

3. Methoden

3.1. DNA

3.1.1. Techniken zur Klonierung

(modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989)

Restriktion

Die Restriktion der DNA erfolgte in den vom Hersteller empfohlenen Reaktions-Puffern. Dabei galt als Regel, dass 1µg DNA mit 2-4 Enzymeinheiten (U) geschnitten und für mindestens 1h bei 37°C inkubiert wurde. Analytische Ansätze wurden in einem Volumen von 10µl, präparative in 50µl angesetzt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach Größe der DNA-Fragmente in EtBr-haltigen (15µl/30ml Agarose) Agarosegelen in 1xTAE-Puffer.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus Agarosegelen ausgeschnitten und mit der Stickstoff-Elutionsmethode (Sambrook *et al.*, 1989) aus dem Gel herausgelöst. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 0,1Vol Na-Acetat sowie 2,5Vol 99% Ethanol bei -20°C gefällt. Nach Pelletierung durch Zentrifugation (15min, 14000rpm) wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1xTE oder DEPC-H₂O gelöst.

3.1.2. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase verwendet, wobei das Verhältnis zwischen Vektor und Fragment im Ansatz in etwa 1:3 betrug.

Ligationsansatz: xµl Ligationspuffer (10% des Endvolumens)
 xµl Fragment-DNA (max. 3µg)
 xµl Plasmid-DNA (max. 1µg)
 xµl H₂O_{bidest} Endvolumen: 10µl
 1µl T4-DNA-Ligase (5 Units/µl)

Inkubation üN bei: 16°C

3.1.3. DNA-Transformation in Bakterien

(modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen des Bakterienstamms E.coli DH5α (2.2.) mit dem gesamten Ligationsansatz (3.1.2.) gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschockbehandlung (30sec, 37°C, dann 3min auf Eis) wurden 800µl vorgewärmtes LB-Medium zugesetzt und die Inkubation 1h bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln fortgesetzt. Danach sind 135µl Zellsuspension auf die jeweilige Selektions-Agarplatte ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert worden.

3.1.4. Präparation von Plasmid-DNA (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989)

Bei der Plasmid-Präparation unterscheidet man grundsätzlich zwei Methoden, abhängig von der DNA-Ausbeute und der Qualität. Die "Mini-Präparation" wird zur schnellen Isolierung von DNA eingesetzt, um z.B. rasch Produkte einer Ligation analysieren zu können. Die Ausbeute ist im Allgemeinen gering und die DNA von minderer Qualität. Im Gegensatz dazu gewinnt man bei der "Maxi-Präparation" eine große Menge an DNA mit einem hohen Reinheitsgrad.

Mini-Präparation

Für die Minipräparationen wurden mit den nach der Transformation gewachsenen Bakterienkolonien (3.1.3.) je 3ml Amp-haltiges LB-Medium angeimpft und die Flüssigkultur über Nacht bei 37°C unter konstantem Schütteln (200rpm) angezogen. 1,4ml der Kultur wurden am nächsten Tag in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 14000rpm für 20sec abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 250µl GTE gelöst. Zu dieser Suspension wurden 250µl SDS/NaOH zugefügt und der Ansatz sofort mit 250µl Na-Acetat neutralisiert. Zellrückstände wurden durch Zentrifugation (10min, 14000rpm) abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA gefällt und in 30µl 1xTE (2.10.1.) aufgenommen. Eine Überprüfung des Klonierungserfolges erfolgte durch Restriktionsverdau (3.1.1.). Dazu wurden 4µl der Mini-Präparation genutzt.

Maxi-Präparation

Konnte durch Restriktionsverdau (3.1.1.) der Minipräparation ein positiver Zellklon identifiziert werden, wurden mit 30µl der dazugehörigen üN-Kultur 250ml LB-Medium (mit Amp) angeimpft und üN angezogen. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Qiagen-Säulen nach Herstellerangaben.

3.1.5. Präparation von genomischer DNA

aus Tierschwänzen

Für die Analyse der chromosomalen DNA von Tieren durch Southern-Blot-Technik wurden größere und sehr saubere Mengen an DNA benötigt. Dazu sind zu den koupierten Schwanzstücken (1cm) 700µl Tailpuffer und 35µl Proteinase K-Lsg. gegeben worden. Die Reaktionsgefäße wurden üN, über Kopf drehend, bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag sind zu den Proben nach 10min Lagerung auf Eis 300µl einer 6M NaCl-Lsg. gegeben, alles kurz durch mehrmaliges Kippen der Reaktionsgefäße gemischt und für 5min auf Eis belassen worden. Danach sind die Proteine durch Zentrifugieren bei 14000rpm für 10min präzipitiert und der Überstand abgenommen (Pipetten-spitze muss etwa 5mm gekürzt werden) und in ein 2,0ml-Reaktionsgefäß überführt worden. Nach halbstündigem RNase-Verdau (5µl RNase-Lsg.) bei 37°C, wurde die DNA durch Zugabe von 1ml Isopropanol und mehrmaliges Kippen gefällt, anschließend für 20min bei 14000rpm und 4°C abzentrifugiert und

mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet, in 200µl TE aufgenommen und nach mehrstündigem Schütteln die DNA-Konzentration bestimmt. Je nach verwendeter Sonde wurden für die anschließende Southern-Blot-Analyse (3.1.6.) zwischen 5 und 20µg DNA verdaut.

aus Ohrstückchen

Da die Feststellung des Genotyps durch PCR viel schneller durchgeführt werden konnte, als durch Southern-Blot-Analyse, die DNA hierfür nicht so rein und nicht in großen Mengen zur Verfügung stehen musste, reichte die Aufarbeitung eines kleinen Stückes des Mausohrs völlig aus.

