

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Mausmodell**

#### **2.1.1 Das Virus**

Die Infektion der Mäuse erfolgte mit CVB3-Virus (Nancy Strain). Das Virus wurde in einer Konzentration von  $1 \times 10^8$  plaque forming units (PFU) in HeLa-Medium bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert, direkt vor Gebrauch wurden Infektionsdosen von  $5 \times 10^5$  PFU in 0,5 ml 1×PBS gelöst und im Wasserbad auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt.

#### **2.1.2 Versuchstiere**

Acht Wochen alte, männliche BALB/c (H-2<sup>d</sup>) Mäuse wurden vom The Jackson Laboratory bezogen. Diese wurden in Gruppen von 6–8 Tieren in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen des Typs Makrolon III 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 in einem 12 Stunden hell-dunkel-Rhythmus. An diese Bedingungen konnten sich die Mäuse vor Versuchsbeginn 2 Wochen lang gewöhnen. Die Nahrung bestand aus pelletierter Alleindiät, die kontinuierlich verabreicht wurde. Steriles Leitungswasser war über Tränkeflaschen ad libitum verfügbar. Die Tiere wurden täglich beobachtet und ihre Verhaltensweisen protokolliert.

#### **2.1.3 Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau**

Die Infektion von Mausstämmen und deren Behandlung ist in unserem Labor eine gut etablierte Methode<sup>142</sup>.

Als Baseline dieser Arbeit wurden 8 Tiere mit CB3-Virus infiziert und weitere 8 Tiere mit einer equivalenten Menge 1xPBS behandelt. In 4 weiteren Versuchsgruppen wurden infizierte

Tiere und Kontrolltiere mit IL-4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion behandelt. Dabei wurden die Gruppengrößen mit n=4 möglichst klein gehalten (siehe Tab. 2.1).

**Tab. 2.1:** Versuchsgruppeneinteilung

<b>Versuchsgruppen</b>	<b>Behandlung</b>
Gruppe 1.1 (n = 8)	nichtinfizierte Kontrollgruppe
Gruppe 1.2 (n = 8)	mit CVB3 infizierte Gruppe
Gruppe 2.1 (n = 4)	nichtinfizierte Kontrollgruppe mit IL-4 durchgehend behandelt
Gruppe 2.2 (n = 4)	infizierte Gruppe (CVB3) mit IL-4 vom 1.–5. Tag behandelt
Gruppe 2.3 (n = 4)	infizierte Gruppe (CVB3) mit IL-4 vom 6.–10. Tag behandelt
Gruppe 2.4 (n = 4)	infizierte Gruppe (CVB3) mit IL-4 durchgehend behandelt

#### 2.1.4 Versuchsablauf

Bei der in diesem Kapitel kurz beschriebenen Methode der Virusinfektion von BALB/c Mäusen und deren Behandlung, erfolgte die Durchführung durch die Arbeitsgruppe von PD. Dr. med. P.L. Schwimmbeck (Institut für Kardiologie und Pulmologie, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin).

Die Tiere der infizierten Versuchsgruppen 1.2, 2.2, 2.3 und 2.4 wurden am 1. Tag einmalig mit  $5 \times 10^5$  PFU Coxsackievirus B3 (Nancy strain) in 0,5 ml 1×PBS i. p. behandelt, parallel dazu wurde den Tieren der Kontrollgruppen 1.1 und 2.1 0,5 ml 1×PBS ohne Virus i. p. appliziert.

Die Behandlung mit IL-4 erfolgte mit 200ng/die i.p (R&D Systems), dabei wurden die Versuchsgruppen 2.1, 2.2, 2.3 und 2.4 zeitlich unterschiedlich behandelt (siehe Tab. 2.1).

### 2.1.5 Hämodynamische Messungen

Bei der in diesem Kapitel kurz beschriebenen Methode der Messung von hämodynamischen Funktionsparametern, erfolgte die Durchführung durch die Arbeitsgruppe von Dr. med. Carsten Tschöpe (Institut für Kardiologie und Pulmologie, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin).

Am 10. Versuchstag wurden alle 32 Tiere intraperitoneal anästhesiert, intubiert und maschinell beatmet. Der Thorax wurde eröffnet, und die linken, ventralen Rippen wurden teilweise entfernt, um einen Zugang zum Apex des Herzens zu schaffen. Zur Vermeidung größerer Blutverluste wurde versucht mit minimaler Schnittführung zu arbeiten. Der linke Ventrikel wurde anschließend mit einer 20 G Plastikkanüle punktiert, durch die ein Millar-tip Katheter in den Ventrikel geführt wurde. Die gemessenen kardialen Funktionen wurden mit einem Mark VII Linearorder (Graphtec Corp., Tokyo, Japan) aufgezeichnet, und folgende Parameter wurden dabei angegeben und berechnet:

- $dP/dt$  max: wurde berechnet als Verhältnis des maximalen Druckanstiegs zur Zeit (angegeben in mmHg/s) als Maß für die Kontraktilität des linken Ventrikels
- $dP/dt$  min: wurde berechnet als Verhältnis des negativen Druckanstiegs zur Zeit (angegeben in mmHg/s) als Maß für die diastolische Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels
- LVsP: linksventrikulärer systolischer Druck (angegeben in mmHg) als Maß für die Nachlast des Herzens
- Herzfrequenz (angegeben in  $\text{min}^{-1}$ )

### 2.1.6 Gewebepräparation

Direkt im Anschluss an die hämodynamischen Messungen wurden die Herzen unter sterilen Bedingungen am Gefäßstiel entnommen und nach Entfernen der intrakardialen Blutmenge gewogen. Anschließend wurden die Vorhöfe entfernt und die Ventrikel mit einem horizontalen Schnitt geteilt. Der untere Teil wurde für die in-situ-Hybridisierung in  $1 \times \text{PBS}$ -

Puffer eingefroren, der obere Teil zur späteren RNA/Protein-Extraktion vorübergehend in flüssigem Stickstoff gelagert. Beide Herzteile wurden anschließend bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

Bei der Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten der Kapitel 2.2.1-2.2.1.3 sowie 2.2.9.2-2.2.9.7 wurden ausschließlich sterile, RNase-freie Substanzen und Materialien verwendet, wobei alle nicht erworbenen Lösungen mit DEPC behandelt, Glaswaren bei  $250^{\circ}\text{C}$  für 5h gebacken und Arbeitsflächen und Einmalhandschuhe mit RNase-Zap behandelt wurden. Die Arbeiten der Kapitel 2.2.2-2.2.9.1.7 wurden unter Verwendung steriler Materialien und Substanzen durchgeführt. In den Kapiteln 2.3.9.8-2.3.2.2 wurden saubere, unbehandelte Materialien und Substanzen verwendet.

### **2.2.1 RNA-Präparation**

#### **2.2.1.1 RNA-Extraktion mittels TRIZOL<sup>®</sup>**

Die RNA-Präparation wurde mit TRIZOL<sup>®</sup> Reagent und den dazugehörigen Protokollen der Firma GibcoBRL durchgeführt. Die in Stickstoff gelagerten Herzproben (mit einer Masse zwischen 15,7 und 52,1 mg) wurden direkt in 400 $\mu\text{l}$  Trizol gegeben, gewogen und mit Homogenisierstäbchen vollständig homogenisiert. Anschließend wurden 400 $\mu\text{l}$  Trizol nachgelegt und der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 160  $\mu\text{l}$  Chloroform, 15 sec starkes Schütteln und Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  wurde der Ansatz in drei Phasen separiert. Die obere, wässrige, RNA-haltige Phase wurde abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß in 500 $\mu\text{l}$  Isopropanol zur Fällung der RNA gelöst, fünfmal umgeschwenkt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. (Die Protein- und DNA-haltige Unter- und Interphase wurden für die spätere Proteinextraktion (siehe 2.3.1) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.) Durch 10 minütige Zentrifugation bei 12.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  wurde die RNA

pelletiert und einmal in 800 µl, -20°C-kaltem, 75%igem Ethanol (v/v) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 7.500 g und 4°C und Verwerfen des Überstandes wurde das RNA-Pellet etwa 15 min an der Luft getrocknet, bevor es in DEPC-behandeltem Aqua bidest. nach folgender Formel gelöst wurde: Lösemenge in µl H<sub>2</sub>O = Gewebemasse der Herzprobe in mg × 1,6. Zur vollständigen Lösung der RNA wurde das Pellet für 10 min bei 55°C inkubiert.

Abschließend wurden die Konzentration und Qualität der RNA photometrisch bei 260 und 280 nm gemessen, wobei eine A<sub>260/280</sub> - Ratio von 1,6-1,8 als qualitativ gut beurteilt wurde.

### **2.2.1.2 DNase-Verdau**

Um bei der RT-PCR eine genaue Aussage über die RNA-Expression treffen zu können, wurde vor der cDNA-Synthese ein Verdau zur Eliminierung chromosomaler DNA aus den RNA-Proben durchgeführt. Die Durchführung erfolgte mit DNase I<sup>®</sup> nach Protokollen der Firma Roche.

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

Zur Kontrolle der vollständigen DNA-Eliminierung wurde anschließend eine Kontroll-PCR mit β-Actin-Primern durchgeführt (siehe 2.2.7). Bei verbliebener DNA-Kontamination wurden weitere 25 U DNase I in den Reaktionsansatz gegeben, erneut für eine Stunde verdaut und abschließend wieder eine Kontroll-PCR mit β-Actin-Primern durchgeführt.

