

2 Materialien und Methoden

Vorbemerkung

Für Techniken, die sterile Lösungen, Materialien und Medien erfordern, erfolgte die Sterilisation in einem Standard-Autoklaven (Sauter) mindestens 30 min lang bei 134°C und 2.2 bar. Die Glaswarensterilisation wurde in einem Trockenschrank bei 180°C vorgenommen. Die Sterilfiltration temperaturempfindlicher Lösungen erfolgte über 0.2 µm – Celluloseacetatfilter (Sartorius).

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Allgemeine Geräte/ Hersteller

- 20°C Kühlschrank	Liebherr	- 80°C Kühlschrank	Thalheimer
4°C Kühlschrank	Liebherr	DigitalkameraSpot RT™	Diagnostic Instr.
Feinwaage	Sartorius		
Flüssigstickstofftank	MVE	Heizblock	Eppendorf
Kryostat CM 1800	Cambridge Instr.	Luminometer Microlite	Dynatech
Metamorph V4.1.2.	Visitron	Magnetheizrührer	Ohaus
Polarisationsmikroskop		pH-Meter	Orion Res.
Axioplan 2	Zeiss	Schütteltisch	Heidolph
Vortexer	Heidolph	Waage	Sartorius
Wasserbad	Memmert	Zählkammer	Hausser
Zellkultur-Sterilbank	Kendro	Zellinkubator Heraeus	Kendro
Zentrifugen			
5415 R	Eppendorf	Universal 30 RF	Hettich
Mikrozentrifuge 12-24	Hettich	Handzentrifuge	Labnet

Geräte Proteinarbeiten

Elektrophoreseapparatur	Bio Rad	Proteingelapparatur	Bio Rad
Gewebehomogenisator	Brinkmann	Blotting-System	Bio-Rad

Geräte RNA/DNA-Arbeiten

PCR Thermocycler	Perkin Elmer	Light Cycler System	Roche
Photometer DU 640	Beckman	DU 640 Photometer	Beckman
Szintillationszähler LS 6500	Beckman	Hybridisierungsöfen	Saur
Geltrockner 583	BioRad	Scanner für Röntgenfilme	Mikrotec,
Imagequant Software	Amersham		

2.1.2. Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden handelsübliche Chemikalien in Analysequalität und Biochemikalien folgender Firmen verwandt: Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), New England Biolabs (Schwalbach), Invitrogen (USA), Promega (Mannheim), Stratagene (Heidelberg), Boehringer (Mannheim). Radioaktive Substanzen wurden von Amersham (Braunschweig) und ICN (Eschwege) erworben.

Molekularbiologie

Agar	Sigma	Agarose	Roth
Alkalische Phosphatase	Promega	Blotto	SantaCruz
Borsäure	Roth	Bromphenolblau	Chroma
CaCl ₂	Roth	Chloroform	Roth
DEPC	Ambion	EDTA	Roth
Äthanol	Roth	Ethidiumbromid	Sigma
Formamid	Roth	Hefextrakt	Sigma
HEPES	JCBaker	H ₂ O ₂	Roth
Isopropylalkohol	Roth	Lachssperma-DNA	Promega
Methanol	Roth	Molekulargewichtsmarker	
		100bp DNA Leiter	LifeTech
Natriumdodecylsulfat	Sigma	NBT/BCIP	Roche
NTP Mix 10x	Invitrogen	Paraformaldehyd	Sigma
PIPES	Sigma	RNAse-Inhibitor	Promega
Transkriptionspuffer			
SP6 oder T7	Roche	Tris(trimethylsilyl)silan	Sigma
Triton	Sigma	Trypton (Casein-Pepton)	Roth

TWEEN-20	Serva	³² P-UTP	ICN Biomedicals
Yeast Transfer RNA	Boehringer	λ Hind III	
		Molekulargewichtsmarker	Stratagene

Enzyme

DNase 1	Boehringer	Proteinase K	Sigma
Restriktionsendonukleasen	Promega	RNAse A	Boehringer
RNAse T1	Boehringer	SP6 RNA-Polymerase	Roche
T4-Ligase	Promega	T7 RNA-Polymerasen	Roche
Taq Polymerase	Invitrogen		

Zellkultur und Histologie

BSA	Sigma	CoCl ₂	Sigma
Complete®	Boehringer	Chemilumineszenzsystem	NEN
DMEM Medium	Gibco	DMSO	Roche
DTT Dithiothreitol	Boehringer	Eosinbad	Sigma
Glycin	Sigma		
H 1200 Mounting			
Medium mit DAPI	Vectashield	Hämalaun	Sigma
KCl	Sigma	KH ₂ PO ₄	Sigma
MgCl ₂	Sigma	Na ₂ HPO ₄	Sigma
NaCl	Sigma	PBS steril	Gibco
Penicillin	Invitrogen	PMSF	Boehringer
RPMI 1640 Medium	Gibco	Sera: NGS, NDS, NMS, NRS	Sigma
Streptomycin	Invitrogen	Tissue Tek O.C.T.	Sakura Finetek
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom		