Mit Hilfe einer Ohrlochzange wurde parallel zur Markierung der Tiere auch ein Mausohrteil mit einem Durchmesser von 1,5mm gewonnen. Zu diesem Ohrstück sind in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß 88µl des Ohrlochpuffers (2.10.1.) gegeben worden. Danach wurden 8µl Proteinase K-Lsg. dazu pipettiert und bei 37°C üN unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen ist die Proteinase K durch Erhitzen der Lsg. auf 95°C für 10min inaktiviert worden. Nach Zugabe von 850µl TE-Lsg., kurzem Vortexen und Anzentrifugieren wurde die DNA-Lsg. bei -20°C weggefroren, oder direkt für die PCR-Analyse genutzt. Pro PCR-Ansatz sind dafür je 2µl eingesetzt worden.

3.1.6. Southern-Blot-Technik (modifiziert nach Southern, 1975)

Diese Technik erlaubt die Analyse von chrom. DNA. Dazu wird die DNA (3.1.5.) mit geeigneten RE gespalten (3.1.1.), nach Fragmentlängen gelelektrophoretisch (3.1.6.2.) aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Danach erfolgte eine Fixierung der DNA auf der Membran. Die Hybridisierung spezifischer Genabschnitte mit markierten DNA-Sonden wurde dann autoradiographisch sichtbar gemacht.

3.1.6.1. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Zur radioaktiven Markierung von linearisierten DNA-Fragmenten fand das "Multi-Prime" Markierungsverfahren von Stratagene (La Jolla, USA) Anwendung. Dabei werden an die denaturierte DNA randomisierte Hexamere (Primer) hybridisiert. Nach Zusatz des Klenow-Enzyms sowie radioaktiver Nukleotide, wird ein komplementärer, radioaktiv markierter DNA-Strang synthetisiert. Für die Reaktion wurden 25-50ng linearisierte DNA mit 10µl Primer versetzt und denaturiert (5min, 95°C). Zu dem DNA-Primer-Gemisch wurden anschließend 10µl Markierungspuffer, 5µl [α 32P]dCTP (10µCi/µl) und 5U Exo(-)-Klenow zugesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte für 10-15min bei 37°C. Zur Abtrennung nicht inkorporierter Radionukleotide wurde die markierte DNA über Quick-Spin-Säulen Sephadex G50 (Roche [Mannheim, BRD]), gemäß Herstellerangaben gereinigt. Mit 1µl der DNA-Sonde wurde die Inkorporationsrate im β -Counter LS6000SC (Beckman [Fullerton, USA]) ermittelt.

3.1.6.2. Auftrennung der DNA im Agarosegel und Kapillar-Blot

Genomische DNA (3.1.5.) wurde mit geeigneten RE üN bzw. für 3h bei 37°C gespalten. Anschließend wurde den Restriktionsansätzen Probenpuffer zugefügt und die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.1.1.).

Die genomische DNA wurde mittels Kapillar-Blot (16h, 20xSSC) mit der Methode nach Sambrook et al. (1989) auf eine Membran (Hybond-N, Amersham [Braunschweig, BRD]) übertragen. Hierfür wurde das Gel nach der Elektrophorese mit folgenden Lösungen (2.10.1.) in einer Wanne unter kontinuierlichem, leichtem Schütteln vorbehandelt:

- Depurinisierungslösung 30min
- Denaturierungslösung 30min
- Neutralisierungslösung 30min

Durch UV-Bestrahlung im UV-Stratalinker (Stragene, [La Jolla, USA]) wurde die DNA auf der Membran fixiert. Diese konnte dann zur Hybridisierung (3.1.6.3.) verwendet werden.

3.1.6.3. Hybridisierung

(modifiziert nach Church & Gilbert, 1984)

Zur Hybridisierung wurden die Membranen in eine Hybridisierungsröhre gebracht und kurz mit 6xSSC gespült. Für die Prähybridisierung wurden 10ml des vorgewärmten Prähybridisierungspuffers (mit 50µl HS-DNA/ml) zugegeben und die Röhren für 2h bei 65-68°C (in Abhängigkeit der Sonde) in einem Hybridisierungsofen belassen. Anschließend wurde die Lösung durch neue Hybridisierungslösung, die die frisch denaturierte (5min, 95°C) radioaktiv markierte Sonde (3.1.6.1.) enthielt, ersetzt und über Nacht bei 65-68°C hybridisiert. Unspezifisch gebundene DNA-Sonden wurden am nächsten Tag durch Waschen mit Waschpuffer für 2x5min bei RT und 2x30min bei 65°C entfernt. Zur Detektion von hybridisierten DNA-Abschnitten wurde der Blot auf eine Imager-Platte (FUJI [Tokyo, Japan]) aufgelegt und diese im Phosphor-Imager FUJIX BAS2000 (FUJI [Tokyo, Japan]) eingelesen.

3.1.7. DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die enzymatische Sequenzierung am automatisierten Sequenziergerät wurde von der Firma Invitex (Berlin-Buch, BRD) durchgeführt.

Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme BLAST (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) und BLAST 2 SEQUENCES (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast2seq>) und der Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) genutzt. Zur Analyse auf Promotoren wurden die Internetlinks: <http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/proscan/> (,PROMOTER SCAN'; Bioinformatics & Molecular Analysis Section) und <http://123genomics.homestead.com/files/analysis.html> (,Hctata'; The National Research Council) verwendet und zur Identifizierung der Transkriptionsstarte die

Internetlinks: http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html („Neural Network Promoter Prediction“; Berkeley Drosophila Genome Project) und http://sdmc.lit.org.sg/promoter/promoter1_3a/DPFV13.htm („DRAGON GC+ PROMOTER FINDER“; Knowledge Extraktion Lab). Zum Auffinden von Spleißstellen wurden die Internetlinks: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html („Neural Network Splice Site Prediction“); <http://cbs.dtu.dk/services/netGene2> („NetGene2“) und <http://softberry.com/berry.phtml?topic=fplice&group=program&subgroup=gfind> („FSPLICE“) genutzt.

