

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. MATERIAL

3.1.1. Chemikalien

Agarose Seakem	Biozym
Agarose Seaplaque	Biozym
3-Aminopropyltriethoxysilan	Sigma
Ammoniumacetat	Merck
Bacto-Trypton	Difco
Bovines Serumalbumin	Merck
Bovines Serumalbumin, RNase-und DNase frei	Pharmacia
Bromphenolblau	Sigma
Dextransulfat	Sigma
Diethylpyrocarbonat	Sigma
Dithiotreitol	Sigma
Ethanol (EtOH)	Merck
Eosin G	Sigma
Ethidumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Eukitt	Merck
Extran MA 01	Merck
Faramount	Dako
Ficoll	Sigma
Formamid	Merck
Hämatoxylin	Shandon
Hefeextrakt	Serva
Kristallviolett	Merck
Maxi-Präp Isolationskit	Qiagen

3. Material und Methoden

mRNA Isolationskit	Dynal
Natriumdodecylsulfat	Sigma
Neu Fuchsin-Substratsystem	Dako
OCT compound	TissueTek
Orange-G	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Sephadex G 50 Säulen	Roche
Silikonlösung	Serva
StreptAB/AP-Komplex	Dako
Xylencyanol FF	Sigma

Alle weiteren Chemikalien wurden von Merck bezogen.

3.1.2. Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (suppl. mit Glucose, Glutamin und NaHCO ₃)	Gibco
Foetales Rinderserum	Gibco
Hepes	Gibco
Penicillin-Streptomycin	Gibco

3.1.2. Enzyme

DNase I, RNase frei	Roche
Proteinase K	Merck
Restriktionsenzyme	Roche
RNAguard	Pharmacia
SP6-und T7-RNA-Polymerasen	Roche
RNase A, DNase-frei	Roche
rTth-DNA-Polymerase	Perkin-Elmer
Taq-DNA-Polymerase	Perkin-Elmer

3.1.3. Nukleotide und Nukleinsäuren

Desoxyribonukleotide	Perkin-Elmer
Ribonukleotide	Pharmacia
³⁵ S-UTP	NEN-Dupont
Rabbit Liver t-RNA	Sigma
Salmon Sperm DNA	Pharmacia
Low range RNA-Marker	peqlab
φx / HaeIII	MBI Fermentas
λ / Eco RI - HindIII	MBI Fermentas

3.1.4. Plasmide

pCVB3-R1	Hohenadl, MPI für Biochemie, Martinsried
pSPT 18-Neo	Roche

3.1.5. Bakterienstämme

Escherichia coli DH5α	Stratagene
-----------------------	------------

3.1.6. Antikörper

Biotinyliertes Anti-Ratten-IgG aus dem Schaf	Amersham
Ratte-Anti-Mac 1 (Klon M1/70)	Roche
Ratte-Anti-Maus Ia (Klon M5/114)	Roche
Ratte-Anti-Maus CD 4 /L3T4 (Klon H129.19)	Pharmingen
Ratte-Anti-Maus CD 8/Lyt-2 (Klon 53-6.7)	Pharmingen
Ratte-Anti-Maus CD 45 R/B220 (Klon RA3-6B2)	Pharmingen

3.1.7. Sonstiges

Blotting paper	Whatman
Bottle-Top Filter	Falcon
DAKO-Pen	Dako
Deckgläschen	Langenbrinck
Entwickler D19	Kodak
Fixogum Klebstoff	Marabou
Fillemulsion NBT-2	Kodak
Fixierer	Kodak
Objekträger	Langenbrinck
Röntgenfilme	NEN Dupont

3.1.8. Viren

cDNA generiertes CVB3 (Nancy strain), 3x herzpPassagiert	Kandolf, MPI für Biochemie, Martinsried
---	--

3.1.9. Versuchstiere - ingezüchtete Mausstämme

C57BL/6J Mäuse (H-2 ^b)	Jackson Laboratories
β ₂ Mikroglobulin knock out Mäuse (H-2 ^b)	Jackson Laboratories
Perforin knock out Mäuse (H-2 ^b)	Jackson Laboratories

3.2. METHODEN

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Medien und Puffer für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, suppl. mit Glucose, Glutamin und NaHCO_3),
supplementiert mit:

1mM Hepes

100 units/ml Penicillin/Streptomycin

10% Foetales Rinderserum (FRS)

Phosphate Buffered Saline (PBS): 137 mM NaCl
2,7 mM KCl
6,5 mM Na_2HPO_4
1,5 mM KH_2PO_4

3.2.1.2. Kultivierung von Verozellen

Adherente Verozellen wurden in DMEM mit 10% FRS (foetales Rinderserum) und 100 units/ml Penicillin/Streptomycin bei 37°C, 5%iger CO_2 -Atmosphäre und 90%iger relativer Luftfeuchtigkeit in 250 ml Zellkulturflaschen kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden nach Abnahme des Mediums die Kulturen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1,5 ml (flächenabhängig) einer 0,25% Trypsin-/0,01% EDTA-Lösung in PBS für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in FRS-haltiges DMEM aufgenommen, durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt und verdünnt (1:5-1:10) in neue Zellkulturflaschen eingesät. Das Kulturmedium wurde jeden 3. Tag gewechselt. Alle Arbeiten wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt.

3.2.2. Virologische Methoden

3.2.2.1. Virusvermehrung

Zur Virusvermehrung wurden konfluente Verozellkulturen nach Medienabnahme einmal mit PBS gewaschen und mit einer plaquebildenden Einheit einer cDNA-generierten, 3x herzpassagierten CVB3-Variante (Kandolf & Hofschneider, 1985) pro Zelle inoculiert. Nach einer Stunde Inkubationsdauer bei Raumtemperatur unter leichtem Schaukeln wurde das Inokulum abgenommen, Zellkulturmedium zugegeben und die Kultur bei 37°C, 5%iger CO₂-Atmosphäre und 90%iger relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 Stunden zeigten die infizierten Kulturen einen 90%igen cytopathogenen Effekt (cpE). In diesem Infektionsstadium wurden die Kulturen bei -20°C eingefroren. Nach dreimaligem Frieren und Tauen wurde die virushaltige Suspension mit 3000 rpm 10 Minuten in einem H1000B-Rotor von Sorvall zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, portioniert und bei -20°C gelagert.