Antikörper/ Konjugate

Antigen	Zielspezies	Spezies, Isotyp	mono-/ polyklonal	primär/ sekundär/ ggf. Markierung	Hersteller
Wt1 c-19	Ratte Maus Mensch	Kaninchen, IgG	polyklonal	primär	Santa Cruz
PCNA pc-10 proliferating cell nuclear antigen	Ratte Maus Mensch Insekten	Maus, IgG2a	monoklonal	primär	Santa Cruz
HIF1 α c-19	Ratte Maus Mensch Xenopus	Ziege, IgG	polyklonal	primär	Santa Cruz
PECAM-1m-20 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1	Maus Ratte Mensch	Ziege, IgG	polyklonal	primär	Santa Cruz
VEGF p-20	Maus, Ratte	Ziege, IgG	polyklonal	primär	Santa Cruz
Smooth Muscle α - Aktin (α SM 1)	Mensch, Maus, Ratte, Rind, Huhn, Frosch, Ziege, Meerschwein, Kaninchen, Hund, Schaf	Maus, IgG2a	monoklonal	primär	Sigma- Aldrich
HIF1 α	Mensch	Maus, IgG1	monoklonal	primär	Transduction Labs
WT1 (180)	Maus, Ratte, Mensch	Kaninchen IgG	polyklonal	primär	Santa Cruz
Aktin c-11	Maus, Ratte,	Ziege, IgG	polyklonal	primär	Santa Cruz

	Mensch				
IgG H+L	Kaninchen	Ziege, IgG		sekundär biotinyliert	Vector Labs
Detektionskomplex				Streptavidin Cy3	Sigma
IgG (H+L)	Maus	Ziege	--	sekundär FITC	Dianova
IgG (H+L)	Kaninchen	Ziege	--	sekundär FITC	Dianova
IgG	Kaninchen	Ziege	--	sekundär HRP	Santa Cruz
IgG	Maus	Ziege	--	sekundär HRP	Santa Cruz
IgG	Ziege	Maus	--	sekundär HRP	Santa Cruz

Reaktionskits

β-Gal Enzyme Assay System	Promega	Concert Gelelution	Invitrogen
Gel Shift Assay System	Promega	Lowry BIORAD DC	BioRad
MaxiScript Kit	Ambion	Bradford DC	BioRad
Qiagen Plasmid Maxi	Qiagen	Qiaprep Plasmid Mini	Qiagen
Transformationskompetente Bakterienzellen E.coli DH5α			
"MaxEfficiency"	LifeTech	Trizol RNA-Isolation	Invitrogen

Oligonukleotide

Die Sequenzen verwendeter Primer und Oligonukleotide sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt und wurden von der Fa. LifeTechnologies (Karlsruhe) bezogen.

Plasmide

pGEM-4Z	Promega	pcDNA 3	Invitrogen
pGL2basic	Promega	pEGFP	Clontech

2.1.3. Lösungen

Alle Lösungen wurden mit dd-H₂O (bidestilliertem Wasser) aus einer Reinstwasseranlage angesetzt.

10x TBE-Puffer: Tris Base 108.0 g; Na₂EDTA 9.3 g; Borsäure 55.0 g; ddH₂O ad 1000 ml ;pH 8.3

DEPC-Wasser:

0.1% Diethylpyrocarbonat (DEPC)/ dd-H₂O, autoklaviert

STE-Puffer:

Tris-Puffer 10 mM pH 7.5; EDTA 5 mM; SDS 0.1%

Hybridisierungspuffer (RNase Protektionsassay)

80% Formamid ; 40 mM PIPES; 400 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 6.4

RNase-Puffer

200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 10 mM Tris-Cl ; pH 7.5

Gel-Ladepuffer

80% Formamid; 1xTBE-Puffer; 0.1% Bromphenolblau; 0.1% Xylencyanol

20x SSC

175.3 g NaCl ; 88.23 g Tri-Natrium-Citrat in 900 ml ddH₂O lösen, pH 7.0 einstellen

PBS

8.18 g NaCl; 0.186 g KCl; 0.218 g KH₂PO₄; 2.15 g Na₂HPO₄ ; ddH₂O ad 1000ml

Puffer für mRNA in situ-Hybridisierung

Äquib 1/ Wash 1

Tris 100 mM; NaCl 150 mM; pH7.5

Äquilib 2

Tris 100 mM; NaCl 100 mM ; MgCl₂ 50 mM; pH 9.5

S.O.C. Medium

Bacto Trypton 20.0 g; Bacto Hefeextrakt 5.0 g; NaCl 0.6 g; KCl 0.5 g; MgCl₂ 10 mM
MgSO₄ 10 mM; Glucose 20 mM

LB Medium

Hefeextrakt (BBL) 0.5% 5 g; Trypticase Pepton (BBL) 1% 10 g; NaCl 1% (0.2 M)
10 g; ddH₂O ad 1000 ml, autoklavieren

LB Platten

Hefeextrakt (BBL) 0.5% 5 g; Trypticase Pepton (BBL) 1% 10 g; NaCl 0.2 M 10 g
Agar 1.5 % 15 g; H₂O autoklaviert ad 1000 ml, autoklavieren

2× HEBS

50 mM HEPES [pH 7.05]; 1.5 mM Na₂HPO₄; 10 mM KCl; 280 mM NaCl; 12 mM
Glucose

Puffer für Kernextraktpräparation

<u>Puffer A:</u>	10 mM Tris pH 7.9	<u>Puffer C:</u>	20 mM Tris pH 7.9
	10 mM KCl		420 mM NaCl
	1.5 mM MgCl		1.5 mM MgCl
	10 % Glycerol		0.2 mM EDTA
	10 mM K HPO		10 % Glycerol
	1 mM Na-Vanadat		10 mM K HPO
	10 mM NaF		1 mM Na-Vanadat
			10 mM NaF

Reaktionspuffer für Gelshiftassay

10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl ; 50 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 5mM
DTT; 5% Glycerol; 0.05 mg/ml Heringsperma-DNA.

