

## 2 Material und Methoden

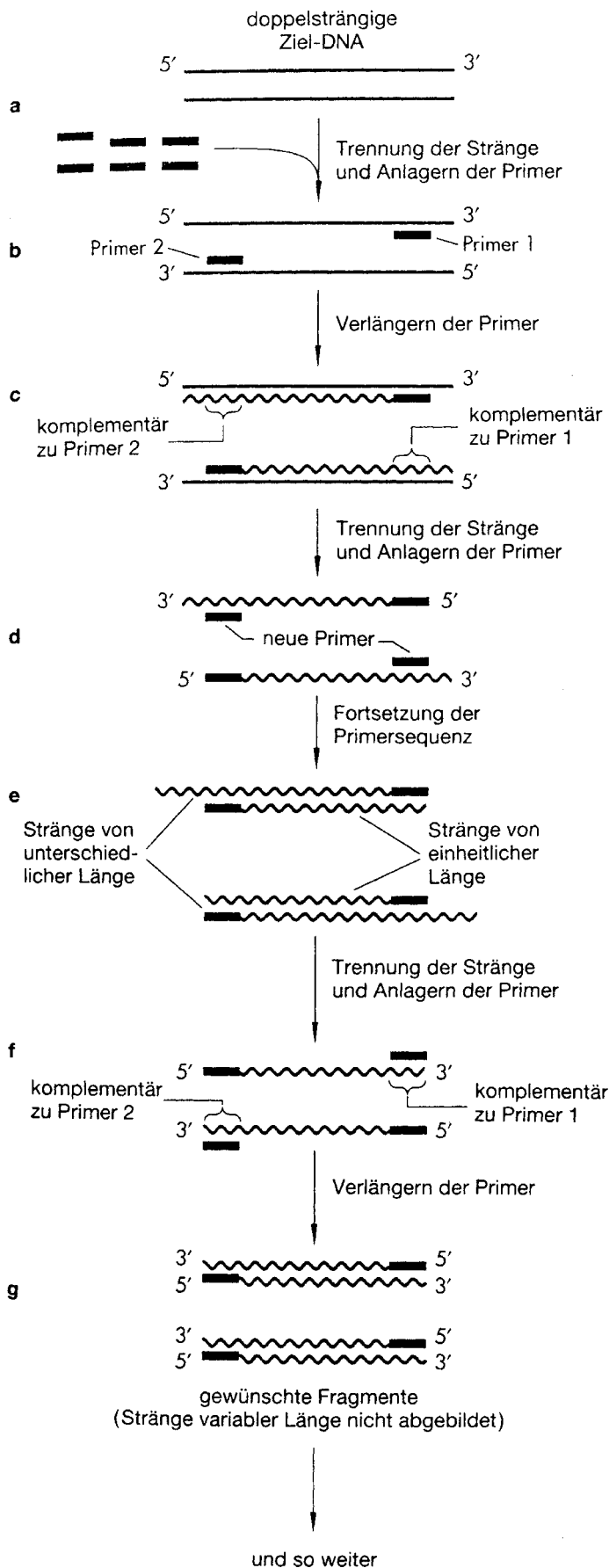
### 2.1 Organpräparation der Tiere

Die Infarkt- und die Kontrolltiere sind normotensive Wistar-Ratten. Der experimentell induzierte Myokardinfarkt der Ratte erfolgt durch Ligation des Ramus interventrikularis anterior. Nach der permanenten Ligation des RIVA werden die Infarkttiere nach 30 min, 3 h, 6 h, 24 h, 72 h und 7 d getötet. Bei den Kontrolltieren erfolgt die gleiche Operation, jedoch setzt man die Ligatur neben der A. coronaria sinistra in den Herzmuskel (Scheinoperation). Nach der Operation werden auch die Kontrolltiere nach 30 min, 3 h, 6 h, 24 h, 72 h und 7 d getötet.

<b>Zeitpunkt post OP</b>	<b>Infarkt-Herzen (MI)</b>	<b>Schein-OP (sham)</b>
30 min	1, 2	9
3 h	3, 4	10
6 h	5	11
24 h	6	12
72 h	7	13
7 d	8	14

Tab. 2: Die Tiere werden zur eindeutigen Identifizierung fortlaufend von 1 bis 14 durchnummeriert (Spalten 2 und 3)

Beiden Gruppen wird nach der Ethernarkose umgehend das Herz entnommen, welches kurz mit 0,9%-igem NaCl gespült und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, sowie anschließend bei -80°C aufbewahrt wird.



## 2.2 rt-PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist ein molekulargenetisches Verfahren, bei welchem selektiv bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Die Neusynthese von DNA-Sequenzen, die von zwei synthetischen Oligonukleotiden (sog. Primer) ausgeht, erfolgt mittels DNA-Polymerasen. Man wählt die Primer für die PCR so aus, dass sie an den Bereich der DNA angrenzen, der vervielfältigt werden soll.