3.2.2.2. Medien und Lösungen für die Virustitration

Plaqueassay-Medium: Mischung (1:1) aus den Lösungen A und B

Lösung A, 37°C: 2xDMEM
 10% FRS

Lösung B, autoclaviert und auf 55°C vorgewärmt:
 2% Seaplaque-Agarose (low melting)
 30 mM MgCl₂

Kristallviolettlösung: 5 g Kristallviolett lösen in 100ml 37% Formalin und 200ml 100% Ethanol, dann Zugabe von 700ml bidestilliertem Wasser, 35 ml 2M Tris-Base und 10 g CaCl₂, ad 2000ml bidestilliertes Wasser.

3.2.2.3. Virustitration

Die quantitative Bestimmung der Infektiosität einer Virussuspension erfolgte durch den Plaquetest. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Zytogenität des verwendeten Virus für eine bestimmte Zellart und auf der eingeschränkten Virusausbreitung nach Überschichtung des Zellrasens mit Agarose. Dabei führt die Virusvermehrung zu makroskopisch sichtbaren lytischen Herden, sogenannten "Plaques", die deutlich von der Umgebung abgesetzt sind. Ein Plaque kann auf die Infektion einer Zelle mit einem infektiösen Partikel zurückgeführt werden. Um den Virustiter einer Lösung zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe des zu titrierenden CVB3-Virusstocks von 10^{-1} bis 10^{-9} in DMEM angelegt. Konfluente Verozellmonolayer in 60 mm Petrischalen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit je 0,5 ml der Virusverdünnung überschichtet. Nach einer Stunde Inkubationsdauer bei Raumtemperatur unter leichtem Schaukeln wurde die Verdünnung abpipettiert und die Kulturen mit je 5 ml Plaqueassay-Medium überschichtet. Die Zellkulturen wurden bis zum Erstarren des Plaqueassay-Mediums bei Raumtemperatur belassen. Danach wurden die Kulturen für 48 Stunden bei 37°C, 5%iger CO₂-Atmosphäre und 90%iger Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach der zweitägigen Kultivierung wurden die Zellen mit 5%iger Trichloressigsäure zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Das Plaqueassay-Medium wurde vorsichtig entfernt und die Plaques durch eine Vitalfärbung mit Kristallviolettlösung sichtbar gemacht. Da Kristallviolett nur lebende Zellen anfärbt, werden die Bereiche der durch die Virusinfektion abgetöteten Zellen als klare Plaques auf dem violetten Zellrasen sichtbar. Die Plaquezahl wurde in jenen Verdünnungsstufen ermittelt, welche eine Gesamtzahl von 100 Plaques nicht überschritten. Anhand des eingesetzten Volumens und der ermittelten Plaquezahl wurde der Virustiter als Plaquebildende Einheit/ml (PBE/ml) berechnet. Als Kontrollen wurden 2 Petrischalen mit 0,5 ml DMEM (Negativkontrolle) und 2 Petrischalen mit 0,5 ml einer Virusstocklösung bekannten Titers (Positivkontrolle) inkubiert und in gleicher Weise mitgetestet.

3.2.3. Tierversuch

Die Tierversuche wurden gemäß den Bestimmungen des Tierversuchsantrages PA1/94 durchgeführt, welcher vom Regierungspräsidium Tübingen nach den Bestimmungen über den Vollzug des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 17.02.1993 genehmigt wurde.

3.2.3.1. Tierhaltung

Die Mäuse (C57BL/6J Mäuse, Perforin knock out Mäuse und β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse) wurden in Gruppen zu 4-8 Tieren in 420 x 260 mm² großen Käfigen auf Weichholzgranulat gehalten. Sie erhielten pelletiertes Futter (Mäuse/Rattenstandarddiät) und Wasser ad libitum. Der Tierraum war beheizt (24°C) und mit geregelter Zu- und Abluft ausgestattet. Die Käfige wurden zweimal in der Woche gewechselt und 20 Minuten bei 121°C autoclaviert.

3.2.3.2. Infektion und Tötung der Versuchstiere

Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Infektion 4-5 Wochen alt. Die Infektion erfolgte durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von 1×10^5 pfu CVB3 in 200 μ l PBS pro Maus. Den Kontrolltieren wurde 200 μ l PBS i.p. injiziert. Die Mäuse wurden durch CO₂-Gas getötet.

3.2.3.3. Serumgewinnung und Organentnahme

Unmittelbar nach Tötung der Tiere wurde den Mäusen der Brustkorb eröffnet und durch Punktion der großen Gefäße sowie des Herzens konnte 0,4-0,6 ml Blut gewonnen werden. Nach einer Stunde bei 4°C wurde das Blut 15 Minuten mit 10000 rpm in einem F-12/M.18-Rotor von Sorvall zentrifugiert. Das Serum (200-300 μ l) wurde abgenommen, in sterile Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C gelagert. Die Organe Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas, Niere, Ileum und Gehirn sowie Skelettmuskulatur wurden mit einem sterilen Besteck entnommen und anschließend mit einem sterilen Skalpell geteilt.

3.2.3.4. Fixierung der entnommenen Organe

Je ein Teil der entnommenen Organe wurde in OCT Compound eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Der andere Teil wurde in 4%igem, mit PBS gepuffertem Paraformaldehyd 24 Stunden bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die fixierten Organe nochmals 24 Stunden bei 4°C in PBS gelagert, dann über eine

aufsteigende Alkoholreihe mit abschließender Durchtränkung mit Xylol dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die Lagerung der Paraffinblöcke erfolgte bei Raumtemperatur.

3.2.4. Anfertigung von Gewebeschnitten

3.2.4.1. Vorbehandlung der Objektträger

Die Objektträger wurden 24 Stunden in 10%iger, wässriger Extran MA 01-Lösung inkubiert. Danach wurden sie mit destilliertem Wasser gespült, bis sich kein Schaum mehr bildete. Anschließend wurden die Objektträger einmal in bidestilliertes, autoclaviertes Wasser getaucht und dann 8 Stunden bei 180°C gebacken. Nach dem Abkühlen wurden die Objektträger 10 Sekunden in 2%ige, wässrige 3-Aminopropyltriethoxysilanlösung getaucht. Das überschüssige Silan wurde durch zweimaliges Waschen mit Aceton und anschließendem Spülen mit bidestilliertem, autoclaviertem Wasser entfernt. Die silanisierten Objektträger wurden bei 40°C getrocknet und nach dem Trocknen staubfrei aufbewahrt.