Extraktionspuffer für Westernblot

6,65M Harnstoff; 10% (v/v)Glycerol; 1% SDS; 100 µM Tris pH 6,8 in ddH₂O ; 0,05 mM Na-Vanadat; 5 mM Dithioerythritol ; Proteinaseinhibitoren-Cocktail (Complete)

Laemmli-Puffer

500 mM Tris-HCl ; 100 mM DTT; 2% SDS; 0.1% Bromphenolblau; 10% Glycerol; pH 6.8

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Zellkulturgefäße Kunststoff	Nunc G	Gefäße 2.0 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Eppendorf	Pipettenspitzen	Sarstedt
Kunststoffpipetten	TPP	Pasteurpipetten	Brand
Objektträger und Deckgläser	Langenbrinck	Glasware	Schott
Sterilfilter	Millipore	Minisäulen	Pharmacia
Röntgenfilm	Pharmacia		
Polyvinyliden-Difluorid-Membranen	Pharmacia		

2.2. Versuchstiere

Es wurden 6 Wochen alte männliche Wistar-Kyoto-Ratten (n=80) mit einem Gewicht von 250-280 g verwendet. Die Tierhaltung erfolgte artgerecht unter Beachtung der Richtlinien für die Versuchstierhaltung in den tierexperimentellen Einrichtungen der Charité (Tierversuchsgenehmigung Aktenzeichen G0303/00 vom 13. März 2001).

2.3. Infarktinduktion, Gewebegewinnung

Das Infarktmodell bei der Ratte wurde in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Benno Nafz, Johannes-Müller-Centrum für Physiologie, Charité, entwickelt und durchgeführt. Die Infarktinduktion erfolgte an narkotisierten Ratten (400 mg/kg Chloralhydrat intraperitoneal) durch Ligation des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (45). Die 24 h postoperative Überlebensrate betrug 25%. Eine weitere Versuchstiergruppe (n=20) wurde dem gleichen operativen Eingriff ohne Ligation der linken Koronararterie unterzogen (SHAM). Hier betrug die 24 h postoperative Überlebensrate 100%. Die Tiere wurden 4 Gruppen randomisiert zugeordnet (je n=5). Zu verschiedenen postoperativen Zeitpunkten (24 h, bzw. 3, 6

und 9 Wochen) wurden die Ratten mit Äther narkotisiert, thorakotomiert und die Herzen entnommen. Rechter und linker Ventrikel wurden jeweils separat präpariert und gewogen. Die endokardiale Infarktzone (Nekrosezone nach 24 h, Narbengewebe nach 3 und mehr Wochen) wurde in Relation zur gesamten Endokardfläche bestimmt. Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Als Hypertrophiemodelle wurden spontan hypertensive Ratten (SHR) sowie Tiere mit transgener kardialer Überexpression der Gene für humanes Angiotensinogen und Renin (TGR) verwendet. Die doppelt transgenen Ratten wurden von Dr. Jürgen Bohlender (MDC Berlin-Buch) zur Verfügung gestellt (43).

2.4. RNA-Extraktion

Gesamt-RNA wurde separat aus dem rechten und linken Ventrikelmyokard unter Verwendung von Trizol[®]-Reagenz extrahiert. Je 50–100 mg Gewebe wurden in 1ml Trizol[®] im stickstoffgekühlten Mörser homogenisiert und 5 min lang bei Raumtemperatur in Eppendorf-Gefäßen inkubiert. Nach Zugabe von 0.2ml Chloroform pro 1 ml Trizol[®]-Reagenz erfolgte die Separation von organischer und wässriger Phase mittels Zentrifugation (12.000x g, 15 min, 4°C). Die RNA wurde mit Isopropylalkohol präzipitiert, in 75% igem Äthanol gewaschen und anschließend in RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm. Der Quotient $OD_{260} : OD_{280}$ diente zur Abschätzung der Reinheit der präparierten RNA und betrug in allen Fällen mehr als 1.8

2.5. RNase-Protectionassay zur Quantifizierung der *Wt1* mRNA

Wt1 mRNA in Rattenherzen wurde durch einen sensitiven RNase-Protectionassay nachgewiesen. Bei dieser Technik wird aus Zellen bzw. Gewebe isolierte RNA mit spezifischen antisense-RNA Sonden in wässriger Lösung hybridisiert. Bei Ausbildung spezifischer RNA-RNA Hybride sind diese gegenüber dem Abbau durch RNAsen geschützt. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Polyacrylamidgel werden die Hybride mittels Autoradiographie dargestellt.

