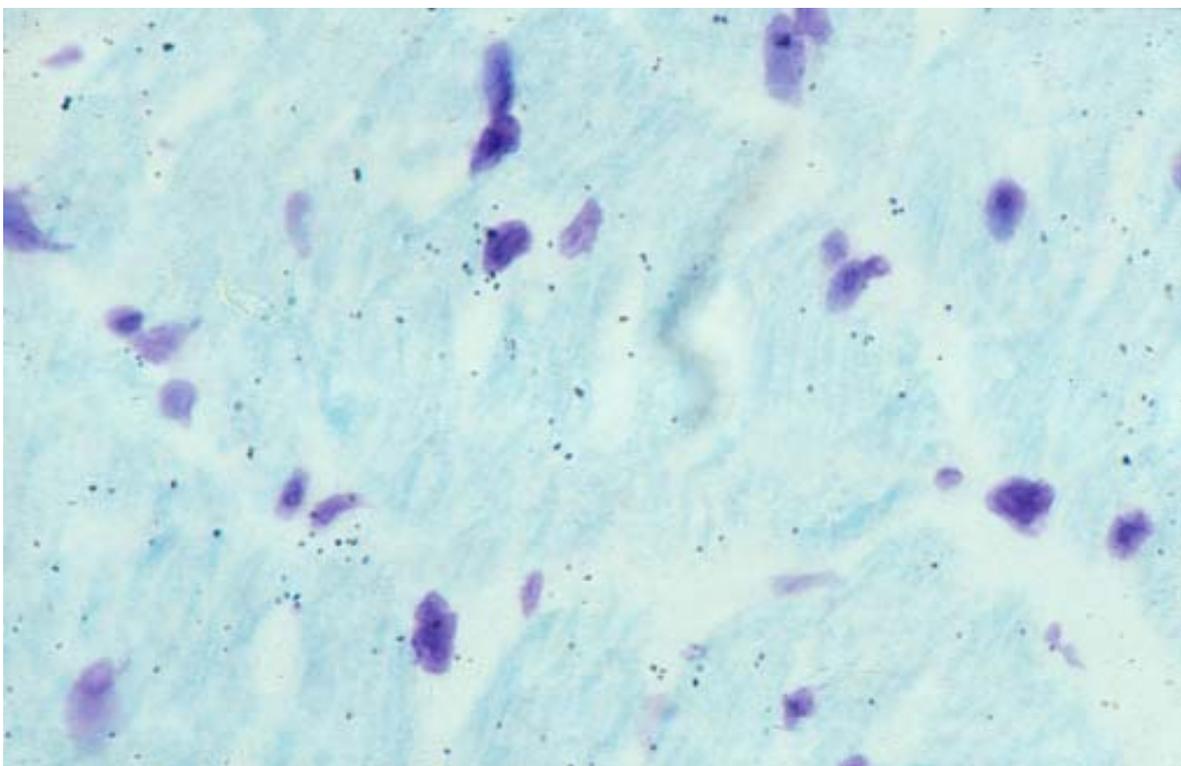


Abb. 11: rNHE-3, Kontrolltier, 30 min post OP

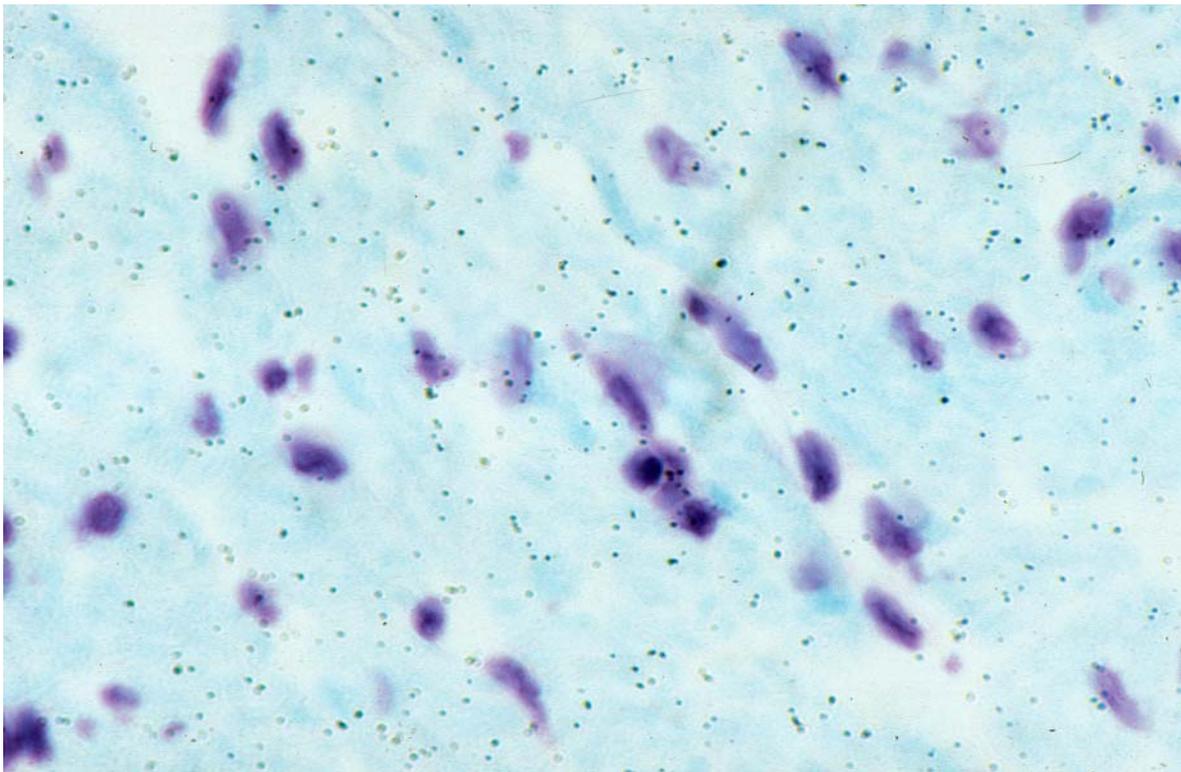


Abb. 12: rNHE-3, Myokardinfarkt, 3 h post OP