3.1.8. Herstellung und Klonierung von PCR-Fragmenten

3.1.8.1. Herstellung von PCR-Fragmenten

(modifiziert nach Mullis & Faloona, 1987)

Generell wird bei dieser Methode ein DNA-Fragment unter Verwendung spezifischer Primer amplifiziert. In drei aufeinander folgenden Schritten wird die DNA zunächst denaturiert (94°C), spezifische Primer am Anfang und am Ende des zu amplifizierenden Genabschnitts gebunden (59-63°C) und in einem dritten Schritt neue DNA synthetisiert (72°C). Für die Synthese wird die hitzestabile Taq-Polymerase aus dem extrem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Dieser 3-Schritt-Zyklus führt zur neu synthetisierten doppelsträngigen cDNA der gewünschten Sequenz. Je nach zu erwartender Fragmentlänge und in Abhängigkeit des bekannten Sequenzbereiches gibt es verschiedene Modifikationen dieser Methode.

1. Herstellung von PCR-Fragmenten der Größe 100 bis 1500bp

Zur Amplifizierung dieser Fragmentlängen kann die „klassische“ PCR-Methode angewendet werden. Der Dreischrittzyklus wird 35-mal durchlaufen.

Ansatz:	x μ l H ₂ O _{bidest}	Endvolumen: 45 μ l
	4,5 μ l PCR-Puffer	
	1,8 μ l Primer 1	Endkonzentration: 0,2- 1,0mM
	1,8 μ l Primer 2	analog Primer 1
	2,4 μ l 5mM dNTP- Mix	
	2,0 μ l chromosomale DNA, isoliert wie unter 3.1.5. dargestellt	
	x μ l MgCl ₂	Endkonzentration: 0,02- 0,05 μ M

Zugabe von 0,25 μ l Taq-Polymerase.

Zyklusparameter:

30sec	94°C	
30sec	59-63°C	
30-61sec	72°C	(bei Fragmenten über 1,0kb je Runde 1sec Verlängerung der Inkubations-Zeit)

Anzahl der Zyklen: 32-35

Nach Abkühlung des PCR-Gemisches wurden davon zur Überprüfung des Amplifikationserfolges 8 μ l auf ein Agarosegel aufgetragen (3.1.1.).

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten zur T-Vektor-Klonierung erfolgte, wie unter 3.1.1. beschrieben.

2. Herstellung von PCR-Fragmenten der Größe 1500 bis 20000bp

Fragmente mit mehr als 1500bp sind in der Regel mit der oben beschriebenen „klassischen“ Methode nicht zu amplifizieren. Deshalb verwendet man hier spezielle Kit-Systeme (LR-Kit), in denen die Eigenschaften der Taq-Polymerase, das Puffersystem und die Zyklusbedingungen modifiziert sind.

Ansatz:

H ₂ O _{bidest}	x µl	Endvolumen: 45µl
chrom. DNA	2,0µl	einer 100ng/µl-Lsg.
dNTPs	3,5µl	eines 5mM-dNTP-Mixes
Puffer	4,5µl	(Puffer1 für Fragmente von 1500-4000bp Puffer2 für Fragmente von 4000-10000bp Puffer3 für Fragmente von 10000-20000bp)
Primer1	x µl	Endkonzentration 0,5-1,0mM
Primer2	x µl	Endkonzentration 0,5-1,0mM
Taq-Polymerase	0,75µl	

Zyklusparameter:

2min	92°C	einmal
10sec	92°C	
30sec	59°C	
6min	68°C	für 10 Zyklen
10sec	92°C	
30sec	59°C	
6min	68°C +20sec je Zyklus	für 20 Zyklen

Zur Kontrolle wurden 8µl des Ansatzes auf ein Agarose-Gel aufgetragen (2.10.2.).

3.1.8.2. Klonierung von PCR-Fragmenten

Klonierungen von PCR-Fragmenten sind aus verschiedenen Gründen mit Schwierigkeiten verbunden (z.B. Reinheitsgrad, Fragmentenden). Daher nutzt man bei der T-Vektor Klonierung die terminale Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase, durch die an 3`-Enden der amplifizierten DNA ein einzelnes Nukleotid, zumeist ein Adenosin, angehängt wird. Besitzt ein Vektor (T-Vektor, Promega [Madison, USA]) komplementär ein Thymidin, kann die Ligation über die jeweils überhängenden Enden erfolgen.

Ansatz:	PCR-Fragment	xµl	
	T-Vektor	1µl	
	H ₂ O _{bidest}	xµl	Endvolumen: 10µl
	T4-Ligase	1µl	

Die Ligation erfolgt ün bei 16°C.

Die Ligationsansätze wurden, wie unter 3.1.2. beschrieben, transformiert.

3.1.9. PCR zur Genotypisierung

Zur Genotypisierung von transgenen bzw. „knockout“-Tieren kann statt der aufwendigen Southern-Blot-Methode (3.1.6.) auch die „klassische“ PCR für Fragmentlängen von 100 - 1500 bp angewendet werden (3.1.8.1.). Mit dieser

Methode erhält man schneller und mit weniger Aufwand ein Ergebnis. Hierzu wurde chromosomale DNA aus Ohrstückchen (3.1.5.) verwendet.

Bei der Generierung der ‚knockout‘-Tiere wurde der ‚targeting‘-Vektor mit einer Neomycinphosphotransferase (Neo)-Kassette für die positive Selektion der homologen Rekombination ausgestattet. Deshalb wurde bei den ‚knockout‘-Mäusen die Neo®-Kassette oder das entsprechende Wildtyp-Gen amplifiziert. Bei den transgenen Ratten wurde das Transgen und ein Kontrollgen mit Hilfe sequenzspezifischer Primer (Tab 3.1, 2.3.) amplifiziert.

Die Amplifizierung wurde wie unter 3.1.8.1. beschrieben durchgeführt. Anhand der amplifizierten Banden wurde der entsprechende Genotyp bestimmt.

Primer und Annealing-Temperaturen zur Genotypisierung und Informationen zu den Fragmenten

	Primer	Amplifiziertes Fragment	PCR-Produktgröße	Annealing-Temperatur	Nachweis der
1	MMB25Ba MMB23Ba MMB232 NeoTho	B ₂ R 3'-B ₂ R-Ende mit Neo ^R fusioniert	~ 400bp ~ 1000bp	59°C 60°C	Wildtyp B ₂ R- Allel ‚knockout‘ B ₂ R-Allel
2	MMB12 MMB18 MMB1ES Neo1L	B ₁ R 3'-B ₁ R-Ende mit Neo ^R fusioniert	~ 350bp ~ 1000bp	60°C 60°C	Wildtyp B ₁ R- Allel ‚knockout‘ B ₁ R-Allel
3	AT15 AT13N AT1TW32 NeoPVU	AT ₁ a 3'-AT ₁ a-Ende mit Neo ^R fusioniert	~ 400bp ~ 700bp	59°C 60°C	Wildtyp AT ₁ - Allel ‚knockout‘ AT ₁ -Allel
4	HSKLK5 HSKLK4 Mas11 Mas12	HSKLK Mas	~ 550bp ~ 700bp	63°C 62°C	transgenes HSKLK-Allel Wildtyp Mas- Allel

Tab. 3.1 Übersicht über verwendete Primer (2.1.) und Annealing-Temperaturen, die für die Genotypisierung genutzt wurden, und Informationen zu den Fragmenten.

3.2. RNA

3.2.1. RNA-Extraktion aus Organen und Zellen

(modifiziert nach Wilkinson, 1988)

Um die mRNA aus Organen zu isolieren, müssen diese zum Transport in autoklavierte 2ml-Reaktionsgefäße gebracht, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C (oder kälter) gelagert werden. Zellen werden von den Zellkulturschalen mit 0,025% Trypsin-EDTA-Lösung gelöst, gewaschen und in 1ml TRIzol® gebracht. Zur Präparation der mRNA wird ausschließlich DEPC-Wasser verwendet.

Durchführung:

Die tiefgefrorenen Gewebe wurden in 10fachem Vol. TRIzol® bzw. die präparierten Zellen direkt mit einem Polytron (Kinematika [Luzern, Schweiz]) bei max. Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenat wurde 10min bei RT inkubiert und pro 1ml TRIzol® wurden 200µl Chloroform in das Homogenat gegeben. Der Ansatz wurde vermischt, für weitere 5min bei RT inkubiert und anschließend bei 10000rpm und 4°C für 30min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Zum Fällern der RNA wurde der Überstand mit 500µl Isopropanol aufgefüllt, gut gemischt, 10min ruhen gelassen und für 10min bei 12000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1,5ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC-behandeltem H₂O resuspendiert. Die isolierte RNA wurde photometrisch vermessen, die Qualität gelelektrophoretisch überprüft und bei -80°C eingefroren.

3.2.2. Reverse Transkription

Zur Reversen Transkription wurden an die RNA zunächst randomisierte Hexamere gebunden. Mit Hilfe eines viralen Enzyms, der Reversen Transkriptase, wurde dann die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Daraus konnten mit spezifischen Primern in der PCR bestimmte Genabschnitte amplifiziert werden.

Die reverse Transkription wurde in einem Gesamtansatz von 20µl durchgeführt:

1,5µg	RNA
4mM	dNTP
2µl	10 x PCR-Puffer
5pM	randomisierte Hexamere
40U	RNasin
200U	Reverse Transkriptase

Zur Bindung der Hexamere an die RNA wurden die Ansätze zunächst für 10min bei 20°C inkubiert. Die Reverse Transkription erfolgte dann für 45min bei 42°C. Anschließend wurde das Enzym inaktiviert (5min, 95°C). Der gesamte Ansatz konnte dann für die PCR eingesetzt werden (3.1.8.).

3.2.3. Amplifizierung von B₁- und B₂-RNA-Enden

Wenn Teilsequenzen einer cDNA bekannt sind, ist es möglich, die gesamte cDNA eines Gens zu identifizieren. Dazu konnte für die unter 3.2.1. gewonnene RNA ein Kit-System genutzt werden, das es erlaubt, die bekannte Sequenz sowohl 5' (5'-Race) als auch 3' (3'-Race) zu verlängern. Das Race-Kit wurde von Roche (Mannheim, BRD) bezogen. Die Amplifikation der B₁- und B₂-cDNA erfolgte jeweils nach Herstellerangaben.

3.2.4. ‚RNase-Protection-Assay‘

Um quantitative Aussagen über mRNA-Konzentrationen bestimmter Gene machen zu können, reicht eine rT-PCR nicht aus, da die dort erhaltenen Bandenstärken sehr von den jeweiligen PCR-Bedingungen abhängen. Eine Methode, um quantitative Bestimmungen durchführen zu können, ist der ‚RNase-Protection-Assay‘ (RPA). Hierbei wird eine radioaktive ‚Antisense‘-RNA-Sonde mit Hilfe einer RNA-Polymerase durch Transkription bei Zugabe von [α - 32 P] UTP hergestellt. Anschließend wird diese mit isolierter mRNA hybridisiert und die gesamte einzelsträngig gebliebene RNA und die Überhänge der Hybride abgebaut. Dadurch bleiben nur doppelsträngige Fragmente einer definierten Größe übrig (nur die Bereiche, bei denen Sonde und native RNA 100% übereinstimmen), die nach elektrophoretischer Auftrennung sichtbar gemacht werden können.