Als Vorlage für die *in vitro* Transkription der antisense-RNA Sonden diente pGEM4Z Vektor, in dessen BamHI-PstI Restriktionsstellen eine 271-bp Sequenz aus der *Wt1* cDNA der Ratte (NCBI Nr. NM_031534) kloniert war (46). Das DNA-Insert umfasste

Exon 4 bis 7 der *Wt1* cDNA. Die zu erwartenden geschützten RNA-Fragmente waren 271 bzw. 220 Nukleotide lang, entsprechend der An- bzw. Abwesenheit von alternativ gespleisstem Exon 5. Das Plasmid zur Herstellung einer antisense-Sonde für U6 snRNA wurde von Dr. P. Ratcliffe (Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Oxford, UK) zur Verfügung gestellt (NCBI Nr. X01366). Die antisense-Sonden wurden mit ^{32}P -UTP (250 Ci/mmol) auf eine spezifische Aktivität von 5×10^8 cpm/ μg markiert. Dazu wurde 1 μg linearisierte und gereinigte Plasmid-DNA unter Verwendung von SP6- (WT1-Sonde) bzw. T7-RNA-Polymerase (U6 snRNA-Sonde) in vitro transkribiert. Der Reaktionsansatz für die in vitro-Transkription bestand aus 1 μg linearisierter Plasmid-DNA, je 2.0 μl GTP/CTP/ATP (je 10mM), 2.0 μl ^{32}P -UTP, 2 μl 10x Transkriptionspuffer, je 2.0 μl SP6 oder T7 RNA-Polymerase, DEPC- H_2O ad 20 μl . Die Reaktionsansätze wurden 2 h lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert, anschließend mit 2 μl DNaseI verdaut und über G50-Minisäulen gereinigt. Danach erfolgte die Szintillationsmessung zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der RNA-Sonde.

Jeweils 20 μg der präparierten Gesamt-RNA wurde mit je 5×10^5 cpm der *Wt1*-antisense und U6 snRNA-Sonden hybridisiert. Durch Zugabe von Hefe-Transfer-RNA wurde der RNA-Gehalt der Hybridisierungsansätze auf insgesamt jeweils 50 μg eingestellt. Das Volumen der Reaktionen betrug 50 μl . Die Ansätze wurden 15 min lang bei 95°C denaturiert und anschließend über Nacht bei 55°C in Hybridisierungspuffer inkubiert. Um nicht-hybridisierte RNA abzubauen, wurde ein RNase A/T1-Gemisch verwendet. Dieses bestand als 100-fach konzentrierte Stammlösung aus 200mg RNase T1 und 4 mg RNase A gelöst in 1 ml RNase-Puffer. Am Folgetag wurden je 350 μl RNase A/T1-Gemisch in RNase-Puffer zugegeben und die Proben 30 min lang bei 25°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Proben 30 min lang bei 37°C mit 0.15 mg/ml Proteinase K (in 0.5%igem Natriumdodecylsulfat, SDS) behandelt. Zur internen Kontrolle wurde ein Zehntel (10 Vol.%) der mit U6 small nuclear (sn) antisense-RNA hybridisierten Proben (0.1 μg) den mit *Wt1* antisense-Sonde hybridisierten Proben zugesetzt. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion und Äthanol-fällung wurden die luftgetrockneten RNA-Pellets in Gel-Ladepuffer (80% Formamid, 1xTBE-Puffer, 0.1% Bromphenolblau, 0.1% Xylencyanol) resuspendiert. Die Proben wurden 5 min lang bei 95°C erhitzt und auf einem 8%igen denaturierenden Polyacrylamidgel in 1x TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (300 V, 3 h). Das Gel wurde in einem Geltrockner

getrocknet und bei -80°C zwischen 2 Verstärkerfolien mindestens 36 h lang auf Röntgenfilm exponiert. Nach Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte die Quantifizierung der Autoradiographie mittels Densitometrie. Das Verhältnis der spezifischen Wt1-mRNA zu U6 snRNA Signale wurde nach Hintergrundsubtraktion ermittelt.

2.6. Immunhistochemische Färbungen

Die Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Tissue Tek O.C.T. Compound eingebettet. Zehn μm dicke Kryostatschnitte wurden auf gelantinierte Glasobjektträger aufgetragen und bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt. Die Fixierung der Gewebeschnitte erfolgte für 15 min mit 3% Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur. Danach wurden die Gewebeschnitte 5min lang in PBS gewaschen, anschließend für 5min in einer Lösung aus 3% H_2O_2 : Methanol (1:4 vol.) inkubiert und erneut 15min lang in PBS gewaschen.

Zur Permeabilisierung und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte 1h lang bei Raumtemperatur mit 10% gereinigtem Serum aus der Tierspezies des jeweils verwendeten Zweitantikörpers in PBS/0.1% Triton X-100/3% BSA inkubiert.

WT1-Einfachfärbung

Die Inkubation mit polyklonalem WT1-Primärantikörper aus dem Kaninchen (1:150 Verdünnung in PBS/1%BSA) erfolgte 16 h lang bei 4°C . Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 3x15 min in PBS/0.1% Triton X-100 gewaschen. Mit biotinyliertem, gegen Kaninchen IgG gerichtetem Zweitantikörper (1:150 Verdünnung in PBS/1% BSA) wurde 1.5 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde wiederum 3x15min lang in PBS/0.1% Triton X-100 gewaschen. Es erfolgte eine einstündige Inkubation mit Streptavidin-Cy3-Komplex (1:200 Verdünnung in PBS/0.1%Triton X-100) bei Raumtemperatur und drei Waschschrte von jeweils 10 min Dauer in PBS/0.1% Triton X-100.