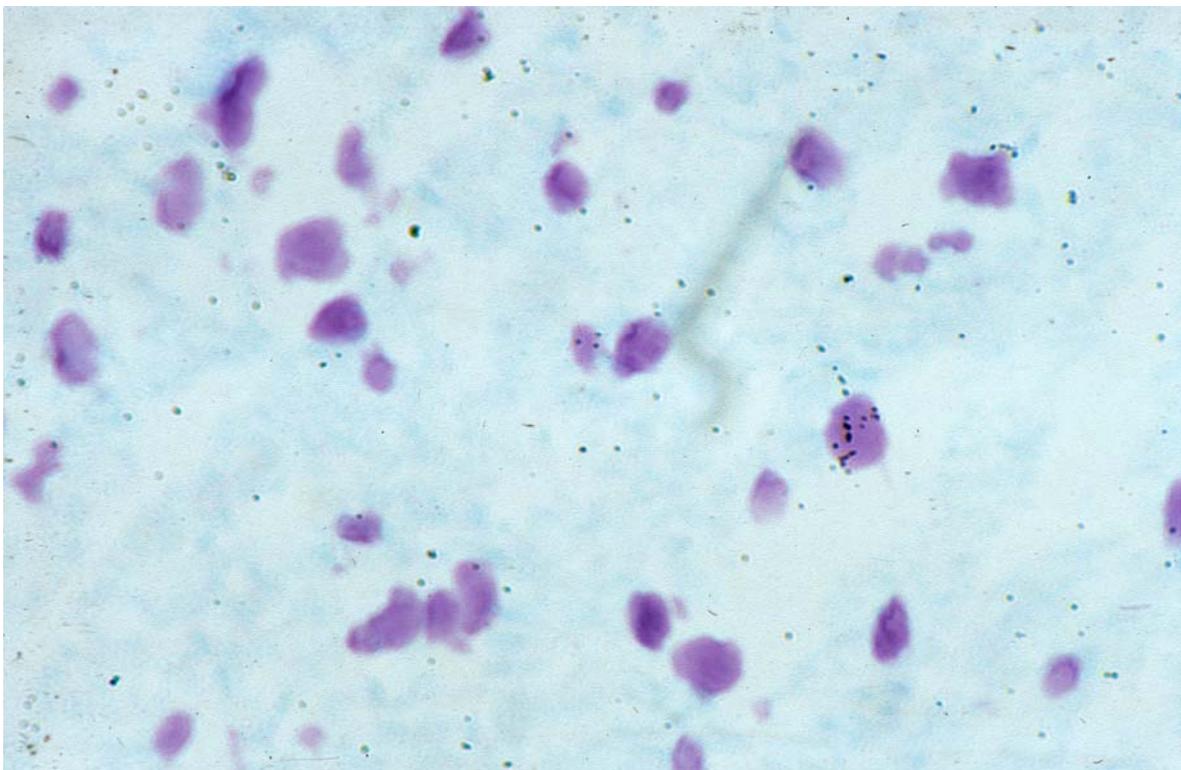


Abb. 13: rNHE-3, Kontrolltier, 3 h post OP

3.3.3 Fotografische Darstellung der rNHE-4-Ergebnisse

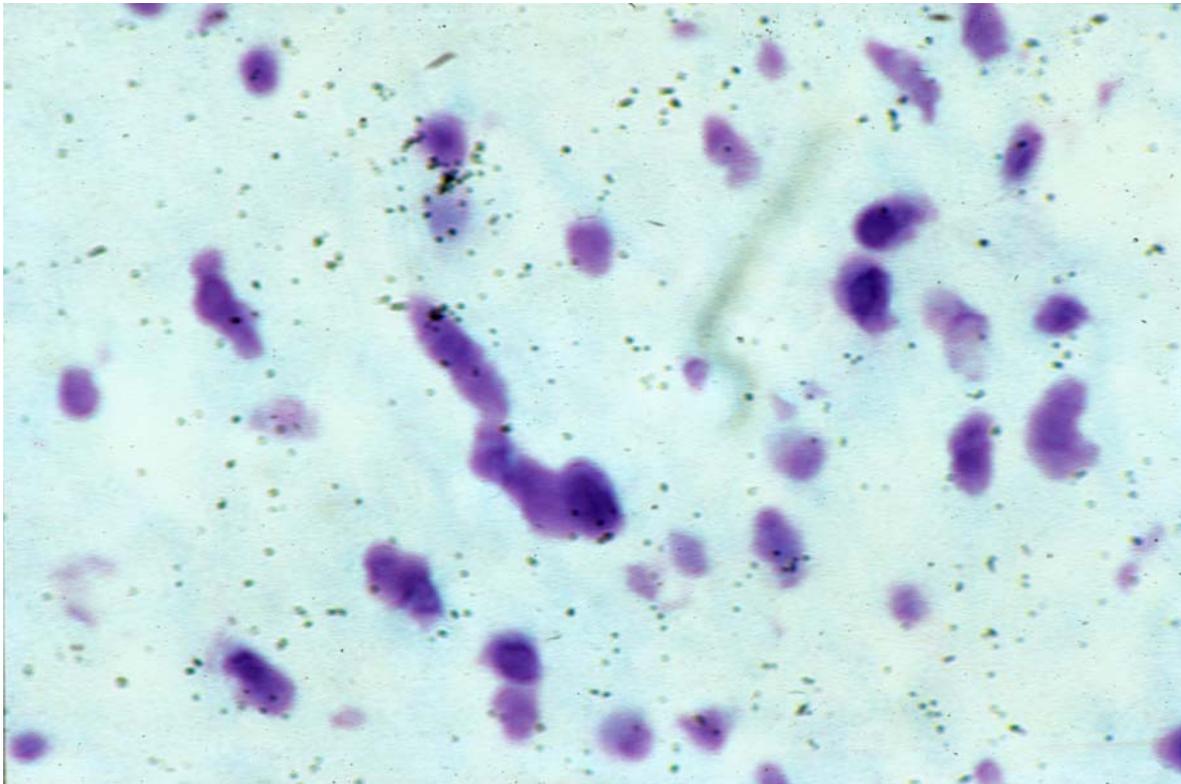


Abb. 14: rNHE-4, Myokardinfarkt, 30 min post OP