Vollständig verdaute Proben wurden abermals photometrisch bei 260 und 280 nm vermessen und die Konzentration bestimmt.

### **2.2.1.3 Reverse Transkription**

Die cDNA-Synthese wurde mit dem Reverse Transcription System der Firma Promega und den dazugehörigen Protokollen durchgeführt.

2 µg der DNase-verdaute RNA-Proben wurden in 20 µl DEPC-behandeltem Aqua bidest gelöst und 10 min bei 70°C denaturiert. Anschließend wurden in einem 40 µl Reaktionsgemisch (20 µl gelöste RNA, 4µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 10×Reverse Transcription Buffer, 2 µl 10mM dNTPs, 0,5 µl RNAsin<sup>®</sup>, 0,5 µl AMV Reverse Transcriptase, 1 µl Oligo (dt)<sub>15</sub> Primer und 10 µl DEPC-behandeltem Aqua bidest.) bei 42°C für 30 min transkribiert. Durch Inkubation bei 95°C für 5 min und auf Eis für 3 min, wurde das Enzym inaktiviert, und die so gewonnene cDNA konnte direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt werden.

Für den Nachweis enteroviraler RNA wurde das gleiche Protokoll leicht modifiziert. Der Ansatz erfolgte in einem 20 µl Reaktionsgemisch (500 ng RNA gelöst in 10 µl DEPC-behandeltem Aqua bidest., 2µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl 10×Reverse Transcription Buffer, 1 µl 10mM dNTPs, 0,25 µl RNAsin<sup>®</sup>, 0,25 µl MMLV Reverse Transcriptase, 0,5 µl Random Primer und 10 µl DEPC-behandeltem Aqua bidest.) mit Verwendung von MMLV Reverse Transcriptase und Random Primer.

### 2.2.2 Verwendete Primer für den Nachweis von enteroviralem Genom

Amplifikat	Länge	Primersequenzen 5'→3'	Annealing- Temperatur	Zyklenzahl
β-Aktin	450 bp	5'-Primer: gggaaatcggtcgtgacat 3'-Primer: tgccaccttcagcagatg	60,0°C	30
CVB3 (1) Primär-PCR	314 bp	5'-Primer: cggtagctttgtgcgctgt 3'-Primer: caggccgccaacgcagcc	60,0°C	30
CVB3 (2) Sekundär-PCR	195 bp	5'-Primer: cccactgagtatcaata 3'-Primer: ggccgccaacgcagccaccg	55,0°C	35

### 2.2.3 Verwendete Primer für die semiquantitative RT-PCR

Amplifikat	Länge	Primersequenzen 5' → 3'	Annealing- Temperatur	Zyklenzahl
Kollagen Typ I	607 bp	5'-Primer: ctggaagagcggagagta 3'-Primer: taaactccctccaccca	62,2°C	33
Kollagen Typ III	548 bp	5'-Primer: cccagaacattacataccact 3'-Primer: ctcaaaatgtctcaatggtg	59,0°C	28
INF- $\gamma$	456 bp	5'-Primer: agcaacagcaaggcgaaaaag 3'-Primer: gttgtatctgggggtggggga	62,9°C	40
TNF- $\alpha$	425 bp	5'-Primer: caaaggagagtggtcaggtt 3'-Primer: cactgaacctctgctccccac	65,5°C	34
$\beta$ -Aktin	450 bp	5'-Primer: gggaaatcgtgcgtgacat 3'-Primer: tgccaccttcagcagatg	60,0°C	23

### 2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein wichtiges Verfahren zur Auftrennung von DNA-Proben. Ihr Prinzip beruht auf der Wanderung von Nukleinsäuren im elektrischen Feld, die aufgrund ihrer Phosphat-Gruppen negativ geladen sind. Im verwendeten 0,5xTBE-Puffer (45 mM Trisborat, 1 mM EDTA, pH = 8,0) wandern die Nukleinsäuren als Polyanionen im elektrischen Feld zur Anode. Die Agarose bildet im ausgehärteten Zustand eine dreidimensionale Gelmatrix, welche die Wanderung größerer DNA-Fragmente stärker behindert als die kleineren.

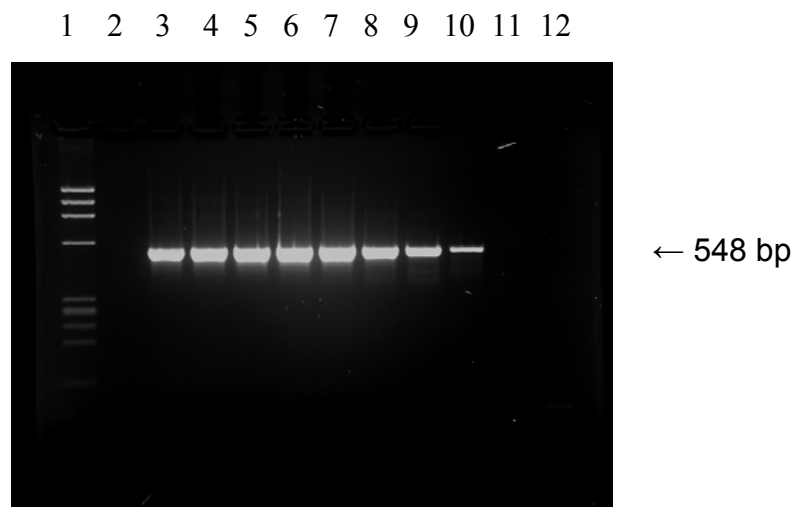
PCR-Produkte und die Klonierungsexperimente wurden in einem 2%igen Agarosegel (w/v) in 0,5xTBE in einer Horizontalelektrophorese für 20 min bei 120 V aufgetrennt, während die Überprüfung der Linearisierung in einem 1%igen Agarosegel (w/v) in 0,5xTBE für 20 min bei 120 V stattfand. Je Spur wurde in allen verwendeten Gelen 10  $\mu$ l der jeweiligen DNA-Probe in 1xGelbeladungspuffer (40% Sucrose (w/v), 0,25% Bromphenolblau (w/v))

aufgetragen. Zur optischen Darstellung der DNA unter UV-Licht wurden 0,4 µg/ml Ethidiumbromid den Agarosegelen zugefügt. Zur Kontrolle wurde bei allen Gelen ein DNA-Größenstandard mitgeführt.

Direkt nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel im UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm digital aufgezeichnet (Belichtung = 1000 ms, Blende = 4,0, Vergrößerungsfaktor = 20) und zur Dokumentation elektronisch gespeichert.

### 2.2.5 Optimierung der PCR-Bedingungen für die einzelnen Primer

Zur Optimierung der PCR-Bedingungen wurde zunächst die Primeranlagerungstemperatur mit Hilfe des Gradient-Thermozyklers der Firma Eppendorf in mehreren Probeläufen zwischen 50°C und 70°C ausgetestet (siehe Abb. 2.1).



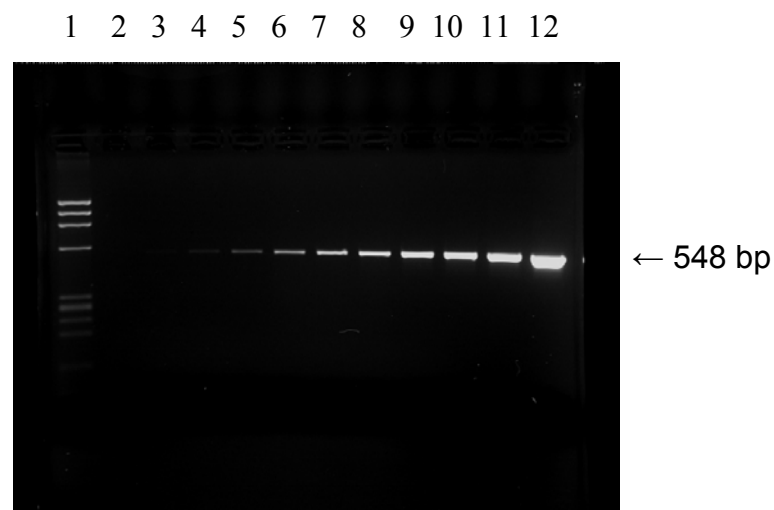
**Abb. 2.1: Gradienten-PCR von Kollagen Typ III**

Spur 1: DNA-Längenstandard, Spur 3-10: ansteigende Primeranlagerungstemperaturen: 54,0°C, 55,9°C, 57,3°C, 58,9°C, 60,5°C, 62,2°C, 63,7°C, 65,0°C, Spur 12: Negativkontrolle

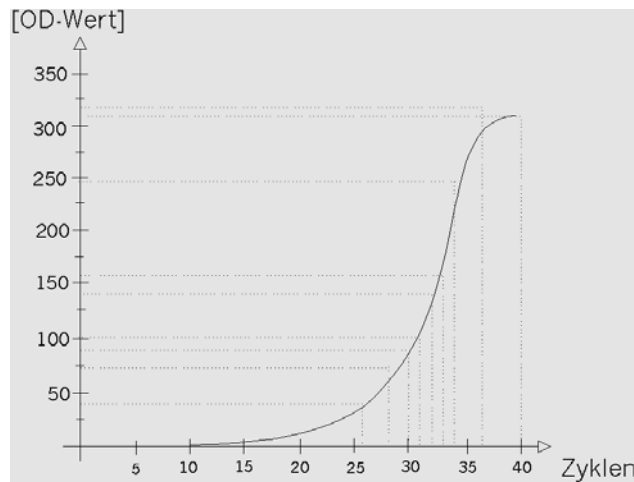


Bei einem semiquantitativen Vergleich zweier PCR's ist es von essentieller Bedeutung, dass sich die PCR im linear ansteigenden Teil der DNA-Amplifikationskurve befindet, um größtmögliche Unterschiede in der Genexpression zu zeigen.