Immundoppelfärbungen

Zur Doppelmakierung von WT1 und einem weiteren Protein wurden die Gewebeschnitte zunächst wie oben beschrieben mit einem gegen das WT1-Protein gerichteten Antikörper behandelt (s.o.). Anschließend erfolgte eine 16-stündige

Inkubation bei 4°C mit jeweils dem jeweiligen Zweitantikörper. Als Negativkontrollen wurden die Gewebsschnitte mit normalen Serum anstelle von Primärantikörper inkubiert. Nach Behandlung mit Erstantikörper bzw. Normalserum wurde 3x15 min lang in PBS/0.1% Triton X-100 gewaschen. Es folgte eine 90 minütige Behandlung bei Raumtemperatur mit einem FITC-konjugierten spezifischen Fab-Fragment gegen das IgG des jeweiligen Erstantikörpers. Danach wurden die Gewebeschnitte erneut 3x15 min lang in PBS/0.1% Triton X-100 gewaschen und mit Deckgläsern versehen. Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurde DAPI enthaltendes Mounting Medium verwendet. Die Betrachtung der Gewebeschnitte erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop. Zur Dokumentation wurde ein digitales Videoimaging-System verwendet. Von allen Schnittserien wurden HE-Färbungen zur Beurteilung des Infarktareals angefertigt. Dazu wurde das frische Schnittmaterial in 3% Paraformaldehyd in PBS 15 min lang fixiert und anschließend in PBS/0.1% Triton X-100 5min lang gewaschen. Die Färbung erfolgte für 3-5 min im Hämalaun-Bad und anschließend für 10 min in Eosinlösung.

2.7. Nichtradioaktive mRNA in-situ Hybridisierung

Die nicht-radioaktive mRNA in-situ Hybridisierung wurde an paraformaldehydfixierten Kryostatschnitten durchgeführt (47). Dazu wurden zunächst Digoxigenin-markierte RNA-Sonden durch in-vitro-Transkription von HindIII-linearisierter Plasmid DNA unter Verwendung von SP6 RNA-Polymerase hergestellt. Als Vorlage für die in-vitro Transkription wurde dasselbe Konstrukt wie zur Herstellung der Sonde für den RNase-Protectionassay benutzt. Sense-RNA-Transkripte wurden mit T7 RNA-Polymerase von demselben Plasmid hergestellt. Die Linearisierung erfolgte in diesem Fall mit BamHI. Die Markierungsreaktion wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung von 1µg Plasmid-DNA durchgeführt.

Zehn µm dicke Kryostatschnitte wurden 15 min lang in 3%igem Paraformaldehyd (in PBS) fixiert und für 2 x 15 min in PBS/0.1% DEPC gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für weitere 15 min in 5xSSC (in DEPC-H₂O) äquibriert. Die Prähybridisierung erfolgte bei 58°C über 2 h in einer 50%igen Formamid- / 5xSSC-Lösung unter Zusatz von 60µg/ml Lachssperma-DNA. Die Hybridisierung wurde bei 58°C über einen Zeitraum von 48 h mit 400 ng/ml DIG-markierter RNA durchgeführt. Es folgten drei Waschschrte: 30 min in 2xSSC bei Raumtemperatur, 60 min in 2xSSC bei 37°C, 60 min in 0.1xSSC bei 37°C. Die Detektion der mRNA-Hybride

erfolgte durch Inkubation mit Alkalischer-Phosphatase-konjugiertem anti-Digoxigenin-Antikörper (1:1.000 Verdünnung in 100 mM Tris / 150 mM NaCl, pH 7.5 und 1.3% igem Blockierungsreagenz nach vorheriger Äquilibrierung (Puffer Äquilib 1). Daran schloss sich ein weiterer Waschschrift an. Es folgte die Äquilibrierung für 5 min (Puffer Äquilib 2) und die nachfolgende Färbung über Nacht mit NBT 45 µl / BCIP 35 µl in Puffer Äquilib 2 bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde die Färbereaktion durch 15 minütige Inkubation in Tris 10 mM/EDTA 1mM/pH 8.0 beendet, die Schnitte 1 h lang in 95% igem Äthanol inkubiert und für 3x15 min in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Nachfärbung mit Eosin (s.o.).

2.8. Zellkultur

Humane U2OS Osteosarkomzellen (ATCC-HTB 96) und Reh Lymphoblastzellen (ATCC-CRL 8286) wurden von der American Type Culture Collection erworben. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C in Gegenwart von 21% O₂ / 5% CO₂ kultiviert. Für die als Monolayer wachsenden U2OS-Zellen wurde DMEM-Medium mit Zusatz von 10% FCS, 100 i.E. Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Für die Reh-Suspensionskulturen wurde RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 100 i.E. Penicillin und 100µg/ml Streptomycin benutzt. Die Hypoxieexposition erfolgte bei 1% O₂ / 5% CO₂ über einen Zeitraum von 16 h. Zur Simulation einer Hypoxie wurden die Zellen 16h lang bei 21% O₂ / 5% CO₂ unter Zugabe von 100 µM CoCl₂ zum Kulturmedium inkubiert.

