

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. MATERIAL

4.1.1. Reagenzien

4.1.1.1. Substanzen

Substanz	Firma
2-Mercapto-Ethanol, 98+%, 25ml, #MI-3148	Sigma Chemical Company, Saint Louis/Missouri/USA
6-Aminohexansäure, 98%, 100g, #A4-460-6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acrylamid/Bis-Solution, 30% (29:1, 3.3%C), 500ml, #161-0156	Biorad Laboratories, Hercules/ CA/USA
Algecid II Special Biocide, 1000ml, #13160 595-0056	AGFA-Gevaert AG, Leverkusen
Ammoniumpersulfat (APS), 250g, #13375	Serva Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidel- berg
Ampuwa, 10l	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Bromphenol Blue (3',3'',5',5''-Tetrabromolphenolsulphonphtha- lein), No. B-0126	Sigma Chemical Company, Saint Louis/Missouri/USA
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 500g, #1.02382.0500	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform (CHCl_3), 99.9+% (biotech quality), 1000ml, #49-618-9 [67-66-3], stabilized with 0.5-1% ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue R-250, 10g, #161-04606, work order-No. L1610406 REV E	Biorad Laboratories, Hercules/ CA/USA
DEPC- H_2O (RNase-free water), 1.1ml, Mat.-No. 1008200	Qiagen GmbH, Hilden
Developer A (for medical x-ray film processing), 1000ml, G153A, REF HT536, D09-287901 5099	AGFA-Gevaert AG, Leverkusen
Developer B (for medical x-ray film processing), 250ml, G153B, REF HT 536, L10-305701 05801	AGFA-Gevaert AG, Leverkusen
Dimethylarsenige Säure (Cacodylische Säure), 10g, approx. 98%, #0250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), 500g, #1.06586.0500	Merck KGaA, Darmstadt
DNase I (RNA-free, from bovine pancreas), 10U/ μl , 10000U, #0776785	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
ECL Western Blotting Detection Reagents, RPN2106	Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire/UK
Eisessig (Essigsäure 100%), 1000ml, #1.000 63.1011	Merck KGaA, Darmstadt
Entellan (Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie), #107961	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure, 90-100%, 2.5l, #8.18755.2500	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Ethanol (absolut), 2.5l, #1.009 83.2511	Merck KGaA, Darmstadt

KAPITEL 4 – MATERIAL UND METHODEN

Formaldehyd (HCHO) für die Histologie, 37Gew.-%-Lösung in Wasser, 500ml, #53-399-8 [50-00-0]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Gelatine Type B (from Bovine Skin), 100g, approx. 225 Bloom, G 9391	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol, 99+%, 100ml, #5516	Sigma Chemical Company, Saint Louis/Missouri/USA
Glycin, 1kg, #1.04201.1000	Merck KGaA, Darmstadt
High Molecular Weight Range Marker (36kDa-205kDa), Product-No. 143788	Sigma Chemical Company, Saint Louis/Missouri/USA
Isopropanol (2-Propanol, Isopropylalkohol, (CH ₃) ₂ CHOH) für die Histologie, 99%, 1000ml, #53-402-1 [67-63-0],	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl), 1kg, #1.04936.1000	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄), 250g, #1.04873.0250	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH), 85%, 1kg, in Schuppen, #7986.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Low Molecular Weight Range Marker (6.5kDa-66kDa), Product-No. 143913	Sigma Chemical Company, Saint Louis/Missouri/USA
Methanol, 2.5l, #1.06009.2500	Merck KGaA, Darmstadt
MMP-Control-1, Product-No. M2928	Sigma Chemical Company, Saint Louis/Missouri/USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, 1,2-Bis[dimethyl-amino]ethan), 100ml, #87689	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Natriumazid (NaN ₃), [26628-22-8], 99%: 19993-1/ 99.99+%: 43845-6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl), >99.9%, 10kg, Art.Nr. 9265.3	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH), 500g, Plättchen, #1.06498.0500	Merck KGaA, Darmstadt
Omniscript RT Kit 50 (200 U: Omniscript RT (4U/μl), dNTP-Mix (5mM), 10x Buffer RT, DEPC-H ₂ O), #205111	Qiagen GmbH, Hilden
PCR Reaction Buffer (10x conc.), 1000μl, #1271318	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
peqGOLD RNA-Pure, 200ml, Bestell-Nr. 30-1020	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pikrinsäure (2,4,6-Trinitrophenol(O ₂ N) ₃ C ₆ H ₂ OH), 99+% (bez. auf Trockensubstanz), 50g, #23-980-1 [88-89-1]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Poinceau Red-Solution (for Electrophoresis) (0.2% in 3% TCA), 500ml, #33427	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Primer Random p[dN] ₆ , 50x, A260-units (2mg, 1μmol), #1034731	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rapid Fixer (for medical x-ray film processing), 500ml, G354, REF 2828Q, L03-218901 01558	AGFA-Gevaert AG, Leverkusen
Reagent A for BIORAD Dc Protein Assay, 250ml, #500-0113	Biorad Laboratories, Hercules/CA/USA
Reagent B for BIORAD Dc Protein Assay Reagent B, 1000ml, #500-0114	Biorad Laboratories, Hercules/CA/USA

RNasin Ribonuclease Inhibitor, 40U/μl, 10000U, #N2115	Promega GmbH, Mannheim
Saccharose (für biochemische Zwecke), 1kg, #1.07687.1000	Merck KGaA, Darmstadt
Sirius Red C.I. (Direkt Rot 80), 5g, λ_{max} 528nm, #35780 [2610-10-8], Product-No. 09400	Polyscience Inc., Warrington/UK
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS), 1kg, #20760	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
SYBR Green PCR Master Mix, Product-No. 4309155	Applied Biosystems, Warrington/UK
Tris[hydroxymethyl]aminomethan (TRIS, TRIZMA-Base), 1kg, T-1503, EC-No.201-064-4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris[hydroxymethyl]aminomethanhydrochlorid (TRIS/HCl, TRIZMA-Hydrochloride), 1kg, T-3253, EC-No. 214-684-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRITON X-100 Sigma Ultra, 1000ml, #T9284	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TWEEN 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate), 500ml, [9005-64-5], P-7949	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Western Blocking Reagent, 100ml, #1921673	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Xylol (Isomerengemisch) für die Histologie, 500ml, #53-405-6 [1330-20-7]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Zinkchlorid (ZnCl ₂), 250g, #1.08816. 0250	Merck KGaA, Darmstadt

