

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Advanced Biotechnologies, Hamburg

- DNA-Polymerase (thermostabil) aus *Thermus icelandicus*
- 25 mM MgCl₂-Lösung für PCR
- PCR-10-fach-Puffer (75 mM Tris-HCl, pH: 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄)

AGS GmbH, Heidelberg

- Qualex Gold Agarose (für DNA und RNA)
- RNase Zap

Amresco/Biometra GmbH, Göttingen

- Natronlauge (Pellets), Reinheit > 99 %

Becton Dickinson, Berlin

- 50 ml Blue Max-Reaktionsgefäße
- Primaria-Petrischalen
- sterile Einwegpipetten, 10 ml

Biochrom KG/Seromed, Berlin

- Hanks´ Salt Solution (HSS)
- MCDB 131 (Knedler, A.; Ham. R. G., 1987)
- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)
- Trypsin/EDTA Lösung (500 U Trypsin + 180 µg EDTA/ml in PBS)
- Kollagenase II (Trockensubstanz), spez. Aktivität:
125-250 Mandl-Einheiten/mg, aus Clostridium histolyticum

Boehringer Mannheim, Mannheim

- ECGF (aus Rinderretina; 12 ng/µl)

Braun Melsungen, Melsungen

- Ringerlösung

Collaborative Research, Bedford

- Dispase (0.012%, 5.000 U/ml)

Dynal, Hamburg

- paramagnetische Beads: beschichtet mit Ulex europäus-1 Lektin

Falcon, Heidelberg

- Zellkulturflaschen (T-75/T-25)

Kimberley-Clark, Mülheim-Kärlich

- fusselfreie Papiertücher (Kimwipe)

Karow, Berlin

- Nylonnetz (200 µm)

Kodak, Stuttgart

- X-OMAT Scientific Imaging Film, Format 24 cm x 30 cm

Life Technologies GmbH, Eggenstein

- Puffer für die reverse Transkription (50 mM Tris-HCl, pH: 8,3)

MWG Biotech GmbH, Ebersberg

- Oligonukleotide als Primer für PCR

New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus

- 100 bp DNA-Ladder, N3231S
- RNA-Ladder (Bright Star™ Biotinylated RNA Millennium™ Markers)

Novagen/Böhringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg

- Mineralöl für PCR

Pharmacia Biotech

- Oligo-dT's pd(T)₁₂₋₁₈ für reverse Transkription

Promega/Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg

- 25 mM MgCl₂-Lösung für PCR
- Natriumacetat 3 H₂O

- Tris-Base [$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$]
- M-MLV reverse Transkriptase

PromoCell, Heidelberg

- Supplement Pack MV für MCDB 131 (25 ml fetales Kälberserum, 2 ml endothelialer Wachstumszusatz / Heparin, 5 μg hEGF, 500 μg Hydrokortison, 25 mg Gentamicinsulfat)

Roth-Chemie GmbH & Co, Karlsruhe

- Diethylcyanophosphonat (DEPC)
- Ethanol (70% und 95%)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
- Ethidiumbromid
- Formaldehyd (37%), stabilisiert mit 10 % Methanol
- MOPS ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$), Pulver
- Sodiumdodecylsulfat (SDS), Pulver
- Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen
- Trinatriumcitratdihydrat, Pulver

Schleicher & Schuell, Dassel

- Nylonmembran (Nytran SuPerCharge)
- Chromatographiepapier (Nytran TurboBlotter-System), GB 002, GB004

Seromed, Berlin

- Medium 199 (fetales Kälberserum 20 %, Streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Penicillin 100 U/ml, ECGF 10 ng/ml)

Serva, Heidelberg

- Trypsin (0,012%, 1:250)

Sigma-Chemie GmbH, Deisenhofen

- Natriumchlorid
- β -Mercaptoethanol
- Krebs-Henseleit Puffer
- Kollagenase II (0,074%)
- Kälberserum-Albumin (Fraktion V, 7,5%)
- Streptomycin (100 μ g/ml)
- Penicillin (100 U/ml)
- HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)
- Ulex europäus-1 Lektin (für paramagnetische Beads)
- Progesteron 1 mg

Tebu, Frankfurt a. M.

- rekombinanter humaner VEGF (gewonnen aus E. coli)

2.1.3 Puffer und Lösungen

Es wurden folgende Puffer und Lösungen angesetzt:

Assay-Puffer 10 x aus: 4,8 g Tris Base 200 mM + 0,4 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mM

Blockierungspuffer aus: 150 ml Washing Buffer + 0,3 g I-Block Pulver (Tropix, Bedford, USA), zusammen erhitzen

DEPC-Wasser aus: Aqua bidest 500 ml + 500 μ l DEPC; DEPC in Flasche mit 500 ml Aq. Bid.; nach Verschluss kräftig schütteln und über Nacht auf "schiefer Ebene" weiterschwenken lassen; 2 x für 50 min. bei 1 bar autoklavieren

FA Puffer aus: MOPS 41,9 g, Na-Acetat $3\text{H}_2\text{O}$ 6,8 g, 20 ml EDTA 0,5 M, DEPC- H_2O (auf 1000 ml auffüllen)