2.9. Plasmide

Der Promotor des murinen *Wt1*-Gens wurde aus genomischer DNA kloniert (P1 Klon 1405, Genome Systems, USA). Dazu wurde eine 767 bp umfassende Sequenz von -513 bp bis +254 bp relativ zur Transkriptionsstartstelle unter Verwendung der folgenden Oligonukleotidprimer mittels PCR amplifiziert:

5'-ACCCCGCAGCTAGCCTCTAGAAT-3'	(Vorwärtsprimer)
5'-GGCTCCCGGCGGAGCGTG-3'	(Rückprimer)

Das PCR-Produkt wurde in die KpnI/HindIII Schnittstellen des pGL2basic Reporterplasmids ligiert und durch Didesoxysequenzierung beider Nukleotidstränge verifiziert.

Die Ligationen erfolgten nach folgendem Schema:

1 µl T4-Ligase
2 µl 10x Ligasepuffer
2 µl linearisierter Vektor
10 µl Insert
5 µl ddH ₂ O

Die Konzentrationsberechnung der einzusetzenden DNA erfolgte nach der Formel:

$$x \text{ ng Insert} = (y \text{ ng Vektor} \times \text{Länge des Inserts in kb} \times 3) / \text{Länge des Vektors in kb.}$$

Zur Plasmidamplifizierung wurden kompetente Bakterienzellen (E.coli Stamm DH5α) nach Herstellerangaben durch einminütige Inkubation bei 42°C transformiert. Die Selektion der auf LB-Medium ausplattierten Bakterien erfolgte mit Ampicillin (100 µg/ml) als Zusatz zum Agar. Nach Auswertung von Minipräp-Kulturen wurde die endgültige Plasmid-DNA aus bakteriellen Schüttelkulturen unter Verwendung des Qiaprep Maxi Systems (Qiagen) gewonnen. Die korrekte Identität der DNA wurde durch Restriktionsverdau und Elektrophorese in einem 0.8% igen Agarosegel bestätigt.

Die Sequenzanalyse zeigte, dass der murine *Wt1*-Promotor (NCBI-Nr. AL512584) zwei potenzielle Bindungsstellen für den HIF-1-Transkriptionsfaktor (5'-RCGTG-3') aufweist. Die erste befindet sich bei ca. -217bp relativ zur Transkriptionsstartstelle und wird im Folgenden als HRE1 (hypoxie-responsives Element 1) bezeichnet. Die zweite potenzielle Bindungsstelle ist bei ca. +208 bp relativ zur Transkriptionsstartstelle lokalisiert und wird HRE2 genannt.

Mittels PCR wurden zwei Promotorkonstrukte hergestellt, in denen jeweils eine der putativen HIF-1-Bindungsstellen (HRE1 bzw. HRE2) deletiert war. Die beiden Konstrukte werden im Folgenden als pΔHRE1 bzw. pΔHRE2 bezeichnet.

```

accccgagctagcctctagaattctggacatgggaggagataagccccaaagttaggctatctgcctcagaacc
tggggcgtcgatcggagatcttaagacctgtaccctcctctattcggggtttcaatccgatagacggagtcttgg

caggagagttctctgggctctctgggtcccgcctcttggagcccacctgcccctccctccacccccacccttcc
gtcctctcaagagacccgagagaccaagggcgggagaaacctcgggtggacggggaggagggtgggggtgggaagg

tgattaacagcccggactcttctcctacttcgggtccgacaccgaggggactcattacttacctagacggccttgc
actaattgtcgggcctgagaagaggatgaagccaggctgtggctcccctgagtaatgaatggatctgccggaacg

ctcaaggcgcctacactcgggaaggccagctagggtagcagggggaggcttgcggtacagggcagctgagagcac
gagttccgcggatgtgagcccttcgggtcgatcccatcgtccccctccgaacgccatgtccggtcgactctcgtg

gtggcggggccagagaggagggtgtctccgagatgaacgctccctcgggccgccccacacccccggtgctagtaa
caccgcccgggtctctcctcccacagaggctctacttgcgagggagcccgggcgggggtgtgggggcccacgatcatt

cgggacgagcagcgcgctttgctgagctaggctagggtgctgtgtgaatggagcggccgagcatcctggctcc
ggcctgctcgtcgcgcgaaacgactcgatccgatcccgacgacacacttacctcgccggctcgtaggaccgagg

tcctcctccctgctgcccggccctcttatttgagctttgggaagctgggggcagccagggcagctggggttaagga
aggaggaagggacgacggccgggggagaataaaactcgaaacccttcgacccccgtcgggtcgtcgaccccattcct

gttcaaggcagcgcacacacccggggtctccgcaaccgaccgcctgctcctcctccttttcccggccc
caagttccgctcgcgggtgtgggccccgagagggcgttgggctggcggacggacgagggggaaaggaaaaggcggg

tcctcccaccactcattcaccacccaccagagagaggacggcagcccaggaacccgggcccgcctcct
agggaggggtgggtgagtaagtgggtgggtgggtctctcctcctgccgtcgggtccttgggcccgggcggcggagga

cgcccgatcctggacttctcctgctcgcaggagccggcttccacgtgtgtcccggagccggcgtctcagcacac
gccccgctaggacctgaaggaggacagcgtcctcggccgaaggcgcacacagggcctcggccgcagagtcgtgtg

gctccgcccgggagcc
cgaggcggccctcgg

```

Abb. 3: Sequenz des verwendeten murinen Wt1-Promotorkonstruktes (NCBI-Nr. AL512584). Die beiden putativen HIF-1 Bindungselemente sind gelb unterlegt. Die Transkriptionsstartstelle ist grau markiert.