3.2.4.2. Anfertigung von Kryo- und Paraffinschnitten

Sämtliche Gewebeschnitte wurden auf silanierte Objektträger aufgezogen. Für die immunhistologische Untersuchung wurden mit einem Gefriermikrotom (Shandon) bei -18°C circa 6 µm dicke Gewebeschnitte von den nativen, bei -70°C gelagerten Herzen infizierter und uninfizierter Mäuse angefertigt. Nach einstündiger Trocknung bei 37°C wurden die Gewebeschnitte 20 Minuten in 4°C kaltem Aceton fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C. Für die *in situ* Hybridisierung wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Mikrom) 4 µm dicke Schnitte von den in Paraffin eingebetteten Organen infizierter und uninfizierter Mäuse angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden 24 Stunden bei 37°C getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.2.5. Präparation von rekombinanten Plasmiden

3.2.5.1. Puffer und Lösungen für die Plasmidpräparation

LB-Medium	10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Bacto-Trypton ad 1 Liter bidestilliertes Wasser nach Autoclavieren und Abkühlen Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin
Puffer P1	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 mg/ml RNase A
Puffer P2	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer P3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
Puffer QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Ethanol 0,15% Triton X-100
Puffer QC	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Ethanol
Puffer QF	1,25 M NaCl 50 mM Tris/HCl, pH 8,5 15% Ethanol
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

3.2.5.2. Plasmidpräparation

Zur Herstellung einer radioaktiv markierten RNA-Sonde mittels *in vitro* Transkription muß das zu transkribierende Plasmid in ausreichender Menge vorliegen. Zur Gewinnung reiner Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurde die Methode der alkalischen Hydrolyse unter Verwendung von QIAGEN-tip 500-Säulen der Firma QIAGEN eingesetzt.

Escherichia coli DH5 α -Bakterien, welche mit dem Plasmid pCVB3-R1 transformiert waren, wurden in 100 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln vermehrt. Anschließend wurden die Bakterien in einem Sorvall GSA Rotor bei 6000 rpm und 4°C 15 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer 1 gründlich resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer 2 und einer Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde 10 ml Puffer 3 zugegeben und nach vorsichtigem Mischen wurde die Suspension 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension 30 Minuten bei 13000 rpm und 4°C in einem Sorvall SS-34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf die zuvor mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte QIAGEN tip 500-Säule geladen. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit je 30 ml Puffer QC wurde die Plasmid DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde anschließend mit dem 0,7 fachen Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und anschließend 30 Minuten bei 4°C und 11000 rpm in einem Sorvall SS-34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70% Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach Trocknung des Pellets im Vakuum wurde es in 300-500 μ l TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

3.2.5.3. Linearisierung des Plasmids pCVB3-R1

Zur Vorbereitung des Plasmids pCVB3-R1 für die *in vitro* Transkription wurde eine Linearisierung des Plasmids mit dem Restriktionsenzym SmaI durchgeführt. Hierzu wurden 30-40 μ g Plasmid-DNA mit 20 Einheiten SmaI über Nacht bei 25°C inkubiert. Die Vollständigkeit des Verdauens wurde mittels Gelelektrophorese überprüft (siehe 3.2.9.3.). Mittels des SmaI linearisierten Plasmids pCVB3-R1 lässt sich mit Hilfe der *in vitro* Transkription (siehe 3.2.6.) eine Sonde zum Nachweis enteroviraler Plusstrang-RNA generieren. Durch anschließende Phenolextraktion wurde das Restriktionsenzym entfernt.

3.2.5.4. Phenolextraktion

Proteine und andere Verunreinigungen können aus Nukleinsäurelösungen durch Extraktion mit Phenol entfernt werden. Die zu extrahierende Lösung wurde auf 200 µl mit TE-Puffer aufgefüllt. Nach Zugabe von 200 µl TE-gesättigtem Phenol und gründlicher Vermischung der beiden Phasen wurde durch 5-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm in einem Sorvall F-12/M.18-Rotor wieder eine Phasentrennung hergestellt. Die obere, wässrige Phase mit den Nukleinsäuren wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit einer Mischung aus TE-gesättigtem Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 wie beschrieben gemischt und erneut zentrifugiert. In einem letzten Extraktionsschritt wurde die abgenommene obere Phase mit Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 abermals vermischt und zentrifugiert. Danach folgte eine Fällung der Nukleinsäuren aus der wässrigen Phase mit Ethanol.

3.2.5.5. Ethanolfällung

Zur Konzentrierung des linearisierten und phenolisierten Plasmids und zur Entfernung eventueller Chloroformverunreinigungen wurde eine Fällung der Nukleinsäuren mit Ethanol durchgeführt. Dazu wurde die Nukleinsäurelösung mit 1/10 ihres Volumens 8 M LiCl und dem 3-fachen Volumen absolutem Ethanol versetzt und 30 Minuten bei -70°C gefällt. Anschließend wurde die Lösung 30 Minuten bei 4°C in einem Sorvall F-12/M.18-Rotor mit 12000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Nukleinsäurepellet vorsichtig zweimal mit kaltem, 70%igem Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Nach Aufnahme des Nukleinsäurepellets in 10 mM Tris, pH 8,2 wurde die Nukleinsäurekonzentration photometrisch bestimmt.

3.2.5.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine Extinktion von 1,0 etwa 50 µg doppelsträngiger DNA, 40 µg einzelsträngiger DNA oder RNA oder 20 µg Oligonukleotiden in 1 ml wässriger Lösung (Maniatis et al., 1982).

3.2.6. Herstellung der RNA-Hybridisierungssonden

Zum Nachweis coxsackieviraler Plusstrang-RNA mittels *in situ* Hybridisierung wurde eine strangspezifische CVB3-RNA-Sonde mit Minusstrang-Orientierung verwendet. Diese wurde durch *in vitro* Transkription mit SP6 RNA Polymerase des mit SmaI linearisierten Plasmides pCVB3-R1, welches 7128 (98%) Nukleotide des CVB3 Genomes enthält, hergestellt (Hohenadl et al., 1991). Als Kontrollsonde zum Nachweis unspezifischer Bindungen wurde das mit SmaI linearisierte Plasmid pSPT18-Neo, dessen 550 bp umfassendes Insert für die Neomycin-Resistenz kodiert, mit SP6 RNA-Polymerase transkribiert. Hierdurch erhält man 550 Nukleotide umfassende Minusstrang-Transkripte des Neomycin-Resistenzgens, welche, als Kontrollsonde eingesetzt, keine spezifischen Bindungen eingehen.