Es wurden deshalb PCR's mit identischen Reaktionsansätzen, gleichen Versuchsbedingungen, aber unterschiedlichen Zyklenzahlen durchgeführt. Die Proben wurden nebeneinander in einem 2%igem Agarosegel aufgetragen (siehe Abb.: 2.2), mit dem Scan-Image-Programm (siehe 2.2.7) ausgewertet. In einem Koordinatensystem wurden die Pixel-Werte (OD-Werte) als Maß für die Stärke der Signale gegenüber den Zyklenzahlen aufgetragen (siehe Abb.: 2.3). Für die semiquantitative RT-PCR wurde eine Zykluszahl im unteren, linear ansteigenden Teil der Amplifikationskurve gewählt.



**Abb. 2.2:** Amplifikation von Kollagen Typ III bei verschiedenen Zyklenzahlen:  
Spur 1: DNA-Längenstandard, Spur 2: Negativkontrolle, Spur 3-12:  
ansteigende Zyklenzahlen: 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 37



**Abb. 2.3:** Zusammenhang zwischen Zyklenzahl und Grad der Amplifikation: bei gleichem Einsatz an cDNA bei Kollagen Typ III

### 2.2.6 RT-PCR und Nested-RT-PCR

Zum Nachweis enteroviraler RNA wurde eine RT-PCR modifiziert nach Saiki et al.<sup>143</sup> durchgeführt. Nach reverser Transkription mit MMLV-Reverse Transcriptase jeder einzelnen RNA-Probe unter Einsatz von random Primern in einem 20 µl Reaktionsansatz wurden 5 µl davon für die PCR eingesetzt. Die Amplifikation der cDNA 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, Primer-Annealing 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 MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,01% (w/v) Gelatine, 0,4 µM Primer, 0,2 mM dNTPs und 5 U Ampli-Taq (DNA-Polymerase). Als interne Kontrolle wurden für jede amplifizierte cDNA eine Wasserprobe zur Negativkontrolle und als interne Positivkontrolle simultan eine Koamplifikation von endogenem β-Aktin durchgeführt. Des Weiteren wurde klonierte cDNA von Cocksackie B3 als Positivkontrolle mitgeführt (PCV B3-Typ, 73,5ng/µl). Das Ergebnis der PCR wurde in einem 2%igen Agarosegel kontrolliert.

Zur Steigerung der Sensitivität wurde im Anschluss eine nested-PCR eingesetzt. Es wurden 2  $\mu\text{l}$  aus der primären PCR entnommen und in 98  $\mu\text{l}$  TE-Puffer (100mM Tris-Base, 10 mM EDTA, pH 7,4) verdünnt. Von der Verdünnung wurden wiederum 2  $\mu\text{l}$  entnommen und in einer 35 Zyklen umfassenden sekundären PCR erneut amplifiziert. Jeder Zyklus bestand aus 40 sec Denaturierung bei 94°C, 60 sec Annealing bei 55°C und 60 sec 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%igen Agarosegel.

### 2.2.7 Semiquantitative RT-PCR

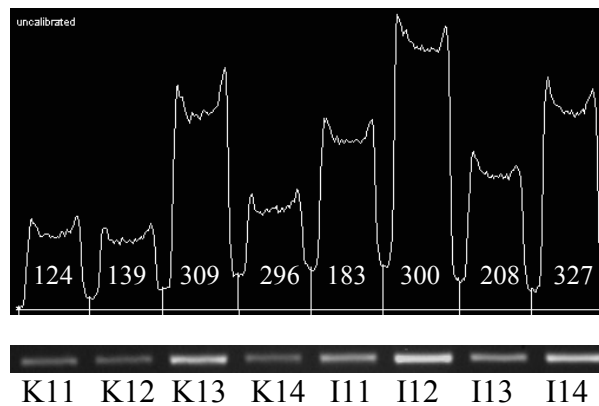
Die gewonnene cDNA wurde auf die Transkripte von Kollagen Typ I und III, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  und  $\beta$ -Aktin untersucht. Für jede PCR wurden 0,5  $\mu\text{l}$  cDNA eingesetzt (bei INF- $\gamma$  mußten 1,5  $\mu\text{l}$  cDNA zum Nachweis eingesetzt werden), die in 32,9  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst wurden. 12,1 $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz wurden zu jeder Probe gegeben (4,5  $\mu\text{l}$  10 $\times$ PCR-Puffer, 2,0  $\mu\text{l}$  50mM dNTPs, 1,8  $\mu\text{l}$  25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8  $\mu\text{l}$  3`Primer, 1,8  $\mu\text{l}$  5`Primer (Primerkonzentration: 50 ng/ $\mu\text{l}$ , gelöst in Aqua bidest.), 0,5  $\mu\text{l}$  Biotherm-Taq-Polymerase (2,5 U)), und für alle Primerpaare wurde das gleiche PCR-Programm verwendet:

Schritt 1 :	5 min bei 94°C	Denaturierung
Schritt 2 :	30 sec bei 94°C	Denaturierung
Schritt 3 :	30 sec	Primeranlagerung
Schritt 4 :	35 sec bei 72°C	DNA-Synthese
Schritt 5 :	10 min bei 72°C	DNA-Synthese
Schritt 6 :	bei 4°C	Reaktionsstop

Die Schritte 2, 3 und 4 wurden zyklisch wiederholt (die unterschiedlichen Zyklenzahlen und auch die Primeranlagerungstemperaturen sind Kapitel 2.2.3 zu entnehmen). Zur Negativkontrolle wurde ein Reaktionsansatz mit Wasser amplifiziert.

Das Ergebnis der PCR wurde in einem 2%igen Agarosegel kontrolliert, im UV-Transluminator digitalisiert und die Stärke der Signale mit dem Scion-Image-Programm (©2000 Scion Corporation) in OD-Werte transformiert (siehe Abb.: 2.4).

Jede PCR wurde durch eine oder mehrere weitere PCRs bestätigt und die Ergebnisse gemittelt. Weiterhin wurden die Ergebnisse von Kollagen Typ I und III , TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  an den Ergebnissen von  $\beta$ -Aktin relativiert, da  $\beta$ -Aktin in allen Eukaryotenzellen in hohem Maße exprimiert wird, jedoch nicht bei Virusinfektionen reguliert wird.



**Abb. 2.4:** Auswertung einer PCR für  $\beta$ -Aktin mit dem Scion-Image-Programm: für die Kontrollmäuse 11-14 und die CB3-infizierten Mäuse 11-14, mit Angabe der OD-Werte.

### 2.2.8 Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur Verifizierung der Aussagen der durchgeführten PCR's wurde jeweils ein PCR-Produkt mit den dazugehörigen Primern bei der Firma SeqLab sequenziert, und die Ergebnisse wurden mit den Literaturangaben abgeglichen.

## 2.2.9 In-situ-Hybridisierung

Die in-situ-Hybridisierung dient dem spezifischen Nachweis von mRNA direkt im Gewebe. Angewendet wurde hierbei ein modifiziertes Protokoll nach Angerer et al<sup>144</sup>.

### 2.2.9.1 DNA-Klonierung der PCR-Produkte

Um ein genspezifisches DNA-Fragment, welches mittels PCR gewonnen wurde, in ausreichender Menge bei der in-situ-Hybridisierung einzusetzen, wurde die Methode der DNA-Klonierung verwendet. Hierbei wird das PCR-Produkt in einen Vektor eingefügt, welcher in eine Wirtszelle transportiert und bei der Zellteilung auf die Tochterzellen übertragen und somit amplifiziert wird. Durch genetische Selektion (siehe 2.2.9.1.2) lassen sich Kolonien von Bakterien, die das Plasmid tragen, isolieren.

Die PCR's für die DNA-Klonierung wurden nicht mit den gleichen Primern durchgeführt, die für die RT-PCR verwendet wurden. Primer, Annealing-Temperaturen und Zyklenzahlen sind in der folgenden Tabelle angegeben, ansonsten erfolgte die Durchführung der PCR wie unter 2.2.7 beschrieben.

Amplifikat	Länge	Primersequenzen 5' → 3'	Annealing- Temperatur	Zyklenzahl
Kollagen Typ I	835 bp	5'-Primer: gtcttcaggtcctaagggt 3'-Primer: ctggtgaatctggctcgtgag	60,0°C	40
Kollagen Typ III	246 bp	5'-Primer: tgcccacagccttctacacct 3'-Primer: ggagtgggaggaatggctggc	60,0°C	40
INF- $\gamma$	396 bp	5'-Primer: gctacacactgcatcttg 3'-Primer: ccaagcattcaatgagctca	60,0°C	40
TNF- $\alpha$	295 bp	5'-Primer: gatccgcgacgtggaactggca 3'-Primer: caccaagtggaggagcagct	60,0°C	40

### **2.2.9.1.1 Vorbereitungen zur DNA-Klonierung**

#### **2.2.9.1.1.1 Aufreinigung der PCR-Produkte durch Elution aus einem Agarosegel**

40 µl des jeweiligen PCR-Reaktionsgemisches wurden in einem 2%igen ethidium-bromidgefärbten Agarosegel bei 100V und 25 min Laufzeit aufgetrennt. Nach Darstellung unter UV-Licht wurde die spezifische Bande aus dem Gel herausgeschnitten und durch Zentrifugation (10 min, 15.000 rpm) in einem Ultrafree DA Tube eluiert.