2.10. Transfektionsexperimente

Transiente Transfektionen wurden unter Anwendung der Calciumphosphat-Präzipitationsmethode an ca. 60% konfluenten Zellen durchgeführt. Die Zellen (ca. 3×10^6) wurden jeweils am Vortag in 10cm Kulturschalen in frischem Medium ausgesät. Im Regelfall wurden pro Ansatz ca. 20 μg Plasmid-DNA bestehend aus 4 μg Reporterplasmid, 15 μg Expressionsvektor und 1 μg Cytomegalievirus-gesteuertem β -Galaktosidase-Expressionskonstrukt transfiziert. Dazu wurden die Plasmide zunächst in 450 μl sterilem Wasser gelöst. Anschließend wurde 50 μl CaCl_2 (2.5M) und tropfenweise 500 μl 2x HeBS zugegeben. Nach Mischen auf dem Vortex-Schüttler und einer 30 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Präzipitat auf die Zellkulturschalen pipettiert und dort über 12 Stunden belassen. Nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen für weitere 48 h im Inkubator kultiviert. Die Zellyse erfolgte nach zweimaligem Waschen in PBS in 900 μl Reporter-Lysepuffer pro 10 cm-Schale. Die Luziferaseaktivität wurde im Überstand der Zellysate in einem Luminometer gemessen. Die β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmungen erfolgten spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 420 \text{ nm}$.

2.11. Quantitative LightCycler Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Gesamt-RNA wurde aus Reh und U2OS-Zellen isoliert (s.o.) und jeweils als 1 μg Aliquots mit oligodT (SuperscriptII, Invitrogen) revers transkribiert. Pro 20 μl Reaktionsansatz wurde 1 μg RNA in die Reaktion eingesetzt. Die quantitative Echtzeit-PCR wurde unter Verwendung des LightCycler-Systems (Perkin Elmer Gene Amp 5700) durchgeführt (30).

Folgende Oligonukleotide wurden für die PCR-Amplifikation der humanen *WT1* Sequenz verwendet:

5'-ACAGGGTACGAGAGCGATAACCA-3' (Vorwärtsprimer)

5'-CACACGTCGCACATCCTGAAT-3' (Rückprimer)

Die Normalisierung erfolgte gegen ubiquitär exprimierte β 2-Makroglobulin-mRNA, die unter Verwendung der folgenden Oligonukleotidprimer amplifiziert wurde (49):

5'-GATGAGTATGCCTGCCGTGTG-3' (Vorwärtsprimer),
5'-CAATCCAAATGCGGCATCT-3' (Rückprimer)

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

<u>Reaktionsansatz:</u>	<u>PCR-Bedingungen</u>
0.75 U temperature-release ("hot start") Taq Polymerase	1.5 min 95°C
2 µl TaqPolymerase Puffer	8 sec 95°C
7.5 mM MgCl ₂	12 sec 68°C
0.2 mM dNTPs	20 sec 72°C
3 µg BSA	40 Zyklen
0.25 µM Vorwärtsprimer	
0.25 µM Rückprimer	
SYBR Green	
0.4 ng cDNA	

Die quantitative mRNA-Bestimmung beruhte auf einem Vergleich der ct (crossing time) -Werte, d.h. der bis zum Überschreiten der Hintergrundfluoreszenz erfolgten Anzahl an Amplifikationszyklen. Der ct-Wert ist direkt von der in die PCR-Reaktion eingesetzten cDNA-Menge abhängig. Zur Normalisierung wurden die gemessenen Werte gegen β 2-Makroglobulin normalisiert.

2.12. Elektrophorese-Mobilitätsshiftassay (EMSA, Gelshift-Assay)

Gelshiftassays wurden durchgeführt, um die Bindung von HIF-1-Transkriptionsfaktor an den *Wt1*-Promotor bei Hypoxie nachzuweisen. Dazu wurden Kernextrakte von normoxischen und hypoxischen bzw. mit CoCl₂ (100 µM) behandelten Zellen mit ³²P-
endmarkierten Oligonukleotiden aus dem *Wt1*-Promotor inkubiert. Bei Ausbildung von Protein-DNA Komplexen resultiert eine verzögerte Wanderungsgeschwindigkeit im nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel, die sich autoradiographisch nachweisen lässt.

Kernextraktpräparation aus U2OS-Zellen

Die Zellen wurden in 10cm-Kulturschalen auf ca. 80% Konfluenz expandiert. Die Hypoxieinduktion erfolgte durch 6 stündige Exposition bei 1% O₂ / 5% CO₂. Alternativ wurde ein Teil der Zellen 6 h lang in Gegenwart von 100 µM CoCl₂ unter normoxischen Bedingungen (20% O₂) inkubiert.