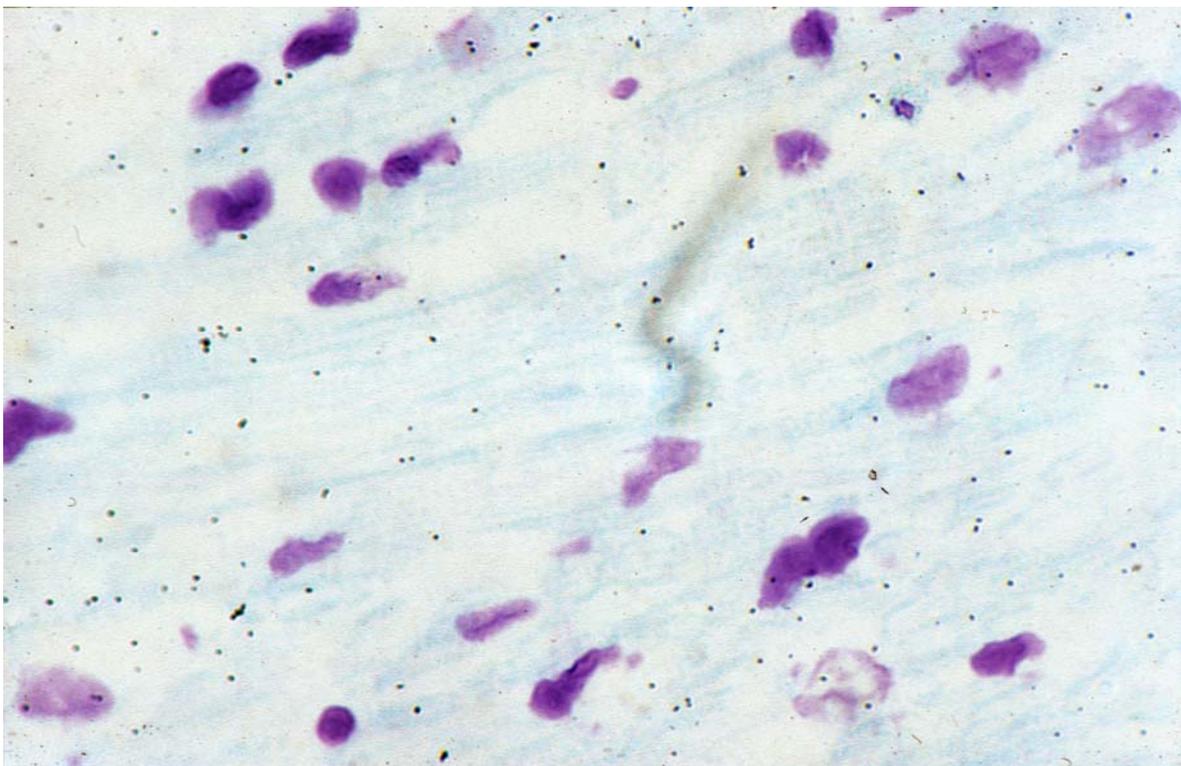


Abb. 15: rNHE-4, Kontrolltier, 30 min post OP

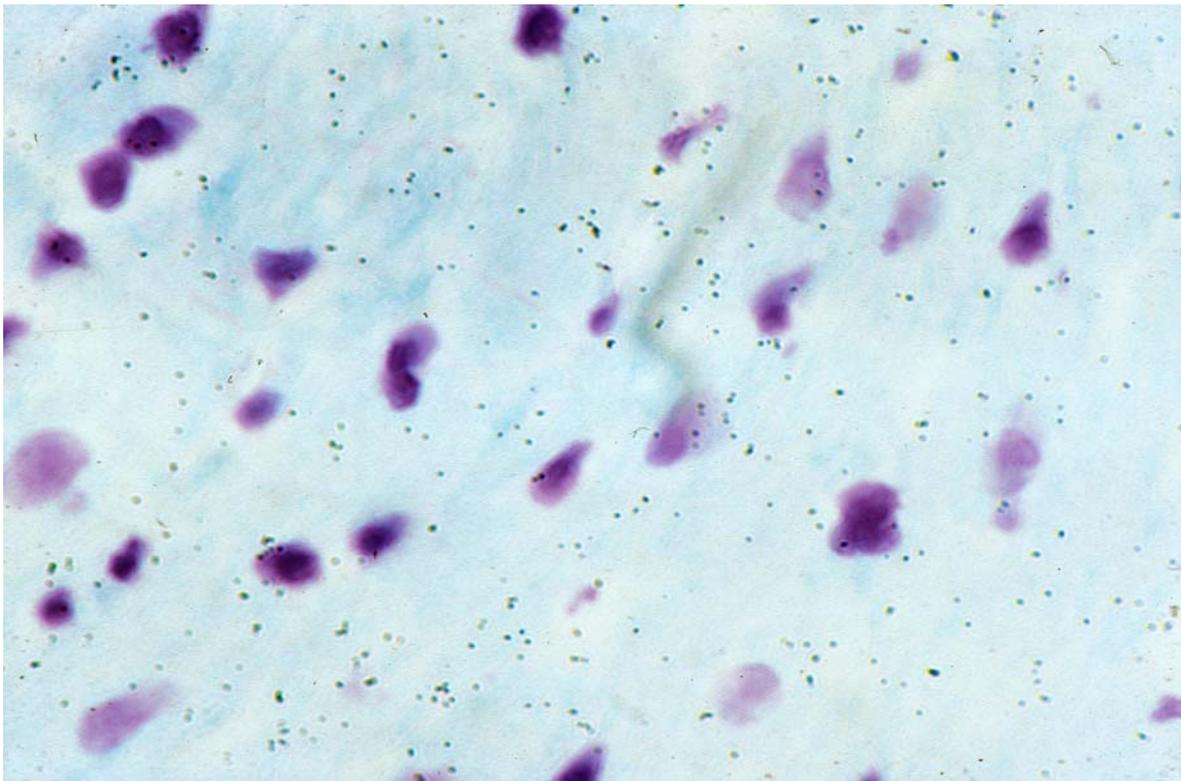


Abb. 16: rNHE-4, Myokardinfarkt, 7 d post OP