1.Tag

- Vor Beginn der Transkription musste der Vektor so linearisiert werden, dass durch die Transkription ein Fragment von max. 700bp entstehen kann, wobei die Restriktions-Schnittstelle die Transkription terminiert.

- Transkriptionsansatz:

Es wurde der Transkriptionskit der Firma Stratagene (La Jolla, USA) genutzt.

je	1 μ l	ATP, CTP, GTP	(10mM)
	x μ l	Probe	(1 μ g)
	4 μ l	Puffer	(5x)
	1 μ l	RNasin	
	5 μ l	[α - 32 P] γ UTP	(800 Ci/mmol)
	x μ l	H ₂ O	(Endvolumen: 20 μ l)
	1 μ l	T3-, T7- oder SP6-RNA-Polymerase	

- Die Transkription erfolgte für 30min bei 37°C, danach Behandlung mit 1 μ l DNase für weitere 15min bei 37°C.

- Nach Zugabe von 20 μ l ‚Loading‘-Puffer (im Kit enthalten) wurde der Ansatz 5min bei 95°C gekocht und anschließend mindestens 2min auf Eis gehalten.

- Der gesamte Ansatz wurde auf ein PAA-Gel (2.10.2.) aufgetragen und bei 250V in der Horizontal-Elektrophorese (BioRad [München, BRD]) aufgetrennt, so dass die ungebundenen NTPs von der markierten Probe getrennt wurden.

- Der TBE-Puffer wurde aus der oberen Kammer mit einer Spritze entfernt.

- Die Platten sind aus der Elektrophorese genommen und vorsichtig auseinander gedrückt worden.

- Auf das Gel (geschützt durch eine Saranfolie) wurde für 20sec eine Imager-Platte gelegt und diese anschließend im Phosphorimager eingelesen (2.8.).

- Es erfolgte ein Ausdruck im Maßstab 1:1, so dass die Höhe der schwarzen Bande auf dem Bild der Höhe der radioaktiven Bande im Gel entsprach.

- Diese ist dann entsprechend der Vorlage aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt worden. Um zu überprüfen, ob die Bande wirklich komplett aus dem Gel geschnitten wurde, erfolgte ein weiteres Auflegen der Imagerplatte und das Bild durfte keine Schwärzung mehr zeigen.

- Auf das Gelstückchen wurden dann 350µl Elutionspuffer (im RPA II-Kit von Ambion enthalten) gegeben und üN bei 37°C inkubiert.

2.Tag

- Nach kurzem Anzentrifugieren des Eluats wurde dieses in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß pipettiert.

- 1µl ist dann zur Messung im β -Counter genutzt worden (2.8.). Je Probe wurden 30000 bis 60000cpm verwendet.

- Die Hybridisierung erfolgte nach Anleitung des Handbuchs „RPA II, Ribonuklease Protection Assay Kit“ der Fa. Ambion (Austin, USA). Es wurde je nach erwarteter Expressionsstärke zwischen 5µg und 40µg isolierter Gesamt-RNA eingesetzt.

3.Tag

Die gefällten und wieder aufgenommenen Reaktionsgemische wurden mit Hilfe einer Horizontal-Elektrophorese der Fa. BioRad (München, BRD) in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe des Vakuum-Gel-Trockners SGD4050 (Appligene [Heidelberg, BRD]) für 2h bei 80°C getrocknet. Danach ist auf das Gel eine Phosphor-Imager-Platte gelegt und für mindestens 24h exponiert worden. Die Auswertung der radioaktiven Signale erfolgte am Phosphor-Imager (FUJI, [Tokyo, Japan]; 2.8.).

3.3. Proteine

3.3.1. Immunhistochemie

Eine Methode zur *in situ* Analyse von Proteinen ist die Histochemie, mit der man bestimmte Proteine mikroskopisch und elektronenmikroskopisch innerhalb des Gewebeverbandes lokalisieren kann. Die Einführung der Immunfluoreszenz zur Detektion spezifischer Proteine im Gewebe, etablierte die Immunhistochemie als Standardmethode, mit vielen Varianten zur qualitativen und semiquantitativen Analyse bestimmter Antigene.

3.3.1.1. Präparation der Organe

Die Tiere wurden dekapitiert und ihre Herzen so schnell wie möglich entnommen. Von ihnen wurden transversale Schnitte auf Korke in Tissue Tec® (Sakura-Finetek [Zoeterwoude, NL]) eingebettet und sofort bei -70°C in Methylbutan (in flüssigem Stickstoff gekühlt) schockgefroren. Davon wurden im Kryostaten Jung CM 3000 (Leica, [Bensheim, BRD]) bei -30°C serielle Schnitte (5µm Dicke) auf handelsüblichen Poly-L-Lysin-behandelte Objektträgern (-20°C) aufgetragen. Die Schnitte wurden 5min im Acetonbad fixiert und bei mindestens -20°C gelagert. Für immunhistologische Analyse wurden diese mit spezifischen Antikörpern für den B₁R und B₂R untersucht (2.4.).

3.3.1.2. Immunhistochemischer Proteinnachweis

(nach Noutsias *et al.*, 2002)

Um auf fixierten Gewebeschnitten Proteine sichtbar zu machen, nutzt man unter anderem die ABC-Methode. Dieses hochspezifische System mit hoher Empfindlichkeit bedient sich der außerordentlich stabilen Avidin-Biotin-Komplexbildung, bei der ein primärer oder sekundärer Antikörper biotinyliert ist. Das tetravalente Avidin wird an den primären bzw. sekundären Antikörper gebunden und an die restlichen drei Bindungsstellen mehrfach biotinylierte Amplifikatoren, wie z.B. Peroxidase oder alkalische Phosphatase, gebunden. Der hier verwendete sekundäre Antikörper war mit Peroxidase gekoppelt. Die Peroxidase wiederum bildet mit chromogenen Substraten wie Carbazol unlösliche farbige Produkte (rot), die lichtmikroskopisch ausgewertet wurden.