#### **2.2.9.1.1.2 Herstellung von Nährmedium für die Bakterienkultur**

Als Nährmedium für die Bakterienkulturen wurde Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) benutzt. Dieses gehört zu den komplexen oder undefinierten Medien, das heißt die genauen Bestandteile und ihre Anteile im Medium sind nicht vollständig bekannt. LB-Medium hat sich für die DNA-Klonierung mit *E. coli* als günstig erwiesen, da in ihm ohne weitere Zusätze ein breites Spektrum von Bakterienarten vermehrungsfähig ist.

Zur Herstellung wurden 10 g Bacto<sup>®</sup>-tryptone, 5 g Bacto<sup>®</sup>-yeast extract und 10 g NaCl in 1000 ml Aqua bidest. gelöst. Durch Zugabe von NaOH wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und der Ansatz sofort autoklaviert<sup>147</sup>.

Zur genetischen Selektion transformierter Bakterien wurde ampicillinhaltiges LB-Medium verwendet in einer Konzentration von 50mg/1000ml.

#### **2.2.9.1.1.3 Herstellung kompetenter Zellen**

Zur Effizienzsteigerung der Transformation in *E. coli* wurden die Zellen nach der Methode von Tang et al.<sup>145</sup> kompetent gemacht.

100 ml LB-Medium wurden dazu mit 1 ml Über-Nacht-Kultur des Bakterienstammes angeimpft und im Inkubator bei 37°C und 300 rpm schüttelnd bis zu einer optischen Dichte von  $A_{578nm} = 0,4$  kultiviert. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Bakterienkultur in eisgekühlte Zentrifugationsröhrchen überführt und 5 min bei 4°C und 4000 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml kalter 0,1 M Calciumchlorid-Lösung aufgenommen, erneut 10 min auf Eis inkubiert und abermals bei 4°C und 4000g für 5 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, ehe die Bakterien in 4 ml 0,1 M Calciumchlorid-Lösung resuspendiert wurden. Nach Zugabe von 400 µl 78%igem Glycerin (w/v) wurden die kompetenten Zellen zu 50 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### **2.2.9.1.1.4 Herstellung von Agarplatten**

Zur Herstellung von Agarplatten wurden zu einem Liter LB-Medium 15 g Bacto<sup>®</sup>-Agar gegeben und durch Erhitzen gelöst. Der Ansatz wurde in einem Wasserbad auf 45°C heruntergekühlt und mit Ampicillin (Endkonzentration von 100 µg/ml) versetzt. Zur Selektion plasmidtragender Bakterienklone wurden ferner 100 mg X-Gal (in 1,6 ml DMSO) und 80 mg IPTG dazugegeben. Anschließend wurde die Lösung zu 30 ml in Petrischalen (16 mm x 94 mm) gegossen und nach Aushärtung bei Raumtemperatur bei 4°C gelagert.

#### **2.2.9.1.2 Verwendeter Vektor**

Zur Klonierung wurde der pGEM<sup>®</sup>-T Vector<sup>146</sup> der Firma Promega benutzt, der sich für die direkte Klonierung von PCR-Produkten eignet. Die direkte Ligation mit dem PCR-Produkt wird durch das Prinzip der TA-Klonierung ermöglicht, wonach die verwendete Taq-Polymerase unabhängig vom PCR-Produkt ein zusätzliches Adenosin an die 3'-Enden des amplifizierten Fragments anhängt, welches an einen T-Überhang am 5'-Ende des linearisierten Vektor bindet. Weiterhin besitzt der pGEM<sup>®</sup>-T Vector ein β-Lactamase-Gen, das den Bakterien eine Ampicillinresistenz verleiht, wodurch die Selektion plasmidtragender Bakterienklone ermöglicht wird, ein lacZ-Gen, zur farblichen Unterscheidung von selbstligierten und fragmenttragenden Plasmiden, sowie einen T7- und einen Sp6-Promoter für die Produktion von Sense- und Antisense-RNA-Transkripten.

### **2.2.9.1.3 TA-Ligation**

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'-PO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ende.).

Die Ligation wurde mit dem pGEM-T-Vector-System der Firma PROMEGA durchgeführt. Dazu wurden in einem 10 µl Ligationsansatz 3 µl des aufgereinigten PCR-Fragments, 1 µl pGEM-T-Vector (50 ng), 5 µl 2×Ligationspuffer und 1 µl Ligase (3 U) vermennt und der Ansatz über Nacht bei 4°C ligiert.

### **2.2.9.1.4 Transformation in kompetente E. coli-Zellen**

Die Transformation<sup>147</sup> wurde mit DH5α kompetenten Zellen durchgeführt. Hierzu wurden 50 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz vermennt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für exakt 45 sec in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten (Hitzeschock) und danach 2 min auf Eis gestellt (Kälteschock). Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurde der Ansatz eine Stunde im 37°C-Inkubator bei 600 rpm geschüttelt. Je 135 µl des Transformationsansatzes wurden auf zwei Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die weißen Kolonien, die durch den Einbau des PCR-Produkts in das lacZ-Operon des Vektors die Fähigkeit zur Farbentwicklung im IPTG/X-Gal-Medium verloren hatten, wurden mit einer Pipettenspitze in 3 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt, welches anschließend über Nacht bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt wurde.

### **2.2.9.1.5 Mini-Präparation**

Die Mini-Präparation wurde durchgeführt, um den Erfolg der Transformation zu überprüfen. Erst dann wurde eine Maxi-Präparation zur Isolierung der Plasmide durchgeführt.

1,5 ml der Übernachtskulturen wurden bei 15.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 250 µl RNase/GTE-Mix resuspendiert und danach für



5 min in 250 µl NaOH/SDS-Mix lysiert. Anschließend 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 in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in 500 µl Isopropanol gelöst und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert; das Pellet wurde verworfen. Durch abermalige Zentrifugation bei 4°C und 14.000 rpm für 10 min wurden nun die Plasmide pelletiert. Das Pellet wurde in -20°C-kaltem, 70%igen (v/v) Ethanol gewaschen und 5 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet 15 min bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet, ehe es in 30 µl TE-Puffer pH 7,4 resuspendiert und durch 30 minütiges Schütteln bei 37°C und 1.000 rpm gelöst wurde.

Der Erfolg der Transformation des PCR-Produktes wurde durch einen Restriktionsverdau des isolierten Plasmides beurteilt. Das Plasmid wurde an beiden Enden des Vectors in der multiplen cloning-site mit Restriktionsenzymen geschnitten. In einem 20 µl Reaktionsansatz wurden 6 µl der Mini-Präparation, 2 µl 10×Restriktionspuffer, 10 µl Wasser und je 1 µl der zwei Restriktionsenzyme miteinander vermengt und für zwei Stunden verdaut, wobei sich die Inkubationstemperaturen nach den speziellen Anforderungen der verwendeten Restriktionsenzyme richteten.

Das Ergebnis des Restriktionverdaus wurde durch Auftragen von 3 µl des Verdauansatzes in einem 2%igen Agarosegel beurteilt. Anhand der Größe (Größe des PCR-Fragments + beidseitige Reste der multiplen cloning-site des Vektors) der entstehenden Fragmente konnte die Aufnahme des PCR-Fragments in den Vektor beurteilt werden. Bei einem positiven Ergebnis wurde mit der Maxi-Präparation fortgefahren.

#### **2.2.9.1.6 Maxi-Präparation**

Die Maxi-Präparation wurde mit dem Maxiprep-Kit der Firma Genomed durchgeführt. 100 µl der Bakterienkultur, die bei der Mini-Präparation eine Aufnahme des PCR-Fragments in den Vektor gezeigt hatte, wurden in 200 ml ampicillinhaltiges LB-Medium gegeben und bei 37°C und 300 rpm über Nacht inkubiert.

Die Übernachtskultur wurde bei 5.000 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml E1-Puffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) gelöst. Mit 10 ml E2-Puffer (200mM NaOH, 1,0 % SDS (w/v)) wurde die Bakteriensuspension 5 min lysiert, anschließend wurden mit 10 ml E3-Puffer (3,1 M Ammoniumacetat pH 5,5) Proteine und chromosomale DNA präzipitiert und für 30 min bei 15.000 g zentrifugiert. Die Maxiprep-Säule wurde mit 30 ml E4-Puffer (600 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, 0,15 % TritonX-100 (w/v), pH 5,0) equilibriert, bevor der Überstand der Proben auf die Säule aufgetragen wurde. Die Säule wurde einmal mit 60 ml E5-Puffer (800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,0) gewaschen und die Plasmide danach mit 15 ml E6-Puffer (1250 mM NaCl, 100 mM Tris, pH 8,5) eluiert. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 10,5 ml Isopropanol zum Eluat gegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dieser Ansatz bei 4.300 rpm und 4°C für 60 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das entstandene Pellet mit -20°C kaltem 70%igen (v/v) Ethanol gewaschen, abermals bei 4.300 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und das DNA-Pellet für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet je nach Größe in 100 – 250 µl TE-Puffer pH 7,4 resuspendiert und 30 min bei 37°C und 1.000 rpm schüttelnd gelöst.

Die Konzentration und Qualität der isolierten Plasmide wurde photometrisch bei 260 und 280 nm gemessen, wobei ein OD<sub>260/280</sub>-Ratio von 1,8-2,0 als qualitativ gut beurteilt wurde.

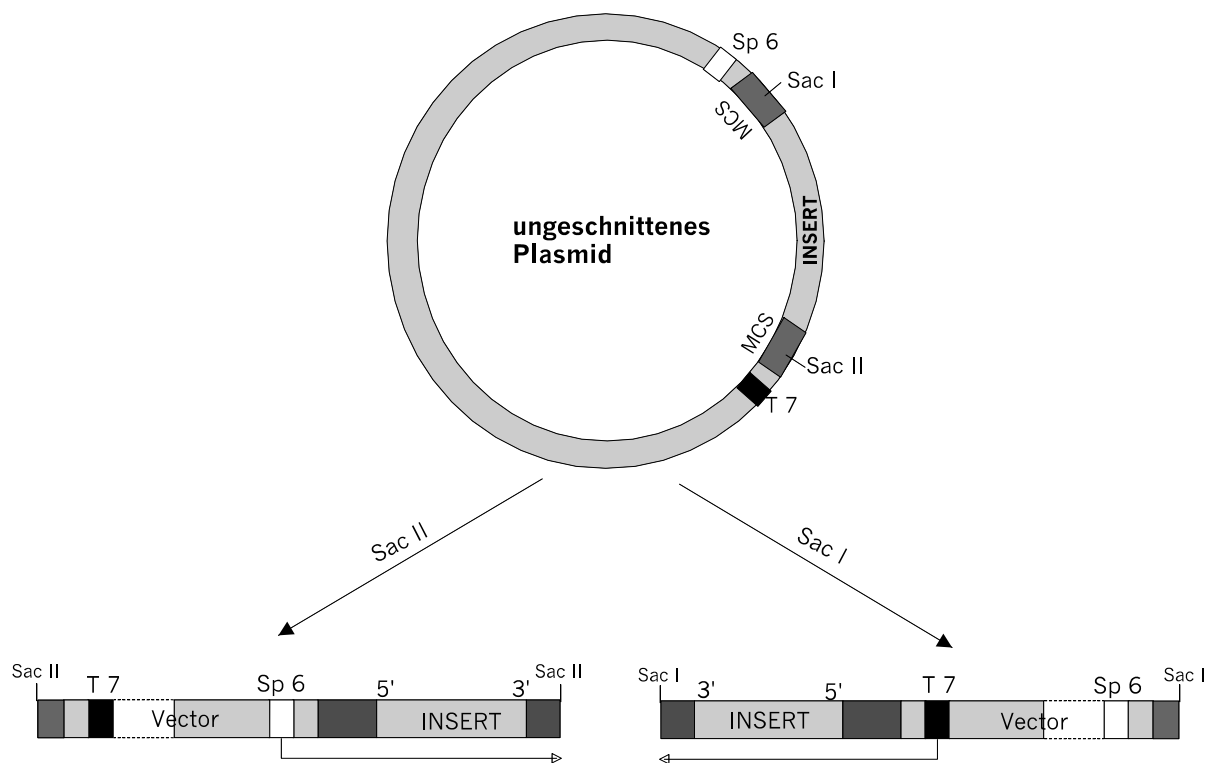
Der Erfolg der Maxi-Präparation wurde wie unter 2.2.9.1.5 beschrieben durch zweimaligen Restriktionsverdau überprüft.

#### **2.2.9.1.7 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. Bei einer Übereinstimmung von 98% oder mehr wurden die isolierten Plasmide weiter für die in-situ-Hybridisierung bearbeitet.

### 2.2.9.2 Linearisierung der Plasmide

Vor der *in-vitro*-Transkription mit  $^{35}\text{[S]}$ -UTP wurden die Plasmide linearisiert. Durch Restriktion in der multiplen Cloning Site (MCS) nahe des Sp6-Promoters und anschließender Transkription mit der T7-Polymerase entstand ein antisense-konfiguriertes Transkript. Durch Restriktion nahe des T7-Promotors und Transkription mit der Sp6-Polymerase erhielt man die Sense-Sonde als Negativkontrolle (siehe Abb.: 2.5).



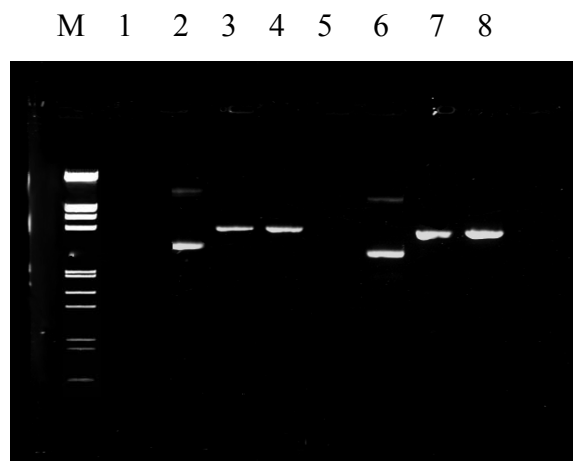
**Abb. 2.5: Linearisierung der Plasmide durch Restriktionsverdau**

Zum Erhalt je eines sense- und eines antisense-konfigurierten Transkripts wurden zwei Restriktionsverdauansätze hergestellt mit jeweils einem Restriktionsenzym. In einem 50  $\mu\text{l}$  Verdauansatz wurden 25  $\mu\text{g}$  Plasmid, 5  $\mu\text{l}$  10 x Restriktionspuffer und 50 U des jeweiligen Restriktionsenzym bei 37°C über Nacht verdaut. Die Vollständigkeit der Linearisierung

wurde durch Auftragen von 0,5  $\mu\text{l}$  des Verdauansatzes in einem 1%igen Agarosegel und Vergleich mit ungeschnittenem Plasmid überprüft (siehe Abb.: 2.6).

Vollständig linearisierte Plasmide wurden mit 5  $\mu\text{l}$  3 M Ammoniumacetat pH 6,0 und 110  $\mu\text{l}$   $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem, 100%igem Ethanol über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  wurde das Pellet in 750  $\mu\text{l}$   $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, nach erneutem Zentrifugieren für 15 min an der Luft getrocknet und abschließend in 20  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert.

Die Vollständigkeit der Linearisierung wurde durch Auftragen auf einem 1%igen Agarosegel überprüft, und die Konzentration und Qualität der DNA wurden wie unter 2.2.9.1.6 beschrieben photometrisch bestimmt. Die Konzentration des linearisierten Plasmids wurde abschließend durch Verdünnung mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  oder mittels Vakuumrotationsverdampfer auf  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt.



**Abb. 2.6:** Beispiel zweier vollständiger Linearisierungen der Kol I- und Kol III-Plasmide: Spur M: DNA-Längenstandard, Spur 2: ungeschnittenes Kol I-Plasmid, Spur 3: Linearisierung von Kol I mit EcoR1, Spur 4: Linearisierung von Kol I mit Hind3, Spur 6: ungeschnittenes Kol III-Plasmid, Spur 7: Linearisierung von Kol III mit EcoR1, Spur 8: Linearisierung von Kol III mit Hind3

### 2.2.9.3 Radioaktive Markierung der Sonden

0,5 µg des linearisierten Plasmids wurden mittels *in-vitro*-Transkription mit  $^{35}\text{[S]}$ -UTP in beiden Richtungen radioaktiv markiert. Das antisense-Transkript wurde mit T7-Polymerase, das sense-Transkript (Negativkontrolle) mit Sp6-Polymerase synthetisiert.

Die beiden Transkriptionen erfolgten in einem 10 µl Ansatz mit:

- 4,5 µl  $^{35}\text{[S]}$ -UTP (10 mM  $\approx$  90 µCi)
- 2,0µl 5µl  $\times$  Transkriptionspuffer (Sp6 und T7 zugehörig )
- 0,5µl 0,1 M DTT
- 0,5µl RNAsin ( 40 U / µl )
- 1,0µl rNTP`s ( 10 mM rATP, 10 mM rGTP, 10 mM rCTP )
- 0,5µl Plasmid ( 1,0 µg / µl )
- 1,0µl Polymerase (Sp6 und T7 zugehörig ) ( $\approx$  50 U )

Dieser Ansatz wurde für 90 min bei 37°C inkubiert, wobei nach 60 min erneut 0,5 µl Polymerase nachgelegt wurden. Die synthetisierten RNA-Sonden wurden durch 5 µl Yeast-tRNA(c:50mg/ml) und 0,5µl RNAsin stabilisiert und die DNA-Matrize abgebaut durch 8 minütige Inkubation bei 37°C mit 0,5µl (5 U) RNase-freie DNase I. Nach Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat pH 6,0 und 74 µl DEPC-H<sub>2</sub>O wurde die RNA mit 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm entstand eine RNA-haltige Oberphase, die abgenommen und mit einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumina Ethanol für 30 min bei -80°C gefällt wurde. Durch abermalige Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 13.000 rpm wurden die RNA-Sonden pelletiert und nach Trocknung in 50 µl 10 mM DTT gelöst. Abschließend wurde 1 µl des Sondenansatzes in 2 ml Szintillationslösung gelöst und eine Szintillationsmessung durchgeführt.

### 2.2.9.4 Alkalische Hydrolyse

Durch alkalische Hydrolyse wurden die Sonden auf eine Größe von 150 bp reduziert, um eine optimale Gewebepenetration für die Fragmente zu erreichen.

Die Berechnung der Hydrolysezeit erfolgte nach folgender Formel:

$$t = \frac{L_{\text{Anf}} - L_{\text{Ende}}}{L_{\text{Anf}} \cdot L_{\text{Ende}} \cdot k}$$

$L_{\text{Anf}}$  = Anfangslänge der Sonde in kb  
 $L_{\text{Ende}}$  = gewünschte Endlänge der Sonde in kb  
 $k$  = Hydrolysekonstante ( $k = 0,11$  kb / min)

Die Hydrolyse der Sonde erfolgte durch Zugabe von 50  $\mu$ l Hydrolyse-Puffer (4  $\mu$ l 1M NaHCO<sub>3</sub>, 6  $\mu$ l 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 10,2), 5  $\mu$ l 0,1 M DTT, 35  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O ) und Inkubation bei 60°C für die errechnete Hydrolysezeit (Kol I : 50 min, Kol III : 24 min, TNF- $\alpha$  : 30 min, INF- $\gamma$  : 38 min). Mit 100  $\mu$ l Stopp-Puffer (6,6  $\mu$ l 3 M Natriumacetat, 1  $\mu$ l 100%iger Essigsäure, 10  $\mu$ l 0,1 M DTT, 82,4  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O) wurde die Hydrolyse beendet. Abschließend folgten eine erneute Präzipitation der RNA mit Ethanol und 3 M Natriumacetat (siehe 2.3.9.3), eine Resuspension der RNA-Sonden in 30  $\mu$ l 10 mM DTT und eine Szintillationsmessung (siehe 2.3.9.3).

### 2.2.9.5 Vorbereitungen zur Hybridisierung

#### 2.2.9.5.1 Beschichten von Objektträgern

Objektträger wurden für 5 h bei 250°C gebacken, um eine RNase-freie Oberfläche zu erhalten. Anschließend wurden sie 5 min in Aceton entfettet und 5 min in 2%igem Aminopropyltriethoxysilan (gelöst in Aceton(w/v)) beschichtet, bevor sie zweimal in Aceton und zweimal in DEPC-H<sub>2</sub>O gespült wurden. Über Nacht wurden die Objektträger bei 37°C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung staubfrei gelagert.

### **2.2.9.5.2 Silikonisieren der Deckgläschen**

Deckgläser wurden silikonisiert, um ein besseres Ablösen der Deckgläschen beim Posthybridisierungswaschen zu gewährleisten. Dazu wurden sie 20 min mit 0,2 M HCl behandelt, kurz in 100%igem (v/v) Ethanol entwässert und nach 15 minütiger Trocknung an der Luft 5 h bei 250°C gebacken. Anschließend wurden die abgekühlten Deckgläser in Silikon-Lösung getaucht und die Silikonbeschichtung für 2 h bei 110°C eingebrannt.

### **2.2.9.5.3 Präparation der Gewebe**

Die Herzgewebe wurden für die in-situ-Hybridisierung in 5 µm dicken Gefrierschnitten auf aminopropyltriethoxysilanbeschichtete Objektträger gebracht und für 3 min bei 70°C auf einer Heizplatte angetrocknet. Die Fixierung erfolgte mit 20 minütiger Behandlung in 4%igem Paraformaldehyd in 1×PBS (pH 7,0) und anschließendem jeweils 5 minütigem Waschen in 3x und 1×PBS. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 2 min in 30%-, 70%-, 90%-, 100%igem Ethanol (v/v)) wurden die Gewebsschnitte entwässert, eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und in luftdicht verschlossenen Kartellboxen mit entwässerndem, gekörnten CaCl<sub>2</sub> bei -80°C gelagert.

### **2.2.9.6 Prähybridisierung**

Die tiefgefrorenen Gewebeschnitte wurden verschlossen in den Kartellboxen 1 h aufgetaut. Nach Fixierung in 4%igem Paraformaldehyd (w/v) in 1×PBS für 5 min und kurzem Waschen in 1×PBS wurden die Schnitte zur Denaturierung basischer Proteine 20 min in 0,2 N HCl inkubiert. Nach zweimaliger Spülung in 1×PBS für 30 sec und 2 min wurde die Ziel-RNA durch Abbau von Proteinen mittels Pronase in 1×PBS (0,417 mg/Objektträger) zugänglich gemacht. Nach 8 min wurde diese Reaktion gestoppt durch Behandlung der Schnitte mit 0,1 M Glycin/1×PBS für 30 sec. Nach zweimaliger Spülung für je 30 sec in 1×PBS wurden die Schnitte abermals in 4%igem Paraformaldehyd (w/v) in 1×PBS für 20 min fixiert. Einer weiteren Spülung für 3 min in 1×PBS folgte die Acetylierung des Gewebes mit 0,1 M

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

### **2.2.9.7 Hybridisierung**

Für die Hybridisierung wurden pro Gewebeschnitt 5 µl Sondenmix (250.000 cpm <sup>35</sup>[S]-markierter RNA-Sonde gelöst in 2 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 0,5 µl 0,1 M DTT, 2,5 µl deionisiertes Formamid) für 30 sec bei 80°C inkubiert und mit 20 µl 50°C-warmem Hybridisierungsmix (10 µl deionisiertes Formamid, 2,5 µl 10×Salze (5 mM EDTA pH 8,0, 0,3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,8), 2 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl Hefe-tRNA(c:50mg/ml), 5 µl 50%iges Dextransulfate-Na-Salz (w/v), 0,025 µl 100×Denhardt's) vermengt, für 30 sec gevortext und direkt auf die Herzgewebe gegeben. Die Gewebeschnitte wurden mit silikonisierten Deckgläschen bedeckt und für 18 h bei 48°C in luftdichtverschlossenen Hybridisierungskammern auf befeuchtetem, zweilagigem Zellstoff (10 ml 50%iges Formamid (v/v)) hybridisiert.

### **2.2.9.8 Waschen nach Hybridisierung**

Die Gewebeschnitte wurden für 15 min in einer 50°C warmen Posthybridisierungswaschlösung (50%iges deionisiertes Formamid (v/v), 5 mM EDTA pH 8,0, 0,3 M NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,8, 10 mM DTT, 1xDenhardt's Lösung) gespült, wobei die silikonisierten Deckgläschen entfernt wurden. Danach wurde 4h in frischer Posthybridisierungswaschlösung bei 50°C unter leichtem Schütteln gewaschen. Anschließend wurde zweimalig mit 1xTES-Waschlösung pH 7,5 (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl) für je 15 min bei 37°C unter leichtem Schütteln gewaschen. Zum Abbau nicht-gebundener, einzelsträngiger RNA folgte eine Inkubation bei 37°C mit RNase A (0,02 mg/ml in 1xTES) für 30 min. Abermals wurden die Gewebeschnitte zweimal für 15 min bei 37°C in



1xTES gewaschen, gefolgt von 30 minütigem Waschen in 2xSSC (300mM NaCl, 34mM Na<sub>3</sub>-Citrat, pH 7,0) und 30 minütigem Waschen in 0,1xSSC (15mM NaCl, 1,7mM Na<sub>3</sub>-Citrat, pH 7,0) bei Raumtemperatur. Schließlich wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (je 20 sec in 30%-, 70%-, 90%-, 100%igem Ethanol (v/v)), wobei dem Alkohol 0,3 M Ammoniumacetat pH 7,5 zur Stabilisierung der Hybride beigesetzt wurde. Abschließend wurden die Schnitte über Nacht luftgetrocknet.

### **2.2.9.9 Beschichten der Objektträger mit Fotoemulsion**

42°C-warme G5 Fotoemulsion wurde 1:1 mit 0,6 M Ammoniumacetat versetzt. Die Objektträger wurden in absoluter Dunkelheit mit der flüssigen Emulsion durch kurzes Eintauchen beschichtet, 2 h getrocknet und lichtdicht verschlossen bei 4°C erschütterungsfrei gelagert. Die Expositionszeiten für die RNA-Sonden betrug für Kol I: eine, drei und vier Wochen; für Kol III, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  wurden Expositionszeiten von einer bis acht Wochen ausgetestet.

### **2.2.9.10 Entwicklung**

Die exponierten Schnitte wurden zum Entwickeln 3 min mit 50%igem Entwickler D19 behandelt, 1 min wurde die Entwicklung in 1%iger Essigsäure (v/v) gestoppt und 3 min in 25%iger Fixierer 3000 Lösung A (v/v) fixiert. Anschließend wurden die Schnitte 30 min in fließendem Leitungswasser gespült.

### **2.2.9.11 Gegenfärbung**

Zur Gegenfärbung wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte kurz in Aqua bidest. gespült, 1 min in filtriertem 1%igem Hämatoxylin (w/v) gefärbt und in Leitungswasser gespült. Die Schnitte wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 10 sec in 30%-, 70%-, 90%igem Ethanol (v/v)) entwässert, 10 sec in

alkoholischem Eosin (0,05%igem Phloxin B (w/v), 0,1%igem Eosin Y (w/v), 1%iger Essigsäure (v/v) in Ethanol) gefärbt und in absteigender Alkoholreihe wieder hydriert. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Kaiser's Glyceringelatine eingedeckelt.

## **2.3 Proteinchemische Methoden**

### **2.3.1 Protein-Extraktion mittels TRIZOL<sup>®</sup>**

Die aus der RNA-Extraktion verbliebenen Unter- und Interphasen (siehe 2.2.1.1) wurden für die Proteinextraktion verwendet. Nach Zugabe von 240 µl  $-20^{\circ}\text{C}$ -kaltem Ethanol und Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur wurde eine Zentrifugation bei 2.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 min durchgeführt. Der Überstand wurde weiterverarbeitet, und die Proteine wurden durch Zugabe von 1200 µl Isopropanol, Inkubation für 10 min und Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  gefällt. Der Überstand wurde nun verworfen und die verbliebenen Proteine dreimalig in einer 1,6 ml Lösung aus 0,3 M Guanidiniumhydrochlorid in 95% Ethanol (v/v) und einmalig in 2 ml 100%igem Ethanol gewaschen, jeweils mit anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min und 5 minütiger Zentrifugation bei 7.500 g und  $4^{\circ}\text{C}$ . Die gewaschenen Proteine wurden anschließend für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und nach Zugabe von Resuspensionspuffer (300 mM Tris-HCl, 5% Sucrose (w/v), 5% SDS (w/v), 0,25 mg/ml Pyronin G) bei  $50^{\circ}\text{C}$  und 1.000 rpm schüttelnd gelöst. Abschließend wurden alle nicht gelösten Teile durch Zentrifugation für 10 min bei 10.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  sedimentiert.

### **2.3.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford**

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde nach der Methode von Bradford<sup>148</sup> durchgeführt, bei der die Absorption von Proteinproben mit unbekannter Konzentration in einer Eichkurve an Proteinproben mit bekannter Konzentration relativiert wird.

Mit 5 µl jeder Probe wurde zunächst eine Chloroform-Methanol-Fällung durchgeführt, um Störungen durch das im Resuspensionspuffer enthaltene SDS zu vermeiden. Nacheinander

wurden zu jeder Proteinprobe 95 µl Aqua bidest., 100 µl Chloroform, 400 µl Methanol und 300 µl Aqua bidest. gegeben (nach jedem Schritt wurden die Proben gevortext) und der Ansatz durch Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm in 3 Phasen separiert. Die Oberphase wurde entfernt und 300 µl Methanol zu den verbliebenen Unter- und Interphasen gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm wurde der Überstand verworfen und die Proteine 15 min bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie in 20 µl 0,1 M NaOH gelöst wurden.

Als Eichproben wurde Albumin (Albumin, Bovine) der Konzentrationen 0 mg/ml, 0,28 mg/ml, 0,56 mg/ml, 0,84 mg/ml, 1,12 mg/ml und 1,4 mg/ml verwandt. Zu den 20 µl der Eich- und Messproben wurde jeweils 1 ml Coomassie-Blue-Färbelösung gegeben und in PS-Küvetten überführt. Die Absorption wurde dann photometrisch bei 595 nm gemessen.

### **2.3.3 WESTERN-Blot**

Beim WESTERN-Blot<sup>149</sup> werden immobilisierte Antigene mit Antikörpern detektiert. Nach erfolgter Inkubation der Blotmembran mit einem spezifischen Antikörper für das nachzuweisende Antigen folgt eine zweite Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der an den spezifischen Antikörper bindet. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert, so dass nach Reaktion mit einem chromophoren Substrat der autoradiographische Chemilumineszenznachweis der spezifischen Proteinbanden gelingt.

#### **2.3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)<sup>150</sup> dient der Auftrennung von Proteinen durch Wanderung geladener Moleküle im elektrischen Feld.

Durch die Zugabe des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die individuellen Ladungen der Proteine, die durch die Anzahl positiv und negativ geladener Aminosäuren bedingt sind, bei der SDS-PAGE maskiert. SDS ist negativ geladen, lagert sich den Proteinen

an und führt zu einer vollständigen Denaturierung. Die entstandenen Proteinkomplexe wandern somit im elektrischen Feld zur Anode und ihre elektrophoretische Beweglichkeit ist ausschließlich durch die Größe des Moleküls und die Porengröße der dreidimensionalen Gelmatrix bedingt.

Für den Nachweis von Kollagen Typ I wurden in dieser Arbeit 5 µg Protein je Spur in Elektrophoresepuffer (50 mM Tris, 400 mM Glycin, 0,1% SDS (w/v)) für 60 min bei 20 mA in einem 7,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Auf jedem Gel wurde eine antigenspezifische Positivkontrolle und ein Größenstandard (Full Range Rainbow Marker) mitgeführt.

### **2.3.3.2 Immunoblotting**

Das aufgetrennte Proteinmuster des Polyacrylamid-Gel wurde nach der Tankblot-Technik in kaltem Transferpuffer (125 mM Tris-HCl, 1 M Glycin, 20% Ethanol (v/v)) über Nacht bei 4°C auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach dem Transfer wurden zur Kontrolle des Blots die auf dem Gel verbliebenen Proteine für eine Stunde unter leichtem Schütteln in Coomassie-Blue-Lösung (8% Ammoniumsulfat (w/v), 2% Phosphorsäure (v/v), 0,8 mg/ml Coomassie G-250) gefärbt und anschließend in mehrfach wechselndem Aqua bidest. gewaschen.

Die PVDF-Membran wurde dann unter leichtem Schwenken für zwei Stunden in Blockierungslösung (5% Magermilchpulver (w/v) in 1×PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1000 ml H<sub>2</sub>O bidest, pH 7,4)) geblockt. Es folgte eine Inkubation mit dem antigenspezifischen Primärantikörper für 2h bei Raumtemperatur. Überschüssiger Primärantikörper wurde 30 min mit viermal wechselnder Waschlösung (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1000 ml H<sub>2</sub>O bidest, pH 7,4, 0,1% Tween 20 (v/v)) entfernt, bevor die Membran 2h mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert wurde. (Der Primärantikörper für Kol I wurde 1:100, der Sekundärantikörper 1:1000 in Waschlösung verdünnt.)

Nach erneutem Waschen wurde der Chemilumineszenz-Nachweis der gebundenen HRP mit ECL Plus nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Exposition eines Hyperfilms mit der Membran (für 10 sec bei Kollagen Typ I) in einer

Röntgenfilmkassette. Der belichtete Hyperfilm wurde vollautomatisch in einem Kodak RP X-OMAT entwickelt. Die Größe des detektierten Proteins konnte durch Vergleich mit dem Proteinstandard bestimmt werden.

## 2.4 Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse

Die Darstellung der beobachteten Ergebnisse erfolgte mit dem graphischen Mittel des Boxplots. Der Boxplot besteht aus einer Box, die vom ersten und dritten Perzentil (25. bzw. 75. Perzentil) begrenzt wird, und dessen innere Linie den Median repräsentiert, weiterhin werden größte und kleinste Werte markiert. Werte, die um mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen (Extremwerte), werden im Boxplot mit einem Stern markiert. Werte, die um mehr als anderthalb Kastenlängen außerhalb liegen, werden mit einem Kreis gekennzeichnet. Die im Text angegebenen Mittelwerte wurden als Quotient aus der Summe der Beobachtungen durch die Anzahl der Beobachtungen berechnet und zusammen mit der Standardabweichung als Maß für die Beurteilung der Streuung der Werte angegeben. Die Standardabweichung ließ sich aus der Wurzel des Quotienten der Summe der Fehlerquadrate dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen bestimmen.

Für die statistische Analyse der Daten wurden nichtparametrische Tests verwendet, da zum einen die Stichprobenumfänge nicht gleich waren, und zum anderen Tests auf Normalverteilung der Fehlerkomponenten und Tests auf Homogenität der Fehlervarianzen bei Gruppengrößen  $<10$  nicht sinnvoll zu berechnen sind<sup>151</sup>.

Mit dem H-Test nach Kruskal-Wallis wurde geprüft, ob die 6 Stichproben aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammen, wobei sich diese Verschiedenheit auf die Lageparameter (Mittelwerte) bezieht. Dabei wurde jede Variable (Kol I, Kol III, Herzfrequenz usw.) darauf getestet, ob die einzelnen Versuchsgruppen (1.1, 1.2, 2.3 usw.) insgesamt signifikant voneinander differieren. Bei  $p < 0,05$  konnte die Nullhypothese, Gleichheit zwischen den beobachteten Gruppen für eine Variable, verworfen werden.

Zeigte der H-Test eine signifikante Varianz zwischen den Versuchsgruppen, wurden Einzelvergleiche zur Prüfung signifikanter Zusammenhängen zwischen zwei unabhängigen Stichprobenverteilungen (Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen) mit Hilfe des U-Tests nach Mann-Whitney durchgeführt<sup>152</sup>. Dabei interessierten uns für jede Variable fünf

Einzelvergleiche, so dass eine  $\alpha$ -Adjustierung nach Bonferroni durchgeführt wurde, die das neue Signifikanzniveau auf  $p < 0,01$  festsetzte.

Für die statistische Auswertung der zwei Versuchsgruppen, die im Western Blot untersucht wurden, wurde einmalig ein U-Test nach Mann-Whitney durchgeführt und das Signifikanzniveau dabei nicht adjustiert ( $p < 0,05$  gilt als signifikant).

## 2.5 Eingesetzte Arbeitsmittel

Für die Bearbeitung der Aufgabenstellung wurden die nachfolgend aufgelisteten Arbeitsgeräte, Verbrauchsartikel und Chemikalien eingesetzt:

Arbeitsgerät	Bezeichnung	Bezug
250°C Ofen		Heraeus
Autoklaviergerät		Hartmann
Betriebssystem	Windows 2000 Professional	Microsoft
Blot-Kammer	Mini Trans Blot	Bio-Rad
Brutschrank	Function Line (ISH)	Heraeus
Brutschrank 37°C		Heraeus
Computer	Pentium III	Asus
Digitaler Grafikdrucker	Digital Graphic Printer UP-D890	Biometra
Entwicklungsmaschine	Kodak Diagnostik Imaging Kodak RP X-OMAT Processor Model M6B	Kodak
Eismaschine	AF-10	Scotsman
Elektronische Waage	DMS 580	Kern
Elektrophoresekammer	Mini-Protean <sup>®</sup> 3 Cell	Bio-Rad
Gellaufkammer		Biometra
Gelschlitten		UKBF

Homogenisiergerät	Pellet Pestle Motor	Sigma
Kühlschrank -20°C	economic super	Bosch
Kühlschrank -20°C/4°C	Electronic (ISH)	Bosch
Kühlschrank 4°C	cooler	Bosch
Kühlschrank -80°C	-85°C Ultralow Freezer	Nuaire
Kühlschrank -80°C	(ISH)	GFL
Magnetrühr- und Erwärmungsplatte	Ikamag RCT	IKA-Labortechnik
Mikrowelle	Microwave 800	Severin
Netzgerät	Standard Power Pack P25	Biometra
PCR-Maschine	Mastercycler gradient	Eppendorf
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick
Photometer	Spectrophotometer DU 640i	Beckman
Pipetten	Reference	Eppendorf
Polarisationsmikroskop	Eclipse E 600 Pol	Nikon
Präzisionswaage		Sartorius
Röntgenfilmkassette	Hypercassette™	Amersham
Schneidemaschine	CM 3000	Jung
Schüttler	Swip	Edmund Bühler
Schüttler	3015 (ISH)	GFL
Szintillationsmessgerät	LS 1701 (ISH)	Beckman
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Superspeed RC-2B	Sorval
UV-Transilluminator	Bio Doc Analyse System	Biometra
Vakuumrotationsverdampfer	Univapo 150 H	Uniequip
Vortexgerät	VF 2	IKA-Labortechnik
Wasserbad		GFL
Wasserbad	(ISH)	GFL
Zentrifuge	Megafuge 1.OR	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge 13R (ISH)	Heraeus

Verbrauchsartikel	Bezeichnung/Besonderheiten	Bezug
0,2 ml Reaktionsgefäße		Biozym
0,5 ml Reaktionsgefäße	RNAse-frei	Eppendorf
0,5 ml Reaktionsgefäße	Safe-Lock	
1,5 ml Reaktionsgefäße	RNAse-frei	Eppendorf
1,5 ml Reaktionsgefäße	Safe-Lock	
15 ml Reaktionsgefäße	Falcon tubes	Sarstedt
50 ml Reaktionsgefäße	Falcon tubes	Sarstedt
Deckgläschen	21 x 26 mm	Menzel-Gläser
Einmalhandschuhe		Ansell Medical
Homogenisierstäbe	Pellet Pestles	Sigma
Hybridisierungskammern		UKBF
Hyperfilm	ECL	Amersham
Kartellboxen		Brand
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel-Gläser
Petrischalen	94 × 16 mm	Grainer bio-one
Photopapier	K 65 HM-CE	Mitsubishi
Pipettenspitzen 10,100,1000 µl	unsteril	Eppendorf
Pipettenspitzen 10,100,1000 µl	mit Filtertip, RNAse-frei	Biozym Diagnostik
Polyacrylamidgel	7,5% Tris-HCl-Gel	Bio-Rad
PS-Küvetten	Proteinbestimmung	Brand
PVDF-Membran	for Protein Blotting	Bio-Rad
Reaktionsgefäße zur Gelelution	Ultrafree DA Tubes	Amicon
Zentrifugationsgefäße	Polypropylen Oak Ridge Bottle	Sorval



Abkürzung/Formel/Name (so im Text verwendet)	Erläuterung/vollständiger Name	Bezug
100×Denhardt`s Solution		Eppendorf
Aceton	pro analysi	Merck
Agarose	SeaKem LE Agarose	BioWhittaker Molecular Applications
Albumin, Bovine		Sigma
Ammoniumacetat		Merck
Ammoniumsulfat		Serva
Ampicillin trihydrat	Antibiotikum	Serva
Ampli-Taq	DNA-Polymerase	Perkin Elmar
antigenspezifischer Primärantikörper für Kol I	Anti-Collagen, Type I, Fetal Mouse	Calbiochem
Apa I	Restriktionsenzym	Roche
APES	Aminopropyltriethoxysilan	Sigma
Aqua bidest.	Aqua Spüllösung	Delta Pharma
Bacto <sup>®</sup> Agar		Difco
Biotherm Taq-Polymerase	DNA-Polymerase	Rapidozym
Borsäure	für die Molekularbiologie	Merck
Bromphenolblau		Sigma
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid	Merck
Chloroform		Merck
Coomassie-Blue-Färbelösung	Coomassie <sup>®</sup> Brilliantblau G 250	Merck
D(+)-Glucose	Wasserfrei	Merck
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Sigma
DEPC-treated water	RNAse- freies Wasser	Ambion
Dextransulfate-Na-Salz		Merck
DH5α	kompetente Zellen	Gibco BRL
Dinatriumhydrogenphosphat Natriumdihydrogenphosphat	beide zur Herstellung von NaPO <sub>4</sub> pH 6,8 (ISH)	Merck

DNase I	RNase- frei	Roche
dNTP`s	ATP,GTP,CTP,TTP	AB-Gene
dNTP`s	rATP,rCTP,rGTP (ISH)	Pharmacia
DSMO	Dimethylsulfoxid	Merck
DTT	Dithiothreitol	Promega
DTT (fest)	1,4Dithiothreitol	Biomol
ECL Plus		Amersham
ECO RI	Restriktionsenzym	Roche
EDTA als Dihydrat	Ethylendiaminetetracetic acid	Merck
Entwickler D19		Kodak
Eosin Y		Sigma
Essigsäure	pro analysi	Merck
Essigsäureanhydrid	pro analysi	Merck
Ethanol absolut	pro analysi	Merck
Ethidiumbromid		Merck
Fixierer 3000 Lösung A		Kodak
Formamid		Merck
Full Range Rainbow Marker	Proteingrößenstandard	Amersham
G5 Fotoemulsion		Ilford
Glycin		Serva
Guanidiniumhydrochlorid		Merck
Hämatoxylin		Merck
HCl	Salzsäure	Merck
Hind III	Restriktionsenzym	Roche
HRP-konjugierter Sekundäntikörper	Schein&Kaninchen Ig HRP	Dako
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Sigma
Isopropanol	= 2-Propanol	Merck
Jet-Star 2,0 Maxi Prep Kit	Maxi-Präparation	Genomed

Kaiser's Glyceringelatine		Merck
KCl	Kaliumchlorid	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kol I Positivkontrolle	HS 68 (für Western Blot)	Santa Cruz
KSP I	Restriktionsenzym	Roche
Lamda DNA/EcoRI+HindIII Marker	DNA-Längenstandard	Fermentas
Magermilchpulver	Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad
Magnesiumchlorid-Hexahydrat		Merck
Marker VIII	DNA-Längenstandard	Roche
Methanol		J.T.Baker
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Na <sub>3</sub> -Citrat	Trinatriumcitrat-dihydrat	Merck
NaAc	Natriumacetat	Merck
NaCl	Natriumchlorid	Merck
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen	NaOH-Herstellung	Merck
Nco I	Restriktionsenzym	Roche
NDE I	Restriktionsenzym	Roche
Paraformaldehyd		Merck
PCV B3-Typ	Positivkontrolle für CB3V-Nachweis	Prof. R. Kandolf, Institut für Pathologie, Universitätskrankenhaus Tübingen
PFA	Paraformaldehyd	Merck
PGEM T Vector System I	inkl. Ligase	Promega
Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol	im Verhältnis 25:24:1	Gibco BRL
Phloxin B		Merck

Pouceau S		Merck
Primer	siehe Kapitel 2.3.2	Tib Molbiol
Pronase	Proteinase	Boehringer
Pyronin G		Merck
Reverse Transcription System	inkl.: AMV Reverse Transkriptase, RNAsin, Oligo(dT) <sub>15</sub> Primer, 10mM dNTP's, Reaktionspuffer, 25mM MgCl <sub>2</sub> , Random Primer	Promega
RNase A		Roche
RNase Zap	zur RNase Neutralisierung	Ambion
RNasin	RNase-Inhibitor	Promega
RQ1 RNase-free DNase	(ISH)	Promega
S <sup>35</sup> α-UTP	(ISH)	NEN
Sac I	Restriktionsenzym	Roche
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sodium Lauryl Sulfate	Sigma
Silicone Lösung		Serva
SP6 RNA Polymerase	inkl. Reaktionspuffer	Gibco BRL
Sucrose		Sigma
Szinti-Lösung		Beckman
T7 RNA Polymerase	inkl. Reaktionspuffer	Gibco BRL
Tissue TEK <sup>®</sup>	zur Gewebeeinbettung	Sakura
Trichloressigsäure		Merck
Triethanolamin		Sigma
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid	Merck
TRISMA Hydrochlorid	beide zur Herstellung von	Sigma
TRISMA Base	Tris pH 7,5 (ISH)	
Trizol LS Reagent	zur Gewebeextraktion	Gibco BRL
Tryptone Peptone		Difco
Tween	Tween <sup>®</sup> 20	Aldrich

X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galactoside	Gibco BRL
Yeast Extract	Hefeextrakt	Difco
Yeast tRNA	Hefe tRNA	Gibco BRL

## 2.6 Tierversuchsantrag

Alle Tierversuche wurden entsprechend den gesetzlichen Richtlinien von 1993 angemeldet und entsprechend der Genehmigung durchgeführt. Die Genehmigung wurde gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes mit der Genehmigungsnummer G 0164/01 erteilt.