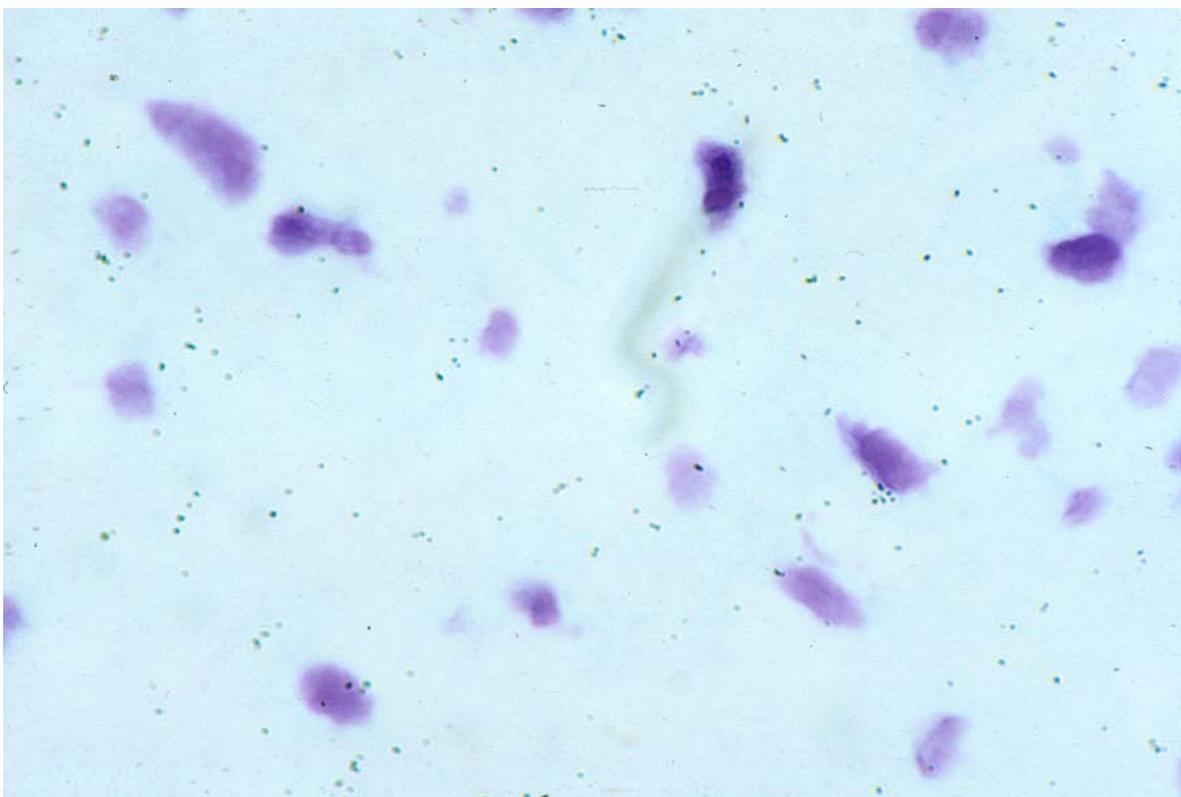
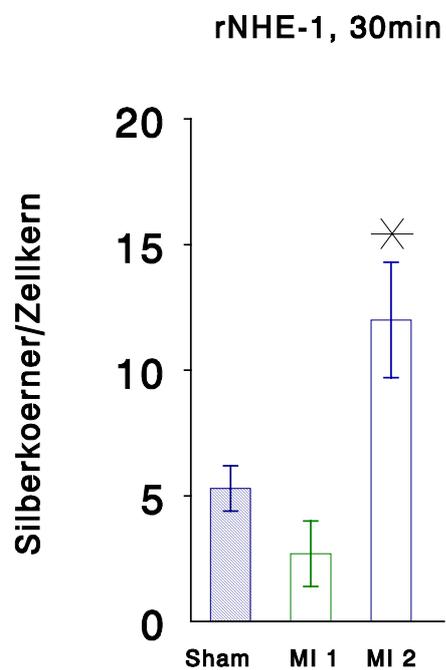
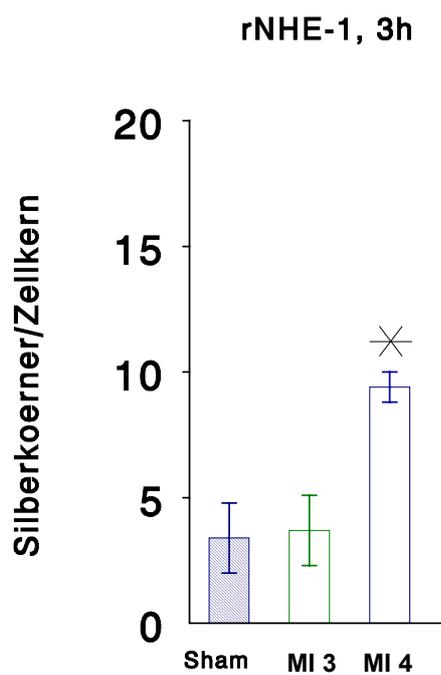


Abb. 17: rNHE-4, Kontrolltier, 7 d post OP

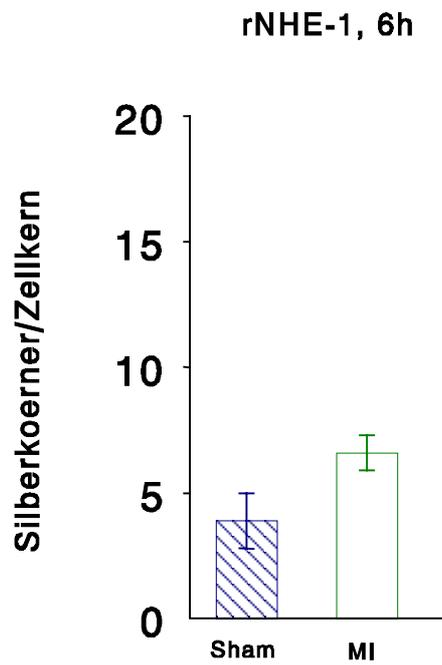
3.3.4 Graphische Darstellung der rNHE-1 - Ergebnisse



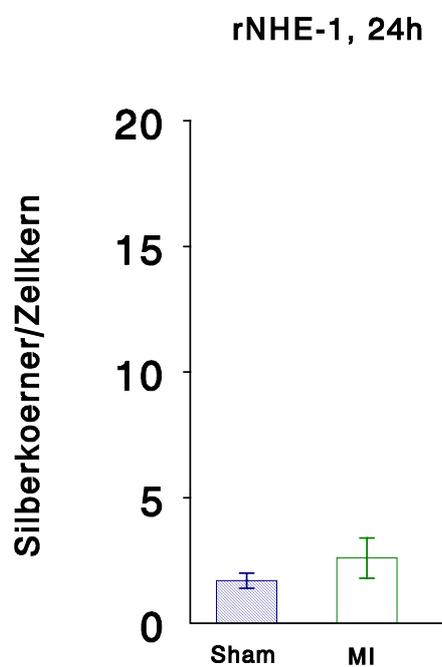
Mittelwerte \pm SEM, n = 10, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert



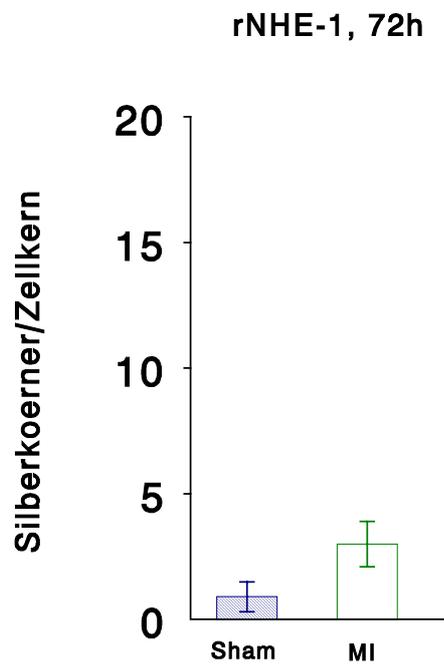
Mittelwerte \pm SEM, n = 5, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert



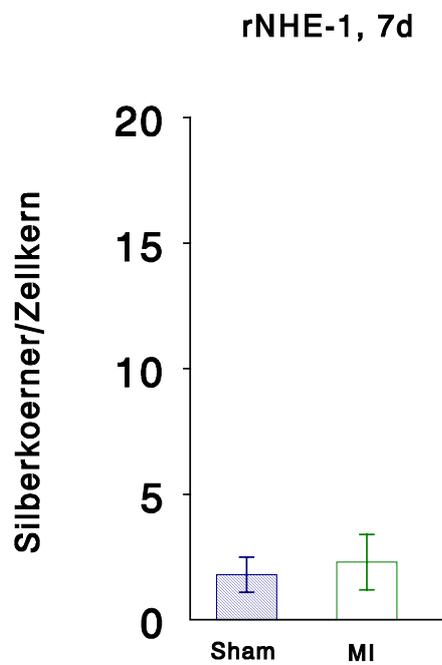
Mittelwerte \pm SEM, n = 5, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert



Mittelwerte \pm SEM, n = 5, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert

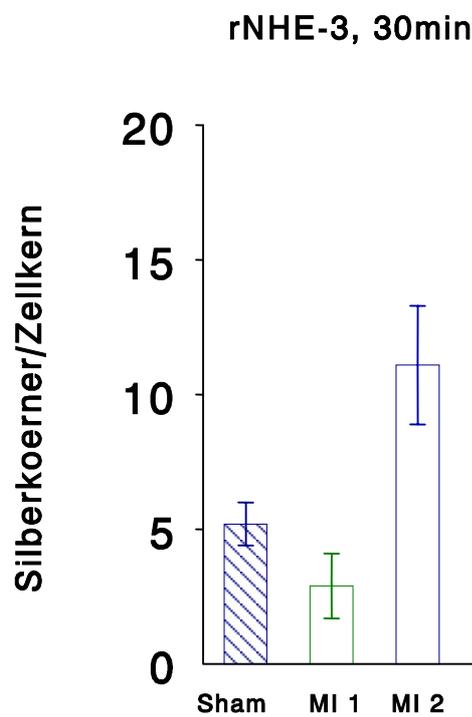


Mittelwerte \pm SEM, n = 5, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert

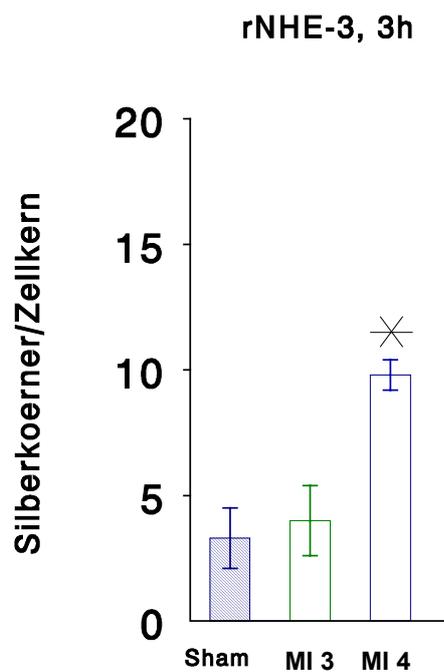


Mittelwerte \pm SEM, n = 5, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert

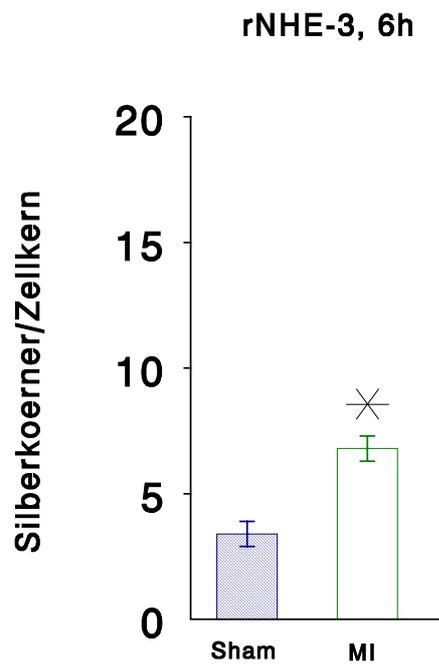
3.3.5 Graphische Darstellung der rNHE-3 – Ergebnisse



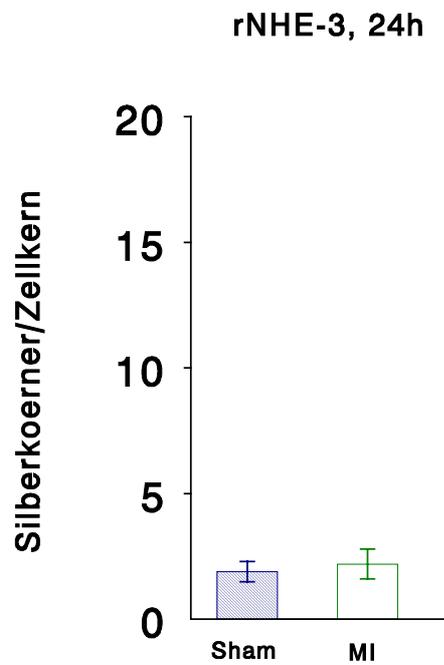
Mittelwerte \pm SEM, n = 5, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert



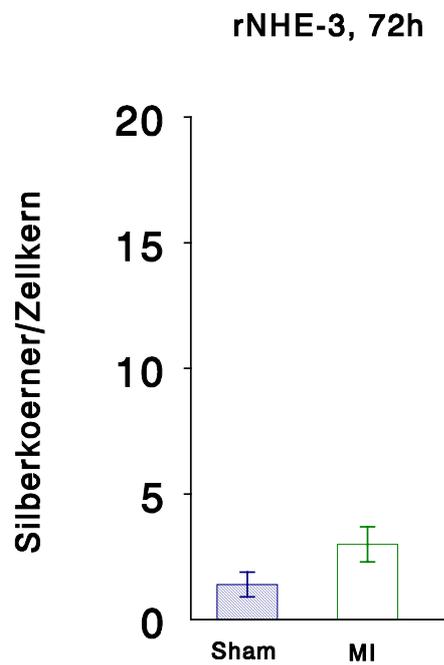
Mittelwerte \pm SEM, n = 5, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert



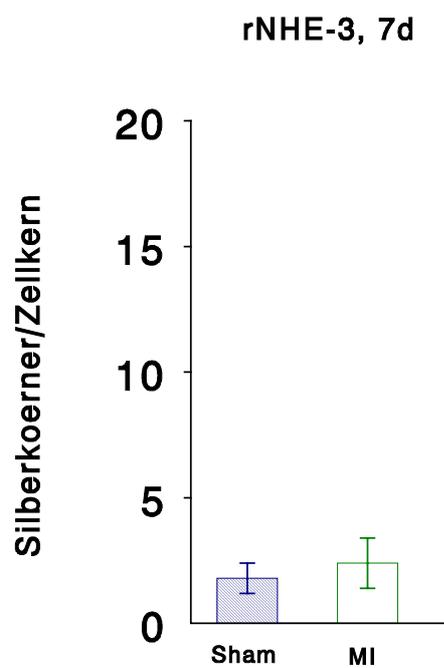
Mittelwerte \pm SEM, n = 5, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert



Mittelwerte \pm SEM, n = 5, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert

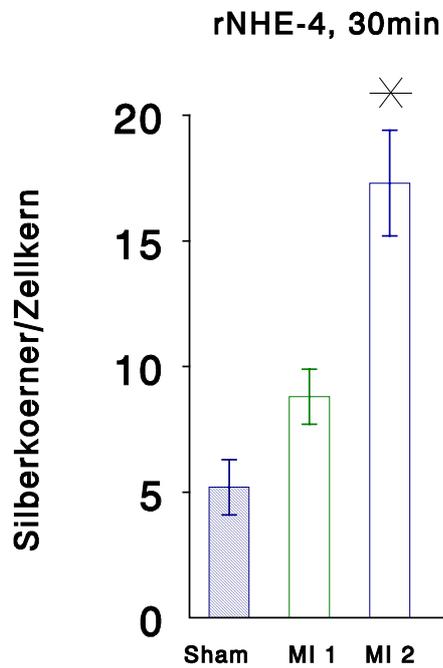


Mittelwerte \pm SEM, n = 5, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert

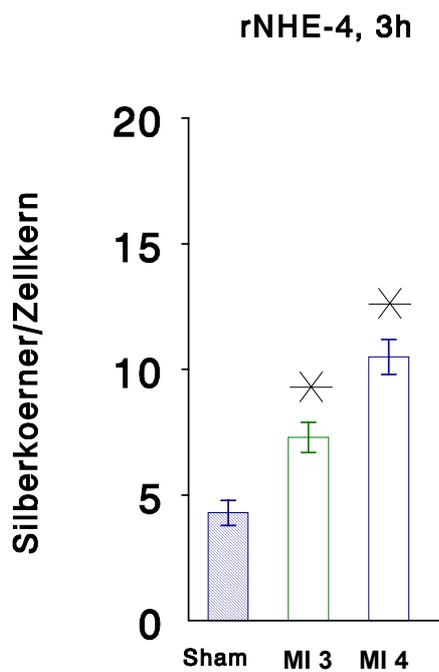


Mittelwerte \pm SEM, n = 5, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert

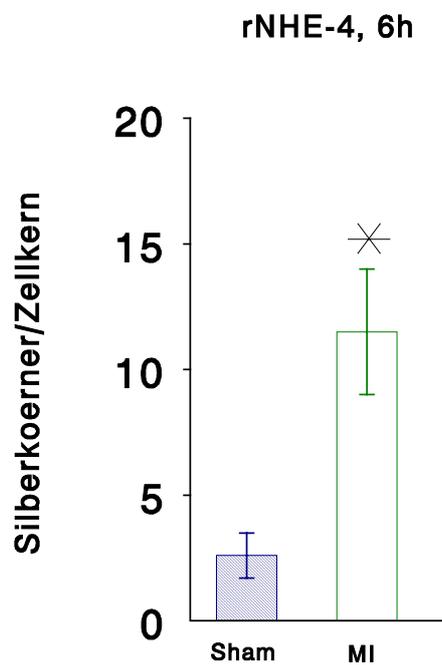
3.3.6 Graphische Darstellung der rNHE-4 - Ergebnisse



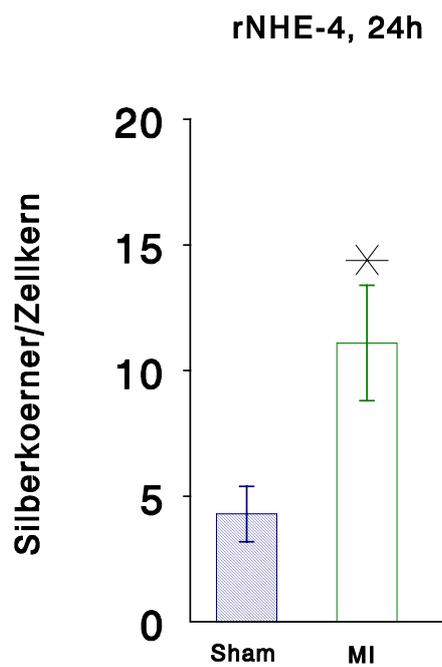
Mittelwerte ± SEM, n = 15, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert



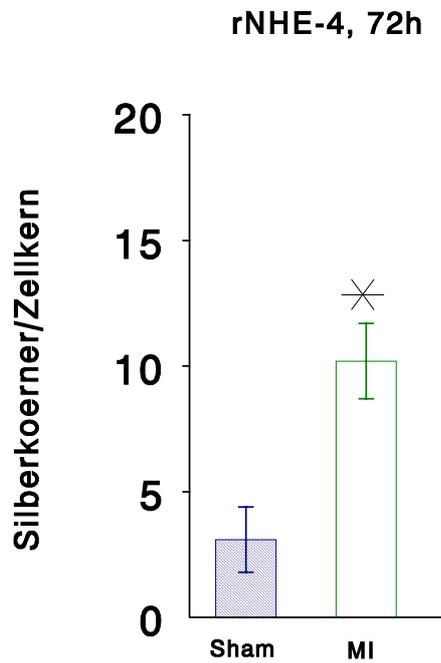
Mittelwerte ± SEM, n = 15, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert



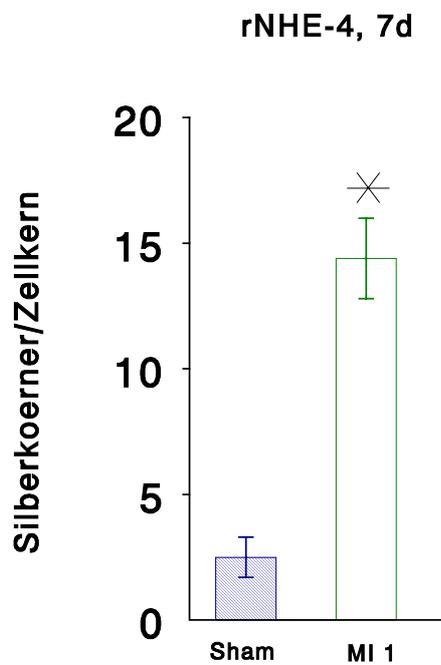
Mittelwerte ± SEM, n = 15, ungepaarter t-Test, p<0,05, nach Bonferroni adjustiert



Mittelwerte ± SEM, n = 10, ungepaarter t-Test, p<0,05, nach Bonferroni adjustiert



Mittelwerte \pm SEM, n = 10, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert



Mittelwerte \pm SEM, n = 10, ungepaarter t-Test, $p < 0,05$, nach Bonferroni adjustiert