

3. **Material und Methoden:**

3.1 **Materialien**

Für die Durchführung der Versuche sowie die Ermittlung und Auswertung der Ergebnisse wurden die unter Hinweis auf die Herstellerfirmen nachstehend aufgeführten Materialien sowie herkömmliche Chemikalien (nicht im Einzelnen aufgeführt) eingesetzt. Alle Chemikalien sind mindestens in der Spezifikation „reinst“ oder in der höchstmöglichen kommerziell erhältlichen Reinheit verwendet worden.

3.1.1 **Mausstämme**

Balb/c	Institut für Pathophysiologie, Abt. Versuchstierkunde, Med. Fakultät der EMAU Greifswald
C57Bl/10ScSn/J	Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland, gezüchtet am Institut für Pathophysiologie, Med. Fakultät der EMAU Greifswald
C57Bl/10ScSn- <i>Dmd^{mdx}</i> /J (mdx)	Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland, gezüchtet am Institut für Pathophysiologie, Med. Fakultät der EMAU Greifswald

3.1.2 **Zelllinien**

C2C12-Mausmuskelzelllinie	Ursprünglich von der Universität Ulm, Abt. Allgemeine Physiologie, gezüchtet am Institut für Pathophysiologie, Med. Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
---------------------------	--

3.1.3 **Chemikalien**

Agar	Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Braun, Deutschland
5-Bromo-4-Chloro-3-Indol Phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

BigDye® Terminator 3.1	PE Applied Biosystems, Deutschland
Blockingreagenz	Roche Biochemicals, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
ChemMate™ Target Retrieval Solution	Dako Cytomation Denmark, Dänemark
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)	Promega, USA
Coomassie® Brilliantblau G250	Carl Roth GmbH, Deutschland
Fluorescent Mounting Medium	Sigma Diagnostics, USA
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Deutschland
Glycerolgelantine	Merck, Deutschland
Nitroblau-tetrazolium Chlorid (NBT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range	Bio-Rad Laboratoies, Kanada
Ponceau S Solution	Sigma, USA
Roti®-Load 1	Carl Roth GmbH, Deutschland
SYTOX® Green 488	Molecular Probes, USA
t-RNA	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
T-7 Primer	PE Applied Biosystems, Deutschland
TaqMan Universal Mastermix	PE Applied Biosystems, Deutschland
Isopropyl-β-D-Thiogalacto-pyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

3.1.4 Enzyme

Hifi-Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	England Biolabs, Gibco BRL
Taq-DNA-Polymerase	QIAGEN, Deutschland
T ₄ -DNA-Ligase	Promega, USA
Reverse Transkriptase	PE Applied Biosystems, Deutschland

3.1.5 Kits für die Molekularbiologie

GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences, Bucking
DIG RNA Labelling Kit (SP6/T7)	Roche Biochemicals, Deutschland
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
RNeasy®MiniKit (250)	QIAGEN, Deutschland
RNeasy®Fibrous Tissue MiniKit (50)	QIAGEN, Deutschland
TaqMan-Reverse Transcription Reagents	PE Applied Biosystems, Deutschland
Quiagen®Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Deutschland
Qiashredder	QIAGEN, Deutschland
pGEM®-T-Easy Vector System	Promega, USA
Vectastin®ABC Kit	Vector Laboratories, USA
GeneAmp®RNA PCR Kit	PE Applied Biosystems, Deutschland

3.1.6 Verwendete Lösungen

1 x TBE	100 mM TRIS [<i>tris</i> -Hydroxymethyl-aminomethan] 86 mM Borsäure 2,5 mM EDTA, pH8,0
10 x LB-Medium	100 g / l Tryptone 50 g / l Hefeextrakt 100 g / l NaCl (pH 7,0 - 7,5)
LB-Agar	15 g Agar Noble / l 1 x LB-Medium
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat in 0,1 % DEPC-Wasser, pH 7,4 autoklaviert
1 M Magnesiumchlorid	1 M MgCl ₂ x 6 H ₂ O in 0,1 % DEPC-Wasser, steril filtriert

1 x Lösung D	4 M Guanidinthiocyanat 25 mM NaCl in 0,1 % DEPC-Wasser, pH 7,0, steril filtriert
10 % Triton X-100	0,1 g Triton / ml in 0,1 % DEPC-Wasser, autoklaviert
12 % Tween 20	0,12 g Tween 20 / ml in 0,1 % DEPC-Wasser, autoklaviert
0,1 M Triethanolamin (TEA)	14,9 g TEA / l in 0,1 % DEPC-Wasser, pH 8,0 autoklaviert
10 x PBS	1,5 M NaCl 30 mM KH_2PO_4 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ in 0,1 % DEPC-Wasser, pH 7,4 autoklaviert
2 x Maleatpuffer	200 mM Maleinsäure 300 mM NaCl in 0,1 % DEPC-Wasser, pH 7,5 autoklaviert
10 x AP-Puffer	1 M TRIS 1 M NaCl in 0,1 % DEPC-Wasser, pH 9,5 autoklaviert
20 x SSPE	3,6 M NaCl 0,2 M NaH_2PO_4 0,2 M EDTA in 0,1 % DEPC-Wasser, pH 7,4 autoklaviert

10 x Blocking Reagents	0,1 g Blocking Reagent / ml 1x Maleatpuffer im Wasserbad gelöst (56 °C) autoklaviert aliquotiert bei -20 °C
1 x TE-Stopplösung	10 mM TRIS 1 mM EDTA in 0,1 % DEPC-Wasser, pH 7,5 autoklaviert
2,5 und 5 M NaCl	5 M NaCl 29,2 g NaCl / 100 ml 2,5 M NaCl 14,6 g NaCl / 100 ml in 0,1 % DEPC-Wasser, autoklaviert
1 x Pepsinlösung	0,75 mg Pepsin / ml 0,2 M HCl bei 37 °C lösen
1 x TRIS/HCl-Puffer	40,65 mM TRIS Base 434,6 mM TRIS/HCl 1,5 M NaCl, pH 7,4
1 x Citratpuffer	9 ml 0,1 M Zitronensäure 41 ml 0,1 M Natriumcitrat 450 ml A.dest, pH 6,0
1 x PBS	137 mM NaCl 26,8 mM KCl 8,09 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
1 x TRIS/HCL-Puffer mit MgCl ₂	10 mM TRIS/HCL, pH 7,4 10 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂

7,5 % Acrylamid-Gel	7,2 ml A.dest 3,3 ml Trenngelpuffer 3,8 ml 30 %ige Acrylamidlösung 75 µl 20 %iges SDS Spartelspitze Ammoniumpersulfat 15 µl TEMED
10 x SDS-PAGE-Puffer	1,92 M Glycin 0,25 M TRIS 1 % SDS
1 x Laufpuffer	0,192 M Glycin 0,025 M TRIS 10 % Methanol
1 x Inkubationspuffer	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 100 mM TRIS, pH 9,5

3.1.7 Plasmide

Für die Klonierung doppelsträngiger cDNA wurde der Vektor *pGEM-T-Easy* genutzt. Der Einbau erfolgte über Homopolymerschwänze. Hierbei wurde der Vektor durch die Firma *Promega* mit dem Enzym Eco R V geschnitten und die Schnittstelle mit 3'-„T“-Überhängen versehen. An diesen 3'-„T“-Überhängen konnte das PCR-Produkt mit seinen „A“-Überhängen andocken. Weiterhin enthielt der Vektor *pGEM-T-Easy* sowohl einen T7- als auch einen SP6-RNA Polymerase Promotor. An diesen Promotoren konnte die T7- bzw. die SP6-Polymerase zu weiteren Zwecken binden. Zur Selektion von Bakterien ohne Vektor besitzt *pGEM-T-Easy* eine Ampicillinresistenz. Somit konnten auf ampicillinhaltigem Medium nur Bakterien wachsen, welche den Vektor eingebaut hatten. Ob der Vektor das cDNA-Fragment enthielt, wurde durch die so genannte „Blau-Weiß-Selektion“ getestet. Hierbei wurde das LacZ-Gen des Vektors benutzt, welches für die β-Galaktosidase kodiert. Dieses Enzym spaltet im Laktose-Metabolismus die Laktose in die Monosaccharidkomponenten Galaktose und Glukose. Dabei gehört die β-Galaktosidase zu den induzierbaren Enzymen, welche erst nach Induktion synthetisiert werden.

Ein solcher Induktor ist auch Isopropylthiogalaktosid (IPTG), welcher strukturell der Allolaktose ähnelt, aber nicht abgebaut wird. Konnte so die Enzymsynthese vom LacZ-Gen ausgehend aktiviert werden, so erschienen diese Kolonien auf X-Gal-Medium, welches das Substrat darstellte, blau. Da die Bindungsstelle für die cDNA-Fragmente genau in diesem Gen lag, wurde bei cDNA-Fragmenteinbau das LacZ-Gen zerstört. Somit konnte keine β -Galaktosidase gebildet werden und diese Kolonien erschienen auf X-Gal-Medium weiß. Folgende Abb. 7 zeigt die Plasmidkarte des Vektors *pGEM-T-Easy*.

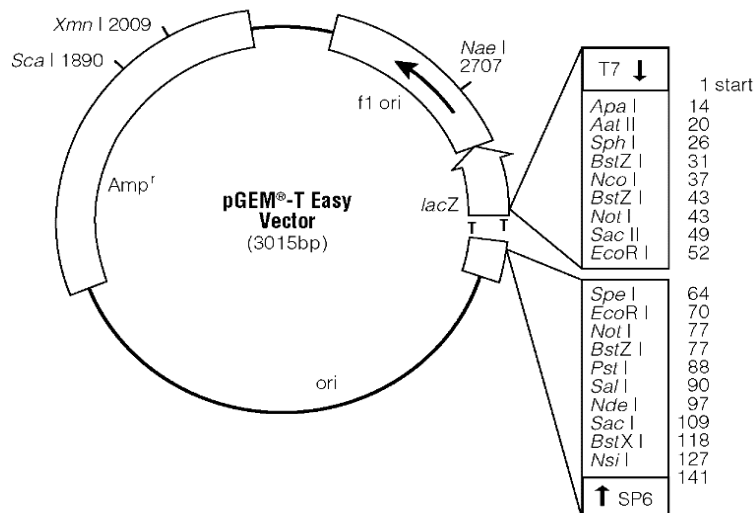


Abb. 7: Plasmidkarte des Vektors *pGEM-T-Easy*

In den Promoterregionen für die T7- und SP6-Polymerase befinden sich verschiedene Schnittstellen für einige herkömmliche Enzyme.

3.1.8 Bakterienkulturen

Zur Vermehrung der cDNA-Fragmente dienen, in Form von kompetenten Zellen (*Solopack®Gold competent cells*, Stratagene) erhaltene, *E. coli*-Bakterien als Wirt. Diesen Bakterien fehlen alle bekannten *E. coli* Restriktions-Systeme (McrA-, McrCB-, McrF-, Mrr- und HsdR), wodurch eine Spaltung von methylierter DNA verhindert wird. Weiterhin fehlt die Endonukleaseaktivität (*endA*), womit sich die Qualität der präparierten DNA verbessert. Eine Verminderung der Neukombination (*recA*) bewirkt eine Stabilisierung des Inserts. Zusätzlich enthalten diese Bakterien ein *lac^qZΔM15*-Gen, wodurch ebenfalls eine „Blau-Weiß-Selektion“ möglich ist.

3.1.9 Primer und Sonden

3.1.9.1 Primer für die Standard RT-PCR

Für die Standard RT-PCR wurden die in den folgenden Tabellen 1 bis 3 aufgelisteten Primer eingesetzt. Die Primer wurden entweder von TIBMOLBIOL und MWG bezogen, oder es wurden die Primer-Sondenmixe von Applied Biosystems genutzt.

Gen	Firma	Zugangsnummer/ Fragmentgröße	Sequenz 5´-3´
TRPC1	MWG	NM_011643.1 371 Bp	For: CAAGATTTTGGGAAATTTCTGG Rev: TTTATCCTCATGATTTGCTAT
TRPC2	MWG	NM_011644.1 326 Bp	For: GATCCGGTTCATGTTCATCCT Rev: GAGCGAGCAAACCTTCCACTC
TRPC3	MWG	NM_003305.1 317 Bp	For: TGACTTCCGTTGTGCTCAAATATG Rev: CCTTCTGAAGCCTTCTCCTTCTGC
TRPC4	MWG	NM_016984.1 414 Bp	For: TCTGCAGATATCTCTGGGAAGGATGC Rev: AAGCTTTGTTGAGCAAATTTCCATTC
TRPC5	MWG	NM_009428.1 339 Bp	For: ATCTACTGCCTAGTACTACTGGCT Rev: CAGCATGATCGGCAATGAGCTG
TRPC6	MWG	NM_013838.1 326 Bp	For: AAAGATATCTTCAAATTCATGGTC Rev: CACGTCCGCATCATCCTCAATTC
TRPC7	MWG	NM_012035.1 692 Bp	For: CGTGCTGTATGGGGTTTATAATG Rev: GCTTTGGAATGCTGTTAGAC
TRPV1	TIB MOLBIOL	XM_112546 276 Bp	For: GCATCTTCTACTTCAACTTCTTCGTC Rev: CCACATACTCCTTGCGATGGC
TRPV2	MWG	NM_011706.1 427 Bp	For: CGGCACTTCCTCTCT Rev: GTCGGTCACGGTCAA
TRPV3	MWG	NM_145099.1 298 Bp	For: CAAGGACTGCCACCACCATC Rev: CATCACAGTTGCCAGAGAGG
TRPV4	MWG	NM_022017 249 Bp	For: GAGTCCTCAGTAGTGCCTGG Rev: CAACAAGAAGGAGAGCAGTC
TRPV5	MWG	XM_149866.2 172 Bp	For: CGTTGGTTCTTACGGGTTGAAC Rev: GTTTGGAGAACCACAGAGCCTCTA
TRPV6	MWG	NM_022413.2 318 Bp	For: AACCAGCCTTCCACC Rev: CCTCCATTAGCACCA

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primer von TRPC1-7 und TRPV1-6 für die Standard RT-PCR. Die Primer wurden von TIBMOLBIOL oder MWG erhalten.

Gen	Firma	Zugangsnummer/ Fragmentgröße	Sequenz 5'-3'
TRPM1	Applied Biosystems	NM_018752 100 Bp	Mm00450619_m1
TRPM2	TIB MOLBIOL	NM_138301.1 187 Bp	For: GAAGGTGTAGTTGAACATGGCGA Rev: CAGATCCCAACCTACATTGACG
TRPM3	MWG	NM_177341.2 497 Bp	For: CCTGTTCTTCTGGCA Rev: GCTTCTCTGGCTCCT
TRPM4	TIB MOLBIOL	NM_175130.2 176 Bp	For: CCCTGAGGATGGTGTGAGT Rev: AGGAGCACTGGGATGTCAAT
TRPM5	TIB MOLBIOL	NM_020277 360 Bp	For: CAGATACTGAGGATGGCTGG Rev: GGATCTTGGTGGATGTGCTA
TRPM6	TIB MOLBIOL	NM_153417.1 219 Bp	For: CCAGGTGCCGGTAATAACA Rev: CTCTTGTGGCTGCCTTAGGT
TRPM7	TIB MOLBIOL	NM_021450.1 295 Bp	For: CGGAGCTGGTCGCACAATTA Rev: CCTGGAAGACATCTGTGAGG
TRPM8	TIB MOLBIOL	NM_134252 344 Bp	For: TCCACGAGACTTCTTCACTT Rev: GTGTATCTGAGGTCAGTCTT
ACCN1	MWG	NM_007384.1 110 Bp	For: GTGCCGGTCCTCAGAGAT Rev: ACCATGCGGCAGTTACAGTTCT
ACCN2	MWG	NM_009597 185 Bp	For: GGCCAGATGGGATTGTT Rev: CCTCGCAGGGATTGTGTCTT

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Primer von TRPM1-8 und ACCN1-2 für die Standard RT-PCR. Die Primer wurden von TIBMOLBIOL, MWG oder Applied Biosystems erhalten.

Gen	Firma	Zugangsnummer/ Fragmentgröße	Sequenz 5'-3'
SCNN1a	MWG	NM_011324 223 Bp	For: CTGGGCAGCTTCATCTTTAC Rev: AGCCCCCGTCACTGTGG
SCNN1b	MWG	NM_011325.1 267 Bp	For: AACAGGTGCCACCATGCCAG Rev: CATGGAGAGCGAGACGCTGA
SCNN1g	MWG	NM_011326.1 215 Bp	For: CAACTGGATTTGCTACT Rev: AGGTCAGTCTTGTTGAGCTT
SCN4A	MWG	Nm_133199.1 329 Bp	For: CATCAAATCCCTGCGCACGC Rev: ATAAAGATGACGAAGTAAAGG
TRPA1	Applied Biosystems	NM_177781 73 Bp	Mm00625268_m1
GAPDH	MWG	NM_008084.1 233 Bp	For: ACCACAGTCCATGCCATCAC Rev: TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Primer von SCNN1a, 1b und 1g, sowie SCN4a, TRPA1 und GAPDH für die Standard RT-PCR. Die Primer wurden von MWG oder Applied Biosystems erhalten.

3.1.9.2 Primer und Sonden für die „Real-time“ RT-PCR

Für die „Real-time“ RT-PCR dienten zum einen die käuflichen Primer-Sondenmische (Tabelle 4) der Firma PE Applied Biosystems zur Amplifizierung. Zum anderen wurden die Primer und die Sonden von der Firma TIBMOBOLBIOL einzeln bezogen und eingesetzt (Tabelle 5 und 6).

Gen	Zugangsnummer/ Fragmentgröße	Primer-Sondenmix
TRPC1	NM_011643 130 Bp	Mm00441975_m1
TRPC2	NM_011644 72 Bp	Mm00441984_m1
TRPC5	NM_009428 105 Bp	Mm00437183_m1
TRPC6	NM_013838 153 Bp	Mm00443441_m1
TRPC7	NM_012035 93 Bp	Mm00442606_m1
TRPV2	NM_011706 99 Bp	Mm00449223_m1
TRPV3	NM_145099 56 Bp	Mm00454996_m1
TRPV4	NM_022017 55 Bp	Mm00499025_m1
TRPV6	NM_022413 58 Bp	Mm00499069_m1
TRPM1	NM_018752 100 Bp	Mm00450619_m1
TRPM5	NM_020277 65 Bp	Mm00498453_m1
TRPM7	NM_021450 115 Bp	Mm00457998_m1
TRPM8	NM_134252 88 Bp	Mm00454566_m1
SCN4A	NM_133199 83 Bp	Mm00500103_m1
SCN5A	NM_021544 90 Bp	Mm00451971_m1
ACCN1	NM_007384 79 Bp	Mm00475691_m1
TRPA1	NM_177781 73 Bp	Mm00625268_m1

Table 4: Auflistung der verwendeten Primer-Sondenmixe für die „Real-time“ RT-PCR.

Die Primer wurden von der Firma PE Applied Biosystems erhalten und enthielten bereits die Sonden.

Gen	Zugangsnummer/ Fragmentgröße	Sequenz 5'-3'
TRPC3	NM_019510 180 Bp	For: CCAAGCTGGCCAACATAGAG Rev: GGCAAGTTTGACACGACTCA Sonde: ACTCGGAGGAGGTGGAAGCCATTC
TRPC4	NM_016984 209 Bp	For: TGGAGTGGATGATATTACCG Rev: CCACATGTCCCATGATTC Sonde: TGTGATGAACTCCTTGTATCTGGCAACAA
TRPV1	XM_112546 321 Bp	For: GCATCTTCTACTTCAACTTCTTCGTC Rev: CCACATACTCCTTGCGATGGC Sonde: CAAACTCTTGAGGGATGGTCGCCTCT
TRPV5	XM_112633 281 Bp	For: CAAGAAGAAAGAGGCTCGAC Rev: AATGACTGTCACCAACTCCC Sonde: CCGTACACATGTTTCGAGATAACACCATCA
TRPM2	NM_138301 187 Bp	For: CAGATCCCAACCTACATTGACG Rev: GAAGGTGTAGTTGAACATGGCGA Sonde: ACCAGTGCAGCCCCAATGGCA
TRPM3	NM_177341 157 Bp	For: CAAAGATGACATGCCCTATATGA Rev: CTTTCTTTCTGGATGATTCCC Sonde: ATGAAGAGGACATGGAGCTAACAGCAA
TRPM4	NM_175130 176 Bp	For: CCCTGAGGATGGTGTGAGT Rev: AGGAGCACTGGGATGTCAAT Sonde: CTTCTTGGTGGATGATGGCACC
TRPM6	NM_153417 219 Bp	For: CCAGGTGCCGGTAATAACA Rev: CTCTTGTGGCTGCCTTAGGT Sonde: CAGTTGAATGCAGAGCCAGGAGAAAC

Table 5: Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden für die „Real-time“ RT-PCR.

Die Primer wurden von der Firma TIBMOBIO erhalten. Hierbei wurden die Primer und die Sonden im vorgeschriebenen Verhältnis gemischt und anschließend dem Reaktionsansatz zugefügt.

Gen	Zugangsnummer/ Fragmentgröße	Sequenz 5´-3´
SCNN1a	NM_011324 107 Bp	For: TGCCTTCTCCTTGGATAGCC Rev: GACTTCACAGACGGCCATC Sonde: AGGAAGCCGTGCAGTGTGACCAAC
SCNN1b	NM_011325 287 Bp	For: ACCACATGATCCGTAAGTGC Rev: TGCTCAGGGTGATATTCGAG Sonde: AAGGAGTCCTGCAATGACACCCAG
SCNN1g	NM_011326 320 Bp	For: ACCCTTTCATCGAAGACGTG Rev: GGACAAAGGCCTGGTACAG Sonde: CTATTCCCTCCAGATCTGCCTTTACTCA
ACCN2	NM_009597 214 Bp	For: AGGCTTCCAGACGTTTGTG Rev: GCTCCGGAGTACAGTATGGG Sonde: TTCGACTCCTACAGCATCACGGCC
ACCN3	NM_183000 294 Bp	For: AAGTGCGGATGTGCAATGAT Rev: GTTCCACGGCCTCATAGTTG Sonde: AGTACAAGGACTGTGCCAGCCCAGC
ACCN4	NM_183022 236 Bp	For: ACATTGAATGTGCCGACC Rev: CCATGGCTTCAGAAGTTAGG Sonde: TCGTTACGGCAAAGAGATCTCCATGG
ACCN5	NM_021370 322 Bp	For: CACGAGATTCTCCCGGATA Rev: CCATCCTTGATCACATCGAG Sonde: ACAACTCCAGCTGCCCTGTGTCA
18S	Applied Biosystems	For: Nr. 430449008025 Rev: Nr. 430448611024

Table 6: Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden für die „Real-time“ RT-PCR.

Die Primer wurden von der Firma TIBMOLBIOL erhalten. Hierbei wurden die Primer und die Sonden im vorgeschriebenen Verhältnis gemischt und anschließend dem Reaktionsansatz zugefügt.

3.1.9.3 cRNA-Sonden für die *in-situ* Hybridisierung

Für die *in-situ* Hybridisierung wurden spezifische cRNA-Sonden für TRPC3, TRPC6, TRPV4 und TRPM7 mRNA hergestellt. Die Hybridisierungspositionen der eingesetzten Sonden wurden in der Tabelle 7 aufgelistet.

Gen	Zugangsnummer	Hybridisierungsposition der cRNA-Sonde
TRPC3	NM_019510	+ 1856 bis + 2173 (317 Bp)
TRPC6	NM_013838	+ 2181 bis + 2507 (326 Bp)
TRPV4	NM_022017	+ 353 bis + 601 (248 Bp)
TRPM7	NM_021450	+ 36 bis + 330 (294 Bp)

Tabelle 7: Übersicht über die Hybridisierungspositionen der verwendeten cRNA-Sonden für TRPC3, TRPC6, TRPV4 und TRPM7 mRNA.

3.1.10 Antikörper

Anti-DIG-AP Antikörper	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/AP	Dako Cytomation Denmark, Dänemark
anti-TRPC3	Alomone Labs, Jerusalem
anti-TRPC6	Alomone Labs, Jerusalem
anti-TRPV4	Alomone Labs, Jerusalem
anti-TRPM7	Unicus GmbH, Deutschland
Anti-Rabbit IgG Alexa 568	Molecular Probes, USA

3.1.11 Geräte

BioPhotometer	Eppendorf, Deutschland
Ultra-Thurrax-Homogenisator	Micra, Deutschland
Kühlzentrifuge 5804 R	Eppendorf, Deutschland
Thermocycler Px2	Thermo Electron, Deutschland
Elektrophorese Consort E815	Consort, Belgien
Inkubator 37 °C	Johanna Otto GmbH, Deutschland
TaqMan PCR system 5700 Sequence Detektor	Applied Biosystems, Deutschland
Mikroskop E 400	Nikon, Deutschland
Digitalkamera, HVC 20 N	Hipachi, Japan
Lasermikroskop Nikon, Eclipse, TE 300	Nikon, Deutschland
Ultraschallgerät Sonopuls GM 70	Bandelin Electronic, Deutschland
Elektrophorese Protean II	Biometra, Deutschland
MiniV 8.10 Vertical Gel Elektrophorese	Gibco Life Technologies

3.2 Methoden

3.2.1 **Präparation der Mäusegewebe und Herstellung von Gewebeschnitten**

Für die Studie wurden Balb/c Mäuse, C57Bl/10ScSn/J (C57Bl/10Sc) und C57Bl/10ScSn-*Dmd^{mdx}/J* (mdx) Mäuse am Institut für Pathophysiologie in der Abteilung Versuchstierkunde der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald (EMAU Greifswald) gezüchtet. Sowohl weibliche, als auch männliche Tiere im Alter von 30 d, 100 d und 365 d wurden durch Etherinhalation getötet und folgende Gewebe präparativ entnommen: Leber, Lunge, Milz, Niere, Pankreas, Aorta, Dünndarm, Muskulus tibialis anterior, Muskulus gastrocnemius, Zwerchfell und das Herz. Des Weiteren wurden bei den männlichen Tieren die Samenblase, der Nebenhoden und der Hoden entnommen sowie bei den weiblichen Tieren die Ovarien und der Uterus. Das Gehirn wurde entweder im Ganzen entnommen (für Western Blot, *in-situ* Hybridisierung und Immunfluoreszenz) oder für die Standard RT-PCR und „*Real-time*“ RT-PCR in folgende Kompartimente untergliedert: Stammganglien, Hippocampus, Hirnstamm, Hirnrinde, Vorderhirn und Kleinhirn. Das entnommene Gewebe wurde für die Standard RT-PCR, die „*Real-time*“ RT-PCR und den Western Blot sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die *in-situ* Hybridisierung und die Immunfluoreszenz wurde das entnommene Gewebe in Formalin 24 h fixiert und anschließend am Institut für Pathologie der EMAU Greifswald in Paraffin eingebettet. Durch Einlegen in flüssigem Paraffin und anschließendem Erstarren wurden die Gewebe haltbar gemacht. Von diesen Paraffinblöcken wurden dann 4 µm dünne Schnitte angefertigt, jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger fixiert und diese bei 4 °C gelagert.

3.2.2 **Präparation der Total-RNA aus „weichem“ Mausgewebe und C2C12-Zellen**

Für die Isolierung der RNA aus „weichem“ Gewebe, wie z. B. Niere, Milz und Gehirn, wurden, unter Verwendung des *RNeasy®MiniKit*, max. 30 mg tiefgefrorenes Probenmaterial mittels *Ultra-Thurrax-Homogenisator* homogenisiert und das Standardprotokoll des „*RNeasy®Fibrous Tissue Mini Handbuch*“ verwendet. Die RNA wurde mit 2 x 30 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und anschließend der RNA-Gehalt und die Reinheit mittels BioPhotometer bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C. Die RNA aus den Zellen der C2C12-Zelllinie wurde mit gleichem Protokoll unter Standardbedingungen isoliert.

3.2.3 Präparation der Total-RNA aus „faserhaltigem“ Mausegewebe

Das „faserhaltige“ Gewebe (z.B. Herz, Skelettmuskel, Dünndarm) wurde unter Verwendung des *RNeasy®Fibrous Tissue MiniKit* aufbereitet. Hierzu wurde aus max. 30 mg tiefgefrorenem Probenmaterial mittels Ultra-Thurrax-Homogenisator und Standardprotokoll des „*RNeasy®Fibrous Tissue Mini Handbuch*“ die RNA isoliert. Die Aufnahme der RNA erfolgte in 2 x 30 µl RNase freiem Wasser. Nach Bestimmung des RNA-Gehaltes und der Reinheit wurde die RNA bei -80 °C eingefroren und gelagert.

3.2.4 Umschreibung der RNA in cDNA

Unter Verwendung des *GeneAmp®RNA PCR Kit* wurde von der Sequenz der RNA eine komplementäre Kopie, die cDNA, erzeugt. Dies geschah mit Hilfe der „Reversen Transkriptase“ aus *Murine Leukemia Virus (MuLV)*. Dieses Enzym schreibt aus der Gesamt-RNA nur die Messenger-RNA (mRNA), welche in lebenden Zellen eine Matrize für die Proteinbiosynthese darstellt, um. Zur Erkennung der mRNAs wurde Random-Hexamere benutzt, welche dort sequenzspezifisch binden. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurden 200 ng Total-RNA mit 1 x Puffer, 5,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP's, 20 U Rnase-Inhibitor, 0,125 µM Random-Hexamere und 62,5 U der Reversen Transkriptase versetzt und der Reaktionsansatz mit reinem Wasser auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt. Die Ansätze wurden nun im *Thermocycler Px2* für zehn Minuten auf 25 °C erwärmt, dann für 30 min bei 48 °C gehalten, für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C heruntergekühlt. Die cDNA wurde bei mehrmaliger Verwendung bei 4 °C gelagert oder aber bei -20 °C für einen längeren Zeitraum eingefroren.

3.2.5 Standard RT-PCR (Polymerase chain reaction)

Um bestimmte cDNA-Fragmente zu amplifizieren wurde die Polymerase-Kettenreaktion genutzt. Bei dieser Methode wurde eine denaturierte DNA-Matrix mit der DNA-Polymerase und 2 Primern inkubiert, welche die Synthese komplementärer Stränge einleiteten. Die Primer wurden dabei so ausgewählt, das sie den 5'- bzw. 3'-terminalen Ende des zu amplifizierenden DNA-Segmentes entsprachen. In jedem Zyklus wurden die beiden Stränge der Duplex-DNA zunächst durch Hitzedenaturierung getrennt, dann die Primer komplementär angelagert und schließlich die komplementären Stränge durch die DNA-Polymerase synthetisiert. Multiple Zyklen dieses Prozesses, wobei jedes Mal etwa eine Verdopplung der vorhandenen DNA-Menge stattfand, amplifizierten die DNA exponentiell. Als DNA-Polymerase diente die Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, einem hitzestabilen Bakterienstamm, der in 70 °C heißen Quellen wächst.

Das Enzym besitzt neben seiner 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, wodurch nicht nur neue DNA-Stränge aus der Matrizenvorlage synthetisiert, sondern auch andere, angelagerte DNA-Fragmente, z.B. DNA-Sonden, aufgespaltet werden. Weiterhin ist eine template unabhängige Polymeraseaktivität von Bedeutung, da hierdurch an jeden neu synthetisierten Strang eine zusätzliche Base, ein Adenosin angehängt wird. Für TRPM1 und TRPA1 wurde die Hifi-Taq-Polymerase verwendet, welche eine weiterentwickelte Form der vorhergehenden Polymerase darstellt und noch hitzestabiler ist. Für die Amplifikation wurden 8 ng der cDNA in einem Reaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt. Hinzu kamen 50 pmol der genspezifischen *Forward*- und *Reverse*-Primer, 0,1 µM dNTP und 1 x Puffer, welcher 15 mM MgCl₂ enthielt sowie 3 Units der Taq Polymerase. Bei Verwendung der Hifi-Taq-Polymerase wurden weiterhin 0,0375 µM Mg₂SO₄ hinzugefügt. Der Ansatz wurde mit reinem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Für die immer mitgeführte Negativkontrolle wurde statt der cDNA hochreines Wasser eingesetzt. Die Ansätze wurden im *Thermocycler Px2* für 5 min bei 94 °C denaturiert. Anschließend erfolgte in 40 Zyklen je die Anlagerung der Primer für 15 s bei ca. 54 °C (primerspezifisch), die DNA-Strangsynthese für 30 s bei 72 °C und die Denaturierung des Doppelstranges für 15 s bei 94 °C. Den Zyklen folgte eine 5-minütige Elongation bei 72 °C mit anschließendem Herunterkühlen auf 4 °C. Die erhaltenen PCR-Produkte und ein DNA-Marker zur Identifizierung der Bandengröße wurden auf ein entsprechendes Agarosegel, welches 0,005 % Ethidiumbromid enthielt, aufgetragen. Als Puffer diente eine 1 x TBE-Lösung. Die DNA-Elektrophorese wurde bei 80 mA für ca. 1 h durchgeführt. Die aufgetrennten PCR-Produkte wurden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert und digitalisiert.

3.2.6 Klonierung

Für die Klonierung wurden die PCR-Produkte von nicht eingebauten Nukleotiden und Primern durch die Elektrophorese getrennt und die cDNA-Fragmente unter Verwendung des *GFXTM PCR, DNA and Gel Band Purification Kit* aus dem Agarosegel nach Standardprotokoll isoliert und gereinigt. Das so erhaltene cDNA-Fragment wurde für die Klonierung, unterteilt in nachfolgende Schritte, verwendet.

a) Ligation

Bei der Ligation werden DNA-Enden mit Hilfe einer T₄-Ligase miteinander verbunden. Man unterscheidet hierbei eine Ligation mit glatten Enden, auch „*blunt ends*“ genannt, von einer Ligation mit überstehenden Enden, welches als „*sticky ends*“ bezeichnet wird.

Da bei Verwendung der Taq-Polymerase an die freien Enden der entstehenden cDNA-Fragmente schon automatisch ein dATP angehängt wurde (siehe Abschnitt 3.2.5), erfolgte die zweite Variante der Ligation. Der verwendete Vektor *pGEM-T-Easy* besitzt in der Region des Fragmenteinbaus einen „dTTP“-Überhang (siehe Abschnitt 3.1.7), so dass dort das cDNA-Fragment gezielt andocken kann. Zur Ligation wurden nun cDNA-Fragment und Vektor im Verhältnis 3 : 1 gemischt, wobei nicht mehr als 1 µg DNA eingesetzt wurde. Dem Reaktionsansatz wurden weiterhin 1 x Ligationspuffer und 3 U der T₄-DNA-Ligase zugesetzt und vermischt. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C für 12 - 16 h.

b) Transformation

Der unter a) erhaltene Vektor wurde für die notwendige mengenmäßige Vermehrung in *E. coli*-Bakterien transformiert. Hierfür wurden 2 µl vom Ligationsansatz in 25 µl kompetente Zellen eingebracht, leicht gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für ca. 60 s und Abkühlung auf Eis folgte die Zugabe von 475 µl 1 x Luria-Bertani-Medium (LB-Medium). Anschließend wurden die Bakterien 1,5 h bei 37 °C und 150 U/min geschüttelt und 200 µl auf eine Agarplatte ausplattiert, welche sowohl 0,05 % Ampicillin, als auch IPTG (0,476 mg) und X-Gal (1,75 mg) enthielt. Durch die Einzelkoloniebildung konnte eine Blau-Weiß-Selektion erfolgen (erläutert in Abschnitt 3.1.7), wobei die das cDNA-Fragment enthaltenden Klone weiße Kolonien auf der Agarplatte bildeten und weiter verwendet wurden.

3.2.7 DNA-Präparation aus Bakterien

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA aus den kultivierten Bakterien wurden zunächst mehrere weiße Kolonien pro Agarplatte „herausgepickt“ und in ein 15 ml Falkontube mit 2 ml (Mini-Präparation) bzw. in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml (Midi-Präparation) 1 x LB-Medium mit 0,05 % Ampicillin gegeben. Die Behälter wurden für 12 - 16 h bei 37 °C in Schräglage bei 275 U/min geschüttelt. Die Plasmide wurden unter Verwendung des *RNeasy®MiniKits* bzw. *RNeasy®MidiKits* nach Standardprotokoll isoliert. Die Plasmid-DNA wurde mit 100 µl A. bidest aufgenommen und die Konzentration mittels BioPhotometer bestimmt. Die Lagerung für kurze Dauer erfolgte bei 4 °C und für einen längeren Zeitraum bei -20 °C.

3.2.8 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau mit Restriktionsenzymen diente der Kontrolle der präparierten Plasmid-DNA und für die Liniarisierung des Plasmids. Dazu wurden 10 µl der Probe, welche 5 - 20 µg DNA enthielt, mit jeweils 10 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease sowie mit der entsprechenden Menge des dazugehörenden Puffers versetzt, der Reaktionsansatz mit A. bidest auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und für 1 - 3 h bei vorgegebener Temperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Kontrolle der DNA-Spaltung mit der Agarosegel-Elektrophorese, wobei die Auftragung eines geeigneten DNA-Längenstandards zur Identifizierung der erhaltenen Banden spezifischer Größe diente.

3.2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung diente zur Identifizierung der Basenfolge der klonierten cDNA-Fragmente. Hierfür wurde die Kettenabbruchmethode nach F. SANGER (1977) verwendet. Diese Methode benutzt das Enzym DNA-Polymerase I (DNA-Pol I) aus E. coli, um von der zu sequenzierenden einzelsträngigen DNA eine komplementäre Kopie zu machen. Die DNA-Pol I besitzt neben der größeren Untereinheit, welche die Polymeraseaktivität von 5' nach 3' aufweist, noch eine kleinere Untereinheit, welche eine für 5' - 3' Exonukleaseaktivität katalysiert und den Abbau von Nukleotiden vom 5'-Ende her bewirkt. Für die DNA-Sequenzierung wurde das Enzym gespalten und nur die größere Untereinheit, auch „Klenow-Fragment“ genannt, verwendet, um sicher zu stellen, dass alle replizierten Ketten dasselbe 5'-Ende besitzen. Bei der ursprünglichen Kettenabbruchtechnik wurde die zu sequenzierende DNA mit dem „Klenow-Fragment“ von der DNA-Polymerase I, einem geeigneten Primer, der den Startpunkt vorgab und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten, von denen mind. eines (gewöhnlich dATP) [α - 32 P] markiert war, inkubiert.

Zusätzlich wurde eine kleine Menge des 2', 3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphat-Analogons von einer Base zum Reaktionsgemisch gegeben. Wurde dieses an Stelle des „normalen“ Nukleotids eingebaut, so endete das Kettenwachstum abrupt, da keine freie 3'-OH-Gruppe mehr vorhanden war. So konnte ein ganzer Satz verkürzter Ketten erzeugt werden, welche auf einem Sequenzierungsgel elektrophoretisch nach ihrer Länge aufgetrennt und somit die Positionen der betroffenen ersetzten Basen angezeigt wurden. Jedes der Dideoxy-Analoga der 4 Basen wurde ein einem separaten Reaktionsgefäß verwendet und die entstehenden Reaktionsprodukte auf einem Sequenzierungsgel in parallelen Lauflinien elektrophoretisch getrennt. Die Sequenz des replizierten Stranges konnte dann direkt vom Autoradiogramm des Gels abgelesen werden.

Für ein schnelleres, automatisiertes Verfahren wurde die Kettenabbruchmethode einem computergesteuerten Verfahren angepasst. Anstelle der Verwendung radioaktiv markierter Nukleotide wurde jedes Desoxyribonukleosidtriphosphat kovalent mit jeweils einem unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoff konjugiert. Die Kettenverlängerung erfolgte in einem einzigen Reaktionsgefäß, das alle vier unterschiedlich fluoreszierenden Didesoxy-Analoga enthielt. Bei der Polymerase-Reaktion entstand ein Satz von Polynukleotiden verschiedener Länge, die jeweils ein Fluoreszenzspektrum aufwiesen, welches für das am 3'-Ende eingebaute modifizierte Nukleotid charakteristisch war. Die Reaktionsmischung wurde auf einem Sequenzierungsgel in einer einzigen Lauflinie elektrophoretisch getrennt, was zu einer Serie von Banden führte, deren Fluoreszenzspektrum sukzessiv die Basenabfolge der zu sequenzierenden DNA lieferte. Für die Sequenzierung wurden 200 ng der DNA in einem Volumen von 4 µl mit 2 µl 5 x Sequenzerpuffer versetzt und mit derselben Menge *BigDye® Terminator 3.1* und T-7 Primer auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht. Die Proben wurden nun im *Thermocycler Px2* für 1 min bei 96 °C denaturiert und 25 Zyklen mit je 10 s bei 96 °C, 5 s bei 50 °C und 4 min bei 60 °C vollzogen. Das Reaktionsprodukt wurde gekühlt und anschließend aufgereinigt. Dazu wurden dem Ansatz 2 µl 125 mM EDTA-Lösung (pH 8,0), 500 µl 96 %iges Ethanol und 2 µl 3 M Na-Acetat (pH 4,8) zugefügt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 11000 U/min und 4 °C wurde das Pellet mit 70 %-igen Ethanol gemischt und nochmals 15 min bei 4 °C und 11000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde nun vollständig entfernt und das Pellet bei 37 °C getrocknet. Diesem wurden dann 20 µl deionisiertes Formamid hinzugefügt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Sequenzierung musste das Reaktionsvolumen nun für 2 min bei 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis gelagert werden. Die Proben wurden im *ABI Prism 310 Sequenzer Analyzer* analysiert und mittels „*ABI Prism™ Collection Software Version 1.2.2*“ ausgewertet.

3.2.10 Quantitative „*Real-time*“ RT-PCR

Die modernste Methode der Quantifizierung von Nukleinsäuren stellt die quantitative „*Real-time*“ RT-PCR, auch quantitative Echtzeit-RT-PCR genannt, dar, bei der sich die Amplifikationsrate in den einzelnen Zyklen verfolgen lässt. Dabei wird die 5' - 3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase genutzt, indem der PCR-Reaktion ein drittes, markiertes Oligonukleotid zugefügt wird, dessen 3'-Ende blockiert ist, so dass es nicht als Primer fungiert. Das dritte Oligonukleotid wird so gewählt, dass es zwischen den beiden Primern hybridisiert. Während der Neustrangsynthese baut die Polymerase das dritte Oligonukleotid ab und lässt die im Folgenden erläuterte Detektion zu.

Erfolgte die Detektion früher über radioaktive Markierung, so basiert die neuere Technik auf der Ausnutzung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers. Hierbei lässt sich ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) mit Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen und strahlt die aufgenommene Energie anschließend in Form von Licht einer anderen Wellenlänge wieder ab. Anregungs- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes sind dabei für diesen charakteristisch. Bringt man allerdings ein weiteres Fluorochrom, dessen Anregungsspektrum dem Emissionsspektrum des ersten entspricht, in eine ausreichende Nähe des ersten Fluorochroms, so wird die durch das erste Fluorochrom abgestrahlte Energie direkt zum zweiten übertragen, welches seinerseits Licht einer anderen, spezifischen Wellenlänge abstrahlt. Je nach Versuchsaufbau kann nun die Abstrahlung der Energie des ersten Fluorochroms oder die des zweiten verfolgt werden. Wird die erste Variante praktiziert, so bezeichnet man das erste Fluorochrom als *Reporter* („report“ = engl. berichten) und das zweite Fluorochrom als *Quencher* („quench“ = engl. löschen). Aus der Kombination von PCR-Gerät mit Fluoreszenzdetektion und dem oben erläuterten Verfahren entstand unter anderem die Nachweismethode nach dem TaqMan-Prinzip. Hierbei sitzen Reporter und Quencher auf demselben dritten Oligonukleotid, vorzugsweise am 5'- und 3'-Ende. Bei intaktem Oligonukleotid ist die Lichtaussendung des Reporters gering. Wird der Reporter aber durch die Polymerase, welche das Oligonukleotid zerstückelt, freigesetzt, steigt die Lichtemission der spezifischen Wellenlänge des Reporters an. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr Reporter-moleküle werden freigesetzt und entsprechend steigt die Signalstärke.

Dieses Prinzip wurde für die Quantifizierung der mRNA-Expression verwendet, welche mit Hilfe des *TaqMan PCR System 5700 Sequence Detektor* durchgeführt wurde. Hierbei wurden dem 8 ng cDNA enthaltenden Reaktionsansatz neben den spezifischen Primern und 1 x *TaqMan Universal Mastermix* zusätzlich genspezifische Sonden hinzugefügt, welche alle am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM: 6-carboxy-fluorescein) markiert und am 3'-Ende mit einem Quencher (TAMRA: 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) versetzt wurden (siehe oben). Der Ansatz wurde mit reinem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Proben wurden jeweils als Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und im *TaqMan PCR System* analysiert. Dabei wurden die Proben zunächst für 2 min auf 50 °C erwärmt, dann für 10 min bei 95 °C erhitzt und durchliefen 40 Zyklen mit jeweils 15 s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Nach dem oben beschriebenen Prinzip wurde das laserinduzierte Fluoreszenzsignal detektiert. Die Menge der entstandenen DNA-Kopien wurden anhand einer immer mitgeführten Standardreihe ermittelt, welche definierte DNA-Mengen enthielt. Die im Verlaufe der Reaktion erhaltenen Fluoreszenzsignale dieser Standardreihe entsprachen 10^2 bis 10^6 Kopien.

So konnte das Programm anhand des negativen linearen Anstieges des Fluoreszenzsignals zum Logarithmus der Kopienzahl dem Fluoreszenzsignal einer bestimmten Probe eine bisher unbekannte Kopienzahl zuordnen. Die so für jedes Gen erhaltene mRNA-Quantität in Form der Kopienzahl wurde für die Auswertung ins Verhältnis der ermittelten Kopienzahl der 18S rRNA derselben cDNA gesetzt und der Quotient mit 1000 multipliziert. Die Auswertung erfolgte für $n = 3 - 10$ Tiere pro Gen und Gewebe. Die erhaltenen Daten wurden als Mittelwert (\bar{x}) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Für die Bestimmung der signifikanten Änderungen bei dem Gesamtscreening wurde der ungepaarte *Student's t-Test* mittels „Sigma Plot“-Programm durchgeführt, während für die zeitabhängige Ermittlung der unterschiedlichen Expressionen in Kontroll- und mdx-Mäusen die statistische Kalkulation durch den *t-Test* mittels „GraphPad Prism 4“ erfolgte. Die statistisch signifikanten Unterschiede wurden wie folgt sichtbar gemacht: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$.

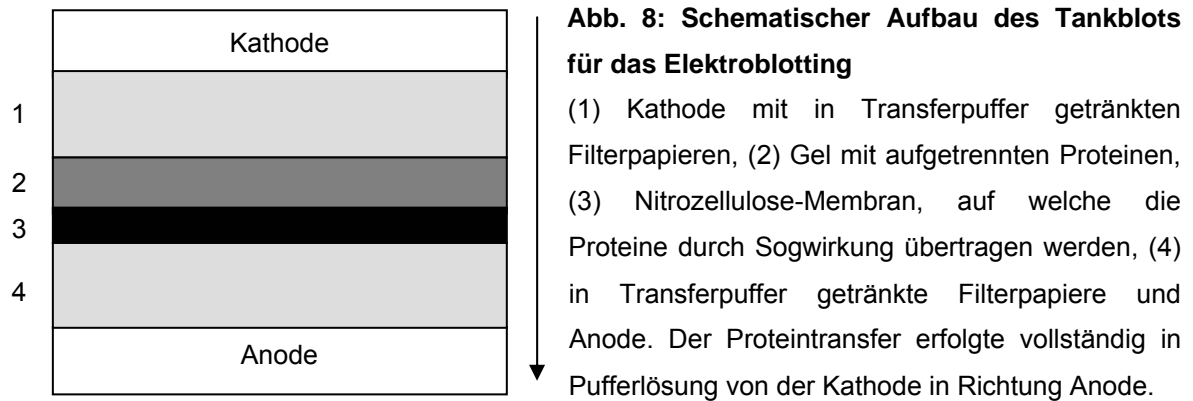
3.2.11 Protein-Elektrophorese und Western Blot

Durch den Western Blot war eine Detektion eines bestimmten Proteingehaltes möglich. Dazu wurden die Proteine einer Probe zunächst elektrophoretisch aufgetrennt, durch „Blotten“ auf eine Nylonmembran übertragen und mit einem spezifischen Antikörper versehen, welcher nur an das zu analysierende Protein gebunden hatte. An diesen ersten Antikörper konnte nun ein zweiter Antikörper spezifisch binden, welcher wiederum mit einer alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert war. Die so an die Membran fixierte Phosphatase war dann in der Lage ein spezifisches Substrat umzuwandeln und eine Farbreaktion hervorzurufen.

Für die Durchführung wurden 30 mg tiefgefrorenes Gewebe in 250 μ l 1 x Tris/HCL-Puffer mit $MgCl_2$ sowie 0,4 % Proteaseinhibitor auf Eis aufgetaut und mittels manueller Zerstampfung (Pottern) zerkleinert. Das Gefäß (Potter) wurde 2 x mit jeweils 250 μ l desselben Puffers nachgespült und die Lösungen vereinigt. Es folgte eine Behandlung mit Ultraschall für 10 s auf Eis und eine Zentrifugation bei 4 °C für 1 h bei 10.000 U/min. Der Überstand wurde abgetrennt, das Pellet mit 500 μ l desselben Puffers aufgenommen, nochmals kurz für 10 s mit Ultraschall behandelt und sowohl der Überstand, als auch das Pellet bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen erfolgte die Proteinbestimmung mittels *BCA-Methode* bei 490 nm. Für die weitere Verwendung wurden 30 μ g aliquotiert und ebenfalls eingefroren.

Für die Durchführung der SDS-Gel-Elektrophorese wurden die Aliquots mit A. bidest auf ein Volumen von 15 μ l aufgefüllt und mit der entsprechenden Menge *Roti®-Load 1* versetzt. Nach Mischen wurde der Ansatz für 10 min bei 70 °C denaturiert und anschließend auf ein 7,5 %iges Acrylamid-Gel aufgetragen.

Die Proteinauftrennung erfolgte mit der Elektrophoreseapparatur *Protean II* bei 30 mA und 50 mV in 1 x SDS-Laufpuffer. Danach wurde das Gel in 1 x Laufpuffer für 30 min bei 4 °C gewaschen und die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher&Schuell, Protran Nitrocellulose Transfer Membrane) überführt. Der schematische Aufbau des Tankblots ist in der Abbildung 8 dargestellt.



Der Transfer erfolgte mit der *Gibco-BRL MiniV 8.10 Vertikal Gel Elektrophorese* bei 150 V und 400 mA bei 4 °C für eine Stunde, bzw. bei 30 V und 50 mA über Nacht. Nach dem Transfer wurde die Membran mit A. bidest gespült und durch Trocknen die Proteine auf der Membran fixiert. Anschließend wurde die Membran mit A. bidest befeuchtet, zum sichtbar machen der Proteine für 5 min mit *Ponceau S Lösung* behandelt und abermals mit A. bidest gespült. Die sichtbar gewordenen Proteinbanden wurden protokolliert und *Ponceau S* mit 1 x PBS entfernt. Dem schloss sich die Blockierung mit 5 % Magermilch in 1 x PBS mit 0,025 % Natriumacid für 2 - 3 h bei RT an. Der Antikörper anti-TRPC3 wurde 1 : 200, anti-TRPC6, anti-TRPV4 und anti-TRPM7 1 : 100 in Blockinglösung verdünnt und die Membran bei 4 °C für 12 – 16 h inkubiert. Als Kontrolle wurden die Antikörper mit den spezifischen Antigenen für 1 h bei RT, dann für 12 - 16 h bei 4 °C vorinkubiert und anschließend genauso und zeitgleich verwendet, wie die unbehandelten Antikörper.

Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit 1 x PBS + 0,05 % Tween folgte für 2 h bei RT die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (*Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/AP*, 1 : 1.000 in 5 % Magermilch / PBS). Der ungebundene 2. Antikörper wurde letztlich heruntergewaschen. Die an den 2. Antikörper gebundene alkalische Phosphatase konnte nun in einer Substratlösung aus NBT / BCIP seine enzymatische Aktivität entfalten und dabei eine Farbreaktion hervorrufen. Die Färbung erfolgte bei RT im Dunkeln unter Sichtkontrolle für 1,5 - 12 h. Die spezifischen Proteine erschienen als dunkelviolette Banden, wobei die Intensität der Bande eine quantitative Beurteilung mittels „*GelScan*“-Programm zuließ.

3.2.12 *in vitro* Transkription

Mit Hilfe der *in vitro* Transkription war es möglich, Nukleinsäuren spezifisch zu markieren. Dazu wurde die Plasmid-DNA an geeigneter Stelle durch Verdau linearisiert, gereinigt und die Konzentration bestimmt. Nun konnten die T7-Polymerase, bzw. die SP6-Polymerase, an den Promotorregionen andocken, welche sich dicht neben dem eingebauten cDNA-Fragment im Plasmid befanden (Vergleich mit Plasmidkarte in Abb. 7). Ausgehend von den Promotoren folgte die Synthese von cRNA-Fragmenten und damit der Einbau von, mit Digoxigenin (DIG) markierten, dUTP. DIG stellt ein Glykosid aus *Digitalis purpurea* (Fingerhut) dar, welches den Vorteil einer hohen Spezifität und eines geringen Hintergrundes mit sich bringt. Dies beruht auf der Tatsache, dass Digoxigenin als Naturstoff in Form der Lanatosid-Verbindung ausschließlich im Fingerhut vorkommt und die verwendeten DIG-spezifischen Antikörper daher keine zellinhärenten Komponenten anderer biologischer Materialien erkennen.

Die Synthese der cRNA-Fragmente endete an der, durch Verdau geschnittenen Stelle automatisch, so dass nur das gewünschte Produkt synthetisiert wurde. Für die Synthese wurde 1 µg der linearisierten DNA mit gereinigtem Wasser auf 13 µl aufgefüllt. Zum Reaktionsansatz wurden anschließend 1 x *NTP labeling mix* gegeben, welcher neben dATP, dGTP und dCTP auch das markierte dUTP enthielt. Die weitere Durchführung erfolgte unter Standardbedingungen unter Verwendung des *DIG RNA Labeling Kits (SP6/T7)*. Die Konzentration der so entstandenen cRNA-Sonden wurde mittels BioPhotometer bestimmt und die Sonden bei -80 °C gelagert.

3.2.13 Tüpfeltest

Die Markierungseffizienz der cRNA-Sonden wurden mittels Tüpfeltest überprüft. Dazu wurden jeweils 1 µl der unverdünnten, einer 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1.000, 1 : 10.000 und 1 : 100.000 Verdünnung der cRNA-Sonde auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgetragen. Die cRNA-Sonde wurden durch trocken und beidseitigem 2-minütigen „UV-Crosslinken“ an die Membran gebunden und unter Verwendung des *DIG Wash and Block Buffer Sets* unter Standardbedingungen visualisiert. Die Inkubation mit Anti-DIG-AP-Lösung (1 : 10.000) erfolgte hierbei für 30 min. Die Färbedauer mit der NBT/BCIP-Lösung lag bei RT zumeist bei 12 – 16 h. Anschließend wurde die Membran getrocknet, in Folie eingeschweißt und im Dunkeln aufbewahrt.

3.2.14 *in-situ* Hybridisierung

Mit der *in-situ* Hybridisierung ist es möglich, spezifische mRNA-Sequenzen an Ort und Stelle (*in-situ*) zu detektieren. Hierbei werden die genspezifischen cRNA-Sonden wie markierte Antikörper verwendet und durch Bildung von RNA-RNA-Hybriden, welche auf nicht-kovalente Wasserstoffbrückenbindungen beruhen, das spezifische Gen im Gewebe durch differenzierte Anfärbung lokalisiert.

Die Konstruktion der cRNA-Sonden wurde bereits unter 3.2.12 beschrieben und die Herstellung der benötigten 4 µm Gewebeschnitte wurde unter 3.2.1 geschildert. Die Gewebeschnitte wurden für 30 min in Xylol entparaffiniert und dieses durch verschiedene Waschschriffe mit fallender Ethanolreihe (100 %, 96 %, 70 %) entfernt. Nach Waschen mit 1 x PBS und 5-minütiger Fixierung in 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) erfolgte die Permeabilisierung in einer Pepsinlösung (0,75 g / ml) für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde nochmals mit 4 %igem PFA für 20 min bei 4 °C fixiert. Nach der 15-minütigen Acetylierung mit 0,4 % Essigsäureanhydrid in Triethanolamin und Waschen mit 50 % Formamidpuffer in 1,5 % SSPE-Lösung wurden die Schnitte für 1 h bei 56 °C oder 58 °C mit je 50 µl Prähybridisierungslösung (50 % Formamid, 50 % Lösung D, 0,5 % Blockingreagenz und 210 µg/ml t-RNA) vorinkubiert. Die Hybridisierung mit 125 ng Digoxigenin-markierten, genspezifischen cRNA-Sonden erfolgte für 14 - 16 h bei gleicher Temperatur, wobei immer jeweils die Sense- und die Antisense-Sonde auf einem Objektträger aufgetragen wurden. Dadurch konnte eine identische Behandlung der Negativkontrolle (sense) und der positiven Sondenreaktion (antisense) gewährleistet werden. Nach Bildung der RNA-RNA-Hybride erfolgte in weiteren Schritten die Detektion des Digoxigenins. Die Sondenlösung wurde dazu mit 2 x je 50 µl Prähybridisierungslösung heruntergewaschen und die Schnitte mehrfachen, verschiedenen Waschschriffen mit SSC und 1 x PBS unterzogen. Es folgte die Inkubation für 1 h bei RT mit Blockinglösung (0,1 % Tween, 0,2 % Triton, 2 M NaCl, 1 x Maleat, 1 % Blocking Reagent) und die anschließende Antikörper-Inkubation für eine weitere Stunde in einer feuchten Kammer mit 0,076 U pro Schnitt Anti-DIG-AP Antikörper, welcher mit einer alkalischen Phosphatase verbunden war. Nachfolgend wurde mittels NBT/BCIP-Substrat (0,402 mM Nitroblau-tetrazolium Chlorid / 0,768 mM 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol Phosphat, 2,2 mM Levamisol) in 1 x AP-Puffer mit 0,2 M MgCl₂ die gebundene Phosphatase sichtbar gemacht. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C im Dunkeln bei Sichtkontrolle. Nach Abstoppen der Reaktion wurden die Schnitte mit gelöster Glycerolgelantine versiegelt und mit einem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung und integrierter Digitalkamera fotografiert. Die positive Reaktion wurde als violette Färbung sichtbar.

3.2.15 Nachweis von TRP-Kanäle mittels der Immunfluoreszenz-Technik

Mit dieser Methode waren Proteine *in-situ*, also am Ort ihres Entstehens, der Funktion oder ihres Abbaus, innerhalb eines Gewebes lokalisierbar. Die Immunfluoreszenz wurde 1941 von dem Mikrobiologen Albert Coons eingeführt und seit dem als variierbare Standardmethode zur meist qualitativen Erkennung bestimmter Antigene genutzt. Bei der indirekten Immunfluoreszenz inkubiert man das histologische Gewebe mit einem Antikörper, der das gesuchte Epitop spezifisch erkennt. Dieser so genannte Primär-Antikörper stammt von einem bestimmten Tier (z.B. vom Kaninchen). Nach der Inkubation werden alle überschüssigen Antikörper, die nicht an das Epitop gebunden hatten, ausgewaschen. Im zweiten Schritt erfolgt eine Inkubation mit einem Sekundär-Antikörper. Dieser ist speziell gegen die Immunglobuline des Wirtstieres gerichtet und bindet an den Primär-Antikörper. Der Sekundär-Antikörper seinerseits ist mit einem einen Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt. Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop kann dieser durch Licht spezifischer Wellenlänge, z.B. mit einem Laser, angeregt werden. Der Farbstoff fluoresziert dann in einer definierten Wellenlänge, wodurch die gesuchten Proteine sichtbar gemacht werden, weshalb die Methode auch Immunfluoreszenz genannt wird.

Für die Immunfluoreszenz wurden die 4 µm Schnitte des gleichen Parafinblockes zweimal für je 10 min in Xylol entparaffiniert und das Xylol durch eine fallende Ethanolreihe (100 %, 96 %, 70 %) entfernt. Nach Waschen mit A. dest folgte ein 4-maliges, 5-minütiges Aufkochen der Schnitte in Citratpuffer (pH 6,0). Nach Abkühlung und Waschung der Schnitte mit 1 x PBS erfolgte die Blockierung mit Ziegenerum (*Vectastain ABC-Kit*) für 20 min bei RT in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde zweimal für je 5 min mit 1 x PBS und darauf folgend dreimal für je 5 min mit 1 x Tris/HCl gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper (verdünnt 1 : 200 in *ChemMate™ Target Retrieval Lösung*) über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Darauf folgend wurde der erste Antikörper mit 1 x Tris/HCl + 0,02 % Tween für 5 min heruntergewaschen und je Schnitt mit 0,3 µg des Sekundärantikörpers *Anti-Rabbit IgG Alexa 568* für 2 - 3 h bei RT inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der nicht gebundene Sekundärantikörper mit 1 x Tris/HCl + 0,02 % Tween heruntergewaschen und die Schnitte mit 1 x Tris/HCl zweimal für je 5 min geschwenkt. Nun erfolgte die Anfärbung der Kerne mit 0,1 µM *SYTOX®Green* für 10 min bei RT. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagerte sich in die Doppelhelix der DNA ein und konnte später unter Anregung mit der Wellenlänge von 488 nm nachgewiesen werden. Die überstehende Lösung wurde mit 1 x Tris/HCl heruntergewaschen und die Objektträger anschließend unter Verwendung des *Fluorescent Mounting Medium* versiegelt. Unter Anregung der entsprechenden Wellenlängen mit einem konvokalen Lasermikroskop (Nikon) wurde die Schnitte fotografiert und die Bilder digitalisiert.