<u>PBS</u> 5 x aus:	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (0,58 M) 51,6 g, NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (0,17 M) 11,7 g, NaCl (0,68 M) 20 g, Aqua bidest (auf 1000 ml auffüllen)
<u>Laufpuffer</u> aus:	FA Buffer 10 x 100 ml, Formaldehyd (37%) 20 ml, DEPC-H ₂ O (auf 1000 ml auffüllen)
<u>SDS 20%</u> aus:	SDS 40 g, Aqua bidest (auf 200 ml auffüllen)
<u>SSC</u> 20 x aus:	NaCl 175,3 g, Na-Citrat 88,2 g, Aqua bidest (auf 1000 ml auffüllen)
<u>TBE</u> 5 x aus:	54 g Tris-Base; 27,5 g Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen.
<u>Waschlösung 1</u> aus:	450 ml Aqua bidest, 50 ml SSC 20 x, 2,5 ml SDS 20 %
<u>Waschlösung 2</u> aus:	500 ml Aqua bidest, 2,5 ml SSC 20 x, 2,5 ml SDS 20 %
<u>Waschpuffer</u> aus:	5 x PBS 400 ml, SDS 20% 50 ml, Aqua bidest 1550 ml

2.1.3 Kits

Folgende kommerziell erhältliche Kits wurden verwandt:

Lig'n Scribe

(Ambion/ams Biotechnologie, Wiesbaden): – Sondenbau

Northern Max

(Ambion/ams Biotechnologie, Wiesbaden): – Northern Blotting

North 2 South Biotin in vitro Transcription Kits

(Pierce; Rockford, USA): – Sondenbau

Quiaquick Kit

(Quiagen, Hilden): – Sondenbau/PCR

RNeasy

(Quiagen, Hilden): – RNA-Isolierung

Southern-Star/CDP-Star-Kit

(Tropix/Applied Biosystems,
Foster City, Kalifornien, USA): – Nachweis von Sonden

2.1.4 Geräte

CO₂-Begasungsbrutschrank: Typ B 50 60 EK/CO₂ (Heraeus GmbH, Hanau):
– Kultivierung von Endothelzellen

Elektrophoresekammer: Typ 59665 (MWG-Biotechnologie, Ebersberg):
– Gelelektrophoresen

Hybridisierungsöfen: Typ Shake`n Stack, mit integrierter Rotations- und Wippvorrichtung (Hybaid, Teddington, England):
– Prähybridisierungen, Hybridisierungen;
Waschvorgänge (Northern Blot)

Infrarotlichtschranke: (Siemens, Cupertino, Kalifornien, USA):
– Messung der Winkelgeschwindigkeit des Kegels

- Kegel-Platte-System: das Gerät wurde in der institutseigenen Werkstatt gebaut, seine Funktionsweise ist unter 2.2.2 detailliert dargestellt.
- Quecksilber-Viskosimeter: (Coulter Electronics LTD, Luton, Bedfordshire, Großbritannien):
- zur Bestimmung der Viskosität des Zellkulturmediums
- Reinraumwerkbank: Typ Laminair HB 2448 (Heraeus GmbH, Hanau):
- alle Arbeiten mit lebenden Zellen
- Spektrophotometer: Typ Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Cambridge, England):
- Messung von DNA- und RNA-Konzentrationen
- Thermocycler: Typ Thermoblock Uno-II (Biotron, Göttingen):
- PCR
- Tansferapparat: Typ TurboBlotter (Schleicher & Schuell, Dassel):
- Northern Blot
- UV-Leuchtschirm: Typ OJ II (Victor Recker Krankenhaus- und Laborbedarf, Berlin):
- RNA-Fixation, Blot-Aufnahmen
- Wipptisch: Typ WT 15 Standard Wipptisch „Rocking Platform“ (Amresco/Biometra GmbH, Göttingen):
- Waschvorgänge, Sondennachweis

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Endothelzellen wurden aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) gewonnen (Jaffe, E. A. et al., 1973). Dazu wurden die Nabelschnüre nach Trennung von der Plazenta in HSS bei 4°C aufbewahrt. Mit einer Knopfkanüle erfolgte die Sondierung der Vene, Blutrückstände wurden durch Spülen mit 50 ml PBS entfernt. Zur Ablösung der Endothelzellen wurde die Vene mit einer Nabelschnurklemme verschlossen und mit Kollagenase Typ II (0,2 % in PBS) bei 37°C für 15 min inkubiert. Nach Spülen der Außenseite mit Ethanol 70% wurde das untere Ende der Nabelschnur oberhalb der Klemme abgeschnitten und der austretende Inhalt in einem Blue-Max-Reaktionsgefäß aufgefangen. Es folgten zwei weitere Spülungen mit je 20 ml HSS. Dann wurden die Endothelzellen pelletiert (5 min bei 200 g) und der Überstand verworfen. Unter den sterilen Arbeitsbedingungen einer Reinraumwerkbank wurde das Zell-Pellet in 10 ml Kulturmedium (MCDB 131: Knedler, A.; Ham. R. G., 1987) und Supplement Pack MV[®] (25 ml fetales Kälberserum, 2 ml endothelialer Wachstumszusatz (Heparin, 5 µg hEGF, 500 µg Hydrokortison, 25 mg Gentamicinsulfat) resuspendiert. Die Zellen wurden in eine mit Fibronectin beschichtete Zellkulturflasche eingesät und bei 37°C, 5% CO₂ und 99% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage erneuert. Nach 4-10 Tagen erreichten die Endothelzellen vollständige Konfluenz.