3.2.6.1. Radioaktive Markierung der RNA-Sonden

Um radioaktiv markierte CVB3-Minusstrang-Transkripte zum Nachweis von CVB3-Plusstrang-RNA bzw. radioaktiv markierte Kontroll-RNA zu erhalten, wurden für die Transkription jeweils 250 μCi ^{35}S -UTP mit einer Aktivität von 1300 Ci/mmol in einer Vakuumzentrifuge eingedampft. Das Pellet wurde in 10 μl Transkriptionslösung aufgenommen. Nach Zugabe von 1 μg linearisierter Plasmid-DNA und 20 Einheiten SP6 RNA Polymerase wurde alles gemischt und der Ansatz für 90 Minuten bei 37°C inkubiert.

Transkriptionslösung (Endkonzentrationen):

40 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM DTT
6 mM MgCl_2
2 mM Spermidin
100 mg/ml BSA (RNase- und DNase frei)
500 μM ATP
500 μM CTP
500 μM GTP
25 μM ^{35}S -UTP
1 U RNAGuard

Nach Inkubation wurde der Ansatz mit Diethylpyrocarbonat behandeltem, bidestilliertem Wasser (depc-Wasser) auf 50 µl aufgefüllt und die Plasmid-DNA mit 20 Einheiten DNase I bei 37°C 20 Minuten verdaut. Anschließend wurden die nicht eingebauten Nukleotide durch Sephadex G50 Säulenzentrifugation abgetrennt (siehe 3.2.6.2.) und eine Phenolextraktion durchgeführt, um Proteinverunreinigungen zu entfernen. Dabei kam die unter 3.2.5.4. beschriebene Methode zum Einsatz mit der Verwendung von Wasser-gesättigtem anstatt TE-gesättigtem Phenol. Nach Fällung der RNA mit 1/10 Volumen 8M LiCl und 3 Volumen absolutem Ethanol folgte eine alkalische Hydrolyse der RNA (siehe 3.2.6.3.). Abschließend wurde die RNA in depc-Wasser gelöst, dem 10 mM Dithiotreitol (DTT) als Oxidationsschutz zugegeben wurde. Die Aktivität der Proben wurde in einem Flüssigszintillationszähler (Packard Tri-Carb 1600TR) bestimmt. Die Länge der RNA-Fragmente wurde durch Agarosegelelektrophorese und anschließender Autoradiographie bestimmt (siehe 3.2.6.4.).

3.2.6.2. Sephadex G50 Säulenzentrifugation

Durch die Sephadex G50 Säulenzentrifugation können nicht eingebaute Nukleotide aus einem *in vitro* Transkriptionsansatz eliminiert werden. Zur Anwendung kamen Sephadex G50 Quick spin columns der Firma Roche. Zunächst wurden die Säulen oben und unten geöffnet, so daß der Puffer, in dem das Sephadex aufgenommen ist, ablaufen kann. Damit sich das Sephadex dicht packt, folgte eine zweiminütige Zentrifugation mit 2400 rpm in einem Sorvall H1000B-Rotor. Anschließend wurden die Proben auf die Säulen aufgetragen und 4 Minuten bei 2400 rpm in dem Sorvall H1000B-Rotor zentrifugiert. Die Säule mit den nicht eingebauten Nukleotiden wurde verworfen, das Eluat wurde phenolisiert.

3.2.6.3. Limitierte alkalische Hydrolyse der radioaktiv markierten RNA

RNA kann durch Inkubation in alkalischen Lösungen partiell hydrolysiert werden. Hierzu erfolgte eine Inkubation in 40 mM NaHCO₃ und 60 mM Na₂CO₃ (pH 10,2) bei 60°C. Dadurch wurde die in nahezu voller Länge transkribierte CVB3-antisense-RNA (7128 bp) in 100-500 Nukleotide umfassende Fragmente zerlegt. Nach einer Inkubationsdauer von 20 Minuten wurde der Ansatz durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 4,9 neutralisiert und mit 3 Volumen absolutem Ethanol gefällt. Nach zweimaligem Waschen des RNA-Pellets mit 70% Ethanol und Trocknen in einer Vakuumzentrifuge wurde die RNA in 50µl depc-Wasser, dem 10 mM DTT als Oxidationsschutz zugegeben wurde, aufgenommen.

3.2.6.4. Nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese

Die Fragmentlänge der *in vitro* transkribierten, radioaktiv markierten RNA wurde auf nichtdenaturierenden Agarosegelen analysiert. Im Prinzip wurde wie bei der DNA-Gelelektrophorese verfahren (siehe 3.2.9.3.). Als Marker diente der low range RNA-Marker der Firma peqlab. Aufgetragen wurden 5x10⁶ cpm je Probe. Nach Fotografie unter UV-Licht wurde das Gel auf einem Geltrockner getrocknet und anschließend eine Autoradiographie durchgeführt.

3.2.7. RNA/RNA *in situ* Hybridisierung

3.2.7.1. Allgemeine Vorbereitungsarbeiten zur *in situ* Hybridisierung

Bei allen Arbeiten zur Vorbereitung und Durchführung der *in situ* Hybridisierung wurden puderfreie Handschuhe getragen, um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden. Alle verwendeten Glaswaren wurden vor Gebrauch bei 180°C 8 Stunden gebacken. Sämtliche Lösungen wurden mit RNase-freien Chemikalien und bidestilliertem, autoklavierten Wasser hergestellt, anschließend nochmals autoklaviert oder sterilfiltriert.

3.2.7.2. Vorbehandlung der Deckgläschen

Die Deckgläschen wurden mit 2%iger Essigsäure gewaschen und nach 30 Minuten mehrfach mit bidestilliertem, autoklaviertem Wasser abgespült. Nach kurzem Schwenken in 100%igem Ethanol wurden die Deckgläschen auf einem Filterpapier ausgelegt. Nach dem Trocknen wurden sie einzeln in Silikonlösung getaucht und nebeneinander in eine mit gebackener Alufolie ausgekleidete große Glasschale gelegt. Zuletzt wurde das Silikon bei 100°C eine Stunde eingebrannt. Die Deckgläschen wurden trocken und staubfrei aufbewahrt.

3.2.7.3. Puffer und Lösungen für die *in situ* Hybridisierung

20 x SSC: 3 M NaCl
 0,35 M tri-Natriumcitrat

Puffer für den Proteinase K Verdau: 20 mM Tris/HCl, pH 7,4
 2 mM CaCl₂

Puffer für den RNase A Verdau: 0,5 M NaCl
 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

3.2.7.4. Vorbereitung der Paraffinschnitte für die *in situ* Hybridisierung

Die Paraffinschnitte wurden unmittelbar vor ihrem Einsatz in der *in situ* Hybridisierung wie folgt entparaffiniert und rehydriert:

3 x 5 Minuten Xylol
5 Minuten 100% Ethanol
5 Minuten 70% Ethanol
5 Minuten 40% Ethanol

3.2.7.5. Methode der *in situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung umfasst 3 Teilschritte: die Permeabilisierung der Gewebeschnitte, die eigentliche Hybridisierung und die Posthybridisierung mit anschließender Autoradiographie.

3.2.7.6. Permeabilisierung der Gewebeschnitte

Um den Eintritt der radioaktiv markierten RNA-Sonden in das Gewebe zu erleichtern, wurden die Gewebeschnitte einer enzymatischen und chemischen Denaturierung unterzogen.

Die Gewebeschnitte wurden folgendermaßen behandelt:

1. 20 Sekunden bidestilliertes, autoklaviertes Wasser
2. 20 Minuten 0,2 N Salzsäure
3. 20 Sekunden bidestilliertes, autoklaviertes Wasser
4. 30 Minuten 2xSSC bei 70°C
5. 20 Sekunden bidestilliertes, autoklaviertes Wasser
6. 15 Minuten in Puffer für den Proteinase K Verdau mit 1 µg Proteinase K/ml bei 37°C
7. 20 Sekunden bidestilliertes, autoklaviertes Wasser
8. 20 Sekunden bidestilliertes, autoklaviertes Wasser
9. 3 Minuten 70% Ethanol
10. 3 Minuten 70% Ethanol
11. 5 Minuten 100% Ethanol

Anschließend wurden die Gewebeschnitte bei 37°C circa 30 Minuten getrocknet.

3.2.7.7. Hybridisierung der Gewebeschnitte

Zur Hybridisierung der Proben wurden 14 µl Hybridisierungslösung auf die permeabilisierten, getrockneten Gewebeschnitte aufgetragen und diese anschließend mit einem silikonisierten Deckgläschen (18x18 mm) abgedeckt. Nach Abdichtung des Deckgläschens mit Fixogum

3. Material und Methoden

Klebstoff wurden die Proben bei 42°C 18 Stunden im Dunkeln inkubiert. Die Hybridisierungslösung setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

3x10⁵ cpm/Gewebeschnitt *in vitro* transkribierte, hydrolysierte ³⁵S-markierte CVB3-RNA-Sonde

oder

3x10⁵ cpm/Gewebeschnitt *in vitro* transkribierte ³⁵S-markierte Kontroll-RNA-Sonde

50% deionisiertes Formamid

10 mM Tris/HCl, pH 7,4

1 mM EDTA, pH 7,2

200 µg sonifizierte Salmon Sperm DNA/ml

100 µg t-RNA (Kaninchenleber)/ml

Die Komponenten wurden gut gemischt, zur Denaturierung der Nukleinsäuren 5 Minuten auf 100°C erhitzt und sofort für 10 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden

600 mM NaCl

10% Dextransulfat

0,05% bovines Serumalbumin, RNase-und DNase-frei

0,02% Ficoll

0,02% Polyvinylpyrrolidon

0,02% Dithiotreitol

0,1% Natriumdodecylsulfat

zugegeben und erneut gut gemischt.

3.2.7.8. Posthybridisierung

Nach der 18-stündigen Inkubationszeit wurden die Deckgläschen vorsichtig abgenommen und Reste der Hybridisierungslösung durch intensives Waschen von den Gewebeschnitten entfernt. Folgende Waschschrte wurden durchgeführt:

1. 10 Minuten 2xSSC
2. 10 Minuten 2xSSC
3. 30 Minuten 2xSSC/50% Formamid bei 42°C
4. 30 Minuten in Puffer für den RNase A Verdau mit 20 µg /ml RNase A bei 37°C
5. 30 Minuten in Puffer für den RNase A Verdau (ohne RNase A) bei 37°C
6. 30 Minuten 2xSSC/50% Formamid bei 50°C
7. 60 Minuten 2xSSC bei 55°C
8. 3 Minuten 70% Ethanol
9. 3 Minuten 100% Ethanol

Anschließend wurden die Gewebeschnitte bei 37°C getrocknet.

3.2.7.9. Autoradiographie

Der Nachweis der ³⁵S-markierten RNA-RNA-Hybride erfolgte mittels Autoradiographie. Sämtliche Arbeiten, die in Zusammenhang mit der Filmemulsion stehen, fanden in der Dunkelkammer statt. Vor Gebrauch wurde die Filmemulsion im Wasserbad bei 43°C verflüssigt und portioniert. Zum Befilmen der Objektträger wurden diese einzeln in die verflüssigte Filmemulsion getaucht und anschließend in einen Objektträgerkasten eingeordnet. Zur Aufnahme der Restfeuchtigkeit waren die Objektträgerkästen mit je einem Säckchen Silikagel bestückt. Die Objektträgerkästen wurden lichtdicht verpackt und alle hybridisierten Gewebeschnitte wurden routinemäßig nach 2-tägiger Exposition bei Raumtemperatur 4 Wochen bei 4°C exponiert.

3.2.7.10. Entwicklung

Zur Entwicklung wurden die befilmten Objektträger in der Dunkelkammer unter adäquater Beleuchtung in Objektträgerständer umsortiert und wie folgt behandelt:

1. 4 Minuten Entwicklerlösung (Kodak D19, 8g/100ml) bei 18°C
2. 20 Sekunden destilliertes Wasser
3. 20 Sekunden destilliertes Wasser
4. 8 Minuten Fixierlösung (Kodak Fixer, 18g/100ml)
5. 5 Minuten destilliertes Wasser

3.2.7.11. Hämatoxilin - Eosin - Färbung

Die entwickelten Präparate wurden vor der lichtmikroskopischen Auswertung mit Hämatoxilin und Eosin G angefärbt. Dabei kam folgendes Protokoll zur Anwendung:

1. 2 Minuten destilliertes Wasser
2. 4 Minuten Hämatoxilinlösung
3. 10 Sekunden destilliertes Wasser
4. 4 Minuten fließendes Leitungswasser
5. 10 Sekunden destilliertes Wasser
6. 30 Sekunden 1%ige, wässrige Eosin G-Lösung
7. 3x15 Sekunden destilliertes Wasser
8. 2x15 Sekunden 70% Ethanol
9. 2x15 Sekunden 90% Ethanol
10. 2x15 Sekunden 100% Ethanol
11. 3x5 Minuten Xylol

Anschließend wurden die Präparate mit Entellan eingedeckt.

3.2.8. Isolierung enteroviraler RNA aus Myokardgewebe

Zum Nachweis enteroviraler RNA mittels nested RT-PCR wurde polyadenylierte RNA aus nativem, schockgefrorenem Myokardgewebe infizierter Mäuse isoliert.

3.2.8.1. Puffer und Lösungen für die Isolierung enteroviraler RNA

Lyse/Bindungspuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0
 500 mM LiCl
 10 mM EDTA
 1% LiDS (Lithiumdodecylsulfat)
 5 mM DTT

Waschpuffer mit LiDS: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 150 mM LiCl
 1 mM EDTA
 0,1% LiDS

Waschpuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 150 mM LiCl
 1 mM EDTA

Elutionspuffer: 2mM EDTA, pH 8,0

3.2.8.2. Isolierung enteroviraler RNA aus nativem Myokardgewebe

Die Isolierung enteroviraler RNA erfolgte aus nativem, schockgefrorenem Myokardgewebe CVB3-infizierter Mäuse. Hierbei kam die Methode der Oligo d(T) Reinigung mit anschließender magnetischer Separation zum Einsatz. Bei diesem Isolationsprinzip macht man sich die Basenpaarung zwischen dem polyadenylierten 3'-Ende der CVB3 RNA und der kovalent an magnetische Partikel gebundenen Oligo d(T)-Sequenz zunutze. Zur Anwendung kam das Dynabeads® mRNA DIRECT Kit der Firma Dynal.

Zunächst wurden fünf 10 µm-dicke Gefrierschnitte pro Probe in einem sterilen 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 250 µl Lyse-/Bindungspuffer überschichtet und bis zur vollständigen Lyse des Gewebes (bis keine Gewebeteilchen mehr sichtbar waren) auf- und abpipettiert. Nach einer kurzen Zentrifugation für 30 Sekunden wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, in dem sich mit Lyse-/Bindungspuffer gewaschene Dynabeads Oligo d(T)₂₅-Partikel befanden. Nach Durchmischung der Dynabeads mit dem Lysat folgte eine 3-5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die an magnetische Partikel gebundene CVB3-RNA mittels eines Magnethalters der Firma Dynal (MCP®-M) aus der Suspension separiert. Der Überstand wurde verworfen und die isolierte, an magnetische Partikel gebundene Poly(A)-RNA wurde zweimal mit je 500 µl Waschpuffer mit LiDS und nachfolgend dreimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen, wobei die an Magnetpartikel gebundene RNA zwischen den Waschschrritten sorgfältig im jeweiligen Waschpuffer resuspendiert wurden. Der Überstand wurde nach der Resuspendierung in den

Waschpufferlösungen jeweils nach zweiminütiger Separation im Magnethalter abpipettiert und verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die an magnetische Partikel gebundene Poly(A)-RNA in 20 µl Elutionspuffer resuspendiert und es folgte eine zweiminütige Inkubation bei 65°C. Bei der anschließenden Separation im Magnethalter wurden dann die Dynabeads-Oligo d(T)-Partikel aus der Lösung separiert und der Überstand, in dem sich nun die Poly(A)-RNA befindet, wurde in ein frisches, steriles 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Die RNA-Konzentration wurde in einer 1/50-Verdünnung photometrisch bestimmt (siehe 3.2.5.6.). Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.2.9. Nested RT-PCR und Gelelektrophorese zum Nachweis enteroviraler RNA

3.2.9.1. Puffer für die nested RT-PCR und Gelelektrophorese

5x EZ Puffer	250 mM Bicine 575 mM Kaliumacetat 40% Glycerol
10x PCR Puffer	100 mM Tris, pH 8,3 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 0,01% Gelatine
5x TBE-Puffer:	54 g Tris-HCl 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 ad 1 Liter bidestilliertes Wasser
6x Ladepuffer:	0,25% Orange-G 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol FF 30% Glycerin 10 mM EDTA

3.2.9.2. Reverse Transkription von RNA und Polymerasekettenreaktion

Zum Nachweis der CVB3 RNA wurde die mit Hilfe des Dynabeads[®] mRNA DIRECT Kit isolierte Poly(A)-RNA in einem einzigen Reaktionsansatz zunächst in cDNA umgeschrieben und unmittelbar anschließend wurden enterovirus-spezifische cDNA-Fragmente mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Hierbei kam die reverse *Thermus thermophilus* DNA-Polymerase (rTth DNA-Polymerase) zum Einsatz. Dieses Enzym hat in Gegenwart von zweiwertigen Manganionen bei einer Temperatur von 60°C sowohl eine reverse Transkriptaseaktivität als auch eine DNA-Polymeraseaktivität. Für den ersten Reaktionsansatz mit der rTth DNA-Polymerase wurde das Primerpaar a und g verwendet. In einer zweiten, sogenannten "nested-PCR" mit *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase wurde dann das Primerpaar r und cx eingesetzt (Klingel et al. 1996). Das Produkt der ersten PCR hatte eine Länge von 478 bp, das der nested-PCR von 300 bp. Um die erfolgreiche Extraktion der Poly (A)-RNA zu überprüfen, wurde von jeder Probe in einem zweiten gleichartigen RT-PCR-Reaktionsansatz der Nachweis der Glyceraldehyd-3-dehydrogenase-mRNA durchgeführt. Das Amplifikationsprodukt der RT-PCR weist eine Länge von 248 bp auf, eine nested-PCR wurde nicht durchgeführt. Sämtliche Oligonukleotide wurden mit einem 392 DNA/RNA Synthesizer der Firma Applied Biosystems hergestellt. Die RT-PCR und die nachfolgende nested-PCR wurden in einem GeneAmp PCR System 9600 der Firma Perkin-Elmer durchgeführt.

Als Primer für die reverse Transkription und erste PCR wurden folgende Oligonukleotidsequenzen verwendet (Klingel et al. 1996):

a	5'-CGGTACCTTTGTGCGCCTGT-3'
g	5'-GTTCCGCTGCAGAGTTGCCCG-3'
gapdh 1	5'-AATGCCTCCTGCACCACC-3'
gapdh 2	5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCG-3'

Als Primer für die nested PCR wurden folgende Oligonukleotidsequenzen verwendet (Klingel et al. 1996):

r 5'-CCCCGGACTGAGTATCAATA-3'
cx 5'-CAGTTAGGATTAGCCGCATT-3'

Für die reverse Transkription mit anschließender PCR wurden folgende Bedingungen gewählt:

1. 30 Minuten 60°C, reverse Transkription
 2. 30 Sekunden 94°C, Denaturierung der doppelsträngigen DNA
 3. 30 Sekunden 60°C, Bindung der Primer und Amplifizierung der DNA
- Die Schritte 2. und 3. wurden 40x wiederholt.

rTth PCR-Ansatz (Endkonzentrationen):

1x EZ Puffer
2,5 mM Mn(OAc)₂
300 mM dATP
300 mM dCTP
300 mM dGTP
300 mM dTTP
20 pmol Primer a bzw. gapdh 1
20 pmol Primer g bzw. gapdh 2
0,1 unit/μl rTth DNA Polymerase
1 ng/μl polyadenylierte RNA

In der nachfolgenden nested-PCR wurden 2 μl aus dem ersten Reaktionsschritt eingesetzt. Sie wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 30 Sekunden bei 94°C, Denaturierung der doppelsträngigen DNA
2. 30 Sekunden bei 56°C, Bindung der Primer
3. 45 Sekunden bei 72°C, Amplifizierung der DNA
(30 Reaktionszyklen)

nested-PCR-Ansatz (Endkonzentrationen):

- 1x PCR Puffer
- 250 mM dATP
- 250 mM dCTP
- 250 mM dGTP
- 250 mM dTTP
- 10 pmol Primer r
- 10 pmol Primer cx
- 0,04 unit/ μ l Taq DNA Polymerase

3.2.9.3. DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Darstellung der DNA-Fragmente, resultierend aus Polymerasekettenreaktionen oder Restriktionsenzymverdau wurden diese für analytische Zwecke in horizontalen 1-2%igen Agarosegelen (je nach Größe der Fragmente) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Lauf- und Gelpuffer wurde 1xTBE-Puffer verwendet. Der Gelpuffer wurde zusätzlich mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 50 ng/ml) versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 ihres Volumens Ladepuffer gemischt und in die Taschen des mit Laufpuffer überschichteten Gels pipettiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer mittleren elektrischen Feldstärke von 5-10 V/cm. Als Längenstandard wurde entweder 200 ng einer EcoRI/HindIII-verdauten DNA des Bakteriophagen λ (Bereich 1000-20000 bp) oder 200 ng einer HaeIII-verdauten DNA des Phagen ϕ X 174 (Bereich 100-1600 bp) verwendet. Die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden durch Fluoreszenz des interkalierten Farbstoffs Ethidiumbromid im UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht und mit einer Sofortbildkamera (Polaroid) mit Rotfilter fotografiert.

3.2.10. Immunhistochemische Methoden

3.2.10.1. Puffer und Lösungen für die immunhistochemische Markierung

Tris-buffered Saline (TBS): 50 mM Tris/HCl, pH 7,6
150 mM NaCl

Verdünnungslösung: TBS mit 2% bovinem Serumalbumin (BSA)

StreptAB-Komplex/AP: Das Ansetzen der Gebrauchslösung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Dako).

Neufuchsin-Substratlösung: Das Ansetzen der Gebrauchslösung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Dako).

3.2.10.2. Nachweis spezifischer Oberflächenmarker mittels indirekter Immunhistochemie

An Aceton-fixierten Gefrierschnitten des Myokards infizierter und nicht-infizierter Mäuse wurden mit Hilfe der indirekten immunhistochemischen Markierung mononukleäre Entzündungszellinfiltrate charakterisiert. Die quantitative Auswertung der durch verschiedene Oberflächenmarker typisierten Zellen erfolgte morphometrisch unter Verwendung eines interaktiven Bildanalyzesystems. Folgende Oberflächenmarker kamen zum Einsatz:

	Verdünnung
Ratte-anti-Maus CD4/L3T4	1:200
Ratte-anti-Maus CD8/Lyt-2	1:200
Ratte-anti-Maus CD45R/B220	1:600
Ratte-anti-Mac-1	1:200
Ratte-anti-Maus Ia	1:400

Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Anti-Ratten IgG-Antikörper aus dem Schaf in der Verdünnung 1:1000. Zum Nachweis des Sekundärantikörpers wurde Streptavidin und an

Biotin gekoppelte alkalische Phosphatase (StreptAB-Komplex/AP) eingesetzt. Durch Umsatz des Substrates Neufuchsin bildet sich ein lichtmikroskopisch sichtbarer roter Farbniederschlag. Um eventuelle unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers oder des StreptAB-Komplexes auszuschließen und einen potentiell unspezifischen Umsatz des Substrates Neufuchsin auszumachen, wurden von jedem Präparat Negativkontrollen angefertigt, die nur mit Verdünnungslösung ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Alle weiteren Schritte entsprechen dem Vorgehen bei den mit Primärantikörper inkubierten Gewebeschnitten.

3.2.10.3. Immunhistochemische Markierung

Zunächst wurden die bei -20°C gelagerten, Aceton-fixierten Gefrierschnitte circa 1 Stunde in den mit Parafilm abgeschlossenen Aufbewahrungsgefäßen an die Raumtemperatur adaptiert. Dann wurde mit einem wasserabweisenden Markierstift auf dem Objektträger im Abstand von ungefähr 0,5 cm um den Gewebeschnitt ein Kreis gezogen, um die Menge der verwendeten Lösungen möglichst gering zu halten und ein Austrocknen des Gewebeschnittes zu verhindern. Im Anschluß daran folgten mehrere Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer sowie Waschschrte in Objektträgerküvetten:

1. 5 Minuten TBS
2. 30 Minuten 100 µl Verdünnungslösung mit 3% Schafserum (Blockierung unspezifischer Bindungsstellen)
3. Serum dekantieren
4. 60 Minuten 100 µl Primärantikörperverdünnung bzw. 100 µl Verdünnungslösung ohne Primärantikörper als Negativkontrolle
5. 3 x 5 Minuten waschen mit TBS
6. 60 Minuten 100 µl Sekundärantikörperverdünnung
7. 3 x 5 Minuten waschen mit TBS
8. 30 Minuten 150 µl StreptAB-Komplex/AP
9. 3 x 5 Minuten waschen mit TBS
10. 2-5 Minuten Neufuchsin-Substratlösung
11. Abwaschen der Neufuchsin-Substratlösung mit destilliertem Wasser
12. 10-20 Sekunden mit Hämatoxylin gegenfärben und mit Faramount eindecken

3.2.11. TUNEL-Assay zum *in situ*-Nachweis apoptotischer Zellen

Apoptose, der sogenannte "programmierte" Zelltod, ist charakterisiert durch Schrumpfen der betroffenen Zelle mit Pyknose, Karyorhexis und apoptotischen Vesikeln. Im Verlauf der Apoptose kommt es außerdem zu einer typischen Fragmentierung der chromosomalen DNA in nukleosomale Einheiten mit einer Länge von circa 180 bp. Bei dem *in situ*-Nachweis apoptotischer Zellen mit der TUNEL-Methode werden die DNA-Fragmente mit Hilfe der terminalen Desoxynukleotidyl Transferase (TdT), welche die Kettenverlängerung an 3'OH-Enden doppel- oder einzelsträngiger DNA katalysiert, mit digoxigenierten Desoxyribonukleotiden markiert. Das Digoxigenin wird anschließend durch eine direkte immunhistochemische Färbung sichtbar gemacht. Zur Anwendung kam das ApopTag™ In Situ Apoptosis Detection Kit der Firma Oncor.

Paraffinschnitte infizierter und nicht infizierter Mäuse wurden zunächst entparaffiniert und rehydriert (siehe 3.2.5.4. Vorbereitung der Paraffinschnitte für die *in situ* Hybridisierung). Im Anschluß an eine Vorbehandlung mit Proteinase K zur Permeabilisierung des Gewebes (siehe 3.2.5.6. Permeabilisierung der Gewebeschnitte) folgten mehrere Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer sowie Waschschriffe in Objektträgerküvetten:

1. 10 Minuten Equilibrierungspuffer (Oncor)
2. Dekantieren des Equilibrierungspuffer
3. 60 Minuten Reaktionspuffer mit TdT (Oncor), bzw. als Negativkontrolle Reaktionspuffer ohne TdT bei 37°C
4. 30 Minuten Stop/Wasch Puffer (Oncor) bei 37°C
5. 3 x 5 Minuten TBS (siehe 3.2.8.1. Puffer und Lösungen für die immunhistochemische Markierung)
6. 30 Minuten Anti-Digoxigenin-AP-Antikörper, 1:500 in TBS mit 2% BSA
7. 3 x 5 Minuten TBS
8. 2-5 Minuten Neufuchsin-Substratlösung (siehe 3.2.8.1. Puffer und Lösungen für die immunhistochemische Markierung)
9. 30 Sekunden mit Hämatoxilin gegenfärben und mit Faramount eindecken

3.2.12. Vergleichende morphometrische und statistische Untersuchungen im Myokard CVB3-infizierter C57BL/6J Mäuse, Perforin knock out Mäuse und β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse

3.2.12.1. Quantifizierung der autoradiographischen Signale

Die aus der *in situ* Hybridisierung resultierenden autoradiographischen Signale, welche die Ausdehnung der myokardialen Infektion reflektieren, wurden mit Hilfe eines halbautomatischen, rechnergestützten Bildanalysesystems unter Anwendung der Analysesoftware Optimas der Firma Stemmer (Puchheim) quantifiziert. Hierzu wurden die Myokardschnitte CVB3-infizierter C57BL/6J, Perforin knock out und β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse mit einem Zeiss-Mikroskop und einer schwarz/weiß Kamera bei einer primären Vergrößerung von x40 erfasst. Die Videosignale wurden dann unter interaktiver visueller Kontrolle digitalisiert. Mit Hilfe eines chain-code Algorithmus wurden die positiven Zellen von den Hintergrundsignalen differenziert (Freeman, 1970). Die lokale Dichte der Silberkörner hybridisierungspositiver Zellen wurde hierbei auf > 0.3 pro μm^2 festgelegt, die der negativen Zellen betrug $< 0,07$ pro μm^2 . Die Flächenanteile des infizierten Myokards (Fläche des infizierten Myokards pro Gesamtschnittfläche des Myokards [$\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$]) wurden an Querschnitten der murinen Herzen, welche den linken und rechten Ventrikel umfassten, ermittelt.

3.2.12.2. Vergleichende Quantifizierung der immunhistochemisch gefärbten Zellen

Immunhistochemisch gefärbte Zellen wurden quantifiziert, indem sie bei 400-facher Vergrößerung in 150 zufällig ausgewählten Quadraten (mittlere Fläche eines Quadrates: $62500 \mu\text{m}^2$) pro Myokardschnitt mit Hilfe eines Meßgitters (Integrationsplatte II, Zeiss, Oberkochen) gezählt wurden. Die Ergebnisse repräsentieren die arithmetischen Mittel von jeweils 10 C57BL/6J Mäusen, Perforin knock out Mäusen und β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen 12 Tage p.i..

3.2.12.3. Morphometrische Analyse des myokardialen Gewebes Schadens

Das Ausmaß der myokardialen Läsionen (Zellnekrose, Entzündung, Narbe) wurde an HE-gefärbten Querschnitten des Myokards von jeweils 10 CVB3-infizierten C57BL/6J, Perforin knock out und β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen 8 Tage p.i. ermittelt. 30 Gesichtsfelder pro Herz wurden bei einer Vergrößerung von 160-fach systematisch (systemic subsampling) evaluiert. Die Flächendichte des geschädigten Myokards (Fläche des geschädigten Myokards pro Gesamtschnittfläche des Myokard [$\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$]) wurde mit dem Punktzählverfahren ermittelt.

3.2.12.4. Statistische Untersuchungen

Um signifikante Unterschiede zwischen den 3 Mausstämmen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten zu finden, wurde der Mann-Whitney Test angewandt. Dabei wurde in allen Untersuchungen ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ gefordert.