Verdünnungen der primären und sekundären Antikörpern für den immunhistochemischen Proteinnachweis

Rezeptor	Primärer Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
B ₁ R	Anti rat B ₁ R	rabbit, polyklonal	1 : 100	Anti –rabbit IgG	1 : 333
B ₂ R	Anti rat B ₂ R	rabbit, polyklonal	1 : 100	Anti –rabbit IgG	1 : 333

Tab. 3.2 *Verdünnungen der verwendeten primären und sekundären Antikörper die für den immunhistologischen Proteinnachweis genutzt wurden (2.4.).*

Durchführung:

Die Kryoschnitte wurden zunächst 20min bei RT in der feuchten Kammer mit jeweils 50µl Avidin-Blocking-Lösung (30µl Avidin-Blocking in 2,5ml 10% FCS-PBS) inkubiert, um das endogene Avidin zu blockieren. Der primäre Antikörper (2.4., Tab. 3.2) wurde in 2,5ml 10% FCS-PBS mit 30µl Biotin-Blocking (Blockierung des endogenen Biotins) 1:100 verdünnt und bei RT für 45min in der feuchten Kammer inkubiert. Der sekundäre Antikörper (2.4., Tab. 3.2) (10ml AK-Lsg. [1:333] in 10% FCS-PBS) wurde ebenfalls für 45min bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation mit dem ABC-Komplex (30µl Avidin + 30µl biotinylierte Peroxidase in 5ml 10% FCS-PBS) wurden die Schnitte 12min bei RT mit der Carbazol-Lösung (2.10.1.) unter Ausschluss von Licht gefärbt. Zwischen allen Schritten und nach der Carbazolfärbung wurde jeweils 2 mal 5min mit PBS gewaschen. Um das Gewebe und die Zellkerne von Artefakten abzugrenzen, wurde nach der ABC-Färbung eine Hämalun-Gegenfärbung angeschlossen. Dazu wurden die Objektträger für 4min bei RT in der Hämalunlösung nach Mayer (Sigma [München, BRD]) inkubiert und für 10min unter fließendem H₂O bidest gebleut. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Gelantine gedeckelt und getrocknet.

Die Auswertung der gefärbten Schnitte fand mit 100-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Leica [Bensheim, BRD]) mit der Software Lucia G 5.1a (Nikon [Berlin, BRD]) statt. Es wurden jeweils 20 Gesichtsfelder gewählt und nach der digitalen Bildanalyse von Noutsias *et al.* (2002) ausgewertet.

3.4. Zellkultur

Alle Zellen wurden in Heraeus-Inkubatoren in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5,0% CO₂ inkubiert. Alle Zelltypen sind in spezifischen Kulturmedien gehalten worden (2.9.2.). Das Medium ist täglich gewechselt worden.

3.4.1. Kultivierung von neonatalen Kardiomyozyten (modifiziert nach Klein, 1982)

Zur Isolierung von CMC wurden 2 bis 4 Tage alten SD-Ratten die Herzen entnommen und diese in eisgekühlter HBSS-Lösung mit 20mM HEPES, pH 7,4, transportiert. Nach zweimaligem Waschen der Herzen mit HBSS, wurden Atrium und Aorta entfernt, die Ventrikel in ca. 1mm³ große Stücke geteilt und weitere zweimal gewaschen. Das präparierte Gewebe wurde 15min bei 37°C unter Rühren in HBSS mit 0,125% Trypsin-EDTA (Sigma [München, BRD]) enzymatisch verdaut. Der Überstand wurde in eisgekühltes 20%iges FBS überführt und die Gewebestücken wieder mit frischem HBSS aufgefüllt. Der enzymatische Verdau wurde vier- bis fünfmal wiederholt. Die so gewonnenen Zellen wurden in DMEM mit FBS (1:1) überführt und mit den Zellen aller Verdauungsschritte vereint. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit frischem DMEM mit 20% FBS und einer Dichte von 1x10⁶/25cm² in Kulturflaschen ausgesät.

Für die Anreicherung der CMC wurde die unterschiedliche Adhäsion von Zellenarten ausgenutzt. Man geht davon aus, dass Fibroblasten schon nach kurzer Zeit an den Kulturflaschen haften und die CMC noch im Medium schweben. Deshalb wurden die schwebenden CMC nach 1h Inkubation mit frischem DMEM-Medium, das 20% FCS und 100U/ml Penicillin/Streptomycin enthält, in neue Flaschen überführt und 24h inkubiert. Nach 24h wurden die Zellen mit DMEM-Medium zur Kultivierung von Kardiomyozyten (2.9.2.) angezüchtet und täglich das Medium gewechselt.

Ab dem 2. Kulturtag konnten über 80% der CMC spontan, nach dem 4. Tag synchron in den konfluenten einschichtigen Zellkulturen schlagen. Mit dieser Methode erzielt man ca. 90% CMC, was durch mikroskopische Beobachtung des Schlagens der Zellen bewertet wurde.

3.4.2. Behandlung der neonatalen Kardiomyozyten

Die Experimente wurden ab dem 4.Tag der Zellkultur durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst für 12h mit serumfreien Medium kultiviert und im Anschluss mit folgenden Behandlungen für 3h inkubiert:

10ng/ml ANG II
45ng/ml Irbesartan
2,8ng/ml PD123319
10ng/ml ANG II + 45ng/ml Irbesartan
10ng/ml ANG II + 2,8ng/ml PD123319
10ng/ml ANG II + 45ng/ml Irbesartan + 2,8ng/ml PD123319

Im Anschluss an die Behandlung wurde aus den behandelten Zellen sofort die RNA isoliert (3.2.1.).

3.5. Tierversuche

Die Durchführung der Tierversuche wurde nach Absatz §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit in Berlin genehmigt. Die Analysen wurden unter den Tierversuchsnummern TVV G0153/02 und G0740/03 genehmigt. Für die Untersuchungen wurden ausschließlich männliche Ratten verwendet. Am Beginn der Experimente hatten die SD-Ratten, die KLK-transgenen Ratten und ihre Wildtypen ein Körpergewicht von 300 bis 330g. Für das Aortenbanding wurden 80 bis 100g schwere SD-Tiere verwendet.

3.5.1. Chirurgische Behandlung der Tiere

3.5.1.1. Narkose und Beatmung

Alle Tiere wurden durch ein Ketamin (50mg/kg)/2% Xylocain® (5mg/kg)-Gemisch (2.6.4.) narkotisiert, anschließend intubiert (18G-Kunststoffkanüle) und mit einer Respirationsrate von 60 Atmungen/min und einem Respirationsvolumen von 8,0ml/kg künstlich beatmet (2.6.3.).

3.5.1.2. Aortenbanding

(nach Spillmann *et al.*, 2002)

Bei 4 Wochen alten Tieren wurde, während der unter 3.5.1.1. beschriebenen Narkose und Beatmung, die linke Thoraxseite bis auf die Rippen frei präpariert und der Brustkorb mit einem Retraktor zwischen den Rippen 2 und 3 aufgespannt. Die Aortenwurzel des nun sichtbaren Herzens wurde frei gelegt und der Clip vor Abzweig eines peripheren Gefäßes an der aufsteigenden Aorta positioniert. Das Zusammendrücken des Clips mit der Clipzange bewirkte eine Verengung der Aorta intraluminal auf einen Durchmesser von 0,6mm. Da die Clipzange auf einen festen Abstand eingestellt war, gewährleistete dies, dass die Aorten bei allen Tieren auf das gleiche Maß eingeeengt wurden. Nach der Positionierung des Clips wurde der Refraktor entfernt, die freie Luft aus dem Thorax verdrängt und der Brustkorb wieder verschlossen. Nach Gewöhnung an die normale Atmung wurde den Tieren

zur Schmerzbehandlung in den ersten 48h subcutan Tramal® (2.6.4.) verabreicht und im Anschluss daran weitere 6 Tage oral therapiert.

3.5.1.2. Scheininfarkt und Myokardinfarkt

(nach Tschöpe *et al.*, 1999)

Zur Induktion des Schein- bzw. Myokardinfarktes wurden die Tiere wie oben beschrieben narkotisiert und beatmet. Nach der Präparation der linken Thoraxseite bis auf die Rippen, wurde mit einem Refraktor der Brustkorb zwischen der dritten und vierten Rippe gespreizt. Zur Induktion des Myokardinfarktes wurde nach Freilegung des Herzbeutels, am Ramus interventriculares anterior (RIVA) eine Ligatur, unmittelbar unterhalb des linken Herzohrlandes positioniert. Der Erfolg der Induktion wurde makroskopisch an der ischämie-bedingten Farbveränderung des Herzgewebes und anhand des plötzlichen Abfalls des LVP überprüft. Bei den schein-infarzierten Tieren wurde eine Ligatur neben der RIVA ohne Verschluss eines koronaren Gefäßastes gelegt. Nach der Ligation wurde der Refraktor entfernt, die freie Luft aus dem Thorax verdrängt, der Brustkorb verschlossen und die Tiere wieder an die normale Atmung gewöhnt (Tschöpe *et al.*, 1999). Zur Schmerzbehandlung wurde in den ersten 48h Tramal® (2.6.4.) subcutan verabreicht und im Anschluss daran weitere 6 Tage oral therapiert.

Um die Größe der Herzinfarkte zu bestimmen, wurden die linken Ventrikel der Herzen, nach der Entnahme zu den entsprechenden Zeitpunkten, in Infarkt- und Nicht-Infarktgebiet unterteilt. Diese Areale wurden dann planimetrisch auf Millimeterpapier vermessen. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden nur die Tiere mit mittelgroßem Infarkt (35-40% des LV) verwendet.

3.5.2. Induktion von Diabetes mellitus Typ I

(nach Tschöpe *et al.*, 1996)

Die Induktion des Diabetes mellitus Typ I wurde mit dem Breitband-Antibiotikum Streptozotocin (STZ) induziert. Dieses Breitband-Antibiotikum wird aus *Streptomyces achromogenis* isoliert und weist neben antibiotischen und karzinogenen Eigenschaften, auch eine stark diabetogene Wirkung auf. Die diabetogene Wirkung des STZ beruht auf der Schädigung der β -Zellen der Bauchspeicheldrüse, während die α -Zellen und die exokrinen Anteile nicht beeinträchtigt werden.

Die intravenöse LD50 von STZ wird auf 140mg/kg Körpergewicht geschätzt, 50mg/kg Körpergewicht führen intravenös injiziert 100%ig zu Diabetes mellitus (Rakieten *et al.*, 1963). Um die sichere Induktion von Diabetes mit geringer Mortalitätsrate zu gewährleisten, wurden 70mg/kg Körpergewicht appliziert. Alle Tiere, die innerhalb von zwei Wochen einen Blutzuckerwert von mehr als 500mg/dl entwickelten, diesen sechs Wochen hielten und mindestens 20g Körpergewicht verloren, wurden als diabetisch gewertet und verwendet. Die Kontrolltiere wurden mit Citratpuffer (2.11.1.) behandelt, in dem das STZ gelöst wurde. Um festzustellen, ob die Tiere durch die STZ-Injektion einen

Diabetes mellitus Typ I entwickeln, wurden vor der STZ-Injektion die basalen Blutzuckerwerte mit einem Blutzuckermessgerät (2.6.3.) im Kapillarblut aus dem Schwanz der Tiere und deren Körpergewicht gemessen. Danach wurde 6 Wochen lang zunächst täglich und dann einmal pro Woche der Blutzuckerspiegel bestimmt.

Durchführung:

Das STZ (2.6.4.) wurde direkt vor der Injektion in 0,1M Citratpuffer (pH 4,5) (2.10.1.) gelöst und einmalig 70mg/kg Körpergewicht in maximal 0,2ml Puffer den Tieren in den Bauchraum injiziert.

3.5.3. Pharmakologische Behandlung der Tiere

Um bestimmte Einflüsse des KKS und RAS auf die Expression der beiden Bradykinin-Rezeptoren und die Interaktion der Systeme unter pathophysiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden den Ratten verschiedene pharmakologische Interventionen verabreicht.

Quinapril Der ACE-Inhibitor Quinapril (2.6.4.) wurde ab dem 2. post-operativen Tag für 6 Tage bzw. 3 Wochen verabreicht. Jedes Tier nahm 10mg/kg Körpergewicht pro Tag über das Trinkwasser auf. Das Quinapril wurde, entsprechend der Annahme in Wasser gelöst, dass eine Ratte pro Tag 20 ml trinkt.

Irbesartan Der AT₁R-Antagonist Irbesartan (2.6.4.) wurde mit der Dosierung von 50mg/kg Körpergewicht/Tag den Tieren täglich ab dem 2. post-operativen Tag für 6 Tage bzw. für 3 Wochen zugeführt. Dazu wurde der AT₁R-Antagonist in 1ml 0,1M KOH gelöst und ‚per gavage‘ verabreicht.

PD123319 Die Tiere wurden mit dem AT₂R-Antagonist PD123319 (2.6.4.) ab dem 2. post-operativen Tag 6 Tage bzw. 3 Wochen behandelt. Dazu wurde das PD 123319 in sterilem H₂O gelöst wurde. Eine tägliche Dosis von 10mg/kg Körpergewicht wurde den Ratten über eine Osmopumpe zugeführt, die 24 Stunden nach dem Myokardinfarkt implantiert wurde. Die Pumpe beginnt am zweiten Tage nach Myokardinfarkt (4h nach Implantation) die Förderung des PD123319 aufgenommen. Je nach Modell, entsprechend der täglichen Dosis, wurden die Mini-Osmopumpen nach Herstellerangaben befüllt und mussten dem entsprechend gewechselt werden.

HMR 3480 Die Tiere wurden mit dem ICE-Inhibitor HMR 3480 (2.6.4.) mit einer Dosis von 50mg/kg Körpergewicht/Tag ab dem 1. Tag nach der Induktion des Myokardinfarktes für 6 Stunden bzw. 3 Wochen behandelt. Der ICE-Inhibitor wurde in einer Wasser-Cremophor-Lösung (75:25) suspendiert und den Tieren täglich ‚per gavage‘ verabreicht.

Zu den entsprechenden Zeitpunkten, am Ende der pharmakologischen Behandlung, wurden die physiologischen Herzparameter (3.5.4.) bestimmt, die isolierten Organe, entsprechend dem Verwendungszweck, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und

bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurden diese für die Extraktion von RNA (3.2.1.) verwendet und dann für den RPA eingesetzt, bzw. für die Immunhistochemie präpariert (3.3.1.1) und immunhistochemisch gefärbt (3.3.1.2.).

3.5.4. Messung physiologischer Herzparameter

Die Herzfunktion wird unter anderem durch folgende Parameter charakterisiert.

Die Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels ist das Maß für die diastolische Funktion des Ventrikels und wird indirekt über die linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{\min}) bestimmt.

Ein Maß für die systolische Herzfunktion ist die Kontraktilität, die indirekt über die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{\max}) bestimmt wird. Der maximale linksventrikuläre Druck (LVP) ist ein weiteres Maß für die systolische Funktion des linken Ventrikels.

Beim Herzindex, als Maß des Remodeling, wird das Herz- (in mg) dem Körpergewicht (in g) gegenübergestellt. Dadurch können Herzen verschiedener Gruppen, abhängig vom Körpergewicht, miteinander verglichen werden (Duncan *et al.*, 1997).

Durchführung:

Die Tiere wurden narkotisiert und künstlich beatmet (3.5.1.1.). Der Brustkorb wurde freigelegt, ein Teil der Rippen entfernt um den Thorax zu mobilisieren und so mit einem Retraktor den Zugang zum linken Ventrikel des Herzens zu ermöglichen. Im Anschluss daran wurde der linke Ventrikel mit einer 20G-Kunststoffkanüle punktiert. Durch diese Kanüle ist ein ‚2,0 French Millar-Tip-Katheter‘ in den Ventrikelhohlraum eingeführt worden. Das erhaltene Signal des linksventrikulären Druckes (LVP; in mm Hg) ist mit einen ‚DC-Bridge Amplifier‘ Typ 660 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, BRD) verstärkt worden. Ebenso wurden die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{\max} , in mmHg/s) und die minimale linksventrikuläre Abfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{\min} , in mmHg/s) durch Transformation mit einen ‚slope quotient-coupler‘ Typ 575 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, BRD) verfolgt. Der LVP, dP/dt_{\max} und dP/dt_{\min} wurden durch einen ‚Mark VII Linear recorder‘ (Graphtec Corp., Tokyo, Japan) aufgezeichnet (Tschöpe *et al.*, 2000). Der LVEDP wurde ausgewertet, wie von Stauss *et al.* (1994) beschrieben.

3.6. Statistische Auswertung

allgemein

Die Ergebnisse der Messungen wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Mit dem Computerprogramm SPSS wurden die Stichproben zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Bei normalverteilten Stichproben wurde eine Anova durchgeführt und die Mittelwertunterschiede mit dem ‚Student’s T-Test‘ bestimmt. Bei nicht normalverteilten Stichproben wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert. Bei allen statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ als signifikant angenommen.