Konfluente HUVEC wurden geerntet, um sie zu passagieren. Zunächst wurde das Medium verworfen und zweimal mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gespült. Pro Flasche wurden 5 ml Trypsin (0,5 %) / EDTA (0,2 %) hinzupipettiert und die Zellkultur für ca. 5 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach noch haftende Zellen wurden durch Beklopfen der Flaschenunterseite abgelöst. Die Suspendierung der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Es folgte Zugabe von 10 ml PBS und Aufnahme der Zellsuspension in ein steriles 50 ml-Zentrifugenröhrchen. Nach Zentrifugation (200×g, 5 min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet resuspendiert, die Zellen in 20 ml Medium aufgenommen und in zwei neue Petrischalen oder Zellkulturflaschen eingesät. Nach erneuter Konfluenz wurden die Zellen mit Testsubstanzen

(VEGF, Progesteron) stimuliert oder einer definierten Strömung ausgesetzt. Einige Zellkulturen wurden über diese erste Passage hinaus bis zur vierten Passage kultiviert. Nach Durchführung der entsprechenden Experimente wurden die Zellen wie beschrieben geerntet, pelletiert, in etwa 1 ml PBS resuspendiert, in ein steriles Kryoröhrchen transferiert, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff bei -196°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Neben HUVEC wurden HCEC (human coronary macrovascular endothelial cells) und HCMEC (human coronary microvascular endothelial cells) sowie HUAEC (human umbilical arterial endothelial cells) untersucht (Zakrzewicz, A. et al., 1997).

Zur Isolierung von HCEC wurden Segmente der epikardialen Koronararterien unmittelbar nach Explantation des Herzens herausgeschnitten und vorerst in eiskaltem Medium 199 gelagert. Innerhalb der folgenden 24 Stunden wurden die Gefäße von umgebendem Gewebe gereinigt und danach in 0,2 %-iger Kollagenase II bei 37°C für 30 min inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit Medium 199 aus den Gefäßen herausgespült. Nach Pelletierung wurden die Zellen in Gelatinebeschichtete T-25 Flaschen ausgesät. Die Zellen wuchsen in Medium 199, mit 20% gepooltem Humanserum, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 10 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethanesulfonsäure-Puffer (HEPES), 10 ng/ml ECGF (endothelial cell growth factor) und 50 $\mu\text{g/ml}$ Heparin enthielt, bei 5 % CO_2 , 37°C und 99% Luftfeuchtigkeit.

Zur Isolierung von HCMEC wurde unmittelbar nach der Explantation des Herzens ein Muskelsegment von ca. 25 g Gewicht, das dem von einer Koronararterie versorgten Areal (meistens das der linken absteigenden Arterie) entspricht, herausgeschnitten und in Ringerlösung bei 4°C bis zu 24 Stunden aufbewahrt. Die Oberfläche des Muskelsegments wurde kurz mit 70 %-igem Ethanol gespült, um die endokardialen Endothelzellen zu devitalisieren. Dann wurde das Präparat in einem modifizierten Langendorff-Perfusionssystem befestigt. Nach Einlegen einer Kanüle in die Koronararterie wurde das Segment mit Krebs-Henseleit Puffer mit Ca^{2+} , dann ohne Zusatz von Kalzium bei 37°C durchspült. Dann wurde der Herzmuskel durchspült mit einer

Enzym-Lösung, bestehend aus Kollagenase II (0,074 %), Dispase (0,012 %, 5.000 U/ml), Trypsin (0,012 %) und Kälber-Serumalbumin (0,27 %) in kalziumfreiem Krebs-Henseleit Puffer. Der Perfusionsdruck wurde auf 60 cm H₂O eingestellt. Nach 30-minütiger Perfusion wurde das schon teilweise zersetzte Gewebe weiter in der Enzymlösung für 20 min. verdaut. Das unverdaute Gewebe wurde mittels Filtrierung durch ein Nylonnetz (200 µm Maschenweite) zurückgehalten, während Kapillarfragmente das Netz passierten. Die Kapillarfragmente wurden pelletiert und anschließend in vier Gelatine-beschichtete T-75 Flaschen ausgesät. Die Zellen wurden in Medium 199 weiter kultiviert. Bei der ersten Passage erfolgte eine weitere Aufreinigung der mikrovaskulären Endothelzellen, indem sie durch Bindung an *Ulex europäus-I* beschichtete paramagnetische Beads von Perizyten getrennt wurden. HUAEC wurden wie HUVEC, jedoch aus Nabelschnurarterien isoliert.

Darüber hinaus wurden Experimente mit folgenden Zelllinien durchgeführt:

- BT-549, duktales Mammacarcinom des Menschen, American Type Culture Collection (ATCC) HTB-122
- EA hy 926: permanente humane Zelllinie; entstanden aus der Fusion von HUVEC und der permanenten humanen Zelllinie A 549 (Edgell, C. J. et al., 1983)
- ECV 304, Harnblasencarcinom (Mensch, Epithel), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Nr. ACC 310
- HeLa, Adenocarcinom der Zervix (Mensch, Epithel), ATCC, CCL-2
- HL-60, Promyelozytische Leukämie (Mensch, peripheres Blut), ATCC, CCL-240
- HS 578, Fibroblast der normalen Haut (Mensch), ATCC, CRL-7320
- HT 29/26, Hybridom der B-Lymphozyten (Maus), ATCC, HB-8247

- NIH 3T3-1, Embryonale Fibroblasten (Maus), ATCC, CRL-1658
- RKO, Koloncarzinom (Mensch, Epithel), ATCC, CRL-2577
- SW 480, kolorektales Adenocarcinom (Mensch, Epithel), ATCC, CCL-228

2.2.2 Strömungsexposition

$$(1) \quad \tau = \eta \cdot \frac{\omega \cdot r \cdot \tan \alpha}{r}$$

τ : Wandschubspannung
 ω : Winkelgeschwindigkeit
 α : Kegelwinkel
 η : dynamische Viskosität
 r : Bahnradius

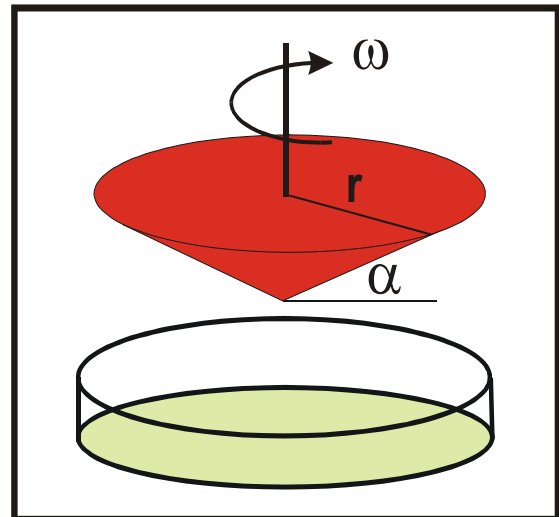


Abb. 4 Kegel-Platte-System (Schema)

Konfluente HUVEC-Monolayer der ersten Passage in Petrischalen für die Zellkultur wurden mit einem Kegel-Platte-System (Abb. 4; 5) unterschiedlich hoher laminarer Strömung ausgesetzt. Dabei erzeugte ein rotierender Kegel durch Mitnahme des Zellkulturmediums über dem am Boden der Petrischale haftenden Endothel-Monolayer eine gleichmäßige Wandschubspannung, die mit Formel (1) beschrieben wird.



Abb. 5 Kegel-Platte-System (Photo)

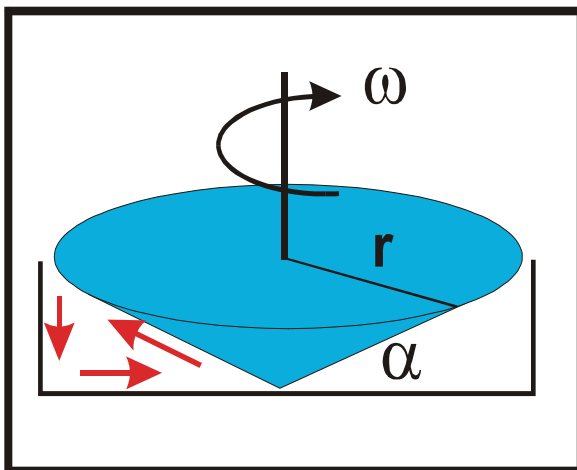


Abb. 6. Sekundärströmung (rote Pfeile) in einem Kegel-Platte-System

$$(2) \quad R = \frac{\omega \cdot \alpha^2 \cdot r^2}{12 \nu}$$

ν : kinematische Viskosität

Der Kegelwinkel betrug $1,0^\circ$, die Viskosität des Mediums $0,0075 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$. Unter diesen Bedingungen wurde die Wandschubspannung durch Änderung der Umdrehungszahl variiert. Typischerweise wurden HUVEC in dem Kegel-Platte-System Wandschubspannungen von $0,6 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ (13 UpM), $1,0 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ (22 UpM), $2,0 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ (45 UpM), $3,0 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ (67 UpM) und $6,0 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ (134 UpM) über jeweils 24h ausgesetzt. Als Kontrolle dienten HUVEC derselben Isolation und Passage, die unter statischen Bedingungen, d.h. ohne Strömung kultiviert wurden.

Durch Zentrifugalkräfte entsteht in einem Kegel-Platte-System eine zweite Strömungsrichtung (Abb. 6). In Abhängigkeit von der Relation dieser Sekundärströmung zu der primär erzeugten Strömung können in einem Kegel-Platte-System Turbulenzen auftreten. Bei turbulenter Strömung besteht jedoch keine einheitliche Wandschubspannung. Deshalb wurden Versuchsbedingungen gewählt (Viskosität $0.0075 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$, Kegelwinkel 1° , maximal 134 Umdrehungen pro Minute), bei denen ein in Analogie zur Reynoldszahl entwickelter Parameter „R“ (2) (Sdougos, H. P. et al., 1984) sicher auf laminare Strömungsbedingungen schließen ließ ($R \leq 1$).

2.2.3 Transkriptionsblockade durch Actinomycin D

Zur Beantwortung der Frage, ob die Reduktion einer mRNA-Bande durch verminderte RNA-Stabilität oder verminderte transkriptionelle Aktivität verursacht wird, wurde die Transkription durch Actinomycin D für 30 min, 60 min oder 90 min blockiert, so dass die Halbwertszeit der interessierenden mRNA als Maß ihrer Stabilität bestimmt werden konnte. Actinomycin D hemmt die Transkription durch Intercalation, dabei wird das Basenpaar Guanin-Cytosin „verklebt“ und so die Ablesung der DNA verhindert. Diese Methode ist insbesondere für strömungsregulierte Gene in Endothelzellen erfolgreich angewandt worden (Kosaki, K. et al., 1998).

Actinomycin D wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Ethanol gelöst (Stammlösung). Aus dieser Stammlösung wurde die Substanz 1:200 in Zell-

kulturmedium auf eine Endkonzentration von 5 µg/ml verdünnt. Das normale Zellkulturmedium wurde verworfen und zur Transkriptionsblockade durch Medium mit 5 µg/ml Actinomycin D ersetzt. Die jeweilige mRNA-Menge wurde durch Northern Blot bestimmt.

2.2.4 Northern Blot

2.2.4.1 RNA-Isolation

Für die Isolierung der in den geernteten Zellen (HUVEC) befindlichen gesamt-RNA wurde das Rneasy-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwandt. Dabei kam das Protokoll des Herstellers zur Anwendung. Nach Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden diese unter Verwendung eines milden Detergens (RLT-Puffer) und β-Mercaptoethanol durch Scherkräfte lysiert. Bei der anschließenden Zentrifugation adsorbiert die freigewordene RNA an der Silicongelmembran einer kleinen Trennsäule. Nach mehreren Waschvorgängen wird die adsorbierte RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser ausgewaschen und in einem ebenfalls RNase-freien Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

2.2.4.2 RT-PCR

Gesamt-RNA (gRNA) wurde mittels reverser Transkriptase und Oligo-dT als Primer in Komplementär-DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurden 2 µg gRNA und 1 µg oligo-dT mit DEPC-Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Die RNA wurde für 8 min bei 70°C denaturiert und zur Vermeidung von Rückfaltungen sofort in ein Eisbad überführt.

Je 10 µl eines RT-Puffer-Mix (2.75 µl H₂O; 5 µl 5fach Puffer, Promega; 1.25 µl 10 mM dNTP, 1 µl [= 200 U] Reverse Transkriptase, Promega) wurden zu der denaturierten gRNA hinzugefügt. Die Reverse Transkription erfolgte bei 42°C für 60 min. Ihr folgte die Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 70°C für

10 Minuten. Die so erhaltene cDNA wurde mit 18 µl DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 50 ng/µl verdünnt. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

Von dieser cDNA-Präparation wurden 50 µl für die folgende Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. In der PCR wurden die Primer DEPP-l (CTCTCCTAGCCTGGATGACTACGTG; spezifisch für 9/B, Accession-Nr. NM-007021, Bindungsstelle 317-341) und DEPP-r (R) (AGGAACTAGGGTCCTTCAGACTCCA; spezifisch für 9/B, Accession-Nr. NM-007021, Bindungsstelle 1684-1660) in einer Endkonzentration von 1 µM eingesetzt. Dazu wurden die Primer (Stammlösung 100 µM) 1:20 mit Wasser verdünnt (3 µl Stammlösung eines jeden Primers plus 54 µl Wasser), so dass der resultierende Primermix jeden der beiden Primer in 5 µM Konzentration enthielt. Der Gesamtansatz (250 µl) enthielt: 104 µl H₂O; 25 µl 10x Puffer (75 mM Tris-HCl, pH: 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄); 15 µl MgCl₂ (25 mM); 50 µl Primermix; 5 µl dNTP (10 mM), 1 µl Taq Polymerase (entspr. 5 U) und 50 µl cDNA. Nach einer Anfangsdenaturierung (94°C, 2 min) folgten 35 PCR-Zyklen (94°C, 30 sek; 63°, 30 sek; 72°, 2 min) und eine Endelongation (72°C, 5 min).

Die RT-PCR wurde mit vier verschiedenen RNA Proben durchgeführt, davon jeweils zwei aus statisch und aus dynamisch (6 dyn/cm², 24h) kultivierten HUVEC. Zur Kontrolle der Produktgröße und Produktreinheit wurden die vier PCR-Produkte (10 µl) in einem Agarosegel (1%-ig in 1-fach TBE) unter Zusatz von 2 µl 6-fach Ladepuffer (2,5 µl Bromphenol Blau; 2,5 µl Xylencyanol; 300 µl Glycerol; 695 µl H₂O) aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid (1%) sichtbar gemacht (Abb. 7). Die Produkte entsprachen der erwarteten Größe von 1368 bp und es traten keine detektierbaren Nebenprodukte auf.

Darüber hinaus ist selbst bei der relativ hohen Zahl von 35 Zyklen noch ein deutlicher Unterschied zwischen statisch und dynamisch kultivierten HUVEC zu erkennen. In dynamisch kultivierten HUVEC ist 9/B niedriger exprimiert. Die PCR-Amplifikate wurden gepoolt und mit einem kommerziellen Kit (Qiaquick, Quiagen, Hilden) über

eine Säule nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt. Dabei wurden kleinere DNA-Fragmente (< 100 bp) abgetrennt und verworfen.

RT-PCR zum Nachweis der mRNA anderer Gene wurden nach demselben Protokoll, jedoch mit anderen Primerpaaren durchgeführt.

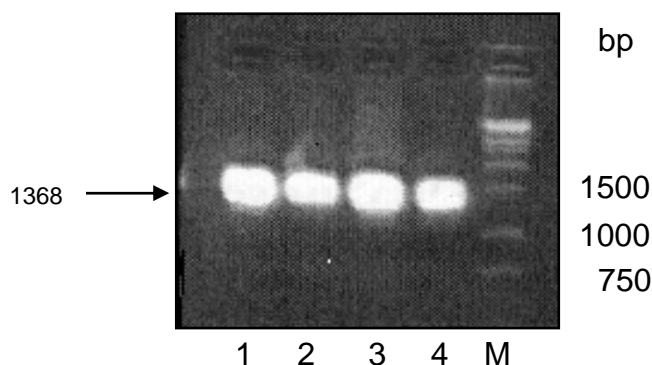


Abb. 7 RT-PCR-Produkte von 9/B. HUVEC wurden statisch (Reihe 1 und 3) oder dynamisch (6 dyn/cm^2 , 24h; Reihe 2 und 4) kultiviert, gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit den Primern DEPP-I und DEPP-r (R) durch PCR amplifiziert. Die Produkte wurden in 1%igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid (1%) nachgewiesen.