Tab. 2: Substanzen

4.1.1.2. Antikörper für Western Blot

Antikörper	Charakteristika	Firma
anti-MMP-1 (AB-1, #IM35L)	Interstitielle Kollagenase; latente Bande: 57/52kDa, aktive Bande: 46/42kDa; Ursprung: Maus; Klon: 41-1E5; Isotyp: mouse monoclonal IgG2aK, Epitop: AS 332-350 von MMP-1(human); Spezies-Reaktivität: Mensch; 2. AK: Goat-anti-mouse	Calbiochem, Bad Soden
anti-MMP-13 (AB-7, #IM81)	Kollagenase 3; latente Bande: 60kDa, aktive Bande: 48kDa; Ursprung: Maus; Klon: LIPCO IID1; Isotyp: mouse monoclonal IgG1; Spezies-Reaktivität: Ratte, Maus; 2. AK: Goat-anti-mouse	Calbiochem, Bad Soden

anti-TIMP-1 (AB-1, #IM32L)	EPA/Kollagenase-Inhibitor; 28kDa-Glykoprotein; Ursprung: Maus; Klon: 7-601; Isotyp: mouse monoclonal IgG1K, Spezies-Reaktivität: Mensch, Maus; 2. AK: Goat-anti-mouse	Calbiochem, Bad Soden
anti-TIMP-2 (AB-2, #IM11L)	CSC-21K; 21kDa-Glykoprotein; Ursprung: Maus; Klon: 67-4H11; Isotyp: mouse monoclonal IgG1; Epitop: AS 178-193 von TIMP-2 (human); Spezies-Reaktivität: Mensch, Maus, Ratte u.a.; 2. AK: Goat-anti-mouse	Calbiochem, Bad Soden
anti-TIMP-4 (#AB816)	TIMP-4 (unglycosyliert): 23kDa; TIMP-4 (glycosyliert): 29kDa; Ursprung: Kaninchen; Isotyp: polyclonal; 2. AK: Goat-anti- rabbit	Chemicon International, Temecula/CA/USA
anti-Calsequestrin (#PA1-913)	Isoformen: Herzmuskel, Skelett- muskel; aufgereinigtes Calse- questrin: 55kDa; Calsequestrin- ähnliche Proteine: 97kDa; Ursprung: Kaninchen; Spezies- Reaktivität: Kaninchen, Mensch, Maus, Ratte; 2. AK: Goat-anti- rabbit	Dianova, Hamburg
Goat-anti-mouse (anti-mouse- IgG peroxidase conjugate) (#A5278)	Ursprung: Ziege; Konjugat: goat-anti-mouse-IgG + Sigma Horseradish Peroxidase Type VI (# P8375)	Chemicon International, Hofheim
Goat-anti-rabbit (anti-rabbit-IgG peroxidase conjugate) (#A9169)	Ursprung: Ziege; Konjugat: goat-anti-rabbit-IgG + Sigma Horseradish Peroxidase Type VI (# P8375)	Chemicon International, Hofheim

Tab. 3: Antikörper

4.1.1.3. Primer für quantitative Real Time PCR

Primer		Charakteristika	5'-3'-Primer-Sequenz
COL1 (Pro(α_2)- Collagen TypI)	FP	FP-m-cl-2-mRNA X58251, 12729 DE 233-56066, MG: 6974, B: 23	GTAAACACCCCAGCGAAGAACTC
	RP	RP-m-cl-2-mRNA X58251, 12729 DE 233-56067, MG : 5715, B: 19	TCAAACCTGGCTGCCACCAT

COL3 (Pro(α_1)- Collagen TypIII)	FP	COL3A1MI8933mu X52046, 14713 D149-65128, MG: 6395, B: 21	ACCCAGAGATCCCATTGGAG
	RP	COL3A1MI8933mu X52046, 14713 D149-65127, MG: 6249, B: 20	AGGAAGCACAGGAGCAGGTG
GAPDH	FP	GAPDH-TM_sense M32599, 776171 26-3339-1/2, B: 21	CCTGGACCACCCAGCCCAGCA
	RP	GAPDH-TM_antisense M32599, 776171 26-3339-2/2, B: 21	TGTTATGGGGTCTGGGATGGA
MMP-13	FP	FPmus.coll. X66473, 12729 DE 233-56064, MG: 6384, B: 21	AGAGGGTCTTCCCCGTGTTCT
	RP	RPmus.coll. X66473, 12729 DE 233-56065, MG: 7679, B: 25	GGCTCTGAATGGTTATGACATTCTG
ANF	FP	ANF K02781mus-51, 14713 D149-65126, MG: 6542, B: 21	AGAGTGGGCAGAGACAGCAAA
	RP	ANF K02781mus-57, 14713 D149-51125, MG: 5869, B: 19	ATGGAGAAGGAGCCCATGC

Tab. 4 : Primer

Primer-Verdünnungen

Primer		Ausgangs-Konzentration	Primer-Verdünnungen	Reaktions-Konzentration
ANF	FP	10pmol/ μ l	50 μ l FP + 50 μ l Ampuwa	5 μ mol/l
	RP	7pmol/ μ l	71.4 μ l RP + 28.6 μ l Ampuwa	5 μ mol/l
COL1	FP	7pmol/ μ l	71.4 μ l FP + 28.6 μ l Ampuwa	5 μ mol/l
	RP	9pmol/ μ l	55.5 μ l RP + 44.5 μ l Ampuwa	5 μ mol/l
COL3	FP	6pmol/ μ l	83.3 μ l FP + 16.7 μ l Ampuwa	5 μ mol/l
	RP	8pmol/ μ l	62.5 μ l RP + 37.5 μ l Ampuwa	5 μ mol/l
GAPDH	FP	100pmol/ μ l	25 μ l FP + 75 μ l Ampuwa	25 μ mol/l
	RP	100pmol/ μ l	25 μ l RP + 75 μ l Ampuwa	25 μ mol/l
MMP-13	FP	9pmol/ μ l	55.5 μ l FP + 44.5 μ l Ampuwa	5 μ mol/l
	RP	9pmol/ μ l	55.5 μ l RP + 44.5 μ l Ampuwa	5 μ mol/l

Tab. 5: Primer-Verdünnungen

4.1.2. Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Anoden-Lösung I (1000ml)	TRIS (300mmol/l): 36.3g, Methanol: 200ml, mit Aqua dest. ad 1000ml
Anoden-Lösung II (1000ml)	TRIS (25mmol/l): 3.03g, Methanol: 200ml, mit Aqua dest. ad 1000ml
Blocking Solution (50ml, 10%ig)	Western Blocking Reagent: 5ml, 1xPBS: 45ml
Coomassie-Lösung (1000ml)	Coomassie Blue R-250: 1g, Ethanol: 100ml, Eisessig: 50ml, mit Aqua dest. ad 1000ml

Elektrophorese-Puffer (10x, 5l)	TRIS: 151.5g, Glycin: 720g, SDS: 50g, mit Aqua dest. ad 5l
Entfärbe-Lösung (1000ml)	Ethanol: 100ml (10%ig), Eisessig: 70ml (7%ig), mit Aqua dest. ad 1000ml
Entwickler-Lösung (2.5l)	Aqua dest.: 1.25l, Developer A: 1l, Developer B: 0.25l
Extraktionspuffer (500ml)	Dimethylarsenige Säure (10mM): 0.8g, NaCl (150mM): 4.4g, ZnCl ₂ (1μM): 68.2μg, CaCl ₂ 2H ₂ O (20mM): 1.47g, NaN ₃ (1,5mM): 48.8mg, TRITON X-100 (0.01%ig): 50μl, mit Aqua dest. ad 500ml, mit HCl pH 5.0
Fixierer-Lösung (2.5l)	Aqua dest.: 2l, Rapid Fixer: 0.5l
Gelatine-Lösung (100ml, 3mg/ml)	Gelatine: 300mg, Aqua dest.: 100ml
Kathoden-Lösung (1000ml)	6-Aminohexansäure (40mmol/l): 5.3g, 10% SDS: 1ml, Methanol: 200ml, mit Aqua dest. ad 1000ml
Lauf-Puffer (Western Blot) (pH 8.8, 500ml)	TRIS: 90.75g, mit HCl[conc] pH 8.8, mit Aqua dest. ad 500ml
Lauf-Puffer (Zymographie) (pH 8.8, 200ml)	TRIS (1.5M): 36.3g, SDS (4%ig): 8g, mit HCl[conc.] pH 8.8, mit Aqua dest. ad 200ml
Ladepuffer (Zymographie) (10ml)	Bromphenol Blue: Spatelspitze, SDS: 1g, Saccharose: 0.4g, mit Aqua dest. ad 10ml
PBS (1x, 1000ml)	NaCl: 8g, KCl: 0.2g, KH ₂ PO ₄ : 0.24g, Na ₂ HPO ₄ : 1.44g, mit KOH pH 7.4, mit Aqua dest. ad 1000ml
PBS/TWEEN (1x, 1000ml)	1xPBS: 1000ml, TWEEN 20: 50μl
Pikrinsäure-Lösung (pH 2, 1.2%ig)	AMPUWA: 32ml, gesättigte wässrige Pikrinsäure (1.2%ig): 12g Pikrinsäure, AMPUWA ad 1000ml): 500ml, mit 10N NaOH pH 2
Proben-Puffer	Bromphenol Blue: Spatelspitze, Stacking Gel Buffer: 2.5ml, 10% SDS: 2ml, AMPUWA: 3ml, Glycerol: 2ml
Sammel-Puffer (Western Blot) (pH 6.8, 200ml)	TRIS: 12g, mit HCl[conc.] pH 6.8, mit Aqua dest. ad 200ml
Sammel-Puffer (Zymographie) (pH 6.8, 200ml)	TRIS (0.5M): 12g, SDS (0.4%): 0.8g, mit HCl[conc.] pH 6.8, mit Aqua dest. ad 200ml
Sirius Red-Lösung	Sirius Red: 0.5g, Pikrinsäure-Lösung (pH 2, 1.2%ig): 500ml
Stacking Gel Buffer (50ml)	TRIS: 3.03g, 10% SDS: 2ml, mit HCl pH 6.8, mit AMPUWA ad 50ml
Stripping Buffer (500ml)	TRIS/HCl: 4.9g, SDS (10%ig): 50g, mit Aqua dest. ad 500ml, Mer-capto-Ethanol: 3.6ml, mit HCl pH 6.7
Substrat-Puffer (pH 8.0, 1000ml)	TRIS (50mM): 6.06g, CaCl ₂ (5mM): 0.735g, mit HCl[conc] pH 8.0, mit Aqua dest. ad 1000ml
TRITON X-100-Lösung (1000ml, 2.5%ig)	TRITON X-100: 25ml, mit Aqua dest. ad 1000ml

Tab. 6: Lösungen

4.1.3. SDS-Polyacrylamid-Gele für Western Blot und Zymographie

SDS-Polyacrylamid-Gele	Zusammensetzung
SDS-Polyacrylamid-Gel (Zymographie)	- Sammel-Gel: 30% Acrylamid/Bis-Solution: 2ml, Sammel-Puffer (Zymographie): 2.5ml, Aqua dest.: 5.5ml, 10% APS: 100µl, TEMED: 5µl - Lauf-Gel: 30% Acrylamid/Bis-Solution: 9.32ml, Lauf-Puffer (Zymographie): 7ml, Gelatine-Lösung: 9.32ml, Aqua dest.: 2ml, 10% APS: 280µl, TEMED: 14µl
SDS-Polyacrylamid-Gel 10%ig (Western-Blot) (Proteine: 30-80kDa)	- Sammel-Gel: 30% Acrylamid/Bis-Solution: 2ml, Sammel-Puffer: 2.5ml, 10% SDS: 100µl, 10% APS: 50µl, TEMED: 10µl - Lauf-Gel: 30% Acrylamid/Bis-Solution: 10ml, Lauf-Puffer (Western Blot): 7.5ml, 10% SDS: 300µl, Aqua dest. 12ml, 10% APS: 150µl, TEMED: 10µl
SDS-Polyacrylamid-Gel 12%ig (Western-Blot) (Proteine: <30kDa)	- Sammel-Gel: 30% Acrylamid/Bis-Solution: 2ml, Sammel-Puffer: 2.5ml, 10% SDS: 100µl, 10% APS: 50µl, TEMED: 10µl - Lauf-Gel: 30% Acrylamid/Bis-Solution: 12ml, Lauf-Puffer (Western Blot): 7.5ml, 10% SDS: 300µl, Aqua dest. 10ml, 10% APS: 150µl, TEMED: 10µl

Tab. 7: SDS-Polyacrylamid-Gele

4.1.4. Murine Myokardproben

Zur Charakterisierung des Einflusses des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf das kardiale extrazelluläre Matrix-Remodeling wurden in Abhängigkeit von einer pharmakologischen Vorbehandlung Untersuchungen an linksventrikulärem Myokard TGF β_1 -überexprimierender Alb/TGF β_1 (Cys^{223,225}Ser)-transgener Mäuse vs. nicht-transgener Tiere durchgeführt.

Alle Tierversuche erfolgten unter Berücksichtigung der „NIH and Institutional Animal Care“-Richtlinien unter standardisierten Bedingungen in Kooperation mit der Klinik für Innere Medizin III der Universität zu Köln. Die murinen Myokardproben wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von PD Dr. S. Rosenkranz (Universität zu Köln) in Form von tiefgefrorenen vollständigen Herzen zur Verfügung gestellt.

Insgesamt wurde linksventrikuläres Myokardgewebe von 40 Mäusen untersucht, die zuvor in 5 Gruppen zu je 8 Tieren eingeteilt worden waren: unbehandelte nicht-transgene Mäuse (Wildtypen, WT), unbehandelte transgene Mäuse (Kontrollen, TG), transgene Mäuse nach Behandlung mit einem β_1 -selektiven Adrenozeptor-Antagonisten (Metoprolol; TG+METO), transgene Mäuse nach Behandlung mit einem AT $_1$ -Rezeptor-Antagonisten

(Telmisartan; TG+TELM), transgene Mäuse nach Behandlung mit einem spezifischen TGF β_1 -Rezeptor-Antagonisten (sTGF β_1 -R-Ab-Fc; TG+sTGF β_1 -RA).

Die pharmakologische Vorbehandlung wurde nach dem Absetzen der Tiere in der 3. Lebenswoche über einen Zeitraum von 6 Wochen durchgeführt. Die Applikation von Metoprolol und Telmisartan erfolgte per os über das Trinkwasser (2mg Metoprolol/ml bzw. 0.06mg Telmisartan/ml entsprechend einer in vivo-Konzentration von 350mg Metoprolol/kg KG bzw. von 10mg Telmisartan/kg KG). Der lösliche spezifische TGF β_1 -Rezeptor-Antagonist wurde parenteral durch intraperitoneale Injektion (1mg sTGF β_1 -R-Ab-Fc/kg KG jeden 2. Tag) verabreicht.

Das Alb/TGF β_1 (Cys^{223,225}Ser)-transgene Maus-Modell wurde von Dr. N. Sanderson und Dr. S. S. Thorgeirsson (National Cancer Institute, NIH, Bethesda/MD/USA) entwickelt und freundlicherweise für unsere Untersuchungen zur Verfügung gestellt (Sanderson N et al., 1995).

Beim Alb/TGF β_1 (Cys^{223,225}Ser)-Transgen handelt es sich um ein 4.7kBp-Fusionsgen bestehend aus den regulatorischen Elementen des murinen Albumin-Gens (Enhancer und Promotor), einem modifizierten Schweine-TGF β_1 -cDNA-Fragment (1.5kBp) und der 3'-Region des humanen Wachstumshormon-Gens (625Bp). Zur Modifikation des porcinen TGF β_1 -cDNA-Fragmentes wurde vor der Insertion in das Fusionsgen an den Positionen 223 und 225 der Aminosäuren-Sequenz (Pro-Region der inaktiven Prä-Pro-Form von TGF β_1) jeweils Cystein durch Serin substituiert, woraus eine bevorzugte Sekretion der aktiven Form von TGF β_1 resultiert (Samuel SK et al., 1992). Das Fusionsgen wurde durch Mikroinjektion in befruchtete Eizellen von F1-Mäusen (C57BL/6J x CBA; Jackson Laboratories, Bar Harbor/ME/USA) eingebracht.

Transgene Mäuse aus Linie 25 weisen phänotypisch neben der höchsten Transgen-Expressionsrate in der Leber mehr als 10-fach erhöhte TGF β_1 -Konzentrationen im Plasma sowie 7-fach erhöhte TGF β_1 -Konzentrationen im Myokard (Seeland U et al., 2002) gegenüber gleichaltrigen Kontrollmäusen auf.

4.2. METHODEN

4.2.1. Präparation der murinen Myokardproben

Sämtliche Präparationsschritte wurden (falls nicht speziell angegeben) zur Wahrung der Protein- und Nukleinsäureintegrität auf Eis oder bei 4°C unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

4.2.1.1. Gewebepräparation

Die tiefgefrorenen vollständigen Herzen wurden in einer sterilen Zellkulturschale (Zellkulturschale, 94 x 16mm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit gekühltem 1xPBS gespült und in einer Wägeschale (Rotilabo-Einmal-Wägeschale, 41x41x8mm, Carl Roth

GmbH & Co.KG, Karlsruhe) auf der Analysenwaage (Kern, Modell 770-12, Laborgerätehandel M. Schroeder & A. Henke GbR, Wiesloch) zur Bestimmung des Herzgewichtes abgewogen. Atrien, Auriculae und eventuell vorhandenes epikardiales Fettgewebe wurden mit dem Skalpell abgetrennt und verworfen. Bei jeweils 3 Herzen pro Gruppe wurde ventrikuläres Gewebe zur histochemischen Aufbereitung mittels Sirius Red Färbung in Formalin asserviert. Bei allen Herzen wurde der Ventrikelabschnitt mit dem Skalpell in einen rechtsventrikulären und einen linksventrikulären Anteil separiert. Der linksventrikuläre Anteil wurde erneut geteilt in eine Fraktion zur Homogenat-Präparation (⇒ Proteine) und eine Fraktion zur Nukleinsäure-Präparation (⇒ RNA). Alle Proben wurden in Reaktionsröhrchen (Eppendorfgefäße) (Reaktionsgefäß, 1.5ml, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) eingefroren und bei -20°C gelagert.

4.2.1.2. Homogenatpräparation für Western Blot und Zymographie

Um für die Homogenatpräparation gleiche Verdünnungen zu erhalten, wurde zunächst das für die Aufbereitung erforderliche Volumen des Extraktionspuffers berechnet (Formel: Volumen des Extraktionspuffers [µl] = 5 x Herzgewicht [mg] x [µl/mg]).

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und anschließend in einem Glas-Teflon-Potter (Potter Type 853202, B. Braun Melsungen AG) bei 4°C und 900U/min unter Zugabe des entsprechenden Volumens des Extraktionspuffers homogenisiert. Die Homogenate wurden in Eppendorfgefäße pipettiert und über Nacht (min. 12h) bei 4°C auf einem Überkopf-Schüttler (Reax 2, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach) inkubiert (dynamische Inkubation). Danach erfolgte für 1h bei 4°C eine statische Inkubation. Im Anschluss wurden die Proben 10min bei 4°C und 1200U/min zentrifugiert (Centrifuge NAPCO 2019R, NAPCO, Winchester/VA/USA). Die Überstände wurden aliquotiert, in Eppendorfgefäße eingefroren und bei -20°C gelagert.

4.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte mittels Dc Protein Assay Kit (Biorad Laboratories, Hercules/CA/USA) nach der Methode von Lowry OH et al. (1951).

Prinzip: Es handelt es sich hierbei um eine zweiphasige kolorimetrische Methode. In einer ersten Phase wird in alkalischer Lösung durch Reaktion von Kupferionen mit Proteinen ein Kupfer-Protein-Komplex gebildet. In einer zweiten Phase reduziert dieser Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung ein zugegebenes Phosphomolybdän-Phosphowolfram-Reagens (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagens) unter Bildung einer blauen Färbung, deren Intensität der Protein-Konzentration in der Lösung proportional ist.

Die Homogenatproben wurden auf Eis aufgetaut und mit Aqua destillata (Aq.d.) im Verhältnis 1:20 verdünnt (2µl Probe + 38µl Aq.d.). Anschließend wurden in 2 Schritten zunächst 100µl Reagens A, dann 800µl Reagens B hinzupipettiert und die Lösung durchmischt. Zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach einer

Inkubationsphase von 10min bei RT die Absorption der Lösung bei 540nm gegen einen Leerwert (40µl Aq.d. + 100µl Reagens A + 800µl Reagens B) mittels Photometer gemessen (Bio Photometer 6131, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg). Um eventuelle Schwankungen der Proteinkonzentration herauszumitteln wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.2.3. Western Blot

Prinzip: Beim Western Blot handelt es sich um eine Methode zur Charakterisierung von Proteinen anhand ihres aus Nettoladung, Größe und Konformation resultierenden Wanderungsverhaltens im elektrischen Feld. In einem ersten Schritt werden die Proteine im Rahmen einer SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) aufgetrennt. Als Trägermedien dienen hierbei Polyacrylamid-Gele, deren Porengrößen und damit Trennschärfen durch Variation des Vernetzungsgrades an die Proteingrößen angepasst werden (10%ige Gele für Proteine mit einem MG von 30-80kDa, 12%ige Gele für Proteine mit einem MG von <30kDa). Die Proteine werden in wässriger Lösung mit SDS versetzt, dessen anionische Gruppen dem Protein eine nach außen negative Ladung verleihen und dessen Fettsäureanteile durch Bindung an hydrophobe Proteinregionen unspezifische Interaktionen reduzieren. Durch Zusatz von Mercapto-Ethanol werden darüber hinaus durch Disulfidbrückenbindungen stabilisierte Proteinkonformationen sowie Protein-Komplexe in Einzelkomponenten aufgelöst. Bei der Elektrophorese wandern die durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld in Richtung Anode, wobei eine Proteinseparation nach dem Molekulargewicht erfolgt. Die aufgetrennten Proteine werden anschließend durch einen Abklatsch (Blot) vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und in einem dritten Schritt durch Inkubation mit verschiedenen Antikörper-Systemen anhand des spezifischen Bandenmusters identifiziert.

Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele wurden Glas-Platten von 18cmx16cm (Glas Plates for Hoefer Vertical Slab Gels, Pharmacia Biotech Inc., San Francisco/CA/USA) sowie Spacer von 2cmx16cmx1.5mm (Spacers for SE600 Vertical Gel Units, #80-6180-89, Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco/CA/USA) verwendet. Die Geldimensionen im Rahmen der Western Blot-Elektrophorese betrugen entsprechend 16cmx16cmx1.5mm.

Die Homogenatproben, Marker und Kontrollen wurden auf Eis aufgetaut. Um für die Elektrophorese äquivalente Proteinbeladungen der Spuren zu erhalten (Soll: 150µg Protein/Spur), wurde zunächst für jede Probe aus der ermittelten Proteinkonzentration das entsprechende Ladevolumen berechnet (xµl). Die Ladevolumina der Proben (xµl), Marker (10µl) und Kontrollen (10µl) wurden in Eppendorfgefäße pipettiert und mit Western Blot-Ladepuffer (5µl Mercapto-Ethanol pro 100µl Probenpuffer) im Verhältnis 1:1 versetzt. Danach wurden die Ansätze gevortext (Vortex Mixer, Modell 7-2020, Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs-GmbH, Heidelberg) und zentrifugiert (Centrifuge 5415C, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg). In Abhängigkeit des zu untersuchenden Proteins erfolgte anschließend eine thermische Behandlung der Proben-Ansätze („Kochen“/

Wärmebehandlung (Thermomixer 5436, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg): MMP-13: für 7min bei 70°C, TIMP-1 und TIMP-2: für 5min bei 95°C; Kältebehandlung: MMP-13, TIMP-1 und TIMP-2: für 5min auf Eis). Die vorbereiteten Ansätze wurden mit der Hamilton-Spritze (Hamilton Microliter Syringes, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz/Schweiz) in Unterlegetechnik so auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, dass jeweils 2 Proben pro Gruppe pro Gel untersucht wurden. Parallel zu den Proben liefen Marker (High Range Marker mit MG-Standardbereich von 36-205kDa, Low Range Marker mit MG-Standardbereich von 6.5-66kDa) und Kontrollen (MMP-Kontrolle bzw. WT-Standard).

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zweiphasig über 4-5h bei RT mittels Hoefer-Elektrophorese-System (Hoefer Electrophoresis Unit, Modell SE600-15-1.5, Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco/CA/USA) und EPS (Electrophoresis Power Supply, EPS 601, Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco/CA/USA): in der Sammelphase über 60min mit einer Stromstärke von 25mA pro Gel, in der Laufphase über 3-4h mit einer Stromstärke von 35mA pro Gel. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden anschließend im Semi-Dry-Blotting-Verfahren (Hoefer Semi Phor Blotting Chamber, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire/UK) mit einem diskontinuierlichen Puffersystem auf eine Nitrocellulosemembran (Protran Nitrocellulose Transfer Membranes, BA83, 300mmx3m, Pore Size 0.2µm, Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, Dassel) übertragen. Die in Anoden-Lösung II getränkte Membran und das Gel wurden zwischen 9 Lagen Elektrodenpapier (Electrode Paper Nova Blot, Amersham Biosciences AB, Uppsala/Schweden) in Anoden-Lösung (6 Lagen in Anoden-Lösung I und 3 Lagen in Anoden-Lösung II) und 9 Lagen Elektrodenpapier in Kathoden-Lösung in direktem Kontakt zu 2 horizontalen Elektroden einem konstanten Gleichstrom ausgesetzt. Die elektrophoretische Übertragung erfolgte über Nacht (min. 12h) mit einer Stromstärke von 90mA pro Gel.

Der Proteintransfer wurde mittels Poinceau Red-Färbung (90s bei RT) kontrolliert. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurde die Membran für 60min bei RT in 10%iger Blocking-Solution inkubiert. Nach einer Waschphase (2x 5min PBS/Tween, 1x 10min PBS/Tween, 2x 5min 1xPBS) bei RT auf dem Schüttler (Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach) bei 45 U/min erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper (Verdünnung: 1:400 (12.5µl AK + 5ml 1xPBS)) bei 37°C im Hybridisationsofen (Hybridization Oven (Hybridizer HB-1000), UVP Inc., Upland/CA/USA). Die Inkubationsdauer richtete sich dabei nach der Art des 1. AK: 7h bei anti-MMP-1 und anti-MMP-13, 90min bei anti-TIMP-1 und anti-TIMP-2, 60min bei anti-TIMP-4. Nach mehrfachen Waschschritten wurde die Membran mit dem Peroxidase-konjugierten 2. Antikörper (Verdünnung: 1:10000 (5µl AK + 50ml 1xPBS)) bei RT auf dem Schüttler bei 20 U/min inkubiert (90 min bei Goat-anti-mouse, 60min bei Goat-anti-rabbit). Nach einer abschließenden Waschphase erfolgte die Detektion der Banden mit dem Western Blot-Detektionssystem ECL (ECL Western Blotting Detection Reagents, RPN2106, Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire/UK) gemäß den Herstellerangaben. Hierbei kommt es durch eine Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenz-Reaktion zur einer Röntgenfilmschwärzung

(Hyperfilm (High Performance Autoradiography Film), RPN6K, Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire/UK) im Bereich der Antikörper-markierten Banden. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte in der Dunkelkammer mittels Curix-Entwickler (Curix 60 Type 94621105, AGFA-Gevaert N.V., Mortsel/Belgien) und AGFA-Reagenzien (AGFA Reagents (for medical x-ray film processing), AGFA-Gevaert AG, Leverkusen). Die entwickelten Röntgenfilme wurden eingescannt (CanoScan D1250 U2F, Canon Inc.) und quantitativ-densitometrisch anhand des spezifischen Bandenmusteres mittels Labworks (Labworks 3.0 Software, UVP Inc., Upland/CA/USA) ausgewertet. Um Schwankungen in der Protein-Beladung herauszumitteln, wurde auf jedem Gel eine Kontrolle (MMP-Kontrolle bzw. WT-Standard) als Standardprotein mituntersucht und die so ermittelten Werte auf die Proteinbeladung normalisiert.

Zur Kontrolle der Proteinbeladung wurden alle Membranen mit einem weiteren Antikörper-System inkubiert: 1. AK: anti-Calsequestrin (1:1000-Verdünnung (5µl AK + 5ml 1xPBS), Inkubation für 60min bei 37°C), 2. AK: Goat -anti-rabbit (1:10000-Verdünnung (5µl AK + 50ml 1xPBS), Inkubation für 30min bei RT). Hierzu wurde ein Stripping-Verfahren durchgeführt, bei dem nach einer ersten Waschphase eine Inkubation mit Stripping-Buffer (5ml pro Membran) für 30min bei 56°C und anschließend eine zweite Waschphase erfolgte. Das weitere Vorgehen entsprach der oben dargestellten Methode.

4.2.4. Zymographie

Prinzip: Die Zymographie verdeutlicht die gewebeabbauenden Eigenschaften der Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) durch die Verwendung von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Zusatz von Gelatine (3mg/ml) als Substrat. In einem ersten Schritt werden die Proteine analog zum Western Blot im Rahmen einer SDS-PAGE aufgetrennt. Durch anschließende Inkubation der Gele mit einem substrathaltigen Medium kommt es im Gelatinasenbereich zu einer charakteristischen Degradation der im Gel enthaltenen Gelatine. Durch Färbung und Entfärbung der Gele wird in einem dritten Schritt dieser Verdau sichtbar gemacht, wobei sich die Gelatinase-spezifischen Banden hell (farblos-weißlich) gegen den dunklen (blauen) Hintergrund darstellen.

Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele wurden Glas-Platten von 18cmx16cm sowie Spacer von 1cmx16cmx1mm (Spacers for SE600 Vertical Gel Units, #80-6179-94, Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco/CA/USA) verwendet. Die Geldimensionen im Rahmen der Zymographie-Elektrophorese betrugen entsprechend 17cmx16cmx1mm.

Die Homogenatproben und der Überstand der humanen Fibrosarkomlinie HT 1080 (Marker und Positiv-Kontrolle) wurden auf Eis aufgetaut. Die Ladevolumina der Proben (xµl; berechnet aus der Proteinkonzentration der jeweiligen Probe und der angestrebten Proteinbeladung der Spuren (Soll: 150µg Protein/Spur)) und von HT 1080 (15µl) wurden in Eppendorfgefäße pipettiert und mit Zymographie-Ladepuffer (7.5µl) sowie Extraktionspuffer (5µl) versetzt. Die Ansätze wurden gevortext, zentrifugiert und danach mit der Hamilton-

Spritze in Unterlegetechnik auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, wobei jeweils 2 Proben pro Gruppe pro Gel und parallel dazu HT 1080 untersucht wurden.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte analog zum Western Blot zweiphasig über 3-4h bei RT mittels Hoefer-Elektrophorese-System und EPS: in der Sammelphase über 60min mit einer Stromstärke von 25mA pro Gel, in der Laufphase über 2-3h mit einer Stromstärke von 35mA pro Gel. Anschließend wurden die Gele für 3x 20min bei RT in 2.5%iger TRITON X-100-Lösung auf dem Schüttler bei 10U/min inkubiert (dynamische Inkubation). Im Anschluss erfolgte für 16h bei 37°C im Wärmeschrank (Wärmeschrank Typ B6060, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) eine statische Inkubation in Substratpuffer.

Nach Abgießen des Substratpuffers wurden die Gele für 90min bei RT mit Coomassie-Lösung gefärbt (Schüttler, 10U/min) und für 3x 30min bei RT mit Entfärbelösung entfärbt (Schüttler, 20U/min). Danach wurden die Gele in feuchte Zellophanfolien (Gel Air Cellophane Support, Biorad Laboratories, Hercules/CA/USA) eingebettet, auf Zelluloseträgern (Chromatography Paper, Whatman International Limited, Maidstone/UK) gelagert und für 2h unter Anlage eines Vakuums getrocknet. Die getrockneten Gele wurden eingescannt und quantitativ-densitometrisch anhand des spezifischen Bandenmusters mittels Labworks ausgewertet. Um Schwankungen in der Proteinbeladung herauszumitteln, wurden die ermittelten Werte auf HT 1080 als Standardprotein normalisiert.

4.2.5. Nukleinsäurepräparation für quantitative Real Time PCR

Sämtliche Präparationsschritte wurden (falls nicht speziell angegeben) zur Wahrung der Nukleinsäureintegrität auf Eis oder bei 4°C unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

4.2.5.1. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mittels RNA-Clean (peqGold RNA-Pure, peqLab Biotechnology GmbH, Erlangen) nach der Methode von Chomczynski P et al. (1987).

Prinzip: Die Vorteile der Guanidinium-Thiocyanat- und der Phenol-Chloroform-Extraktion werden hierbei in einem Ein-Schritt-Verfahren kombiniert (AGPC-(Acid Guanidinium-Thiocyanate-Phenol-Chloroform-)Extraktion), welches RNA-Präparationen auch bei nur geringen Mengen an Ausgangsmaterial ermöglicht.

Als Ausgangsmaterial zur RNA-Isolation wurden jeweils 20-25mg linksventrikulären murinen Myokardgewebes eingesetzt.

Die Proben wurden auf Eis angetaut und in einem Glas-Teflon-Potter bei 4°C und 900U/min unter Zugabe von RNA-Clean (1ml) homogenisiert. Die Homogenate wurden in Eppendorfgefäße pipettiert, nach Zusatz von Chloroform (200µl) zunächst durch Inversion und Vortexen für 30s durchmischt und anschließend für 10min bei RT inkubiert. Danach erfolgte für 30min eine Zentrifugation bei 4°C und 14000U/min. Nach der Zentrifugation ließ sich eine Phasentrennung in eine obere wässrige Phase (RNA) und eine untere sedimentäre

Phase (DNA und Proteine) beobachten. Die wässrige Phase wurde zur weiteren Aufbereitung in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert und mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 versetzt, die sedimentäre Phase dagegen wurde verworfen. Im Anschluss wurden die Ansätze zur RNA-Präzipitation für 60min bei -20°C eingefroren. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 4°C und 14000U/min (60min) wurde der Überstand (Isopropanol) abpipettiert. Das Pellet wurde zunächst durch zweimaliges „Waschen“ (Resuspendieren in 75%igem Ethanol/DEPC-H₂O, Durchmischen für 30s durch Inversion und Vortexen, Zentrifugation für 10min bei 4°C und 14000U/min, Abpipettieren des Überstandes) gereinigt und danach bis zum Farbumschlag von milchig-weiß nach glasig-farblos getrocknet. Nach Resuspendieren des getrockneten Pellets für 3min in DEPC-H₂O (20µl) und Inkubation für 5min bei 65°C wurden die RNA-Isolate zentrifugiert, eingefroren und bei -20°C gelagert.

4.2.5.2. DNase-Verdau der isolierten RNA

Prinzip: Zur Elimination eventuell vorhandener DNA-Reste und damit zur Erhöhung des Reinheitsgrades der RNA-Präparationen wurden die RNA-Isolate einem DNase-Verdau unterzogen. Hierbei kommt es durch Zugabe eines DNase-haltigen Master Mixes (DEPC-H₂O, 10x PCR Buffer, DNase I) in den RNA-Isolaten zu einer selektiven Denaturierung und Degradierung der doppelsträngigen DNA, wogegen die Nukleinsäureintegrität der einzelsträngigen RNA gewahrt bleibt.

Die RNA-Isolate und Master Mix-Substanzen wurden auf Eis aufgetaut (DNase auf Kälteblock), gevortext und zentrifugiert. Anschließend wurde ein Master Mix-Stock (entsprechend der Anzahl der Ansätze) hergestellt: 7µl DEPC-H₂O/Ansatz, 2µl 10x PCR Buffer/Ansatz, 1µl DNase (10U/µl)/Ansatz. Die Reaktionsansätze aus RNA-Isolat (10µl/Ansatz) und Master Mix (10µl/Ansatz) wurden in GeneAmps (GeneAmp Reaction Tube, 0.5ml, Perkin Elmer, Norwalk/Connecticut/USA) vorbereitet (Gesamtvolumen: 20µl/Ansatz) und durch Vortexen durchgemischt. Danach erfolgte eine zweiphasige Inkubation: für 30min bei 25°C (Thermomixer Comfort 5355, Eppendorf AG, Mannheim) und für 5min bei 75°C. Nach der Aufreinigung wurden die RNA-Isolate zentrifugiert, eingefroren und bei -20°C gelagert.

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades der RNA-Präparationen wurden im Rahmen von Probelaufen zur quantitativen Real Time PCR die Signalintensitäten der aufgereinigten RNA-Isolate mit den Signalintensitäten von DNA-haltigen Positiv-Kontrollen bzw. DNA-freien Negativ-Kontrollen verglichen.

4.2.5.3. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Isolate wurden auf Eis aufgetaut und mit Ampuwa im Verhältnis 1:100 verdünnt (2µl RNA-Isolat + 198µl Ampuwa). Zur quantitativen Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Absorption der Lösung bei 260/280nm gegen einen Leerwert (200µl

Ampuwa) mittels Photometer gemessen. Es erfolgten jeweils Doppelbestimmungen, um eventuelle Schwankungen der RNA-Konzentration herauszumitteln.

4.2.5.4. Reverse Transkription

Prinzip: Aus den vorliegenden RNA-Sequenzen werden durch reverse Transkription unter Zugabe eines RT-haltigen Master Mixes (Omniscript RT Kit (Reverse Transcriptase = RNA-abhängige DNA-Polymerase), RNasin, Primer Random) komplementäre cDNA-Sequenzen hergestellt.

Die RNA-Isolate und Master Mix-Substanzen wurden auf Eis aufgetaut (Omniscript RT und RNasin auf Kälteblock), gevortext und zentrifugiert. Die RNA-Volumina ($x\mu\text{l}$; berechnet aus der RNA-Konzentration der RNA-Isolate und der angestrebten RNA-Menge pro Reaktion (Soll: $1\mu\text{g}$ RNA/Reaktion)) wurden in GeneAmps pipettiert und unter Zugabe von DEPC- H_2O ($(10-x)\mu\text{l}$) auf ein RNA-Reaktionsvolumen von $10\mu\text{l}$ /Ansatz verdünnt. Anschließend wurde ein Master Mix-Stock (entsprechend der Anzahl der Ansätze) hergestellt: $2\mu\text{l}$ 10x Buffer RT/Ansatz, $2\mu\text{l}$ dNTP-Mix (5mM)/Ansatz, $2\mu\text{l}$ DEPC- H_2O /Ansatz, $2\mu\text{l}$ Primer Random/Ansatz, $1\mu\text{l}$ Omniscript RT ($4\text{U}/\mu\text{l}$)/Ansatz, $1\mu\text{l}$ RNasin ($10\text{U}/\mu\text{l}$)/Ansatz. Die RT-Ansätze wurden durch Hinzupipettieren von äquivalenten Master Mix-Volumina ($10\mu\text{l}$ /Ansatz) zu den RNA-Reaktionsvolumina ($10\mu\text{l}$ /Ansatz) vorbereitet (Gesamtvolumen: $20\mu\text{l}$ /Ansatz) und durch Vortexen durchmischt. Danach erfolgte eine mehrphasige Inkubation: zunächst für 60min bei 37°C im Wasserbad, dann für 5min bei 93°C und abschließend für 5min auf Eis. Nach der Inkubation wurden die RT-Konstrukte zentrifugiert, eingefroren und bei -20°C gelagert.

4.2.6. Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion

4.2.6.1. Quantitative Real Time PCR

Die quantitative Bestimmung der Genexpression erfolgte durch die Amplifikation der komplementären cDNA-Sequenzen mittels ABI PRISM 7700 SDS (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Weiterstadt).

Prinzip: Beim ABI PRISM 7700 SDS handelt es sich um ein flexibles dynamisches PCR-System bestehend aus einem Thermocycler mit 96-Well-Block und einer kombinierten Laser-/CCD-Kamera-Optik, welche über ein Multiplex-Fiber-Optik-System Fluoreszenz-Analysen ermöglicht. Die Fluoreszenz wird während der PCR durch Erregung von Fluorochromen in der PCR-Lösung mittels Laser induziert und durch die CCD-Kamera detektiert. Die sequentielle Applikation des Lasers in den einzelnen Wells resultiert in einer spektralen Auflösung der Fluoreszenz (Spektralbereich von 500-660nm), so dass in einem Well verschiedene Fluorochrome eingesetzt werden können (Bustin SA, 2000). Als Fluorochrom wurde der DNA-bindende Farbstoff SYBR Green I angewandt (Morrison TB et al. 1998), welcher in Lösung (ungebundene Form während der Denaturierungsphase) nur zu

einer schwachen, nach Interaktion mit doppelsträngiger DNA (gebundene Form während der Polymerisationsphase) dagegen zu einer signifikant verstärkten Fluoreszenz führt. Um nicht-PCR-bedingte Fluoreszenzschwankungen herauszumitteln, wird mittels ABI PRISM SDS Software (ABI PRISM Sequence Detection System Analysis Software Version 1.7, Applied Biosystems, Weiterstadt) für jede Probe der Anteil der einzelnen Farbstoffkomponenten am Fluoreszenzspektrum berechnet und das Fluoreszenzsignal jeder Farbstoffkomponente durch das Fluoreszenzsignal eines internen Referenzfarbstoffes (Passive Reference 1 (ROX)) geteilt. Da SYBR Green I in Gegenwart von doppelsträngiger DNA generell (spezifisch und unspezifisch) zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität führt, wird zur Erhöhung der Spezifität und zur Identifizierung der PCR-Amplicons anhand der Amplicon-spezifischen Schmelztemperatur die Konstruktion einer Schmelzkurve durchgeführt (Ririe KM et al., 1997). Die Real Time PCR ermöglicht als kinetische Methode die zeitnahe Beurteilung und Analyse der PCR-Progression anhand der Korrelation zwischen Zunahme der Fluoreszenzintensität in der PCR-Lösung und Zunahme der PCR-Amplicon-Anzahl (Exponentialfunktion) durch Messung des Fluoreszenzsignals am Ende jedes PCR-Zyklus. Aus den so erhaltenen Daten wird mittels ABI PRISM SDS Software für jede Probe ein Amplification-Plot (Fluoreszenzsignal vs. Zyklusnummer) erstellt und der C_T -Wert (fraktionelle Zyklusnummer, bei der das Fluoreszenzsignal eine definierte Schwelle überschreitet) ermittelt.

Die RT-Konstrukte, Zielgen-Primer (ANF, COL1, COL3, MMP-13), Referenzgen-Primer (GAPDH) und RNA-Standards wurden auf Eis aufgetaut und die jeweiligen PCR-Verdünnungen hergestellt (RT-Verdünnungen: $[RT]_A$: $1\mu\text{g}/20\mu\text{l} \Rightarrow$ Verdünnung: $5\mu\text{l RT} + 45\mu\text{l Ampuwa (1:10)} \Rightarrow [RT]_R$: $10\text{ng}/2\mu\text{l}$; Primer-Verdünnungen: siehe unter 4.1.1.3.; RNA-Verdünnungen: $1\mu\text{l RNA} + 19\mu\text{l Ampuwa (1:20)}$). Die einzelnen Master Mix-Stocks (aus SYBR Green PCR Master Mix (SYBR Green I, AmpliTaq Gold DNA-Polymerase, dNTP, Passive Reference 1), FP, RP und Ampuwa) wurden (entsprechend der Anzahl der PCR-Ansätze/Gen) hergestellt.

Anschließend erfolgte die Präparation der PCR-Ansätze in MicroAmp-96-Well-Reaktions-Platten (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates, Applied Biosystems, Warrington/UK), wobei pro Well zu jeweils $2\mu\text{l RT}$ („template“, in Doppelbestimmung) bzw. RNA („no template“) bzw. Ampuwa („no template control“) jeweils $23\mu\text{l Master Mix}$ hinzupipettiert wurden (Gesamtvolumen: $25\mu\text{l/Well}$). Die PCR-Ansätze wurden abgedeckt (ABI PRISM Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems, Foster City/CA/USA) und zentrifugiert.

Die quantitative Real Time PCR im ABI PRISM 7700 SDS wurde in 40 Zyklen zu je 2 Stufen (Denaturierung („melt“): 15s bei 95°C , Polymerisation („anneal“/„extend“): 1min bei 60°C) mit initialem Arrest („hold“) für 5min bei 95°C zur Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (DNA-abhängige DNA-Polymerase) durchgeführt. Zur Charakterisierung der PCR-Amplicons erfolgte in einem zweiten Schritt die Konstruktion der jeweiligen Schmelzkurve in 3 Stufen (Stage1: 0.15min bei 95°C , Stage2: 0.15min bei 60°C , Stage3: 0.15min bei 95°C).

4.2.6.2. Auswertung der quantitativen Real Time PCR (Komparative C_T-Methode)

Die Bestimmung der quantitativen Genexpression erfolgte nach der komparativen C_T-Methode (User Bulletin #2 (1997), Applied Biosystems, Weiterstadt) durch Berechnung der relativen Effizienz von Zielgen- und Referenzgen-Amplifikation.

4.2.7. Sirius Red Färbung

Zur Charakterisierung der Kollagen-Veränderungen im Rahmen des kardialen extrazellulären Matrix-Remodelings wurde die Picosirius Red Färbung (Sirius Red Färbung) nach der Methode von Sweat F et al. (1964) angewandt.

Prinzip: Es handelt sich hierbei um ein Verfahren der histochemischen Aufbereitung, welches durch Einwirkung des Azofarbstoffes Sirius Red F3BA zu Alterationen der physikochemischen Eigenschaften von kollagenem Gewebe im Sinne von intensiv roter Färbung und verstärkter Doppelbrechung im polarisierten Licht führt, die in Kombination die Darstellung von Kollagenen (TypI - TypIII) sowie von Kollagen-ähnlichen Strukturen (Komplement-Komponente C1q) mit hoher Spezifität und Sensitivität ermöglichen (Junqueira LC et al., 1979). Die Färbung resultiert aus der Interaktion zwischen Sirius Red und Kollagen bei niedrigem pH-Wert (pH 2) durch Reaktion von anionischen (sauren) Sulfonsäure-Gruppen des Farbstoffes mit kationischen (basischen) Gruppen des Kollagens (Aminogruppen von Lysin und Hydroxylysin, Guanidingruppe von Arginin). Die verstärkte Doppelbrechung im polarisierten Licht wird induziert durch additive Anisotropie während des Färbeprozesses durch Bindung von Sirius Red (intrinsisch anisotrop) an Kollagen unter paralleler Orientierung der Längsachsen von Farbstoff- und Kollagen-Molekülen (Puchtler H et al., 1973).

Zur Durchführung der Sirius Red Färbung wurde in Formalin asserviertes ventrikuläres Gewebe in 4%iger Formalin/1xPBS-Lösung fixiert, in Paraffin eingebettet und in Schnitte zu je 5µm fraktioniert. Die Präparate wurden auf Objektträger aufgebracht und zur Vorbereitung des Färbeprozesses für 20min bei 67°C erwärmt (Trockenschrank Typ T12, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold). Nach einer initialen Inkubation in Xylol (3x 10min bei RT) wurde das Gewebe zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe (100% Ethanol: 2x 2min bei RT ⇒ 90% Ethanol: 2min bei RT ⇒ 70% Ethanol: 2min bei RT ⇒ 30% Ethanol: 5min bei RT) und anschließend in Aqua destillata (2x 5min bei RT) rehydriert. Der eigentliche Färbeprozess erfolgte durch Einwirkung von 0.1%iger Sirius Red-Lösung für 60min bei RT. Im Anschluss wurden die Präparate kurz mit Aqua destillata gespült, in 0.01N Salzsäure gewaschen (2min bei RT) und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (90% Ethanol: 2min bei RT ⇒ 100% Ethanol: 2min bei RT) dehydriert. Nach einer terminalen Inkubation in Xylol (2x 5min bei RT) wurden die Schnitte eingedeckt (Entellan, Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie, Merck KGaA, Darmstadt) und getrocknet.

Die quantitative Auswertung erfolgte mittels Lucia G (Lucia G Version 4.60 Software, Nikon GmbH, Düsseldorf) durch Bestimmung des fraktionellen Anteils des kollagenen Bindegewebes am gesamten myokardialen Gewebe sowie durch Vermessung der Myozyten bezüglich morphologischer Kriterien wie Durchmesser, Umfang und Fläche.

4.2.8. Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert (mean) $\pm$ Standardabweichung (SEM) dargestellt. Die statistische Signifikanz (p-Wert) wurde mittels Varianzanalyse und Bonferoni-t-Test für unverbundene Stichproben ermittelt. Ein p-Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.