Nach Waschen in eiskaltem PBS wurden die Zellen (ca. 1x10⁸) von den Kulturschalen geschabt, bei 4°C zentrifugiert und in 200 µl eisgekühltem Puffer A (unter Zugabe von von 0.5 mM DTT, 0.5mM PMSF und Complete[®]-Proteinaseinhibitoren) aufgenommen. Die Zellyse erfolgte während 10-minütiger Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Zellkerne durch Zentrifugieren (4°C, 1400 rpm, 6min) pelletiert und in 30-50 µl eisgekühltem Puffer C (unter Zusatz von 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF und Complete[®]-Proteinaseinhibitoren) resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (4°C, 15.000 rpm, 10 min) wurden die Kernextrakte aus dem Überstand in Aliquots zu je 10 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford. Vor Verwendung für den Gelshift Assay wurden Aliquots der Kernisolate mittels SDS-PAGE/Western Blot (s.u.) bezüglich der Expression von HIF-1α untersucht.

Für die Gelshiftexperimente wurden folgende doppelsträngigen Oligonukleotide verwendet. Oligonukleotid I (5'-GAGAGCACGTCGCGGGCCAG-3') enthält die potenzielle HIF-1 Bindungsstelle aus dem *Wt1*-Promotor. In Oligonukleotid II (5'-GAGAGCTTTTGCGGGCCAG-3') wurde die minimale HIF-1 Bindungssequenz mutiert. Als Positivkontrolle wurde ein 17-bp Oligonukleotid mit der HIF-1 Bindungsstelle aus dem 3'-Enhancer des humanen Erythropoietingens verwendet: 5'-GCCCACGTCGCTGTCTCA-3' (50). Die Oligonukleotide wurden jeweils mit γ^{32} P-ATP (spez. Aktivität: 3000 Ci/mmol bei 10mCi/ml) endphosphoryliert und über G25 Säulen gereinigt. Nach Bestimmung der spezifischen Aktivität durch Szintillationsmessung wurden je Reaktionsansatz 2x10⁵ cpm an markiertem Oligonuklotid verwendet.

In die Bindungsreaktionen wurden jeweils 5 µg Kernextraktprotein in einem Gesamtvolumen von 20 µl Reaktionspuffer eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden 15min lang auf Eis inkubiert. Zum Nachweis eines Supershifts wurden die Kernextrakte mit je 0.25 µg eines monoklonalen anti-HIF-1α-Antikörpers 30min lang auf Eis präinkubiert. Danach erfolgte die DNA-Bindungsreaktion wie oben beschrieben. Nach Inkubation wurden die Reaktionsansätze auf ein 6% iges nicht-

denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 200 V in 0.5xTBE-Laufpuffer bei 4°C separiert. Das Gel wurde getrocknet und auf Röntgenfilm mindestens 48 h lang exponiert.

2.13. SDS-Elektrophorese und Western Blot

Zellen subkonfluenter Kulturen bzw. die unter flüssigem Stickstoff pulverisierten Gewebeproben wurden in ein 15 ml Falcon® Gefäß überführt, 5 min lang bei 1.500 rpm (4°C) zentrifugiert, und anschließend je nach Pelletgröße in 0.5-2ml Extraktionspuffer aufgenommen. Die Proben wurden 4x15 s lang in einem Gewebehomogenisator auf Eis bearbeitet, nach 20 minütiger Inkubation bei 3.000 rpm (4°C, 5 min) zentrifugiert, und der Überstand (Gesamtzell-Proteinisolat) in 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch bei 280 nm sowie nach der Methode von Lowry bei 750 nm.

Gesamtzell-Proteinisolate wurden in Laemmli-Puffer bei 75°C 7min lang im Wärmeblock denaturiert. Pro Bahn wurden 30 µg Protein aufgetragen und nach gelelektrophoretischer Trennung in einem 6% Polyacrylamid-Gel mittels eines halbtrockenen Blottingsystems auf Polyvinylidendifluorid-Membranen übertragen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen 60min lang bei Raumtemperatur in einer PBS/5% Blotto /0.05% TWEEN-20-Lösung inkubiert. Es wurden ein polyklonaler anti-Wt1-Antikörper in 1:100-facher Verdünnung (in PBS/5%Blotto/0.05% TWEEN-20) und ein monoklonaler anti-HIF-1α-Antikörper in 1:100-facher Verdünnung (in PBS/5%Blotto/0.05% TWEEN-20) verwendet. Die Inkubation fand über Nacht bei 4°C statt. Danach wurde 3x je 15 min in PBS/0.05% TWEEN-20 gewaschen. Es folgte die einstündige Inkubation mit HRP-konjugierten Zweitantikörpern bei Raumtemperatur. Danach wurden die Membranen nochmals 3x15 min lang in PBS/0.05% TWEEN-20 gewaschen. Die Darstellung der Proteinbanden erfolgte auf Röntgenfilm mittels Chemiluminiszenz. Zum Entfernen der Antikörper wurden die Membranen 30 min lang bei 56°C mit 0.2 M Glycin, pH 2.5 30 min lang gewaschen. Danach wurden sie mit einem polyklonalen anti-β-Aktin-Antikörper (1:500 verdünnt in PBS/5%Blotto/0.05% TWEEN-20) über Nacht inkubiert und entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll behandelt.

2.14. Statistische Auswertung

Alle Angaben erfolgen - sofern nicht anders bezeichnet - als Mittelwerte \pm S.E.M. Statistische Vergleiche der mRNA-Messungen innerhalb der Gruppen wurden mittels eines einseitigen ANOVA Tests mit einem Bonferroni-Test als post-hoc Analyse durchgeführt. Werte von $P < 0.05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft.