

2. Material und Methoden

2.1 Verwendetes Versuchstiermodell

2.1.1 Das Virus

Die Versuchstiere wurden mit einer kardiotropen Variante des Coxsackievirus B3 infiziert (CVB3-Virus Nancy Strain; erhalten von Prof. Dr. med. Zeichhardt, Institut für Virologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin). Dieses wurde in einer Konzentration von 1×10^8 plaque forming units (PFU) in HeLa-Medium bei -80°C gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch wurden Infektionsdosen von 5×10^5 PFU in 0,5 ml PBS-Puffer (150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4) gelöst und im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.1.2 Versuchstiere

Verwendet wurden acht Wochen alte, männliche Mäuse des Inzuchtstammes BALB/c (H-2^d) aus Zuchten des Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA), mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 27,6 g (Standardabweichung $\pm 1,2$ g). Diese wurden in Gruppen von 4 Tieren in transparenten Polycarbonatkäfigen (Typ Makrolon III, 42 x 26 x 15 cm) auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Um den Energiestoffwechsel und die Nahrungsaufnahme nicht zu stören wurden die Umweltbedingungen in engem Rahmen konstant gehalten: Raumtemperatur $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55 \pm 5\%$, Belichtung 0700 bis 1900 MEZ. An diese Bedingungen konnten sich die Mäuse zwei Wochen lang akklimatisieren. Die Nahrung bestand aus pelletierter Alleindiät, die kontinuierlich verabreicht wurde. Steriles Wasser war über Tränkeflaschen ad libitum verfügbar.

2.1.3 Gruppeneinteilung und Versuchsablauf

Die Mäuse wurden vor Beginn der Versuche zufällig auf sechs Gruppen verteilt (siehe Tabelle 2.1). Insgesamt kamen in zwei Versuchsreihen 32 Tiere zum Einsatz, davon 16 in Versuch 1 und 16 in Versuch 2. Bei allen Versuchen lag die Versuchsdauer bei 10 Tagen.

Tabelle 2.1: Gruppeneinteilung in den Versuchen

Versuch	Gruppe	Anzahl der Tiere	Beschreibung
Versuch 1	K	n = 8	nichtinfizierte Kontrollgruppe (keine Behandlung)
	I	n = 8	infizierte Kontrollgruppe (keine Behandlung)
Versuch 2	K+IL-4	n = 4	mit mrIL-4 vom 0.-10. Tag p.i. behandelte, nichtinfizierte Gruppe
	AP	n = 4	mit mrIL-4 vom 0.-10. Tag p.i. behandelte und infizierte Gruppe (AP = kontinuierliche Behandlung in der Akutphase)
	FAP	n = 4	mit mrIL-4 vom 0.-5. Tag p.i. behandelte und infizierte Gruppe (FAP = Behandlung in der frühen Akutphase)
	SAP	n = 4	mit mrIL-4 vom 6.-10. Tag p.i. behandelte und infizierte Gruppe (SAP = Behandlung in der späten Akutphase)

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. P. L. Schwimmbeck (Institut für Kardiologie und Pulmologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin) durchgeführt.

An Tag 0 wurden die Tiere der Gruppen 1.2, 2.2, 2.3 und 2.4 mit dem Virus infiziert (n = 20). Sie bekamen eine Infektionsdosis von 5×10^5 PFU in 0,5 ml PBS intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Kontrolltiere (n = 12) erhielten eine Scheininfektion mit 0,5 ml PBS i.p.

Die Tiere der Versuchsreihe 2 erhielten zusätzlich 200 ng / d rekombinantes murines IL-4 (mrIL-4) i.p. appliziert, wobei die Behandlung entsprechend den Angaben in Tabelle 2.1 über ein unterschiedliches Zeitintervall erfolgte. Das applizierte mrIL-4 entspricht dem aktiven Protein exklusive der ersten beiden Aminosäuren, welches mittels Klonierung der DNA-Sequenz in E. coli produziert wurde [216].

Am 10. Tag p.i. wurden alle Tiere nach Erhebung der hämodynamischen Parameter (siehe Kapitel 2.2) getötet.

Die Herzen wurden mit sterilem Besteck am Gefäßstiel entnommen, nach Entfernen der intrakardialen Blutmenge gewogen und mit einem sterilem Skalpell die Vorhöfe entfernt. Die verbliebenen Ventrikel wurden durch Schnittführung senkrecht zur Herzlängsachse geviertelt. Der proximale Teil wurde zur späteren mRNA-Extraktion in flüssigem Stickstoff gelagert, der anschließende Teil für die in situ-Hybridisierung und den immunhistochemischen Nachweis auf CD3 und MAC-3 in sterilem PBS-Puffer tiefgefroren, das dritte Viertel wurde für die nachfolgende Paraffineinbettung in vierprozentiger, neutraler Formalinlösung fixiert und der distale Teil für die Proteinextraktion ohne weitere Vorbehandlung bei -80 °C gelagert.

2.2 Hämodynamische Messungen

Die in diesem Abschnitt kurz beschriebene Methode der hämodynamischen Messung erfolgte durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. med. C. Tschöpe (Institut für Kardiologie und Pulmologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin).

Durch eine intrakardiale Druckabnahme wurden die folgenden hämodynamischen Parameter erhoben:

- Linksventrikulärer endsystolischer Druck (LVsP in mmHg) als Maß für die linksventrikuläre Wandspannung
- Kontraktilität des linken Ventrikels (dP/dt max in mmHg/s) als Verhältnis des maximalen systolischen Druckanstiegs zur Zeit
- Diastolische Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels (dP/dt min in mmHg/s) als Verhältnis des negativen Druckanstiegs zur Zeit
- Herzfrequenz (in min^{-1})

2.2.1 Die Messapparatur

Zur Bestimmung der obigen Parameter kam eine aus mehreren Komponenten bestehende Messapparatur zum Einsatz. Der linksventrikuläre Druck (in mmHg) wurde über einen DC Bridge Amplifier Type 660, die zeitlichen Druckveränderungen (in mmHg/s) über den Differentiator Slope Quotient Coupler Type 575 und die Herzfrequenz (in min^{-1}) über das Heart Rate Module HRM Type 669 (alle Firma Hugo Sachs Elektronik) aufgenommen. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit einem WR3101 Mark VII Linearrecorder der Firma Graphtec Corporation.

2.2.2 Vorbereitung der Versuchstiere und Messablauf

Die Mäuse erhielten nach einer gewichtsangepassten Sedation mit Midazolam eine intraperitoneale Narkose mit Ketamin. Anschließend wurden sie mit einer 18 G Kunststoffkanüle intubiert und maschinell beatmet, wobei als Beatmungsgerät der Maus-Ventilator Typ 55-7066 der Firma Harvard Apparatus zum Einsatz kam. Die

Beatmungsfrequenz betrug 160/min und das Beatmungsvolumen 0,01 cm³/g Körpergewicht. Eine Beatmung war bis zur Vollendung der hämodynamischen Messung erforderlich, um die Werte nicht durch eine Ischämie des Myokards zu verfälschen. Die Intubation erwies sich als unblutiges und gut reproduzierbares Verfahren zur sicheren Beatmung der Mäuse.

Die beatmete Maus wurde auf einem Präparierbrett fixiert und mit sterilem Besteck durch einen Längsschnitt und links parasternale Thorakotomie eröffnet. Die unteren Rippen wurden auf der linken Seite bis etwa zur Medioklavikularlinie reseziert, um einen freien Zugriff auf den linken Ventrikel zu haben. Die Präparation wurde auf das notwendige Maß beschränkt, um die hämodynamische Messung nicht durch ein verringertes Blutvolumen zu verändern.

Der linke Ventrikel wurde mit einer 20 G Plastikkanüle punktiert, über die dann ein 2 F Millar Tip Katheter eingeführt wurde. Anschließend erfolgte die computergestützte Aufzeichnung der Druckdaten und der Herzfrequenz.

2.3 RNA – Präparation

Für die RNA-Präparation und die Reverse Transkription wurden ausschließlich sterile, RNase-freie Substanzen und Materialien benutzt. Dazu wurden alle selbsthergestellten Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und autoklaviert, Glaswaren bei 250 °C über 5 h gebacken und Arbeitsflächen sowie Einmalhandschuhe mit RNase-Zap behandelt.

2.3.1 RNA – Extraktion aus Myokardgewebe

Die RNA-Präparation wurde in leicht modifizierter Form nach der Single-Step-Methode von Chomczynski [217,218] mit TRIZOL[®] LS Reagent der Firma Invitrogen durchgeführt. Die zur Extraktion eingesetzten Herzproben hatten eine Masse von 30,2 mg ($\pm$ 12,1 mg) und wurden einzeln aus flüssigem Stickstoff direkt in 400 μ l TRIZOL[®] gegeben, gewogen und dann mit Homogenisierstäben mechanisch vollständig homogenisiert. Anschließend wurden 400 μ l TRIZOL[®] nachgelegt zu einem Gesamtvolumen von 800 μ l. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurden 160 μ l Chloroform zugegeben, woraufhin sich nach Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g und 4 °C drei Phasen separierten. Die obere, wässrige, RNA-haltige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und die RNA durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol und 10 minütiger Inkubation ausgefällt. Durch 10 minütige Zentrifugation bei

12.000 g und 4°C wurde die gefällte RNA pelletiert und einmal in 800 µl eiskaltem 75%igem Ethanol (v/v) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 7.500 g und 4°C wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet, bevor es in RNase-freiem Wasser gelöst wurde. Zur vollständigen Lösung der RNA musste das Pellet für 10 min bei 55°C inkubiert werden. Abschließend wurde die Konzentration und Qualität der RNA photometrisch bei 260 und 280 nm mittels des Spektrophotometers DU 640i der Firma Beckman-Coulter jeweils in einer Verdünnung von 1:50 und 1:100 gemessen, wobei eine $A_{260/280}$ - Ratio von 1,6 – 1,8 als qualitativ gut beurteilt wurde.

2.3.2 Verdau kontaminierender DNA mittels DNase I

Obwohl für die PCR (siehe Kapitel 2.3.3.2) nur exonübergreifende Primer zum Einsatz kamen, wurde, um eine möglichst genaue Aussage über die RNA-Expression treffen zu können, vor der Reversen Transkription etwaig kontaminierende genomische DNA verdaut.

Dazu wurden 10 µg der isolierten RNA in einem 50 µl Reaktionsgemisch (25 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7,2) mit 25 u RNase-freier DNase I für 2 h bei 37°C in einem Thermozykler inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurden die Ansätze anschließend für 5 min bei 90°C inkubiert und dann 3 min auf Eis gestellt.

Der Erfolg der vollständigen DNA-Elimination wurde durch eine PCR mit β -Aktin-Primern (siehe Kapitel 2.4.2 und 2.4.6) kontrolliert. Nach einer Eingangsdenaturierung von 5 min bei 94°C schlossen sich 30 Zyklen an, wobei jeder Zyklus aus 30 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Primeranlagerung bei 60°C und 35 s DNA-Synthese bei 72°C bestand. Danach wurde eine abschließende DNA-Synthese für 10 min bei 72°C durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in einem 2%igem Agarosegel (vergleiche Kapitel 2.4.3). Komplette verdaute Proben wurden photometrisch bei 260 und 280 nm vermessen und die Konzentration bestimmt.

2.3.3 Reverse Transkription (RT)

Mittels des Enzyms Reverse Transkriptase und der Verwendung von Oligo-(dT)₁₅-Primern lässt sich selektiv die in den RNA-Proben enthaltene mRNA zu cDNA (complementary DNA) transkribieren, welche dann direkt in der PCR eingesetzt werden kann.

In dieser Arbeit erfolgte die cDNA-Synthese mit dem Reverse Transcription System der

Firma Promega. Dazu wurden 2 µg der nach der Chomczynski-Methode gewonnenen und verdauten Gesamt-RNA 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend in einem 40 µl-Reaktionsgemisch (5 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTPs, 40 u RNAsin, 1 µg Oligo-(dT)₁₅-Primer) mit 25 u AMV-Reverse Transkriptase bei 42°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde durch Erhitzen auf 95°C für 5 min und Abkühlen auf Eis für 3 min das Enzym inaktiviert. Die so gewonnene cDNA wurde bei -20°C zwischengelagert.

Für den Nachweis enteroviraler RNA musste das obige Protokoll modifiziert werden. In einem 20 µl Reaktionsgemisch (5 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTPs, 40 u RNAsin) wurden 0,5 µg isolierte und DNA-verdaute RNA mit 25 u MMLV-Reverse-Transkriptase und 0,5 µg Random-Primer in den gleichen Zeitintervallen und bei gleicher Reaktionstemperatur transkribiert.

2.4 Polymerase-Kettenreaktion

2.4.1 Prinzip der Polymerase Kettenreaktion

Die PCR ist ein molekulargenetisches Verfahren zur selektiven Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte. Dabei werden ausgehend von zwei synthetischen Oligonukleotiden (sog. Primern) mittels thermostabilen DNA-Polymerasen spezifische DNA-Sequenzen neusynthetisiert. Die Primer werden dabei so gewählt, dass sie direkt an den zu vervielfältigenden Bereich angrenzen. Durch 20 – 40 fache Wiederholung eines Zyklus aus Denaturierung bei 94°C (Trennen der Einzelstränge), Annealing (Primeranlagerung) und Elongation (DNA-Neusynthese von den Primerbindungsstellen aus) kommt es zur selektiven Vervielfältigung der zu untersuchenden DNA. Für die PCR wurden dabei ausschließlich sterile bzw. autoklavierte Substanzen und Materialien verwendet.

2.4.2 Verwendete Primer

Die verwendeten Bezeichnungen sense / antisense beziehen sich auf die relative Lage des Oligonukleotids zum kodierenden Strang der Matrizen-DNA.

2.4.2.1 Verwendete Primer für den Nachweis von enteroviralem Genom

Der Nachweis enteroviraler RNA ist eine in unserem Laboratorium gut etablierte und routinemäßig bei humanen Myokardbiopsien eingesetzte Methode [124].

Für die Amplifikation enteroviraler RNA wurden Primersequenzen in der nicht-kodierenden Region nahe dem 5'-Ende des Cocksackievirus-Genom gewählt, da dort eine hohe Homologie zwischen den einzelnen Enteroviren besteht. Innerhalb des durch das primäre Primerpaar vorgegebenen Genomabschnittes wurde ein sekundäres Primerpaar für die nested-PCR ausgewählt (siehe Kapitel 2.4.5).

Tabelle 2.2: Primersequenzen zum Nachweis enteroviraler RNA sowie der internen Kontrolle für β -Aktin

Template	Genbank-Nr.	Länge	Annealing-temperatur	Zyklen	Primersequenz
CVB-3 (1) RT-PCR	AF231765	314 bp	60,0 °C	30	SE : 5' - AGGGAAATCGTGCGTGACAT - 3' AS: 5' - CATCTGCTGGAAGGTGGACA - 3'
CVB-3 (2) nested-PCR	AF231765	195 bp	55,0 °C	35	SE : 5' - CGGTACCTTTGTGCGCCTGT - 3' AS: 5' - CAGGCCGCCAACGCAGCC - 3'
β-Aktin	X03765	450 bp	60,0 °C	30	SE : 5' - CCCCGGACTGAGTATCAATA - 3' AS: 5' - GGCCGCCAACGCAGCCACCG - 3'

2.4.2.2 Verwendete Primer für die semiquantitative Reverse-Transkriptions-PCR

Alle verwendeten Primer wurden so gewählt, dass der jeweilige sense- und antisense-Primer auf verschiedenen Exons des Gens liegen. Dadurch lässt sich an der Größe des entstehenden Transkripts der Ursprung des Ableseortes sichern: Ein von kontaminierender Genom-DNA transkriptiertes PCR-Produkt wäre entsprechend den mitabgeschriebenen Introns größer als das von der mRNA bzw. cDNA abgeschriebene PCR-Produkt ohne Introns.

Die mRNA-Sequenzen für die zu untersuchenden Enzyme wurden aus der Datenbank des National Center for Biotechnological Information (NCBI) entnommen (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabelle 2.3: Verwendete Primersequenzen für die semiquantitative RT-PCR

Template	Genbank-Nr.	Länge	Annealing-temperatur	Zyklen	Primersequenz
IL-1 β	NM_008361	363 bp	60,0 °C	33	SE : 5' - GGGATGATGATGATAACCTG - 3' AS : 5' - CCACTTTGCTCTTGACTTCT - 3'
IL-2	M16760	413 bp	57,5 °C	35	SE : 5' - TTCAAGCTCCACTTCAAGCTCTACAGCGGAAG - 3' AS : 5' - GACAGAAGGCTATCCATCTCCTCAGAAAGTCC - 3'
IL-4	X05064	357 bp	60,0 °C	36	SE : 5' - CCAGCTAGTTGTCATCCTGCTCTTCTTCTCG - 3' AS : 5' - CAGTGATGTGGACTTGGACTCATTCTGGTGC - 3'
IL-6	NM_031168	273 bp	60,0 °C	31	SE : 5' - GAGAGGAGACTTCACAGAGG - 3' AS : 5' - GGTACTCCAGAAGACGACAG - 3'
TGF- β_1	NM_011577	350 bp	59,0 °C	33	SE : 5' - CGGAAGCGCATCGAAGCCATCC - 3' AS : 5' - GCAAGCGCAGCTCTGCACGG - 3'
MMP-2	NM_008610	214 bp	51,0 °C	31	SE : 5' - GGAGAAGGCTGTGTTCTTCG - 3' AS : 5' - GGAGAAGGCTGTGTTCTTCG - 3'
MMP-3	NM_010809	361 bp	60,0 °C	31	SE : 5' - GGCTTCAGTACCTCCCAGG - 3' AS : 5' - GCAGCAACCAGGAATAGGTT - 3'
MMP-9	NM_013599	481 bp	62,0 °C	38	SE : 5' - CGACAGCACCTCCCCTATG - 3' AS : 5' - CCCACCTTATCCAGACTCCT - 3'
MMP-13	NM_008607	556 bp	58,5 °C	33	SE : 5' - GAGTGCCTGATGTGGGTGAATA - 3' AS : 5' - TCTGGTGTGTTGGGATGCTTAG - 3'
TIMP-1	NM_011593	307 bp	60,0 °C	31	SE : 5' - ACGAATCAACGAGACCACCTTAT - 3' AS : 5' - CGACACCCACAGCCAGCACTAT - 3'
TIMP-2	NM_011594	456 bp	61,5 °C	35	SE : 5' - GTGAGCGAGAAGGAGGTGGATTCC - 3' AS : 5' - CTTGATGCAGGCGAAGAACTTGGC - 3'
TIMP-3	NM_011595	152 bp	51,0 °C	34	SE : 5' - AGCTGGCAAAGGCTTAAACA - 3' AS : 5' - CAAGCTTCCAGCCAACTTC - 3'
TIMP-4	NM_080639	399 bp	60,0 °C	30	SE : 5' - CTCTCCCTCTGTGGTGTGA - 3' AS : 5' - GTGGTTCCTGGTCCCTACTA - 3'
MT1-MMP	NM_008608	362 bp	55,0 °C	34	SE : 5' - TGTCCCCCTTTTACCAGTG - 3' AS : 5' - GCCATCCTTCCTTTCATAG - 3'
EMMPRIN	D00611	241 bp	55,0 °C	24	SE : 5' - AAGGTCGGAAAGAAATCAGAG - 3' AS : 5' - CGTAGGTGCCAGGTCAACAT - 3'
β -Aktin	X03765	450 bp	60,0 °C	23	SE : 5' - CCCCGGACTGAGTATCAATA - 3' AS : 5' - GGCCGCCAACGCAGCCACCG - 3'

2.4.3 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein wichtiges Verfahren zur Auftrennung von DNA-Proben. Ihr Prinzip beruht auf der Wanderung geladener Moleküle im elektrischen Feld. Nukleinsäuren sind bei dem pH-Wert des verwendeten Laufpuffer aufgrund ihrer Triphosphat-Gruppen

Polyanione und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Beweglichkeit der Nukleinsäuren richtet sich nach der Nettoladung und der Molekülgröße. Da sich beide Parameter gleichsinnig verhalten wandern gestreckte DNA-Fragmente gleicher Größe bei konstanter Porengröße und elektrischer Feldstärke übereinstimmend weit in der Gelmatrix. Damit die Nukleinsäuren nur innerhalb der Matrix wandern können, wurden jeweils 45 µl PCR-Produkt mit 9 µl eines 6 x Ladepuffer (40% Sucrose (w/v), 0,25% Bromphenolblau (w/v)) beschwert. Ein gleichzeitig mitlaufender DNA-Längenstandard, der DNA-Fragmente bekannter Größe enthält, zeigt die Länge des untersuchten DNA-Fragmentes an.

Die PCR-Produkte und DNA-Proben der Klonierungsexperimente wurden in einem 2%igen Agarosegel (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Trisborat, 1 mM EDTA, pH 8,0) in einer Horizontalgelelektrophorese in 20 min bei 120 V aufgetrennt. Zur Darstellung der DNA im UV-Licht wurden den Agarosegelen 0,4 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Pro Spur wurden 10 µl der jeweiligen DNA-Probe in Ladepuffer aufgetragen.

Zur Darstellung der Linearisierungsergebnisse (vergleiche Kapitel 2.6.1) wurde ein 1%iges Agarosegel (w/v) unter ansonsten gleichen Bedingungen verwendet.

Die Auswertung der Elektrophorese erfolgte unter UV-Licht (254 nm) und wurde mittels des BioDoc Analyze System (Biometra) unter stets gleichen Einstellungen am Transilluminator dokumentiert. Die Gelbanden wurden mit Hilfe des Gelplot2-Makros der Software Scion Image entsprechend den Handbuchangaben in Signaldichtewerte umgerechnet und graphisch dargestellt.

2.4.4 Optimierung der PCR-Bedingungen für die einzelnen Primer

Um eine bestmögliche Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen und unspezifische Signale zu vermeiden wurden für alle Primerpaare die PCR-Bedingungen in mehreren Versuchen optimiert. Die beiden wichtigsten Parameter dafür sind die Primeranlagerungstemperatur und die MgCl_2 -Konzentration. Die Primeranlagerungstemperatur wurde mit Hilfe des Gradient-Thermostyplers der Firma Eppendorf in drei Probeläufen zwischen 50 und 70 °C systematisch ausgetestet (PCR 1: T = 55,0 °C, G = 5,0 °C; PCR 2: T = 60,0 °C, G = 5,0 °C; PCR 3: T = 65,0 °C, G = 5,0 °C).

Anschließend wurde die MgCl_2 -Konzentration im Bereich von 1,5 – 4,0 mM bei der ermittelten optimalen Primeranlagerungstemperatur verändert. Die optimale MgCl_2 -

Konzentration und Anlagerungstemperatur wurde bei der stärksten spezifischen Bande ohne unspezifische Nebensignale angenommen.

Bei der PCR geht die Amplifikation nach einem kurzen linearen Bereich in eine Sättigung über. Da eine Auswertung insbesondere zum Vergleich zweier semiquantitativer PCR nur im linearen Bereich sinnvoll ist, mussten durch entsprechende Vorversuche die günstigste Zyklenzahl ausgetestet werden, mit der die cDNA noch linear amplifiziert werden kann (siehe Abb. 2.1). Hierzu wurden die PCR-Produkte bei gleicher cDNA-Menge und gleichen PCR-Bedingungen, aber unterschiedlichen Zyklenzahlen in einem Agarosegel aufgetragen. Aus den erhaltenen Banden wurde mittels der Software Scion Image die Signalstärken in den einzelnen PCR-Proben berechnet und gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Anschließend wurde für alle Primer die gleiche cDNA-Einsatzmenge verwendet und die PCR bei der Zyklenzahl durchgeführt, die dem jeweiligen mittleren linearen Bereich entspricht.

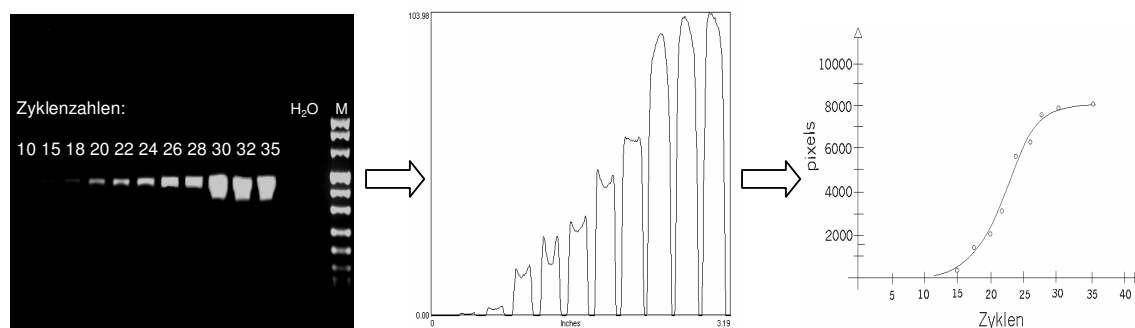


Abb. 2.1: Zusammenhang zwischen Zyklenzahl und Grad der Amplifikation bei gleichem Einsatz an cDNA bei β -Aktin.

Links: Ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel unter UV-Licht (M = Marker VIII; Spur 2 - 12: ansteigende Zyklenzahlen; H₂O = Negativkontrolle). Mitte: Auswertung der Signalstärken mittels der Software NIH-Image. Rechts: Auftragen der berechneten Fläche unter der Kurve gegen die Zyklenanzahl. Als optimale Zyklenzahl wurde hier 23 Zyklen ermittelt.

2.4.5 RT-PCR und nested-RT-PCR zum Nachweis enteroviraler RNA

Zur Sicherung der erfolgten Myokardinfektion wurde eine nested RT-PCR zum Nachweis enteroviraler RNA modifiziert nach Saiki et al. [219] durchgeführt. Nach der Umschreibung jeder einzelnen RNA-Probe unter Einsatz von Random-Primern und MMLV-Reverse-

Transkriptase wurden 100 ng cDNA für die PCR eingesetzt. Die Amplifikation wurde in einem Thermozykler der Firma Eppendorf durchgeführt. Dazu wurde ein 30 Zyklen umfassendes Programm durchlaufen, wobei alle Zyklen aus einer jeweils einminütigen Denaturierung bei 94°C, Primeranlagerung bei 60°C und DNA-Synthese bei 72°C bestanden. Abschließend durchliefen die Proben einen finalen Syntheseschritt für 10 min bei 72°C. Das 50 µl Reaktionsvolumen bestand aus 2,0 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,01% Gelatine (w/v), 0,4 µM Primer, 0,2 mM dNTPs und 5 u Biotherm-Taq-Polymerase. Als interne Kontrolle wurden für jede amplifizierte cDNA-Probe eine Wasserprobe zur Negativkontrolle und als interne Positivkontrolle eine Koamplifikation von endogenem β-Aktin durchgeführt. Als weitere Positivkontrolle wurde klonierte cDNA des gesamten Genoms von Cocksackievirus B3 (73,5 ng/µl PCV B3-Typ; erhalten von Prof. Dr. med. R. Kandolf, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen) mitamplifiziert [220]. Das Ergebnis der PCR wurde in einem 2%igen Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel unter UV-Licht kontrolliert.

Zur Steigerung der Sensitivität wurde im Anschluss eine nested-PCR durchgeführt. Es wurden 2 µl aus der primären PCR entnommen und in 98 µl 1 x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,4) verdünnt. Von der Verdünnung wurden wiederum 2 µl entnommen und in einer 35 Zyklen umfassenden sekundären PCR erneut amplifiziert. Jeder Zyklus bestand aus 40 s Denaturierung bei 94°C, 60 s Primeranlagerung bei 55°C und 60 s Elongation bei 72°C. Auch hier wurde abschließend eine 10 minütige DNA-Synthese bei 72°C durchgeführt. Die Auswertung der PCR erfolgte in einem 2% Agarosegel.

2.4.6 Semiquantitative RT-PCR

Jeweils 25 ng der durch Reverse Transkription erhaltenen cDNA konnten mittels PCR auf die in Tabelle 2.3 genannten Transkripte untersucht werden. Um in den einzelnen Proben eine Expressionsveränderung detektieren zu können, wurde als interne Kontrolle parallel endogenes β-Aktin amplifiziert. Dieses wird in allen Eukaryotenzellen in hohem Maße exprimiert und ist als sogenanntes „*housekeeping gene*“ vom Stimulationsstatus der Zelle unabhängig.

Das verwendete PCR-Programm hatte für alle Primerpaare den gleichen Ablauf. Nach einer 5 minütigen Denaturierung bei 94°C folgten sich zyklisch wiederholend die Schritte Denaturierung für 30 s bei 94°C, 30 s Annealing und 35 s DNA-Synthese bei 72°C. Zum Schluss wurde eine finale Synthese von 10 min bei 72°C durchgeführt. Die Primeranlagerungstemperatur und die Zyklenzahl richtete sich nach den einzelnen Primerpaaren und sind aus Tabelle 2.3 ersichtlich. Das 45 µl Reaktionsvolumen bestand aus 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,01% Gelatine (w/v), 0,4 µM Primer, 0,2 mM dNTPs und 5 u Biotherm-Taq-Polymerase. Die Reaktionslösung enthielt bei TGF-β₁, MMP-13 und TIMP-2 2,2 mM MgCl₂, während es bei allen anderen Primern 2,0 mM enthielt.

Alle PCR wurden zweifach durchgeführt, um zufällige Fehler der Methode zu verringern und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu belegen. Als Negativkontrolle wurde bei jeder PCR steriles Wasser anstatt cDNA amplifiziert.

2.4.7 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Genauigkeit der Basenfolge wurde durch Sequenzieren einzelner Proben von jeder PCR mit Reverse-Primern bei der Firma SeqLab (Sequences Laboratories, Göttingen, Deutschland) und anschließender Überprüfung des Sequenzierungsergebnisses mit Literaturangaben überprüft.

2.5 DNA – Klonierung der PCR-Produkte

Durch die PCR erhält man einige Nanogramm eines genspezifischen DNA-Fragmentes. Für die in-situ Hybridisierung (siehe Kapitel 2.6) benötigt man jedoch mehrere Mikrogramm. Diese Amplifikation des PCR-Produktes erreicht man durch die DNA-Klonierung. Hierbei wird das PCR-Produkt in einen Vektor eingefügt und in eine Wirtszelle transportiert. In der Wirtszelle repliziert sich der Vektor in großer Kopienzahl und wird bei der Zellteilung auf die Tochterzellen übertragen. Es entstehen so viele identische Kopien nicht nur vom Vektor selbst, sondern auch von dem enthaltenen PCR-Produkt. Durch genetische Selektion (siehe Kapitel 2.5.5) lassen sich die Kolonien von Bakterien, die das Plasmid tragen, isolieren. Für die DNA-Klonierung wurden nur sterile bzw. autoklavierte Substanzen und Materialien verwendet.

2.5.1 Vorbereitungen zur DNA - Klonierung

2.5.1.1 Aufreinigung der PCR-Produkte durch Elution aus einem Agarosegel

Die PCR für die DNA-Klonierung wurden bei den gleichen PCR-Bedingungen und Zyklenzahlen, wie in Kapitel 2.4.2.2 beschrieben, durchgeführt, um das Auftreten unspezifischer Signale zu vermeiden. Anschließend wurden 40 µl des jeweiligen PCR-Reaktionsgemisches in einem 2%igen ethidiumbromidgefärbten Agarosegel bei 100V und 25 min Laufzeit aufgetrennt. Die Richtigkeit der Bande wurde durch Vergleich mit einem DNA-Größenstandard überprüft. Nach Darstellung unter UV-Licht wurde das Gelstück mit der Bande ausgeschnitten und durch Zentrifugation (10 min, 15.000 rpm) in einem Ultrafree DA Tube der Firma Millipore das PCR-Produkt eluiert und gereinigt.

2.5.1.2 Herstellung von Nährmedien für die Bakterienkultur

Als Nährmedium für die Bakterienkulturen wurde LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) benutzt. Dieses gehört zu den komplexen oder undefinierten Medien, dass heisst die genauen Bestandteile und ihre Anteile im Medium sind nicht vollständig bekannt. LB-Medium hat sich in unseren Versuchen als günstig erwiesen, da in ihm ohne weitere Zusätze die kompetenten E.coli vermehrungsfähig sind.

Zur Herstellung wurden 10 g Bacto®-tryptone, 5 g Bacto®-yeast extract und 10 g NaCl in 1000 ml Aqua bidest gelöst, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und der Ansatz sofort autoklaviert [221,222].

Für die Kultivierung während der Transformation hat sich in Vorversuchen dagegen SOC-Medium [222,223] anstatt LB-Medium bewährt, da es zu einer höheren Transformationseffizienz führte. Das SOC-Medium bestand aus 2% (w/v) Bacto®-tryptone, 0,5% (w/v) Bacto®-yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Mg²⁺ und 20 mM Glucose. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und der gesamte Ansatz mittels Passage durch einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter sterilisiert.

Beide Nährmedien ließen sich bei 4 °C lagern.

2.5.1.3 Herstellung kompetenter Zellen [222]

Um die Effizienz der Transformation zu steigern, müssen die Bakterien zunächst kompetent gemacht werden. Dafür behandelt man die Bakterien mehrfach mit einer eiskalten Lösung von Calciumchlorid und lockert so die Zellwand auf.

Zunächst wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernacht-Kultur des Bakterienstammes beimpft und im Inkubator bei 37°C und 300 rpm schüttelnd bis zu einer optischen Dichte von $OD_{578nm} = 0,4$ kultiviert. Anschließend wurde die Bakterienkultur 10 min auf Eis inkubiert und nachfolgend in eisgekühlte Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Sedimentation der Bakterien durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 4000 g wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 20 ml eiskalter 0,1 M Calciumchlorid-Lösung aufgenommen. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 10 min auf Eis, bevor eine nochmalige Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 4000 g folgte. Das Waschen in Calciumchlorid-Lösung wurde noch zweimal wiederholt, ehe die Bakterien in 4 ml 0,1 M Calciumchlorid-Lösung resuspendiert wurden. Nach Zugabe von 400 µl 78% Glycerin (w/v) wurden die kompetenten Zellen zu 50 µl aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.5.1.4 Herstellung von Agarplatten zur Rekombinantenselektion [221,223]

Die zur Rekombinantenselektion verwendeten Agarplatten wurden folgendermaßen vorbereitet: Zu 1000 ml LB-Medium wurden 15 g Bacto®-Agar gegeben und der Ansatz autoklaviert. Nach schüttelndem Abkühlen im Wasserbad auf etwa 45°C wurde die Lösung mit Ampicillin auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt. Zur Rekombinantenselektion (siehe Kapitel 2.5.5) wurden ferner 100 mg X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktosid) in DMSO (Dimethylsulfoxid) und zur Induktion der β-Galaktosidase 80 mg IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) hinzupipettiert. Anschließend wurde die Lösung zu 30 ml in Petrischalen (16 mm x 94 mm) gegossen und nach Aushärtung bei 4°C gelagert.

2.5.2 Verwendeter Vektor [223]

Als Klonierungsvektor wurde der pGEM®-T Easy Vector der Firma Promega verwendet (siehe Abb. 2.2). Dieser eignet sich für die direkte TA-Klonierung [224] von PCR-Produkten,

dass heisst ohne vorherigen Verdau durch Restriktionsenzyme. Die TA-Klonierung beruht auf dem Prinzip, dass einige in der PCR verwendete thermostabile DNA-Polymerasen – so auch die hier verwendete Biotherm-Taq-Polymerase – unabhängig vom Template ein zusätzliches Adenosin an die 3'-Enden des amplifizierten Fragments anhängen. Das linearisierte Plasmid besitzt an seinen 5'-Enden einen singulären T-Überhang, der die direkte Ligation mit dem PCR-Produkt ermöglicht. Überdies besitzt der pGEM[®]-T Easy Vector ein β -Lactamase-Gen, das den Bakterien eine Ampicillinresistenz (Amp^r) verleiht, wodurch die Selektion plasmidtragender Klone auf ampicillinhaltigen Nährböden ermöglicht wird. Das außerdem enthaltene lacZ-Gen ermöglicht die Unterscheidung von selbstligierten und fragmenttragenden Plasmiden (siehe Kapitel 2.5.5). Zusätzlich enthält der Vektor einen T7- und einen Sp6-Promoter für die Herstellung von Sense- und Antisense-RNA-Transkripten (siehe Kapitel 2.6.2).

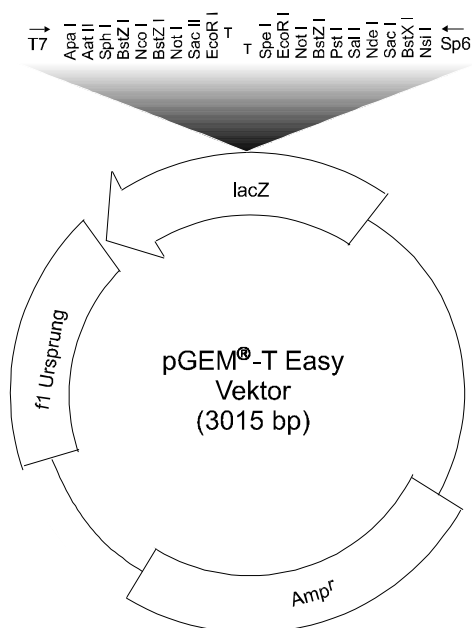


Abb. 2.2: Schematische Plasmidkarte des pGEM[®]-T Easy Vector.

2.5.3 TA-Ligation [224]

Der Einbau des PCR-Produktes in den Vektor wird durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Das Enzym verbindet Nucleotide mit einem 3'-OH und einem 5'-PO₃⁻-Ende. In Vorversuchen hat sich ein molares Vektor:Insert-Verhältnis von 1:3 als günstig erwiesen. Dazu wurden in

einem 10 µl Ligationsansatz die entsprechende Menge Eluat mit 50 ng pGEM-T-Vector in Anwesenheit von 1 x Ligationspuffer und 3 u T4-DNA-Ligase über Nacht bei 4 °C ligiert.

Zur internen Kontrolle wurde ein Ansatz mit 8 ng der mitgelieferten 542 bp langen Control Insert DNA anstatt des Eluats als Positivkontrolle und ein Ansatz ohne PCR-Produkt oder Control Insert als Hintergrundkontrolle mitligiert und transformiert.

2.5.4 Transformation in kompetente E. coli [223]

Kompetente E. coli werden transformiert, indem man die Bakterien nach Zugabe der Plasmid-DNA einem Hitzeschock aussetzt. Die transformierte DNA wird dann im weiteren Bakterienwachstum unabhängig vom Bakteriengenom in großer Kopienzahl repliziert und bei der Zellteilung an die Tochterzellen vererbt.

Zunächst wurden 50 µl kompetente Zellen (E. coli DH5α) auf Eis aufgetaut und dann zu dem 10 µl Ligationsansatz hinzupipettiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 45 s im 42 °C-warmen Wasserbad erhitzt und sofort im Anschluss 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium wurden die Zellen 90 min bei 37 °C und 150 rpm schüttelnd kultiviert, damit die Plasmide sich etablieren und ihre Eigenschaften phänotypisch ausprägen konnten. Im Anschluss wurden auf Agarplatten (LB / Ampicillin / IPTG / X-Gal, 16 mm x 94 mm) je 100 µl des Transformationsansatzes mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5.5 Selektion von rekombinanten Klonen

Nach dem Gentransfer ist es notwendig, den Bakterienklon mit der gewünschten DNA zu identifizieren. Der pGEM®-T Easy Vector ermöglicht eine genetische Selektion über die sogenannte Insertionsinaktivierung. Ligiert man ein DNA-Fragment in diesen Vektor, so wird das für die β-Galaktosidase kodierende lacZ-Gen unterbrochen und damit inaktiviert. Nicht transformierte Kolonien besitzen ein intaktes lacZ-Gen. Die Expression von β-Galaktosidase durch die Bakterien lässt sich durch das chromogene Substrat X-Gal nachweisen. Zur Induktion der β-Galaktosidase enthielt das Medium zusätzlich IPTG. Die β-Galaktosidase spaltet das farblose X-Gal zu 5-Brom-4-chlor-3-Indol, das durch Luftoxidation in einen blauen Indigofarbstoff umgewandelt wird. Da die nicht rekombinierten E. coli ein funktionstüchtiges

β -Galaktosidase-Gen besitzen, erscheinen sie in Gegenwart von X-Gal als blaue Kolonien. Rekombinanten sind phänotypisch lacZ^- und bilden deshalb farblose Kolonien (siehe Abb. 2.3). Letztere wurden für die Plasmidpräparation angezüchtet.

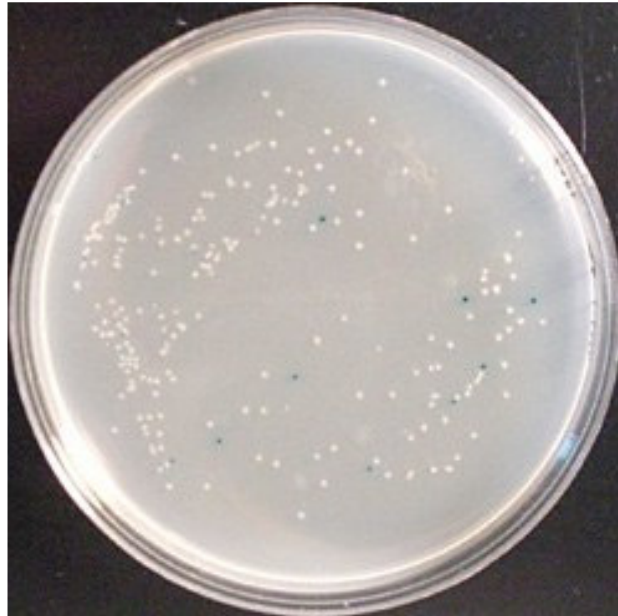


Abb. 2.3: Agarplatte zur Selektion rekombinanter Klone.

2.5.6 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

2.5.6.1 Mini-Präparation der Plasmid-DNA

Zunächst wurde aus den Rekombinanten eine Mini-Präparation modifiziert nach den Protokollen von Birnboim & Doly [225] sowie Ish-Horowicz & Burke [226] durchgeführt und durch Restriktion der Erfolg der Transformation überprüft. Erst dann erfolgte eine Maxi-Präparation zur Isolierung der Plasmide. Beide Präparationsverfahren nutzen das Prinzip der Alkalidenaturierung. Diese Methode beruht darauf, dass es einen kleinen pH-Bereich gibt, in dem nichtüberspiralisierte DNA wie das bakterielle Genom denaturiert wird, überspiralisierte DNA wie Plasmide hingegen nicht. Dadurch lässt sich die gefällte chromosomale DNA zusammen mit kontaminierender RNA und Proteinen leicht durch Zentrifugation aus der Lösung entfernen.

Zur Isolation der Plasmide in der Mini-Präparation wurden Übernachtskulturen aus 3 ml ampicillinhaltigem LB-Medium mit den Bakterien angeimpft und bei 37°C und 300 rpm schüttelnd kultiviert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der Kultur bei 15.000 g für 30 s pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 250 µl RNase / GTE - Lösung (0,1 mg/ml RNase A, 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und danach für 5 min in 250 µl NaOH / SDS - Lösung (200 mM NaOH, 1,0% SDS (w/v)) lysiert. Im Anschluss wurden die chromosomale Bakterien-DNA und die Proteine mit 250 µl 5 M Ammoniumacetat pH 5,5 präzipitiert und durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 700 µl Isopropanol gelöst. Nach 10 minütiger Inkubation wurden die Plasmide erneut durch Zentrifugation bei 4°C und 14.000 g für 10 min sedimentiert. Das Pellet wurde danach in eiskaltem 70% Ethanol (v/v) gewaschen und 5 min bei 14.000 g und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet ehe es in 30 µl 1 x TE-Puffer resuspendiert und durch 30 minütiges Schütteln bei 37°C und 1.000 rpm in einem Thermomixer der Firma Eppendorf gelöst wurde.

Der Erfolg der Transformation des PCR-Produktes wurde durch Restriktionsverdau des isolierten Plasmides beurteilt (siehe Kapitel 2.5.6.2).

2.5.6.2 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an definierten Stellen innerhalb eines Stranges. Jedes Restriktionsenzym erkennt eine spezifische Sequenz von 4-8 Nukleotiden. Dabei sind diese Schnittstellen meist „Palindromsequenzen“, dass heisst die Schnittstelle liegt symmetrisch um eine Achse, an der spiegelbildlich komplementäre einsträngige DNA-Abschnitte stehen.

Zur Kontrolle der Klonierung wurde das Plasmid in einem Ansatz an beiden Seiten des Inserts und in einem anderen Ansatz an einem Ende und asymmetrisch innerhalb des Inserts geschnitten.

Hierfür wurden in einem 20 µl Restriktionsansatz 6 µl der Mini-Präparation mit 20 u des entsprechenden Restriktionsenzym im mitgelieferten 1 x Restriktionspuffer für 2 h verdaut. Die Inkubationsbedingungen richteten sich nach den speziellen Anforderungen der verwendeten Restriktionsenzyme und sind aus Tabelle 2.4 ersichtlich.

Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten Restriktionsenzyme zur Kontrolle der Orientierung des Inserts im Plasmid bei der DNA-Klonierung

DNA-Sonde	verwendete Restriktionsenzyme	Inkubationsbedingungen
IL-6	Bsp LU11 I + Bst X I	48°C, 2 h
TGF-β_1	Mlu N I + Ksp I	37°C, 3 h
MMP-3	Hind III + Sph I	37°C, 2 h
TIMP-1	Stu I + Spe I	37°C, 2 h

Das Ergebnis der Restriktion wurde durch Auftragen von 10 μ l des Verdauansatzes in Ladepuffer in einem 2%igen ethidiumbromidgefärbten Agarosegel unter UV-Licht beurteilt. Anhand der Größe der entstehenden Fragmente konnte die Orientierung des Inserts im Plasmid beurteilt werden.

2.5.6.3 Maxi-Präparation der Plasmid-DNA

Nach erfolgreicher Mini-Präparation wurde 200 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft und schüttelnd bei 37°C und 300 rpm über Nacht inkubiert.

Die Maxi-Präparation wurde mit dem Jetstar 2.0 Maxiprep-Kit der Firma Genomed durchgeführt. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Tag bei 2.500 g für 10 min pelletiert und nach Entfernen des Überstandes in 10 ml E1-Puffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 μ g / ml RNase A, pH 8,0) gelöst. Nach Zugabe von 10 ml E2-Puffer (200mM NaOH, 1,0 % SDS (w/v)) und 5 minütiger Lyse wurden Proteine und chromosomale DNA mit 10 ml E3-Puffer (3,1 M Ammoniumacetat pH 5,5) präzipitiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 15.000 g und Equilibrierung der Maxiprep-Säule mit 30 ml E4-Puffer (600 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, 0,15 % TritonX-100 (w/v), pH 5,0) wurde der Überstand der Proben auf die Säule aufgetragen. Diese wurde einmal mit 60 ml E5-Puffer (800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,0) gewaschen, die Plasmide danach mit 15 ml E6-Puffer (1250 mM NaCl, 100 mM Tris, pH 8,5) eluiert und mit 10,5 ml Isopropanol umgefällt. Nach 10 minütiger Inkubation und 30 min Zentrifugation bei 10.000 g und 4°C wurde das Pellet in eiskaltem 70% Ethanol (v/v) gewaschen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 10.000 g und 4°C wurde

der Überstand abpipettiert und das Pellet für 15 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet je nach Größe in 100 – 250 µl 1 x TE-Puffer pH 7,4 resuspendiert und 30 min bei 37° und 1.000 rpm schüttelnd gelöst. Die Konzentration und Qualität der isolierten Plasmide wurde photometrisch bei 260 und 280 nm in einer Verdünnung von 1:50 und 1:100 bestimmt, wobei eine $A_{260/280}$ - Ratio von 1,8 – 2,0 als qualitativ gut beurteilt wurde.

Der Erfolg der Maxi-Präparation wurde wie unter Kapitel 2.5.6.2 beschrieben durch zweimaligen Restriktionsverdau überprüft. In jedem Ansatz wurden dabei 500 ng Plasmid-DNA verdaut (siehe Abb. 2.4).

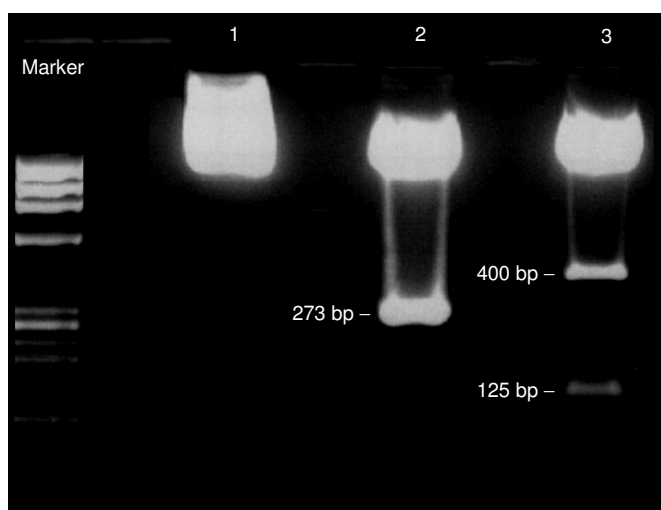


Abb. 2.4: Restriktionsverdau einer Maxi-Präparation von IL-6.

Marker: DNA-Längenstandard (Lambda-DNA / Eco RI + Hind III);

Spur 1: ungeschnittenes Plasmid;

Spur 2: Verdau des Plasmids mit BstZ I (1,5 h, 50°C);

Spur 3: Verdau des Plasmids mit Bsp LU 11 I und Bst XI (2 h, 48°C).

Die Größe der entstandenen Fragmente zeigt die korrekte Orientierung des PCR-Produktes im Vektor an.

2.5.7 Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte

Die Genauigkeit der Basenfolge wurde durch Sequenzieren mit Reverse-Primern bei der Firma SeqLab und anschließender Überprüfung des Sequenzierungsergebnisses mit Literaturangaben überprüft. Nur bei einer Übereinstimmung von 99% oder mehr wurden die isolierten Plasmide für die in-situ Hybridisierung verwendet.

2.6 Radioaktive RNA:RNA-in-situ-Hybridisierung

Die RNA:RNA-in-situ-Hybridisierung erlaubt den spezifischen Nachweis von bestimmten RNA-Transkripten direkt in Gewebeschnitten. Angewendet wurde ein Protokoll nach Angerer et al. [227] mit Modifikationen nach Milani et al. [228].

Für die in-situ Hybridisierung wurden RNase-freie Substanzen (Kapitel 2.6.1 – 2.6.6) bzw. autoklavierte Substanzen und saubere Materialien (Kapitel 2.6.7 – 2.6.9) verwendet .

2.6.1 Linearisierung der Plasmide

Für die in-vitro Transkription mit $^{35}\text{[S]}$ -UTP mussten die Plasmide vorher linearisiert werden. Durch Restriktion in der Multiple Cloning Site (MCS) nahe des T7-Promoters und anschließender Transkription mit der Sp6-Polymerase entstand ein antisense-konfiguriertes Transkript, welches als Sonde in der in-situ Hybridisierung eingesetzt wurde. Durch Restriktion nahe des Sp6-Promoters und Transkription mit der T7-Polymerase erhielt man die Sense-Sonde als interne Negativkontrolle (siehe Abb. 2.5).

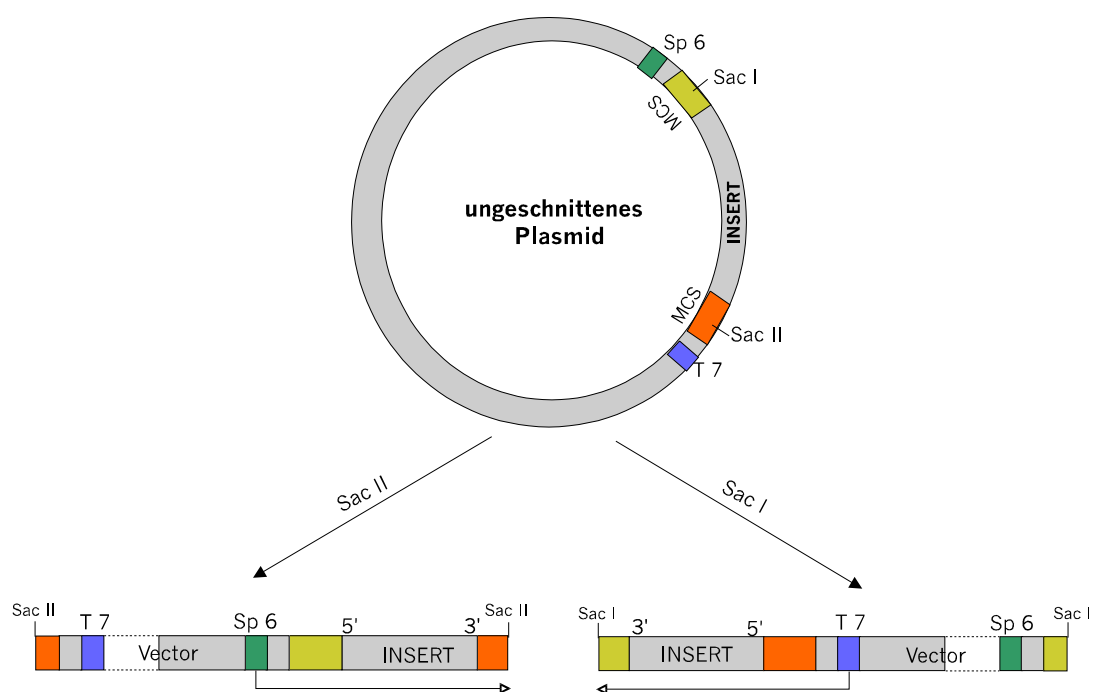


Abb. 2.5: Linearisierung der Plasmide durch Restriktionsverdau.

Zunächst wurde von jedem Plasmid ein Restriktionsverdau mit Sac I und ein Verdau mit Sac II durchgeführt. Dazu wurden in einem 50 µl Verdauansatz 25 µg Plasmid in 1 x Restriktionspuffer und 50 u des jeweiligen Restriktionsenzymys bei 37°C für 8 h verdaut. Die Vollständigkeit der Linearisierung wurde durch Auftragen von 0,5 µl des Verdauansatzes in einem 1%igen ethidiumbromidgefärbten Agarosegel und Vergleich mit dem ungeschnittenen Plasmid abgeschätzt (siehe Abb. 2.6).



Abb. 2.6: Beispiel einer vollständigen Linearisierung des IL-6-Plasmids.

- Spur 1: ungeschnittenes Plasmid;
- Spur 2: Linearisierung mit Sac I;
- Spur 3: Linearisierung mit Sac II (Verdau jeweils 8 h bei 37°C);
- Spur 4: DNA-Längenstandard (Lambda-DNA/Eco RI + Hind III)

Die vollständig linearisierten Plasmide wurden nach Zugabe von 5 µl 3 M Ammoniumacetat pH 6,0 und 110 µl eiskaltem Ethanol über Nacht bei –20°C gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C wurde das Pellet einmal in 750 µl eiskaltem 70% Ethanol (v/v) gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren für 15 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die geschnittene Plasmid-DNA in 20 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Die Vollständigkeit der Linearisierung wurde erneut durch Auftragen auf einem 1% Agarosegel überprüft. Konzentration und Qualität wurden wie in Kapitel 2.5.6.3 beschrieben photometrisch bestimmt.

2.6.2 Radioaktive Markierung der Sonden durch in-vitro Transkription

Die in-vitro Transkription bedient sich der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen des Bakteriophagen T7 bzw. Sp6. Die hohe Promoterspezifität der Bakteriophagenpolymerasen erlaubt es, einzelsträngige RNA-Sonden zu erstellen, die wahlweise komplementär zum codierenden (Sense) oder nichtcodierenden (Antisense) Strang sind.

Es wurde je 1,0 µg des linearisierten Plasmids mit ^{35}S -rUTP in beiden Richtungen radioaktiv markiert, wobei die Transkription des mit Sac I linearisierten Plasmids und Transkription mit der T7-Polymerase die Sense (Negativkontrolle) lieferte und die Synthese der Sp6-Polymerase am Sac II-geschnittenem Plasmid die Antisense als eigentliche Sonde lieferte.

Die Transkription mittels der Sp6- bzw. T7-Polymerase erfolgte in einem 10 µl Ansatz im entsprechenden 1 x Transkriptionspuffer und 5 mM DTT, 10 mM rATP, 10 mM rGTP, 10 mM rCTP, 10 mM ^{35}S -UTP ($= 3,3 \cdot 10^6$ Bq), 20 u RNAsin und 50 u der entsprechenden RNA-Polymerase. Die Sp6- bzw. T7-Puffer sind Teil des Transkriptionskits der Firma Gibco BRL.

Beide Ansätze wurden für 90 min bei 37°C inkubiert, wobei nach 60 min erneut 25 u RNA-Polymerase dazugegeben wurde. Die synthetisierten RNA-Sonden wurden durch 5 µl Yeast-tRNA (50 mg/ml) und 0,5 µl RNAsin stabilisiert und die DNA-Matrize in 8 min bei 37°C durch Zugabe von 5 u RNase-freie DNase I entfernt. Im Anschluss wurde die RNA durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat pH6,0, 74 µl DEPC-H₂O und 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 13.000 rpm wurde die RNA-haltige Oberphase in einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat pH 6,0 und 2 Volumina Ethanol für 8 h bei -80°C gefällt. Durch Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 13.000 rpm wurde die RNA pelletiert und nach Trocknung in 50 µl 10 mM DTT gelöst.

Abschließend wurde der Erfolg der in-vitro Transkription durch Messung der radioaktiven Aktivität von 1 µl Sonde in 2 ml Szintillationslösung in einem LS 1701 Szintillationsmessgerät der Firma Beckman-Coulter überprüft. Entsprechend der Halbwertszeit des ^{35}S -Nuklids von 87,4 Tagen musste die Radioaktivität in den RNA-Sonden im Versuchsverlauf mehrfach nachgemessen werden, um in allen Versuchen die gleichen Bedingungen zu gewährleisten.

2.6.3 Alkalische Hydrolyse

Um eine optimale Gewebepenetration der Sonde zu erreichen, wurde sie durch kontrollierte alkalische Hydrolyse in 150 bp große Fragmente zerlegt (vergleiche Formel 2.1).

Formel 2.1: Berechnung der Hydrolysezeit [229]

$$t = \frac{L_0 - L_1}{L_0 \cdot L_1 \cdot k}$$

t = Hydrolysezeit
 L_0 = Anfangslänge des RNA-Transkripts in kb
 L_1 = gewünschte Endlänge des RNA-Transkripts in kb
 k = Hydrolysekonstante ($k = 0,11 \text{ kb / min}$)

Die Hydrolyse der 50 µl Sonde erfolgte durch Zugabe von 50 µl Hydrolyse-Puffer (80 mM NaHCO₃, 120 mM Na₂CO₃, 10 mM DTT) und Inkubation bei 60°C. Nach der errechneten Hydrolysezeit wurde die Reaktion in 100 µl Stopp-Puffer (200 mM Natriumacetat pH 6,0, 1% Essigsäure (v/v), 10 mM DTT) beendet. Nach Präzipitation der RNA mit Ethanol (20 µl 3 M Natriumacetat pH 6,0, 440µl Ethanol) für 30 min bei -80°C wurden die zerlegten Sonden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C für 30 min pelletiert, einmal mit 750 µl eiskaltem Ethanol gewaschen und nach erneuter 10 minütiger Zentrifugation und Trocknung in 30 µl 10 mM DTT gelöst. Zum Schluss erfolgte eine erneute Szintillationsmessung (siehe Kapitel 2.6.2), ehe die Sonden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

2.6.4 Vorbereitungen zur Hybridisierung**2.6.4.1 Beschichten von Objektträgern mit 2% Aminopropyltriethoxysilan (APES)**

Um die Ablösung der Schnitte bei der in-situ Hybridisierung zu vermeiden wurden die Objektträger mit APES beschichtet. Dazu wurden die Objektträger zunächst 5 h bei 250°C gebacken, um eine RNase-freie Oberfläche zu erhalten. Im Anschluss daran wurden sie 5 min in Aceton entfettet und 5 min in 2% APES in Aceton (w/v) getaucht, bevor sie zweimal kurz in Aceton und zweimal kurz in DEPC-H₂O gespült wurden. Zum Schluss wurden die Objektträger bei 37°C über Nacht getrocknet und bis zur weiteren Verwendung staubfrei gelagert.

2.6.4.2 Silikonisieren der Deckgläschen

Zum besseren Ablösen beim Posthybridisierungswaschen (siehe Kapitel 2.6.7) wurden Deckgläser der Größe 21 x 26 mm silikonisiert. Dazu wurden sie 20 min mit 0,2 M HCl behandelt, kurz in Ethanol entwässert und nach 15 minütiger Trocknung an der Luft 5 h bei 250 °C gebacken. Nach Abkühlen wurden die Deckgläser in Silikon-Lösung getaucht und die Silikonbeschichtung nachfolgend 2 h bei 110 °C eingebrannt.

2.6.4.3 Präparation der Gewebe

Nach der Organpräparation wurden die bei -80 °C in PBS gelagerten Proben vorsichtig auf Eis aufgetaut und anschließend mit Tissue Tek auf dem Objektisch des Gefriermikrotoms Jung CM 3000 (Leica, Solms, Deutschland) fixiert. In Vorversuchen hat sich eine optimale Gewebedicke von 5 µm bei einer Objektischtemperatur von -26 °C für Myokardgewebe als optimal erwiesen. Die Gefrierschnitte wurden auf einen APES-beschichteten Objektträger (siehe Kapitel 2.6.4.1) verbracht, kurz luftgetrocknet und anschließend mit eiskaltem 4% Paraformaldehyd (w/v) in PBS pH 7,0 für 20 min fixiert und nach jeweils 5 minütigem Waschen in 3 x, 1 x und 1 x PBS in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (je 2 min in 30%, 70% 90%, 100% Ethanol (v/v)). Nach einstündiger Lufttrocknung wurden die Schnitte in luftdicht verschlossenen Kartellboxen bei -80 °C gelagert. Zur Bindung freien Wassers enthielt jede Kartellbox separat 5 g gekörntes Calciumchlorid.

2.6.5 Prähybridisierung

Die tiefgefrorenen Schnitte wurden in den Kartellboxen verschlossen 2 h aufgetaut, noch einmal 5 min in 4% Paraformaldehyd (w/v) in PBS pH 7,0 fixiert und 5 min in PBS gewaschen. Dann wurden die Schnitte zur Denaturierung basischer Proteine 20 min in 0,2 M HCl inkubiert. Nach zweimaliger Spülung in PBS für 30 s bzw. 2 min wurde die Ziel-RNA durch Abbau von Proteinen mittels Pronase (0,4 mg / Objektträger in PBS) zugänglich gemacht. Diese Reaktion wurde nach 8 min mit 0,1 M Glycin / PBS für 30 s gestoppt und nach zweimaliger Zwischenspülung für je 30 s in PBS die Schnitte 20 min in 4% Paraformaldehyd (w/v) in 1 x PBS pH 7,0 fixiert. Nach einem erneuten Waschen für 3 min in

PBS wurden sie für 10 min in 0,1 M Triethanolamin pH 8,0 und 0,25% Essigsäureanhydrid (v/v) acetyliert. Abschließend wurden die Schnitte noch einmal 5 min in PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (je 2 min in 30%, 70%, 90% und 100% Ethanol (v/v)), bevor sie 2 h an der Luft getrocknet wurden.

2.6.6 Hybridisierung

Bei jeder Hybridisierung wurden zusätzlich als Kontrollen ein Objektträger mit Wasser anstatt radioaktiver Sonde als globale Negativkontrolle, ein neuer Objektträger ohne Gewebe zur Kontrolle des Glashintergrundes und des Acetylierungsschrittes sowie ein Objektträger mit der Sense-Sonde als interne Negativkontrolle hybridisiert. Da die Sense-Sonde aufgrund ihres identischen Basenaufbaus mit der Gewebe-mRNA keine spezifischen RNA:RNA-Hybride ausbilden kann, gibt sie indirekt Informationen über die Spezifität der verwendeten Antisense-Sonde. Alle Kontrollen wurden mit der längsten Expositionszeit der Reihe ausgewertet.

Auf jeden Objektträger wurden 25 µl einer 4:1 Mischung aus Hybridisierungsmix (50°C vorgewärmt) und Sondenmix (30 s bei 80°C inkubiert) gebracht. Der Sondenmix bestand aus 50% deionisiertem Formamid, 10 mM DTT und 200.000 cpm ³⁵[S]-markierter RNA-Sonde; der Hybridisierungsmix aus 50% deionisiertem Formamid, 10 mM DTT, 1 mg/ml Yeast-tRNA, 10% Dextransulfat (w/v), 0,3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaPO₄ pH 6,8, 5 mM EDTA pH 8,0 und Denhardt's Lösung (0,02% Polyvinylpyrrolidon (w/v), 0,02% Ficoll (w/v), 0,02% Bovines Serumalbumin (w/v)).

Die Schnitte wurden mit silikonisierten Deckgläschen (siehe 2.6.4.2) bedeckt und für 18 h bei 48°C in luftdicht verschlossenen Hybridisierungskammern auf feuchtem Zellstoff hybridisiert. Jeder Kammer wurden dabei 10 ml 50%iges Formamid (v/v) zugegeben.

2.6.7 Waschen nach der Hybridisierung

Der Waschvorgang nach der Hybridisierung dient dem Entfernen nicht gebundener radioaktiver RNA-Sonden, die ansonsten bei der Auswertung zu falsch positiven Signalen führen würden. Dazu wurden die Schnitte für 30 min in einer 50°C warmen

Posthybridisierungswaschlösung (50% deionisiertes Formamid, 5 mM EDTA, 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaPO₄ pH 6,8, 10 mM DTT, 0,02% Polyvinylpyrrolidon (w/v), 0,02% Ficoll (w/v), 0,02% Bovines Serumalbumin (w/v), pH 8,0) gespült, wobei die silikonisierten Deckgläschen heruntergespült und entfernt wurden. Danach wurde weitere 4 h in frischer Posthybridisierungswaschlösung bei 50°C unter leichtem Schütteln gewaschen.

Es folgte ein zweimaliges Waschen bei 37°C für je 15 min in vorgewärmter TES-Waschlösung (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl) unter leichtem Schütteln, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation mit RNase (20 mg/ml in TES) zum Abbau nichtgebundener einzelsträngiger RNA. Erneut wurde zweimal für 15 min bei 37°C in TES gewaschen, gefolgt von je 30 minütigem Waschen in 2 x SSC (300 mM NaCl, 34 mM Trinatriumacetat, pH 7,0) und 0,1 x SSC (15 mM NaCl, 1,7 mM Trinatriumacetat, pH 7,0) bei Raumtemperatur.

Schließlich wurden die Schnitte zügig in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert (je 20 s in 30%, 70%, 90% und 100% Ethanol (v/v)), wobei dem Alkohol 300 mM Ammoniumacetat pH 7,5 zur Stabilisierung der Hybride beigelegt wurde. Abschließend wurden die Schnitte über Nacht luftgetrocknet.

2.6.8 Autoradiographie

Die Objektträger wurden nach dem Waschen mit der silberbromidhaltigen Fotoemulsion G5 (Ilford Imaging, Dreieich, Deutschland) beschichtet. Durch den radioaktiven Zerfall des ³⁵S-UTP werden die Silberbromidkristalle in der Fotoemulsion im Bereich spezifisch gebundener RNA:RNA-Hybride zu metallischem Silber reduziert, welches nach fototechnischer Entwicklung und Fixierung permanent sichtbar wird.

2.6.8.1 Beschichten der Objektträger mit Fotoemulsion

Die Fotoemulsion wurde vorab bei 42°C vorgewärmt und im Verhältnis 1:1 mit 0,6 M Ammoniumacetat pH 7,5 versetzt. Die Objektträger wurden in absoluter Dunkelheit mit der flüssigen Emulsion beschichtet und 2 h luftgetrocknet. und bei 4°C lichtdicht verschlossen. Anschließend wurden die Präparate für 21 Tage (MMP-3, TIMP-1) bzw. 25 Tage (IL-6) bzw. 28 Tage (TGF-β₁) bei 4°C dunkel und erschütterungsfrei gelagert.

2.6.8.2 Entwicklung

Nach Exposition wurden die Schnitte in der Dunkelkammer für 3 min in Kodak D19 Entwickler inkubiert, 1 min wurde die Entwicklung in 1% Essigsäure (v/v) gestoppt und 3 min mit 25% Kodak 3000 Fixierer-Lösung A (v/v) fixiert. Anschließend wurden die Schnitte 30 min in fließendem Leitungswasser gespült.

2.6.9 Gegenfärbung

Als Gegenfärbung wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser gespült, 1 min in filtriertem 1% Hämatoxylin (w/v) nach Mayer gefärbt und anschließend unter fließendem Leitungswasser gebläut. Im Anschluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 10 s in 30%, 70%, 90% Alkohol (v/v)) entwässert, 10 s in alkoholischem Eosin (0,05% Pholxin B (w/v), 0,1% Eosin Y (w/v), 1%iger Essigsäure (v/v) in Ethanol) gefärbt und in absteigender Alkoholreihe wieder rehydriert. Zum Schluss wurden die Präparate mit 21 x 26 mm großen Deckgläsern und Kaiser's Glyceringelatine eingedeckelt.

2.6.10 Auswertung der in-situ Hybridisierung

Bei 100-facher Vergrößerung wurden für jede Sonde und Maus drei Gewebeschnitte in 20 – 30 Bildausschnitten mäanderförmig durchgemustert und das Expressionsmuster qualitativ beschrieben. Dieses erfolgte sowohl für die Antisense- als auch für die Sense-Präparate.

2.7 Histologie und Immunhistochemie

2.7.1 Fixierung der Gewebeproben

Für die histologische Analyse sowie für die immunhistochemische Färbung von CD3 und MAC-3 wurden die Myokardproben unmittelbar nach der Herzpräparation für eine Dauer von 12 – 24 Stunden in neutraler, gepufferter, vierprozentiger Formalinlösung fixiert.

2.7.2 Anfertigung von Paraffin- und Gefrierschnitten für die histologische und immunhistologische Untersuchung

Nach Formalinfixation wurden die Gewebeproben in Paraffin eingebettet. Die hierfür nötige histotechnologische Aufarbeitung erfolgte in einem Gewebeeinbettungsautomaten in folgenden Teilschritten: zweimal 1 h in 70% Ethanol (v/v), dreimal 2 h in 96% Ethanol (v/v), zweimal 1 h in 100% Ethanol, 1 h in 66% Ethanol in Xylol (v/v), 1 h in 33% Ethanol in Xylol (v/v), 1 h in Xylol und zweimal 2 h in Paraplast (56 °C). Die nach dem Abkühlen entstandenen Paraffinblöcke wurden bei 4 °C dunkel gelagert.

Von den Proben wurden in einem Rotationsmykrotom 5 µm dicke serielle Schnitte angefertigt, auf Superfrost-Plus-Objektträger verbracht und über Nacht bei 37 °C getrocknet. Für die Färbung mussten die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Hierzu wurden sie dreimal für 10 min in Xylol verbracht und anschließend schrittweise in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 min in 100%, 90%, 70%, 30% Ethanol (v/v)) rehydriert. Schnittpräparate für den immunhistochemischen Nachweis von CD4 und CD8 entstammten dem in PBS-Puffer tiefgefrorenen Herzviertel. Sie wurden wie in Kapitel 2.6.4.3 beschrieben aufgearbeitet, mit der Ausnahme, dass die Kryoschnitte auf polylysierte Objektträger verbracht, 10 min in kaltem Aceton fixiert und bei -20 °C gelagert wurden.

2.7.3 Histologischer Nachweis von myokardialen Läsionen

Zum Nachweis von Kardiomyozytolyse im Myokardgewebe wurde eine leicht modifizierte Färbung mit Luxol Fast Blue in Anlehnung an Arnold et al. [230] durchgeführt.

Paraffinschnitte wurden wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben mit Xylol deparaffiniert und an 95% Ethanol (v/v) angeglichen. Anschließend erfolgte für 5 h eine Färbung mit 0,1% Solvent Blue 38 (w/v), 0,5% Essigsäure (v/v) in Ethanol bei 60 °C. Darauf wurden die Präparate 10 min in 75% Ethanol (v/v) und 2 min in Aqua dest. gewaschen. Die Färbung wurde durch 5 minütige Behandlung mit 0,05% Lithiumcarbonat (w/v), 2 minütiges Spülen in Aqua dest. und 3 minütige Inkubation in mehreren Aufbereitungen von 75% Ethanol (v/v) differenziert. Nach einer 5 minütigen Spülung in Aqua bidest. erfolgte eine Gegenfärbung mit alkoholischer Eosin Y Lösung für 10 s. Nach Passage durch Aqua dest. erfolgte die abschließende Dehydratisierung der Präparate in 95% Ethanol (v/v) und 100% Ethanol, bevor sie 3 x 10 min in Xylol fixiert und mit Corbit-Balsam eingedeckt wurden.

2.7.4 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (ABC-Methode) mittels des Vectastain Standard-Kits der Firma Vector Laboratories nach Angaben des Herstellers. Im Präparat kommt es zur Bindung des unkonjugierten Primärantikörpers an das entsprechende Antigen. Daraufhin wird das Gewebe mit einem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert, welcher gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers gerichtet ist. Anschließend wird der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex zugefügt, welcher mittels seines Avidinmoleküls an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet. Durch das Enzym Peroxidase wird bei Anwesenheit des Elektronendonors Wasserstoffperoxid das Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) zu einem roten bis rotbraunem Farbniederschlag ausgefällt. Dieses Reaktionsprodukt lagert sich in unmittelbarer Nähe des detektierten Antigens ab, so dass eine lichtmikroskopische Zuordnung möglich ist.

Die geeigneten Verdünnungen der Antikörper wurden vor dem serienmäßigen Einsatz durch serielle Titration ermittelt und mit 1:50 für den Primär- und 1:100 für den Sekundärantikörper als optimal bestimmt.

2.7.4.1 Vorbehandlung der Schnitte zur Demaskierung der Antigene

Formalin fixiert nicht durch Koagulation, sondern es reagiert primär mit basischen Aminosäuren, wobei es zur Bildung vernetzender Methylenbrücken kommt. Übermäßige Aldehydvernetzungen durch das Fixativ können zu einer Maskierung von Antigenen führen, welche den Zugang für Makromoleküle limitieren. Zur Verbesserung der Permeabilität für Antikörper ist daher in formalinfixierten Präparaten eine Vorbehandlung erforderlich, um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden.

Als effektivste Demaskierungsmethode erwies sich in Vorversuchen für die hier verwendeten Primärantikörper eine Vorbehandlung mit Pepsin. Hierzu wurden die entparaffinierten Schnitte 10 min bei 37°C in 4 mg/ml Pepsin in 0,2 M HCl inkubiert. Der Demaskierungsbehandlung folgte ein zweimaliges Waschen in destilliertem Wasser.

2.7.4.2 Ablauf der immunhistochemischen Färbung

Um eine unspezifische Reaktion durch gewebeeigene Peroxidasen zu vermeiden, wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch 15 min Inkubation der Schnitte in 0,9% H₂O₂ in Aqua dest. (v/v) irreversibel inaktiviert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal kurz in TBS-Puffer (2,7 mM KCl, 10 mM Trishydroxymethylaminomethanhydrochlorid, 137 mM NaCl, pH 7,5) gespült. Alle nachfolgenden Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und nach jedem Schritt wurden die Schnitte zweimal 5 min in TBS gewaschen.

Eine weitere unspezifische Hintergrundfärbung kann durch Ablagerung des Primärantikörpers an Kollagen- und Bindegewebsproteinen mit starker elektrostatischer Ladung entstehen. Daher wurden diese Bindungsstellen vor der Inkubation mit dem Primärantikörper durch Aufbringen eines 10% Normalserums in TBS (v/v) aus derjenigen Spezies, aus dem der Sekundärantikörper stammt, abgesättigt. Diese Lösung enthielt ferner 1% BSA in TBS (w/v) und Avidin zur Blockierung des endogenen Biotins. Im Anschluss erfolgte in einer raumtemperierten feuchten Kammer eine 60 minütige Inkubation mit der Primärantikörperlösung, welche zusätzlich 1% BSA in TBS (w/v) und Biotin zur Blockierung des endogenen Avidins enthielt. Die Avidin- und Biotin-Blockierung wurde nach Herstellerangaben eingesetzt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, welche ebenfalls für 60 min in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur erfolgte. Anschließend wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex mit den Schnitten 30 min inkubiert und in die AEC-Färbelösung (0,025% AEC (w/v), 5% N,N-Dimethylsulfonamid (v/v), 3 mM Essigsäure, 7 mM Natriumacetat, 0,01% H₂O₂ (v/v) in Aqua dest.) für 12 min bei vollständiger Dunkelheit verbracht.

Nach einem abschließenden zweimaligen Waschen für 5 min in TBS wurden die Gewebeschnitte 15 s in filtrierter Hämaunlösung nach Mayer (VWR, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt und unter fließendem Leitungswasser gebläut, bevor sie mit Kaiser's Glyceringelatine und 21 x 26 mm großen Deckgläsern eingedeckt wurden.

2.7.4.3 Kontrollfärbungen

Zur Kontrolle der immunhistochemischen Färbung wurden bei jedem Färbedurchgang die verschiedenen Schritte auf ihre Spezifität untersucht.

Zur Testung des Primärantikörpers wurden als Positivkontrolle Schnitte der Milz als lymphatisches Organ angefertigt; als Negativkontrolle diente Myokardgewebe der Kontrolltiere, welches physiologisch keine Lymphozyten enthält. Zur Testung der Spezifität des sekundären Antikörpers wurden Schnitte der oben genannten Gewebe anstelle des Primärantikörpers nur mit Verdünnungspuffer inkubiert und anschließend alle weiteren Schritte entsprechend dem Protokoll durchgeführt. Jede dabei auftretende positive Färbung ist dabei nicht Ausdruck der antikörperbedingten Lokalisation des Antigens, sondern Folge einer unspezifischen Proteinbindung.

2.7.5 Auswertung der Färberesultate

Die Auswertung der Präparate erfolgte an dem Lichtmikroskop Leitz RMBDS (Leica, Bensheim, Deutschland) bei 100facher (Luxol Fast Blue) bzw. 200facher Vergrößerung. Pro Versuchstier und Färbung wurden 2 Gewebeschnitte mäanderförmig analysiert und die Färbereaktion mittels der Software Lucia G Version 3.51 der Firma Imaging Laboratories dokumentiert und jeweils durch ein selbstangepasstes Makro quantifiziert.

2.8 Nachweis gelatinolytischer Aktivität mittels Zymographie

Die Gelatin-Zymographie als direkte Nachweismethode für einer gelatinolytische Aktivität wurde von Kleiner & Stetler-Stevenson 1994 [231] beschrieben und von Leber & Balkwill 1997 [232] modifiziert. Bei dieser Methode werden die Proteine auf Polyacrylamidgelen, die zusätzlich Gelatine enthalten, unter denaturierenden aber nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese werden die Proteine renaturiert und 18 h in einem Ca^{2+} - und Zn^{2+} -haltigen Enzympuffer bei 37°C inkubiert. Bei der nachfolgenden Färbung der Gele stellen sich gelatinolytisch aktive Peptidasen als ungefärbte Areale dar.

Um die Spezifität der zymographischen Analyse zum Nachweis von MMP zu überprüfen, wurden in einem Nebenversuch durch Zugabe von 10 mM EDTA in den Enzympuffer Ca^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen chelatiert und somit die MMP spezifisch inhibiert.

2.8.1 Proteinextraktion

Aus dem distalen Abschnitt der Herzen wurden Proteine mittels RIPA-Puffer extrahiert [231]. Hierzu wurde das Myokardgewebe in RIPA-Lysepuffer (150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , 1% Nonidet P-40 (v/v), 0,5% Natriumdesoxycholsäure (w/v), 0,1% SDS (w/v)) verbracht und mit einem Stabhomogenisierer vollständig homogenisiert. Anschließend wurden die Proteinproben 15 min bei 4°C geschüttelt und Zellreste durch 15 minütiges zentrifugieren bei 16.000 g und 4°C pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wurde entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

2.8.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) nach Herstelleranweisungen. Diese Methode basiert auf der als Biuret-Reaktion bekannten Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ in alkalischem Medium durch die in den Proteinen enthaltenen basischen Aminosäuren. Die Reaktion wird durch Chelation der entstandenen Cu^+ -Ionen mit Bicinchonininsäure (BCA) verstärkt und erlaubt die kolorimetrische Quantifizierung der Gesamtproteinmenge.

Dabei wird die Absorption eines Proteinstandards in einer Verdünnungsreihe (bovines Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 0 µg/ml, 5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 125 µg/ml und 500 µg/ml) gemessen und eine Eichkurve angefertigt. Die Konzentration der Messproben wird dann durch Vergleich der gemessenen Absorption mit der Eichkurve bestimmt. Die Absorption wurde photometrisch bei 562 nm gemessen.

2.8.3 Gelatin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Gelatin-SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese wird als Verfahren zur Trennung von Proteinen im elektrischen Feld eingesetzt. Die Ladung von Proteinen wird durch die individuelle Anzahl positiv und negativ geladener Aminosäuren und den pH-Wert bestimmt. Diese individuelle Proteinladung wird bei der SDS-PAGE durch die Zugabe des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) maskiert. Das negativ geladene SDS lagert sich an das Protein an und macht es zu einem Polyanion, das zur Anode wandert. Nebenbei führt die Zugabe von SDS zur völligen Denaturierung des

Proteins, so dass die elektrophoretische Beweglichkeit allein von der Größe des Moleküls und der Porengröße der dreidimensionalen Gelmatrix abhängt.

In dieser Arbeit wurden gebrauchsfertige 10% Polyacrylamidgele mit einem Anteil von 0,1% Gelatine (w/v) von der Firma Bio-Rad bezogen.

2.8.4 Durchführung der Zymographie

25 µg jeder Proteinprobe wurden in Lademedium (50 mM Tris-HCl, 10% Glycerin (v/v), 1% SDS (w/v), 0,005% Bromphenolblau (w/v), pH 6,8) verbracht, auf das Gel aufgetragen und in Elektrophoresepuffer (250 mM Trishydroxymethylaminomethan, 192 mM Glycin, 0,1% SDS (w/v), pH 8,3) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte im Eisbad bei einer konstanten Spannung von 100 V. Auf diese Weise sollte eine irreversible Inaktivierung der Proteasen durch Hitzedenaturierung und eine vorzeitige Gelatinolyse vermieden werden.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 3 x 20 min in 2,5% Triton X-100 (v/v) schüttelnd gewaschen, um das im Lademedium enthaltene SDS zu entfernen. Anschließend folgte die Reaktivierung durch zweimal 20 minütiges Schütteln in Enzympuffer (5 mM Tris, 20 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂, 0,002% NaN₃ (w/v)) bei Raumtemperatur, bevor sich eine 18 h Inkubationsphase in frischem Enzympuffer bei 37°C anschloss. Schließlich wurde das Gel für 4 h in ein kombiniertes Färbe-/Entfärbemedium (0,5% Coomassie-Blue G-250 (w/v), 10% Essigsäure (v/v), 30% Methanol (v/v)) verbracht.

Zonen mit proteolytischer Aktivität wurden durch Coomassie-Blue nicht gefärbt, da hier die Gelatinspaltprodukte aus dem Gel diffundiert waren, während sich ungespaltenes Gelatin blau anfärbte.

2.8.5 Auswertung der Zymographie

Gefärbte Gele wurden mittels des BioDoc Analyze System der Firma Biometra digital dokumentiert und die Signaldichte ungefärbter Areale, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, mit Hilfe der Software Scion Image ausgewertet.

Die Gelatinasen wurden anhand einer Standardreihe aus Gelatinasen bekannter Konzentration identifiziert und die Aktivität als prozentuale Veränderung gegenüber der gelatinolytischen Aktivität in der Gruppe *K* angegeben.

2.9 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden einer deskriptiven statistischen Berechnung unterzogen, wobei Median, Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient bestimmt wurden. Die Ergebnisse der mRNA-Analyse und der hämodynamischen Untersuchung sowie die Versuchstierdaten wurden graphisch in Boxplots dargestellt. Der Kasten (Box) stellt dabei den Interquartilsbereich zwischen 25% und 75% dar. Werte, die maximal anderthalb Kastenlängen über oder unter den Werten in der Box liegen, bilden die Linien (Whiskers), wobei die Querstriche für den kleinsten bzw. größten tatsächlich gefundenen Wert in diesem Bereich stehen. Ausreisser, die mehr als anderthalb aber weniger als drei Kastenlängen außerhalb der Box liegen, werden mit einem Kreis gekennzeichnet. Extremwerte von mehr als drei Kastenlängen sind durch einen Stern markiert.

Die im Ergebnistext angegebenen Daten repräsentieren den Mittelwert $\pm$ der Standardabweichung. Der jeweilige Mittelwert wurde berechnet aus der Summe der Beobachtungen dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen. Die Standardabweichung ergab sich aus der Wurzel des Quotienten der Fehlerquadrate dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen.

Im vorliegenden Experiment mussten zur statistischen Analyse nichtparametrische Tests verwendet werden, da zum einen unterschiedliche Stichprobenumfänge vorlagen und zum anderen statistische Tests auf Normalverteilung der Feldkomponenten bzw. auf Homogenität der Fehlervarianzen allgemein erst bei einem Vergleich ab 10 Gruppen sinnvoll sind [233]. Alle statistischen Tests wurden unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS für Windows Version 10.0.1 (SPSS Inc., USA) durchgeführt.

Zunächst wurde mit Hilfe des H-Test nach Kruskal-Wallis aus den Mittelwerten bestimmt, ob die sechs Stichproben aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammen. Dabei wurde jede zu untersuchende Variable daraufhin untersucht, ob die einzelnen Versuchsgruppen sich insgesamt statistisch signifikant voneinander unterscheiden ($p < 0,05$).

Wurde im H-Test eine signifikante Varianz festgestellt, konnten Einzelvergleiche zur Prüfung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen durchgeführt werden. Hierzu wurde mittels des U-Test nach Mann-Whitney für jeden zu untersuchenden Parameter die Daten von Gruppe 1.1 mit 1.2 und von der Gruppe 1.2 mit 2.2, 2.3 und 2.4 verglichen [234]. Da bei jeder Variablen mehrere Einzelvergleiche erfolgten, musste das Signifikanzniveau durch eine α -Adjustierung nach Bonferroni mittels der Formel $\alpha' (k) = 1 - (1 - \alpha)^{1/k}$ (wobei k die Anzahl der durchgeführten Tests ist) auf $p < 0,01$ festgesetzt werden [235].

2.10 Tierversuchsantrag

Alle Tierversuche wurden entsprechend den gesetzlichen Richtlinien angemeldet und laut der Genehmigung gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.11 Eingesetzte Chemikalien und Laborgeräte

2.11.1 Laborgeräte

Tabelle 2.5: Verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Bezeichnung / Typ	Bezugsquelle
Aufzeichnung hämodynamischer Daten	WR3101 Mark VII Linear-corder	Graphtec Corporation, Tokyo, Japan
Autoklav		Hartmann, Schleswig, Deutschland
Backofen		Heraeus, Osterode, Deutschland
Beatmungsgerät	Ventilator Typ 55-7066	Havard Apparatus, South Natick, USA
Brutschrank	Function Line	Heraeus, Osterode, Deutschland
Eismaschine	AF-10	Scotsman, Vernon Hills, U.S.A.
Eisschrank -20 °C	Economic super	Bosch AG, Stuttgart, Deutschland
Eisschrank -80 °C	Nuaire Ultralow Freezer	Zapf Instrumente, Sarstedt, Deutschland
Elektrophoresekammer	a) für Agarosegele b) für Zymographie	a) Biometra, Göttingen, Deutschland b) Bio-Rad, München, Deutschland
Gelschlitten	Eigenproduktion Charité	
Gewebeeinbettungsautomat		Shandon, Frankfurt/Main, Deutschland
Grafikdrucker	Digital Graphic Printer UP-D890	Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland
Hämodynamische Messapparatur	a) DC Bridge Amplifier Type 660 b) Differentiator Slope Quotient Coupler 575 c) Heart Rate Module Type 669	alle Hugo-Sachs, March-Hugstetten, Deutschland
Homogenisator	Pellet Pestle Motor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Horizontalschüttler	SM-25	Edmund Bühler, Tübingen, Deutschland

Laborgerät	Bezeichnung / Typ	Bezugsquelle
Kühlzentrifuge + 4 °C	Megafuge 1. OR	Heraeus, Osterode, Deutschland
Laborwaage, elektronisch	DMS 580	Kern Elektronik, Albstadt, Deutschland
Magnetrühr-/Heizplatte	Ikamag RCT	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop	Eclipse E 600 Pol	Nikon, Tokyo, Japan
Mikrowellenherd	Privileg Microwave 800	Welabo, Düsseldorf, Deutschland
Millar Tip Katheter	SPR-407 Ultraminiature Pressure Transducer, 2 F	Millar Instruments, Houston, U.S.A.
Netzgerät	Power Pack P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	Knick Digital 646	Beyer, Düsseldorf, Deutschland
Photometer	DU 640i	Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland
Pipetten	reference	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschl.
Präzisionswaage		Sartorius, Göttingen, Deutschland
Mikrotom	Jung CM 3000	Leica, Bensheim, Deutschland
Szintillationsmessgerät	LS 1701	Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland
Thermomixer	Comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschl.
Thermozykler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschl.
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschl.
Ultrazentrifuge	Sorval Superspeed RC2	Kendro, Langenselbold, Deutschland
UV-Transilluminator	BioDoc Analyze System	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortexer	VF2	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Wasserbad		GFL, Burgwedel, Deutschland

2.11.2 Restriktionsenzyme

Bei der DNA-Klonierung und der Linearisierung der Plasmide wurden folgende Restriktionsendonukleasen verwendet: Bsp LU11 I, Bst X I, Hind III, Ksp I, Mlu N I, Sac I, Sac II, Spe I und Sph I (alle Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland), sowie Bst Z I (Promega, Mannheim, Deutschland).

2.11.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung / Typ	Bezugsquelle
Deckgläschen	21 x 26 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschl.
Einmalhandschuhe	Typ Derma-Free	Ansell-Medical, Bangkok, Thailand
Einmalpipetten		Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Falcon-Tubes	15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Feintücher	Kim Wipe lite	Hakle-Kimberley, Mainz, Deutschland
Fotopapier	K 65 HM-CE	Sony, Köln, Deutschland
Gelelutionsgefäße	Ultrafree DA Tubes	Millipore, Billerica, U.S.A.
Homogenisierspatel	Pellet Pestles	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hybridisierungskammer	Eigenproduktion UKBF	
Kartellbox		Greiner, Solingen-Wald, Deutschland
Kryotubes	1,5 ml	Greiner, Solingen-Wald, Deutschland
Kunststoffkanüle	18G und 20G	Braun, Meisungen, Deutschland
Objekträger	a) geschliffene Kanten für in situ-Hybridisierung b) Super-Frost Plus für Immunhistochemie	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschl.
PCR-Tubes	0,2 ml, konischer Deckel	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Petrischalen	Ø 94 x 16 mm	Greiner, Solingen-Wald, Deutschland
Pipettenspitzen	a) 10, 100, 1000 ml; unsteril b) 10, 100, 1000 ml; mit Filtertip; RNase-frei	a) Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland b) Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße	0,5 / 1,5 / 2,0 ml; Safe- Lock oder RNase-frei	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschl.
Spritzenvorsatzfilter	Filtergröße 0,2 µm	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifugationsgefäße (zur Maxi-Präparation)	Sorval Polypropylen Oak Ridge Bottle (50 ml)	Kendro, Langenselbold, Deutschland

2.11.4 Puffer und Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.a. (pro analysi) Qualität bezogen. 1 x Puffer wurden aus konzentrierten Stammlösungen mit deionisiertem sterilen Wasser verdünnt und der pH-Wert bei Raumtemperatur eingestellt. Spezielle Reaktionspuffer der verschiedenen Enzyme wurden als 10-fach Konzentrate vom jeweiligen Enzymlieferanten bezogen und nach Vorschrift eingesetzt.

Tabelle 2.7: Eingesetzte Puffer und Chemikalien

Artikel	Bezeichnung / Typ	Bezugsquelle
100x Denhardts-Lösung		Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschl.
3-Amino-9-Ethylcarbazol		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ABC-Kit	Vectastain Standard	Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.
Aceton		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose	SeaKem LE Agarose	Cambrex, Rockland, U.S.A.
Ammoniumacetat		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumsulfat		Serva, Heidelberg, Deutschland
Ampicillin	als Trihydrat, Pulver	Serva, Heidelberg, Deutschland
Aminopropyltriethoxysilan	(APES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Antikörper	a) anti murine CD4/CD8/ MAC3-Primärantikörper b) anti murine CD3- Primärantikörper c) Antikörper (EO 468)	a) BD Biosciences (Pharmingen), Heidelberg, Deutschland b) Serotec, Eching, Deutschland c) Dako, Hamburg, Deutschland
Aqua bidest.	Aqua-Spüllösung, steril	Delta Select, Pfullingen, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking-Kit		Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.
Bacto-Agar		BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Biotherm Taq	DNA-abhängige DNA- Polymerase	Rapidozym, Berlin, Deutschland
Borsäure	für die Molekularbiologie	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin	BSA, lyophilisiert	Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.
Brij 35 Solution		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Calciumchlorid	CaCl ₂ , gekörnt	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland

Artikel	Bezeichnung / Typ	Bezugsquelle
Chloroform		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Comassie Blue G-250		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Corbit-Balsam		I. Hecht, Kiel, Deutschland
Diethylpyrocarbonat	(DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dextransulfat	als Natriumsalz	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
DH 5 α – E.coli	Kompetente Zellen	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogen-Phosphat-Dihydrat		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
DNA-Längenstandard	a) Lambda-DNA/Eco RI + Hind III b) Phi-Marker c) Marker VIII d) 100 bp – Ladder	a) Fermentas, Vilnius, Litauen b) Fermentas, Vilnius, Litauen c) Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland d) Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
DNAse I	RNAse-frei	Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
dNTPs	ATP, CTP, GTP, TTP	AB Gene, Hamburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid	DMSO	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	a) als Lösung b) als Pulver für ISH	a) Promega, Mannheim, Deutschland b) Biomol, Hamburg, Deutschland
Dormicum	Wirkstoff Midazolam, Injektionslösung 5 mg/ml	Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic-acid	EDTA	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Entwickler	D 19	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Eosin Y		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure	100% (Eisessig)	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäureanhydrid		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Dab 9 reinst	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	1%ige wässrige Lösung	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Fixierer	Fixierer 3000 Lösung A	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Formamid		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Fotoemulsion	Typ G 5	Ilford Imaging, Dreieich, Deutschland
Glycerol		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycin		Serva, Heidelberg, Deutschland
Hämatoxylin		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland

Artikel	Bezeichnung / Typ	Bezugsquelle
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Jet-Star 2.0 Maxi Prep Kit	Maxi-Präparation	Genomed, Löhne, Deutschland
Kaiser's Glyceringelatine		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketanest S	Wirkstoff Ketamin, Injektionslösung 5 mg/ml	Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
Lithiumcarbonat		Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumchlorid	als Hexahydrat	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol		J.T.Baker, Deventer, Holland
Natriumacetat		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxycholsäure		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	als Plättchen	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
N,N-Dimethylformamid		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P-40		Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Normalserum	aus dem Kaninchen	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd	(PFA)	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
pGEM T-Easy Vector Kit I		Promega, Mannheim, Deutschland
Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol	Verhältnis 25:24:1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phloxin B		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Primer	Sequenzen siehe Kapitel 2.4.2	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
Pronase		Pierce, Rockland, U.S..
Protein Assay Kit BCA		Roche, Grenzach-Whylen, Deutschl.
Ready Precast Gel	10% Tris-HCl Zymogram	Bio-Rad, München, Deutschland
rmIL-4	rekombinantes murines IL-4	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
RNA-Polymerase	Sp6 / T7, inkl. Reaktionspuffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
rNTP's	rATP, rCTP, rGTP (für ISH)	AP Biotech, Freiburg, Deutschland

Artikel	Bezeichnung / Erläuterung	Bezugsquelle
RT System		Promega, Mannheim, Deutschland
RNAse A		Roche, Grenzach-Whylen, Deutschl.
RNAse Zap	aktiver RNAse-Inhibitor	Ambion, Austin, U.S.A.
³⁵ S- α -UTP	für in-vitro-Transkription (ISH)	Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland
RNAasin		Promega, Mannheim, Deutschland
Sodium Dodecyl Sulfate	(SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Solvent Blue 38		Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Silikon-Lösung		Serva, Heidelberg, Deutschland
Sucrose		Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tissue Tek	Einbettmedium	Sakura, Zoeterwoude, Holland
Trichloressigsäure		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Triethanolamin		Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)amino-methan		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)amino-methanhydrochlorid	Tris-HCl	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100		Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trizol LS Reagent	zur RNA-Isolierung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tryptone Peptone		BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid	30% H ₂ O ₂ (v/v), wässrig	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktosid	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Xylol		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Yeast Extract	Hefeextrakt für Nährmedien	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Yeast tRNA	tRNA aus Hefeextrakt	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Zymographie-Gel	Precast Ready Gel 10%	Bio-Rad, München, Deutschland
Zymographie-Standard	MMP-2/MMP-9 Control Mix	Chemicon, Hofheim, Deutschland

2.11.5 Verwendete Software

Tabelle 2.8: Verwendete Softwareprogramme

Programm	Bezeichnung / Typ	Bezugsquelle
Corel Draw 6.0	Grafikprogramm	Corel, Unterschleissheim, Deutschland
Excel 2000	Tabellenkalkulationsprogramm	Microsoft, Unterschleissheim, Deutschl.
Lucia G V3.51 ab	Histomorphometrie	Lucia Imaging, Prag, Deutschland
BioDoc V2.0	Dokumentation der Gele	Biometra, Göttingen, Deutschland
Scion Image	Auswertung der Gelbanden	Ultra-Violet Products Limited, Cambridge, U.K.
SPSS 10.0.1	Statistikprogramm	SPSS Incorporation, Chicago, U.S.A.
Word 2000	Textverarbeitung	Microsoft, Unterschleissheim, Deutschl.