Zuerst wird das Reaktionsgemisch für 3 min auf 94°C erhitzt. Bei dieser Temperatur trennen sich die DNA-Stränge vollständig voneinander. Sie bilden Einzelstränge, die zu Matrizen für die Primer und die DNA-Polymerase werden. Danach senkt man die Temperatur, damit sich die Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Moleküle binden können. Diese *annealing*-Temperatur bestimmt entscheidend über die Spezifität einer PCR. Im nächsten Schritt erhöht man die Temperatur auf 72°C. Das ist die optimale Temperatur für die hitzestabile *Taq*-Polymerase. Die

Abb. 5: Amplifizierung einer Zielsequenz

Temperatur wird für 30 sec bei 72°C gehalten, damit die DNA-Synthese erfolgen kann. Am Ende dieser Zeitspanne erhöht man die Temperatur wieder auf 94°C, diesmal jedoch nur für 30 sec, sodass sich die kurzen Stücke doppelsträngiger DNA (der ursprüngliche und der neu synthetisierte komplementäre Strang) voneinander trennen. Diese Einzelstränge werden nun in einer weiteren Sequenz der DNA-Synthese zu Matrizen. Der ganze Zyklus – Erhitzung zur Trennung der Stränge, Bindung der Primer und Synthese mit Hilfe der DNA-Polymerase – wiederholt sich 30 bis 60 mal (siehe Abbildung 5).

Durch die exponentielle Anreicherung, ausgehend von geringen Mengen DNA ( $10^{-9}$  bis  $10^{-15}$  g), können nach mehrmaliger Wiederholung des Vorgangs (30 bis 60 Zyklen) die DNA-Abschnitte nachweisbar gemacht oder für andere genetische Zwecke genutzt werden. Um mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion das genetische Material zu vervielfältigen und zu untersuchen, muß zunächst die RNA aus dem Gewebe gewonnen werden. Anschließend wird mittels der reversen Transkription die RNA in die cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben und dann mit Hilfe der PCR amplifiziert.

### 2.2.1 Isolierung von RNA

Für die Isolierung von RNA benutzen wir TRIzol (Life Technologies), eine monophasische Lösung, bestehend aus Phenol und Guanidine isothiocyanate, welche eine sehr gute Möglichkeit der DNA-Isolierung bietet. 200 mg vom Herzgewebe werden in 3 ml TRIzol für ca. 15 bis 20 sec mit einem „Pürierstab“ auf höchster Stufe homogenisiert (für 50 bis 100 g Gewebe wird 1 ml TRIzol benötigt) und danach für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation (12000 g, 4°C, Sorvall-RC2-B-Zentrifuge, Rotor SM 24) erhält man einen Überstand, in dem sich auch die RNA befindet, und eine Ablagerung, bestehend aus den Zellresten. Der Überstand wird in ein neues Röhrchen umpipettiert. Pro 1 ml TRIzol werden 0,2 ml Chloroform dazugegeben, kräftig geschüttelt und für weitere 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation (12000 g, 4°C) erhält man 3 Phasen: in der klaren oberen Phase befindet sich die RNA, in der trüben Interphase die DNA und in der unteren roten Phase das Phenol-Chloroform-Gemisch. Die klare obere Phase wird vorsichtig ab-pipettiert und die RNA mit

1,5 ml eiskaltem Isopropanol gefällt (pro 1 ml TRIzol werden 0,5 ml Isopropanol zugeführt). Danach wird für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit die RNA präzipitiert. Die RNA sedimentiert nach einer weiteren Zentrifugation (12000 g, 4°C, 30 min) auf den Grund des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wird verworfen und das RNA-Sediment mit 3 ml eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen (pro 1 ml TRIzol werden 1 ml 70%-iges Ethanol zugeführt). Nach der Lufttrocknung bei Raumtemperatur wird das RNA-Sediment in 40 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgelöst. Die Konzentration der RNA wird in einem Spektrophotometer bei 260/280 nm bestimmt und die Qualität auf einem 1%-igen Agarose-TBE Gel kontrolliert. Die RNA wird bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.2 Reverse Transkription

Die gesammte RNA wird mittels Reverser Transkriptase in die cDNA umgeschrieben. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten im Ansatz für die reverse Transkription ist:

<b>Zusammensetzung des RT-Ansatzes (alle Materialien sind von Life Technologies)</b>	
RNA	3,5 µg
dNTP	10 mM
Random Hexamers	100 pM
DTT	0,1 M
5-fach Puffer	50 mM
RNAse Inhibitor	10 U
M-MLV Reverse Transkriptase	200 U

Die reverse Transkription erfolgt in einem Volumen von 60 µl unter folgenden Bedingungen in einem MJ Research Peltier Thermal Cycler-200:

### Temperaturprofil der reversen Transkription

Anlagerung:	21°C	10 min
Synthese:	37°C	60 min
Denaturation:	95°C	5 min
Lagerung:	4°C	

### 2.2.3 PCR-Amplifikation

Die cDNA wird mittels reverser Transkription von der RNA aus dem Herzgewebe synthetisiert. Die Primer für die sich anschließende PCR werden von einem kommerziellen Anbieter (Life Technologies) hergestellt. Die Sequenz der Primer lautet von 5' nach 3':

#### Primer zur Amplifikation der rNHE-1 cDNA

Sense:	5' TCTTTAGCACAGGCTCCTCACC
Antisense:	5' CGGACGGAGTACTTCTATCCAAA

Das PCR-Produkt hat eine Länge von 777 bp.

#### Primer zur Amplifikation der rNHE-2 cDNA

Sense:	5' AGGAAGGACAACAGCTTAAACCG
Antisense:	5' CCTTCAGGGTGTTTTACTGAAAACA

Das PCR-Produkt hat eine Länge von 704 bp.

### Primer zur Amplifikation der rNHE-3 cDNA

Sense: 5' AGTCCTGTTCATCATTGTTT  
 Antisense: 5' GCCAAGCATCTTCATAGTGTA

Das PCR-Produkt hat eine Länge von 408 bp.

### Primer zur Amplifikation der rNHE-4 cDNA

Sense: 5' AGTTTCTCCCTTGCCTTTTTGC  
 Antisense: 5' GGGAATGTCGTTAGGAGTCGG

Das PCR-Produkt hat eine Länge von 704 bp.

Mit 2 µl des Produktes aus der reversen Transkription wird die PCR durchgeführt. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten für die PCR ist:

### Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (alle Materialien sind von Perkin-Elmer)

10-fach Puffer	50 mM
dNTP	2,5 mM
MgCl-Lösung	25 mM
3'Primer	10 µM
5'Primer	10 µM
Taq-Polymerase	0,2 U

Die PCR erfolgt in einem Volumen von 50 µl unter folgenden Bedingungen in einem MJ Research Peltier Thermal Cycler-200:

**Temperaturprofil der PCR zur Amplifikation der rNHE-1 cDNA**

Initiation	94°C	3 min	
Anlagerung	62°C	60 s	
Extension	72°C	30 s	36 Zyklen
Denaturation	94°C	30 s	
Lagerung	4°C		

**Temperaturprofil der PCR zur Amplifikation der rNHE-2 cDNA**

Initiation	94°C	3 min	
Anlagerung	56°C	60 s	
Extension	72°C	30 s	45 Zyklen
Denaturation	94°C	30 s	
Lagerung	4°C		

**Temperaturprofil der PCR zur Amplifikation der rNHE-3 cDNA**

Initiation	94°C	3 min	
Anlagerung	60°C	60 s	
Extension	72°C	30 s	45 Zyklen
Denaturation	94°C	30 s	
Lagerung	4°C		

**Temperaturprofil der PCR zur Amplifikation der rNHE-4 cDNA**

Initiation	94°C	3 min	
Anlagerung	56°C	60 s	
Extension	72°C	30 s	40 Zyklen
Denaturation	94°C	30 s	
Lagerung	4°C		

Jeweils ein Aliquot des PCR-Produktes wird mittels Gel-Elektrophorese auf einem 2% Agarose-TBE Gel dargestellt. Eine 100 Basenpaarleiter wird zugrunde gelegt. Danach wird das übrige PCR-Produkt auf einem 1% *Low-Melting-Agarose* Gel gereinigt, die Bande ausgeschnitten und die Agarose mit  $\beta$ -*Agarase* (NEB) verdaut. Die DNA wird zweifach mit Phenol/Chlorophorm extrahiert und danach mit Ethanol präzipitiert und bei 15000 rpm gesammelt.

### 2.3 Klonierung der Sonden für die in situ Hybridisierung

Die Information über die DNA-Sequenz für rNHE-1, rNHE-2, rNHE-3 und rNHE-4 wird aus der Datenbank des EMBL entnommen. Mittels *revers-transcription Polymerase Chain Reaktion* (rt-PCR) wird ein Teilbereich der cDNA amplifiziert und in einen Plasmidvektor subkloniert.

Nachdem man das PCR-Produkt wie oben beschrieben gereinigt und gesammelt hat, wird die Konzentration und die Qualitätskontrolle der DNA in einem Spektrophotometer bei 260/280 nm bestimmt.

Im nächsten Schritt wird mit Hilfe der T4 DNA Ligase die mittels der PCR amplifizierte Sequenz in einen Plasmidvektor gebunden, um diesen dann in Bakterienzellen zu vermehren. Die Ligation erfolgt mit dem Invitrogen TA Cloning kit. Für jedes PCR-Produkt werden 2 Ansätze gemacht. Für die Ligation werden 10 ng des PCR-Produktes eingesetzt.

Ligationsansatz (TA-Cloning kit)	
10x Ligationspuffer	1 $\mu$ l
Vector pCR-Skript Amp SK (+) plasmid (c= 25 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
PCR-Produkt (c= 10 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O (steril)	5 $\mu$ l
T4 DNA Ligase	1 $\mu$ l

Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 14°C gelagert.



### 2.3.1 Transformation

Nach der Ligation wird das Ligationsprodukt in kompetente DH 5  $\alpha$ -E. coli-Zellen transformiert. Dazu werden 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes zu 100  $\mu$ l Suspension der kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig durchmischt. 1,7  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $c=1,42M$ ) wird dazugegeben, um die Transformationseffizienz zu erhöhen. Das Reaktionsgefäß wird für 30 min auf Eis gestellt, danach für 45 s bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und dann wieder für 2 min auf Eis gestellt (Kälteschock). 900  $\mu$ l vorgewärmtes LB-Medium (42°C) werden zugeführt und für 1 h bei 37°C mit 190 rpm geschüttelt. Um die Zellen zu konzentrieren, wird ganz vorsichtig 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, die Hälfte des Mediums abpipettiert und verworfen. 200  $\mu$ l der Suspension werden auf selektive LB-Agarplatten (500 ml LB-Medium, 7,5 g Agar-agar und 30  $\mu$ g/ml Ampicillin) ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 16-18 h bei 37°C werden einzelne Klone in selektives LB-Medium (5 ml LB-Medium und 5  $\mu$ l Ampicillin) überführt und für weitere 20 h mit 190 rpm geschüttelt.

### 2.3.2 DNA-Mini-Präparation

**Für die DNA-Mini-Präparation werden folgende Lösungen benötigt (siehe Anhang)**

Lösung I (4°C)

Lösung II (muß immer frisch angesetzt werden, RT)

Lösung III (4°C)

TE-Puffer

Nachdem sich die Bakterien genügend vermehrt haben, wird die Plasmid-DNA mit der Methode nach Birnboim und Doly (Alkali-Lyse) isoliert. Dazu werden 1,5 ml der Bakteriensuspension bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das

Pellet in 100  $\mu\text{l}$  Lösung I ( $4^{\circ}\text{C}$ ) resuspendiert. Dann werden 200  $\mu\text{l}$  Lösung II (Raumtemperatur) zugegeben und das Reaktionsgefäß vorsichtig geschüttelt. Nachdem 150  $\mu\text{l}$  Lösung III ( $4^{\circ}\text{C}$ ) zugegeben sind, wird das Reaktionsgefäß für 5 min auf Eis gelagert, danach bei 15000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wird zweimal mit eiskaltem 70% Ethanol präzipitiert. Nach einer 15 min Inkubation auf Eis wird das Reaktionsgefäß für 15 min bei 15000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die DNA getrocknet und in 40  $\mu\text{l}$  TE-Puffer resuspendiert.

Um die Orientierung der cDNA im Vektorplasmid festzustellen, wird die DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten und auf einem 1% TBE-Agarosegel kontrolliert. Für jedes Plasmid werden Restriktionsenzyme, die unsymmetrisch schneiden, aus der Datenbank des EMBL ausgesucht.

Restriktionsenzyme	
rNHE-1	Ava I Sac I
rNHE-2	Hind III Sac I
rNHE-3	Bal I
rNHE-4	Xmn I

Ansatz für den Restriktionsverdau	
Puffer	2 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	10 $\mu\text{l}$
Plasmid	7 $\mu\text{l}$
Enzym	1 $\mu\text{l}$

Es wird vorsichtig mit der Pipettenspitze umgerührt und für 1-2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Für das Agarose-Gel werden 1 g Agarose und 100 ml TAE-Puffer, mit 5 µl Ethidiumbromid ( $c=4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gemischt, kurz aufgeköcht und in die vorbereitete Form gegossen. Nach dem Erkalten wird das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und diese mit TAE-Puffer gefüllt.

#### Vorbereitung der Probe für die Elektrophorese

DNA-Probe:	1 µl
Auftragspuffer:	1 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O:	9 µl

Die Probe wird gemischt, herunterzentrifugiert und danach in die Tasche des Gels gefüllt. In eine weitere Tasche werden 5 µl der DNA 100bp-Leiter hineinpipettiert. Die Elektrophorese wird bei 70 V und 190 mA für 45 min durchgeführt, das Gel anschließend unter UV-Licht mit einer digitalen Kamera (UVP Image Store 500) fotografiert.

Stellt sich auf dem Agarosegel das Fragment des Restriktionsansatzes mit der erwarteten Größe dar, wird aus der korrespondierenden Bakteriensuspension ein größerer Ansatz (Maxi-Präparation) hergestellt.

### 2.3.3 DNA-Maxi-Präparation

**Für die DNA-Maxi-Präparation werden folgende Lösungen benötigt**  
(siehe Anhang)

Resuspensionspuffer (P1), pH 8,0  
Lysispuffer (P2)  
Neutralisationspuffer (P3), pH 5,5  
Equilibrierungspuffer (QBT), pH 7,0  
Waschpuffer (QC), pH 7,0  
Elutionspuffer (QE), pH 8,0  
TE-Puffer, pH 8,0  
TAE-Puffer, pH 7,8  
LB-Medium, pH 7,0  
DNA-100basenpaar Leiter 50 ng/µl

1 ml von dem Mini-Präp-Ansatz werden in 250 ml LB-Medium und 250 µl Ampicillin über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 190 rpm vermehrt. Wenn sich die Bakterien genügend vermehrt haben, sieht man eine trübe Lösung. Aus ihnen werden die Bakterien-Plasmide isoliert.

Es wird entsprechend des Protokolls der Firma Quiagen verfahren (Maxi-Präparation):

125 ml Bakteriensuspension werden 15 min bei 3000 g (Sorvalzentrifuge RC2-B, Rotor SS 34) und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in 10 ml P1 resuspendiert. Danach werden 10 ml Lysispuffer P2 dazugegeben, vorsichtig gemischt und die Probe 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch diese Prozedur wird die Plasmid-DNA freigesetzt. Nun werden 10 ml Neutralisationspuffer P3 hinzugegeben, gemischt und die Probe für 20 min auf Eis gestellt. Es erfolgt eine erneute Zentrifugation 30 min bei 15000 rpm (>30000 g), im Überstand befindet sich die Plasmid-DNA, im Sediment Bakterienreste. Ist der Überstand nicht klar, muss erneut 15 min, 15000 rpm bei 4°C zentrifugiert werden. Der klare Überstand wird auf die vorher mit 10 ml QBT Puffer equilibrierten Säulen (Quiagen tip 500) gegeben. Dann werden die Säulen zweimal mit 30 ml QC Puffer gewaschen und die DNA anschließend mit 15 ml Elutionspuffer QF von der Säule eluiert.

Für die Alkoholfällung mit dem Eluat werden unter Berücksichtigung des Ausgangsvolumens der DNA-Probe 0,7 Volumenanteile Isopropanol (eiskalt) zugesetzt und damit die DNA für 5 min bei Raumtemperatur präzipitiert. Anschließend wird für 30 min bei 10000 rpm (>15000 g) und 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig eliminiert, das DNA-Sediment mit 15 ml 70 %-igem, eiskaltem Ethanol gewaschen und anschließend 10 min bei 12000 g zentrifugiert. Nach Identifizierung des DNA-Sedimentes wird der Überstand vorsichtig abgegossen. Das DNA-Sediment wird bei Raumtemperatur luftgetrocknet, anschließend in 150 µl TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

Nachdem das Plasmid mit Hilfe des Restriktionsverdaus qualitativ kontrolliert wurde (siehe Kap. 2.3.2 *Mini-Präparation*), erfolgt die Linearisierung (siehe Kap. 2.4.2.1 *Linearisierung der Plasmide*).

## 2.4 In situ Hybridisierung

Benötigte Glaswaren und Metallgegenstände werden für mindestens 6 h bei 240°C im Wärmeschrank erhitzt, Plastikwaren einschließlich der Pipettenspitzen für 5 h bei 110°C in den Wärmeschrank gegeben. Deckgläser werden in eine Silikonlösung getaucht und anschließend für 3 h bei 110°C erwärmt. Alle Lösungen werden mit Diethyl-pyrocbonat (DEPC) vorbehandeltem, sterilem bidestilliertem Wasser (Aqua bidest.) angesetzt. Mit Hilfe von DEPC werden möglicherweise in Lösung vorhandene RNAsen inaktiviert. Dazu wird 1 ml DEPC pro 1 Liter Aqua bidest. zugesetzt, die Lösung mehrere Stunden auf einem Magnetruhrer gerührt und anschließend autoklaviert (30 min, 1atm, 120°C), dabei wird das Diethyl-pyrocbonat, unter intermediärer Radikalbildung, zu H<sub>2</sub>O und CO<sub>2</sub> zersetzt. Um eine Kontamination der benötigten Gegenstände durch an den Fingern haftende RNAsen zu vermeiden, werden während des gesamten Versuches Gummihandschuhe getragen.

### 2.4.1 Herstellung der Gefrierschnitte

Nach der Organpräparation (siehe Kap. 2.1 *Organpräparation der Tiere*) werden die im flüssigen Stickstoff aufbewahrten Organe mit einem Gewebekleber (Tissue Tek) auf dem Träger fixiert und am Gefriermikrotom mit einem C-Messer zu 4 µm dicken Schnitten verarbeitet. Die optimale Schneidetemperatur liegt bei -24°C.) Die Objektträger werden kurz bei Raumtemperatur getrocknet, mit einem Bleistift beschriftet und in eine Fixierlösung überführt.

**Für die Fixierung der Gewebeschnitte werden folgende Lösungen benötigt (siehe Anhang)**

3x PBS (Phosphat-Salz-Puffer), pH 7,2

1x PBS (Phosphat-Salz-Puffer), pH 7,2

4%-iges Paraformaldehyd (PFA) in 1x PBS, pH 7,0

Alkoholreihe (30%-iges, 70%-iges, 90%-iges, 100%-iges Ethanol)

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten werden in Färbekörbchen einsortiert und dann für 20 min in 4%-ige PFA/PBS fixiert, anschließend je 5 min in 3x und 1x PBS gewaschen, je 2 min in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und an der Luft getrocknet. Die Glaskörbchen mit den Schnitten werden in Aluminiumfolie gepackt und bei -80°C bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

## 2.4.2 Herstellung der Hybridisierungs-Sonden

Nach der PCR, der Ligation, der Transformation in die DH 5  $\alpha$ -Zellen, der Anzucht auf den LB-Agarplatten, der Mini- und der Maxi-Präparation (siehe Kap. 2.3 *Klonierung der Sonden für die in situ Hybridisierung*) erfolgt die Linearisierung des Plasmids.

### 2.4.2.1 Linearisierung der Plasmide

Isotyp	Reaktionenzyme
rNHE-1	Antisense: Sac I Sense: Eco R I
rNHE-3	Antisense: Sac I Sense: Eco R I
RNHE-4	Antisense: Eco R I Sense: Sac I

Reaktionspuffer sind ein Bestandteil des Testkits, genaue Angaben über die Zusammensetzung sind nicht bekannt.

Das Gesamtvolumen des Ansatzes beträgt 50  $\mu$ l, davon entfallen 1/10 auf den Reaktionpuffer, die Enzymmenge richtet sich nach der eingesetzten DNA-Menge. Die DNA-Menge liegt zwischen 0,2 und 2  $\mu$ g/ $\mu$ l. Restriktionsenzyme mit der Aktivität von einer Unit (U) schneiden

1 µg DNA, zur Sicherheit setzt man doppelt soviel Enzym ein, wie man für die vorhandene DNA-Menge theoretisch benötigt. Man überprüft die Linearisierung mit Hilfe der Gelelektrophorese mit dem linearisierten und dem ungeschnittenen Plasmid.

### 2.4.2.2 Transkription

Aus den linearisierten cDNA-Sonden werden durch sogenannte *run off Transkription* mit <sup>35</sup>S-UTP markierte RNA-Sonden hergestellt. Diese dienen als Hybridisierungssonden (Sense und Antisense). Die Plasmid-DNA wird vorher linearisiert, so dass ein Angriffspunkt für die T7- bzw. T3-Polymerase besteht.

Isotyp	Reaktionsenzyme
rNHE-1	Antisense: T7 Polymerase Sense: T3 Polymerase
rNHE-3	Antisense: T7 Polymerase Sense: T3 Polymerase
RNHE-4	Antisense: T3 Polymerase Sense: T7 Polymerase

#### Für die Transkription werden folgende Lösungen benötigt

0,1 mol/l Dithiothreitol [DTT]

0,3 mol/l Natriumacetat, pH 6,0

Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol: 25:24:1 (V/V/V)

70%-iges und 100%-iges Ethanol

Sofern nicht anders angegeben sind die Reagenzien Bestandteil des Transkriptionskits (Boehringer 999644).

1,0 µl 0,1 mol/l DTT,  
1,0 µl RNase Inhibitor,  
1,0 µl 10x Transkriptionspuffer für T7 bzw. T3,  
0,5 µl von jedem Nucleotid (ATP, GTP, CTP),  
1,5 µl DEPC behandeltes Wasser,  
2,5 µl linearisiertes Plasmid (DNA Konzentration 1 µg/µl),  
1,0 µl T7 bzw. T3 und  
5,0 µl 35 S-UTP (250µCi/20 µl) wurden  
6 s bei 13000 rpm (Eppendorftischzentrifuge) zentrifugiert.  
Anschließend wird für 1h bei 37°C inkubiert und dann werden  
5,0 µl Hefe-tRNA (50 mg/ml),  
0,5 µl RNase Inhibitor (s.o.) und  
1,0 µl DNase (RNase frei) zugeben und 8 min bei 37°C inkubiert. Dann werden  
79 µl DEPC vorbehandeltes Wasser,  
10 µl 3 mol/l Natriumacetat und  
10 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugefügt, gemischt und 5 min bei  
13000 rpm (Eppendorfzentrifuge) zentrifugiert.

Die obere wässrige Phase (Überstand 1) wird in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und aufbewahrt. Die Phenolphase wird noch einmal mit 100 µl DEPC vorbehandeltem Wasser extrahiert und die wässrige Phase (Überstand 2) wird mit Überstand 1 vereinigt. Zu den Überständen 1 und 2 wird 200 µl Chlorophorm: Isoamylalkohol (24:1) gegeben, gemischt und 5 min bei 13000 rpm (Eppendorfzentrifuge) zentrifugiert. Man erhält zwei Phasen, eine obere wässrig-alkoholische Phase (Überstand 3) sowie eine untere chloroformhaltige Phase. Überstand 3 wird abgehoben und aufbewahrt. Die Chloroform-Phase wird erneut mit 200 µl DEPC vorbehandeltem Wasser extrahiert und die sich ergebende wässrige Phase mit Überstand 3 vereinigt, dies entspricht dem Gesamtextrakt.

#### **Alkoholfällung**

400 µl des Gesamtextrakts  
40 µl 3 mol/l Natriumacetat  
800 µl 100 %iges Ethanol



Für die Alkohol-fällung wird der Ansatz 30 min bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend 30 min bei 13000 rpm (Eppendorffzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Sediment wird mit 500  $\mu\text{l}$  70%igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluß wird das trockene Sediment in 4  $\mu\text{l}$  0,1 mol/l DTT und 36  $\mu\text{l}$  DEPC vorbehandeltem Wasser resuspendiert.

Um die Radioaktivität der Transkriptionslösung zu bestimmen, nimmt man ein Aliquot (1  $\mu\text{l}$ ) der Transkriptionslösung und gibt es zusammen mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit in ein Reaktionsgefäß, um gegen einen Leerwert (nur Szintillationsflüssigkeit) im Packard Szintillationszähler mit dem  $^{14}\text{C}$ -Programm zu messen. Das  $^{14}\text{C}$ -Programm kann benutzt werden, da  $^{14}\text{C}$  ein ähnliches Energiespektrum aufweist wie  $^{35}\text{S}$ . Es werden Impulse pro Minute (cpm) ermittelt. Es sollten 200.000 bis 500.000 cpm/ $\mu\text{l}$  in der Transkriptionslösung enthalten sein, um eine ausreichende Markierung zu gewährleisten. Die mit  $^{35}\text{S}$  markierten Sonden werden bis zur Hybridisierung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.4.3 Hybridisierung

Aus dem linearisierten Plasmid wird durch die *run off Transkription* mit  $^{35}\text{S}$ -UTP eine radioaktiv markierte RNA-Sonde hergestellt. Die Sonden binden spezifisch (Antisense-Positivkontrolle) oder sie binden nicht (Sense-Negativkontrolle) an die im Gefrierschnitt gesuchte mRNA. Es entstehen so gegebenenfalls radioaktiv markierte RNA-RNA-Hybride.

#### **folgende Lösungen werden benötigt (siehe Anhang)**

Alkoholreihe (30%ig, 70%ig, 90%ig, 100%ig Ethanol)

5 mmol/l Ammoniumacetat, pH 7,5

4% PFA in 1x PBS pH 7,0

1x PBS pH 7,2

0,2 mol/l HCl

Pronase (0,125 mg/ml)

0,1 mol/l Glycin / 1x PBS, pH 7,4  
0,1 mol/l Triethanolamin, pH 8,0  
1 mol/l Tris HCl, pH 7,5  
0,5 mol/l EDTA ,pH 8,0  
5 mol/l NaCl  
1 mol/l Natriumacetatpuffer, pH 6,8  
10 fach konzentrierte Salzlösung (SALZ-L) für 500 ml  
1 mol/l DTT (Dithiothreitol)  
Hefe-tRNA (50 µg/µl)  
50% Dextransulfat

#### 2.4.3.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte für die Hybridisierung

Zur besseren Penetration der RNA-Sonden ins Gewebe müssen die durch Paraformaldehyd-fixierung entstandenen Proteinquervernetzungen durch vorsichtige Andauung des Gewebes abgebaut werden. Dafür werden die in vertikale Küvetten einsortierten Präparate 20 min mit 0,2 mol/l HCl vorbehandelt, kurz in 1x PBS gespült und für weitere 10 min mit einer Pronaselösung (0,05 mg Pronase/1 ml 1x PBS-Lösung) angedaut. Die Pronasereaktion wird durch Eintauchen der Schnitte für 30 s in 0,1 mol/l Glycin /1x PBS gestoppt. Nach kurzem Spülen in 1x PBS werden die Gewebeschnitte erneut 20 min in 4%igem PFA/PBS fixiert, danach für 3 min in 1x PBS gespült.

Zur Reduzierung des Hintergrunds, welcher durch unspezifische Bindung der RNA-Sonden an Proteinstrukturen entstehen kann, werden die basischen Gruppen der Proteine für 10 min durch Zugabe einer unmittelbar vorher angesetzten 0,1 mol/l Triethanolaminlösung/ Essigsäureanhydridlösung (400:1) acetyliert. Die Schnitte werden anschließend 5 min in 1x PBS gewaschen und in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, die Objektträger zur Aufnahme des Hybridisierungsmixes waagrecht auf Trägern angeordnet.

Für insgesamt 60-100 Gewebeschnitte werden Antisense und Sense Hybridisationsgemische benötigt. Gefrierschnitte von Infarkttieren und Kontrolltieren mit Antisense und Sense werden im gleichen Versuchsansatz unter den gleichen Bedingungen hybridisiert.

Pro Gewebeschnitt werden 5 µl Probegemisch folgender Zusammensetzung benötigt:

**Probegemisch**

2,5 µl Formamid  
0,5 µl 0,1 mol/l DTT  
x µl <sup>35</sup>S-UTP-RNA mit mindestens 200.000 cpm  
(Sense oder Antisense RNA)  
DEPC H<sub>2</sub>O ad 5 µl Gesamtvolumen

Vor der Herstellung der Lösung ist es zunächst notwendig, die Aktivität der <sup>35</sup>S-UTP-RNA-haltigen Lösung zu überprüfen, da <sup>35</sup>S nur eine Halbwertszeit von 87,4 Tagen hat und mindestens 200.000cpm pro radioaktiv markierter Probe eingesetzt werden.

Pro Gewebeschnitt werden 20 µl Hybridisierungsmischung in folgender Zusammensetzung benötigt:

**Hybridisierungsmischung**

10,00 µl Formamid  
2,50 µl 10x SALZ-L  
1,80 µl DEPC vorbehandeltes H<sub>2</sub>O  
0,20 µl 0,01 mol/l DTT  
0,5 µl Hefe-tRNA  
5,0 µl 50% Dextransulfat  
20,0 µl Gesamtvolumen

Die Menge der Hybridisierungsmischung wird für die entsprechende Anzahl der benötigten Objektträger errechnet, frisch zusammenpipettiert und bis kurz vor dem Gebrauch in ein 50°C warmes Wasserbad gestellt. Die Probemischung wird unter Zugabe der errechneten <sup>35</sup>S-UTP-RNA Menge vorbereitet. Kurz vor dem Auftragen auf den Gewebeschnitt werden

Proben- und Hybridisierungsgemisch zusammengegeben und gemischt (Gesamt Mischung). Ein kurzes Eintauchen des Eppendorfgefäßes in ein auf 80°C erhitztes Wasserbad soll mögliche in Lösung gebildete Sekundärstrukturen der RNA auflösen. Pro Objektträger werden 25 µl Gesamt Mischung aufgetragen, die Schnitte mit silikonisierten Deckgläschen versehen und in die Hybridisierungskammern gestellt (deren Böden mit einer Lösung aus 25 ml Formamid, 5 ml 10x SALZ-L und 20 ml DEPC vorbehandeltem H<sub>2</sub>O bedeckt sind). Die Gewebeschnitte werden über Nacht (20 h) bei 50°C hybridisiert.

### 2.4.3.2 Waschen der Gewebeschnitte nach beendeter Hybridisierung

Die über Nacht hybridisierten Schnitte werden in Färbegestelle umsortiert und in horizontale Küvetten gestellt.

**Für das Waschen werden folgende Lösungen benötigt** (siehe Anhang)

Formamidwaschlösung

TES

RNAse A (10 mg/ml)

TES+RNAse (20 µg/ml)

20x SSC (Salz-Natrium-Citrat-Puffer), pH 7,0

2x SSC

1x SSC

0,1x SSC

0,05x SSC

Pro Küvette werden 200 ml einer 50°C warmen Formamidwaschlösung zugegeben. Die Küvetten werden 3,5 h bei 50°C im Wasserbad auf Stufe 5 geschüttelt. Die Waschlösung wird zweimal nach jeweils 1h 10 min gewechselt (Der hohe Formamidanteil der Waschlösung soll die Wasserstoffbrückenbindungen fehlhybridisierter Nukleinsäurestränge lösen). Nach 3,5 h werden die Präparate in 37°C warmer TES-Lösung für 15 min im Schüttelbad gewaschen. Zur Reduzierung des Hintergrundes wird die nichtgebundene RNA durch RNAse-Verdauung

entfernt (30 min Inkubation in einer TES-Lösung mit 20 µg/ml RNase bei 37°C). Anschließend werden die Objektträger bei 37°C für je 15 min in SSC-Lösungen mit absteigender Salzkonzentration (2x, 1x, 0,05x SSC-Lsg.) gespült. Danach werden die Schnitte bei Raumtemperatur je 2 min in aufsteigender Alkoholreihe entwässert (das Ethanol enthält pro 200 ml 12 ml 5 mol/l Ammoniumacetatlösung). Die Präparate werden nach der Lufttrocknung für die Autoradiographie weiterverarbeitet.

#### 2.4.4 Autoradiographie

##### **Für die Autoradiographie wird benötigt**

Iford K5 Photoemulsion und  
0,6 mol/l Ammoniumacetat, pH 7,5

In der Dunkelkammer wird unter absolutem Lichtausschluss die silberbromidhaltige Photogelatine (15 ml) mit dem gleichen Volumen 0,6 mol/l Ammoniumacetat-Lösung verdünnt, bei 37°C im Wasserbad gelöst und während des gesamten Beschichtungsvorganges auf dieser Temperatur gehalten. Die Iford K5 Photoemulsion wird in eine spezielle Küvette gegeben, in welche die Gewebeschnitte kurz eingetaucht werden. Die Objektträger mit den Gewebeschnitten werden zur Trocknung der Emulsion in Ständer gestellt und nach 2 h in lichtdichte Präparatkästen (Kastellboxen) einsortiert, die grobkörniges CaCl<sub>2</sub> als Trocknungsmittel enthalten. Die Schnitte werden entsprechend der notwendigen Expositionszeit bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Durch den Zerfall der Radioisotope werden die Silberbromidkristalle in der Photoemulsion zu metallischem Silber reduziert, es entsteht ein latentes Bild, das durch photographische Entwicklung und Fixierung sichtbar gemacht wird. Die hybridisierten RNA-RNA-Hybride werden im Gewebe in Form schwarzer Silberkörnchen dargestellt.

**Für Entwicklung und Fixierung werden benötigt**

Kodak D 19 Entwickler (der 1:2 verdünnt wird mit Aqua bidest., pro 200 ml Hellendahlküvette für 18 Schnitte: 100 ml Entwickler + 100 ml Aqua bidest.)

1%ige Essigsäure

Kodak Fixierer (der 1:3 verdünnt wird mit Aqua bidest., pro Küvette 50 ml Fixierer + 150 ml Aqua bidest.)

Nach 28 Tagen Expositionszeit werden die Schnitte in der Dunkelkammer entwickelt und fixiert. Dazu werden die Objektträger aus den Kastellboxen in Färbegestelle umsortiert und für 2,5 min in die Entwicklerlösung getaucht, anschließend wird die Entwicklung in 1%iger Essigsäurelösung terminiert, zwischengewässert und die Proben für weitere 2,5 min im Fixierbad fixiert. Danach werden die Präparate für 20 min unter fließendem Leitungswasser gewässert und mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt.

Zur Vermeidung von Hintergrundschwärzung durch zu lange Exposition werden zu unterschiedlichen Zeiten (nach 15 Tagen, 20 Tagen, 28 Tagen) einige Objektträger entwickelt und das Ergebnis kontrolliert.

Die bei der *run off Transkription* erhaltene Sense RNA-Sonde dient als Negativkontrolle. Da sie im Basenaufbau identisch mit der Gewebe-mRNA ist, können keine spezifischen RNA-RNA-Hybride gebildet werden. Lassen sich dennoch Hybride nachweisen, so können diese nur durch eine unspezifische Hybridisierung entstanden sein, d.h. diese Testserie ist nicht auswertbar.

Analysiert man den Rand eines Gewebeschnittes (Antisense-Reaktion), so dürfen dort nicht überdurchschnittlich viele Silberkörnchen nachweisbar sein, da es sonst zu chemischen Interaktionen zwischen Photoemulsion und verwendeten Lösungen gekommen ist.

### 2.4.5 Photo-Dokumentation

Für die Dokumentation der Ergebnisse wurden die Präparate mit der photomikroskopischen Einrichtung von Olympus (Mikroskop Olympus bh-2 Typ BHT, Kamera Olympus c-34AD-4 Typ PM 10 ADS) fotografiert, 10er Okular und 100er in Öl Objektiv. Die Entwicklung der Filme erfolgt im Photolabor des Benjamin-Franklin-Universitätsklinikum Steglitz, Berlin.

### 2.4.6 Auswertung

Es werden bei 800-facher Vergrößerung (mit einem Okular mit Raster von Zeiss) in jedem Schnitt die entstandenen Silberkörner in 10 oder 15 Bildausschnitten ausgezählt. Zur Vergleichbarkeit werden die Silberkörner pro 100  $\mu\text{m}^2$  angegeben. Die Anzahl der Silberkörner pro Zellkerne wird ermittelt (Anzahl der Silberkörner/Anzahl der Zellkerne). Dieses wird gleichermaßen für die Antisense-Präparate und Sense-Präparate gemacht. Die Differenz zwischen Antisense und Sense ergibt die spezifische Bindung (Antisense-Sense).

## 2.5 Statistische Auswertung

Zur Auswertung wird der *unpaired student's t-test* angewendet, um statistische Unterschiede zwischen den Infarkttieren und Kontrolltieren aufzuzeigen. Die Bonferroni-Korrektur wird für die Versuche angewendet, bei denen mehrere Tests durchgeführt werden. Ab einem Wert von  $p < 0,05$  werden die Ergebnisse als signifikant unterschiedlich bewertet. (Statistische Signifikanz wird angenommen, wenn eine Nullhypothese auf der Ebene 0,05 abgelehnt werden konnte.)