2.2.4.3 Synthese einer RNA-Sonde

Zur Synthese einer RNA-Sonde wurde das durch PCR erzeugte cDNA-Fragment von 9/B in einer T4-Ligase-Reaktion mit einem T7-Promotor verbunden (Lig'nScribe, Ambion). Der Reaktionsansatz (10 μl) enthielt: 6,0 μl H₂O, 1 μl T4 DNA Ligase Puffer (10-fach), 1 μl T7 Adapter (Promotor), 1 μl 9 B PCR Fragment (entspr. 19 ng), 1 μl T4 Ligase. Nach vorsichtigem Mischen inkubierte der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur. Der Ligase-Reaktion folgte eine PCR. In dieser PCR wurde ein Primer, der im Bereich des T7-Promotor-Adapters bindet entweder mit dem 9/B-spezifischen 5'-Primer oder mit dem 9/B-spezifischen 3'-Primer kombiniert. Wird der Gen-spezifische 5'-Primer eingesetzt, so resultiert ein Amplifikationsprodukt, dessen sense-Strang den T7-Promotor am 3'-Ende trägt, so dass hiervon ausgehend die T7-RNA-Polymerase eine anti-sense RNA erzeugt.

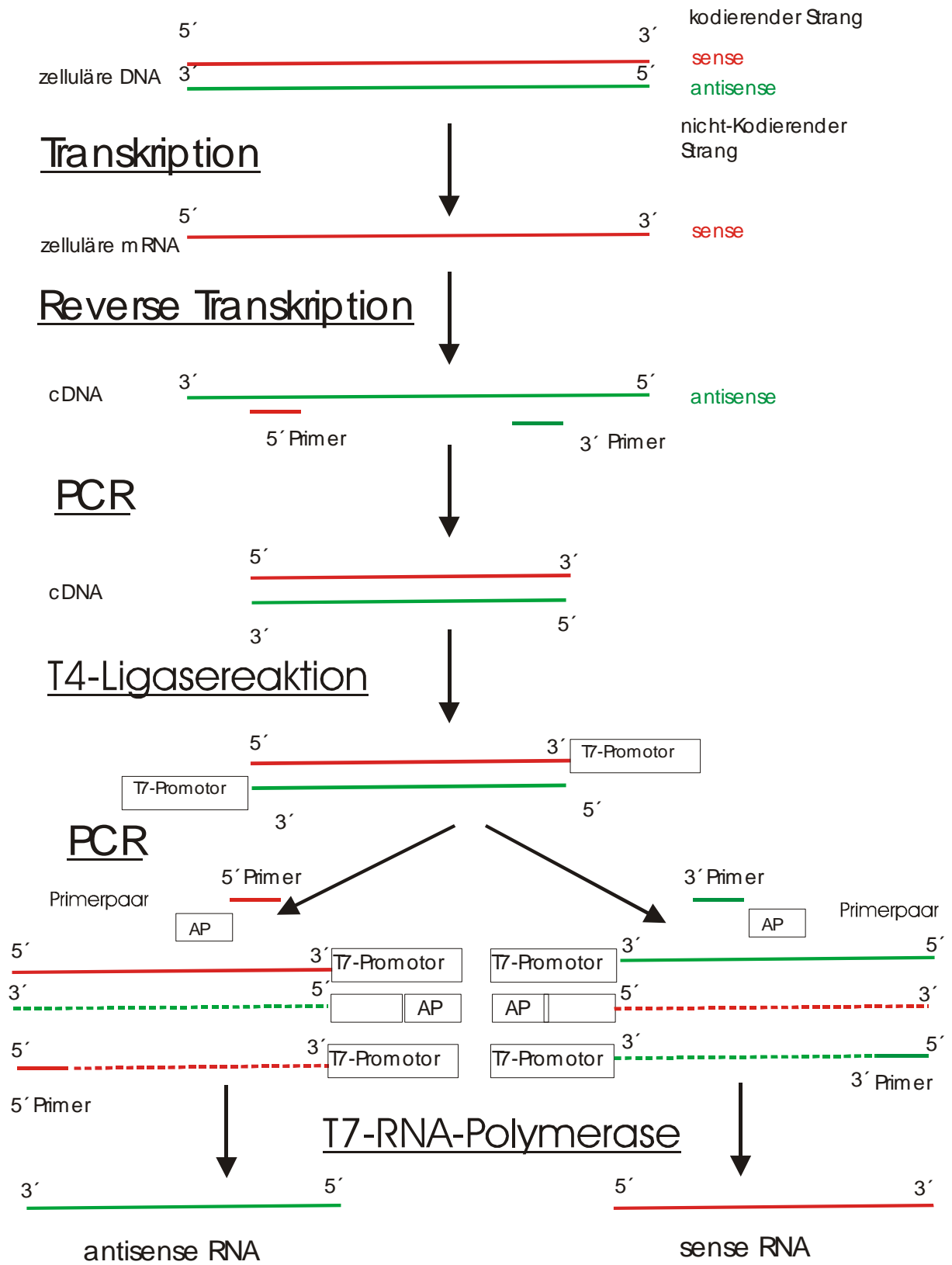


Abb. 8 Schema zur Synthese von RNA-Sonden. Einzelheiten sind im Text beschrieben.

Wird der Gen-spezifische 3'-Primer eingesetzt, so resultiert ein Amplifikationsprodukt, dessen anti-sense-Strang den T7-Promotor am 3'-Ende trägt, so dass hiervon ausgehend die T7-RNA-Polymerase eine sense RNA erzeugt (Abb. 8). Der Gen-spezifische 5'-Primer führt also zu einer anti-sense-RNA als Sonde für den Northern Blot, der Gen-spezifische 3'-Primer dagegen zu einer sense-RNA, die im Northern Bot als negative Kontrolle eingesetzt wurde. Der PCR-Ansatz (50 µl) enthielt: 32,6 µl H₂O; 5 µl 10x Puffer (75 mM Tris-HCl, pH: 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄); 3 µl MgCl₂; 1 µl dNTP; 1,25 µl Adapterprimer 1; 5 µl spezifischer Primer (1 µl 9B-l oder 1µl 9B-r jeweils 2.5 µM); 1 µl Taqpolymerase und 2 µl aus der T4-Ligase-Reaktion als Template. Nach einer Anfangsdenaturierung (94°C, 2 min) folgten 30 PCR-Zyklen (94°C, 30 sek; 63°, 30 sek; 72°, 2 min) und eine Endelongation (72°C, 5 min).

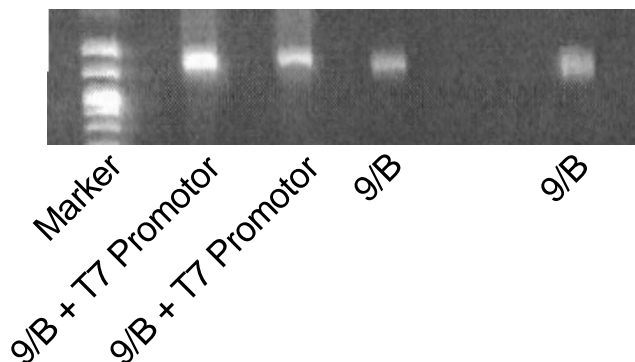


Abb. 9 RT-PCR-Produkte von 9/B wurden mit einem T7- Promotor ligiert und die Ligationsprodukte mit PCR reamplifiziert. Zur Kontrolle sind RT-PCR-Produkte von 9/B ohne T7-Promotor auf dasselbe Agarosegel aufgetragen worden.

Zur Kontrolle der Größe und Reinheit der Ligationsprodukte wurden die PCR-Amplifikate (10 µl) in einem Agarosegel (1%ig in 1-fach TBE) unter Zusatz von 2 µl 6-fach Ladepuffer (2,5 µl Bromphenol Blau; 2,5 µl Xylencyanol; 300 µl Glycerol; 695 µl H₂O) aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid (1%) sichtbar gemacht. Die Produkte entsprachen der erwarteten Größe von 1368 bp + 64 bp und es traten keine detektierbaren Nebenprodukte auf (Abb. 9).

Die PCR-Amplifikate wurden mit einem kommerziellen Kit (Qiaquick, Qiagen, Hilden) über eine Säule nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt. Dabei wurden kleinere DNA-Fragmente (< 100 bp) abgetrennt und verworfen. Die Konzentration der gewonnenen cDNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

Mit dem North2South-Kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA) wurden die mit dem T7-Promotor verbundenen cDNA-Fragmente von 9/B in RNA transkribiert und dabei mit Biotin markiert. Anschließend wurde die verbliebene DNA verdaut und nicht inkorporierte Nukleotide durch Präzipitation mit Lithiumchlorid entfernt.

Der Ansatz für die Transkription enthielt: 5 x Reaktionspuffer, 4 µl; DTT 0.1 M, 2 µl; 2 x NTP Mix (4 mM ATP, 4 mM UTP, 4 mM GTP, 1 mM CTP/Biotin-14 CTP) 10 µl; DNA Templates, 2 µl (entspr. 0,6 µg); Ribonuclease Inhibitor, 1 µl; T7-RNA-Polymerase, 1 µl; H₂O, nukleasefrei, 2 µl. Dieser Ansatz wurde gründlich gemischt und inkubiert sodann bei 37°C für 60 Minuten.

Anschließend wurde der Ansatz durch Kochen für 5 min denaturiert, 2 µl DNase I entspr. 2 units hinzugefügt, und erneut bei 37°C für 15 min inkubiert. Zur Entfernung verdauter DNA bzw. nicht inkorporierter Nucleotide erfolgte eine Präzipitation der RNA mit Lithiumchlorid. Dazu wurden dem Ansatz zugesetzt: 1 µl EDTA (500 mM, pH 8), 2 µl nuclease-freies Wasser und 12,5 µl LiCl 7.5 M. Danach wurde der Ansatz gründlich gemischt und bei -20°C für 30 min stengelassen. Nach Zentrifugation (15 000 x g, 60 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit eiskaltem Ethanol (500 µl, 70%) gewaschen und wiederum zentrifugiert (15 000 x g, 5 min, 4°C). Der Ethanol verdampfte aus dem offenen Reaktionsgefäß (Raumtemperatur, 5 min), das RNA-Pellet wurde in 20 µl nuklease-freiem Wasser gelöst. Die photometrische Konzentrationsbestimmung ergab für 9/B-Antisense-RNA 0.25 µg/µl und für 9/B-Sense-RNA 0.26 µg/µl. Die biotinmarkierten RNA-Sonden wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.4 Gelelektrophorese

Gesamt-RNA aus den jeweils zu analysierenden Zellen wurde in einem Agarosegel (1%) unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Zu 45 ml DEPC-Wasser wurden in einem sterilen Kolben 0,5 g Agarose und 5 ml FA-Buffer hinzugegeben, die Lösung leicht geschwenkt und in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen auf 65-70°C wurden unter Rühren 900 µl Formaldehyd (37%) hinzugefügt. Die noch heiße Lösung wurde in eine bereits mit einem Kamm (RNase-ZAP gereinigt) bestückte Gelkammer gegossen. Etwaige Luftblasen wurden sorgfältig mit einer sterilen Glaspipette entfernt.

Gesamt-RNA (3-10 µg) wurde mit 4 µl 5-fach Ladepuffer (5 ml enthalten: gesättigte Xylencyanol Lösung 8 µl, gesättigte Bromphenol Blau Lösung 8 µl, EDTA 0.5 M, pH 8, 40 µl, Formaldehyd 37% 360 µl, Glycerol 100% 1 ml, Formamid 1.6 ml, FA-Puffer 10-fach 2 ml, H₂O-DEPC auf 5 ml) in DEPC-Wasser (auf 20 µl) aufgenommen, gemischt und bei 70°C für 8 min denaturiert.

Die so vorbereitete Probe wurde auf dem Gel bei einer konstanten Spannung von 60 V und einer Laufzeit von 2 bis 3 Stunden in Laufpuffer aufgetrennt.

Bevor die aufgetrennten Proben durch Kapillartransfer („blotting“) auf eine Nylonmembran übertragen wurden, wurde das Gel in 200 ml Aqua bidest. für 3 min gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen. Anschließend wurde das Gel für 5 min in 200 ml 0,05 M NaOH inkubiert, um den Transfer der RNA auf die Nylonmembran durch partielle Hydrolyse zu erleichtern. Danach wurde das Gel für 5 min in 200 ml 10 x SSC gewaschen.

2.2.4.5 RNA-Transfer

Der Transfer der RNA aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran (Supercharge) erfolgte in der Form des „downward transfers“ mit einem TurboBlotter™

(Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland). Von unten nach oben wurde folgender „Sandwich“ für den Northern Blot aufgebaut: zuunterst 20 dicke, trockene Papierlagen (10 x 7 cm) zentral platziert. Darüber 4 trockene, kleinere, dünne Chromatographiepapierlagen (9 x 6 cm). Es folgt eine weitere kleine, in 20 x SSC getränkte Lage, über dieser die ebenfalls in 20 x SSC getränkte Nylonmembran (9 x 6 cm). Darüber wurde das Gel mit den aufgetrennten RNA-Proben luftblasenfrei ausgebreitet. Obenauf folgten 3 weitere in 20 x SSC getränkte, dünne Lagen. Schließlich wurde über diesen ein größeres Filterpapier platziert, dessen seitliche Enden in die mit 20 x SSC gefüllte Seitenkammer reichten, so dass es als Kapillarbrücke („Bridge“) den Transferpuffer auf das „Sandwich“ leitete. Darüber wurde eine leichte Abdeckung („Cover“) gelegt (Abb. 10). Der RNA-Transfer fand für 3 h statt. Danach wurde die Nylonmembran kurz in 10 x SSC gewaschen. Durch beidseitige UV-Bestrahlung (254 nm, 2 x 2 min) wurde die RNA mit der Nylonmembran quervernetzt. Mit einer digitalen Kamera wurden unter UV-Licht Aufnahmen der jeweiligen 18S- und 28S-Untereinheiten der ribosomalen-RNA angefertigt, um die gleichmäßige Beladung des Gels zu dokumentieren.

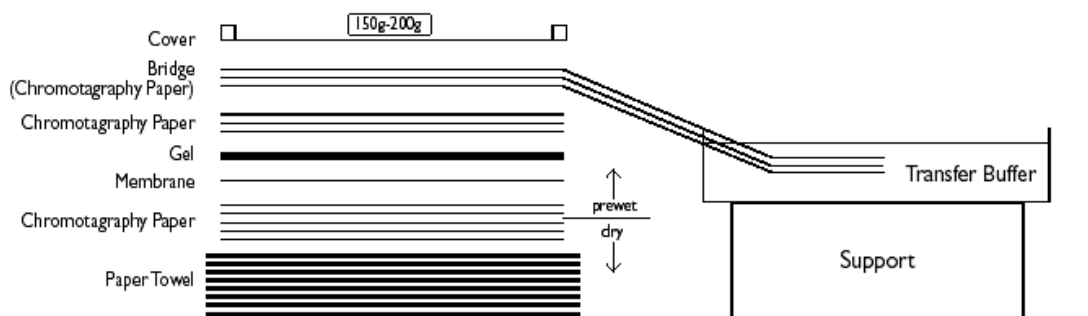


Abb. 10 Anordnung der verschiedenen Schichten („Sandwich“) für den Transfer der mRNA aus einem Gel auf eine Nylonmembran (Northern Blot).

2.2.4.6 Hybridisierungsreaktion

Die Membran wurde bei 68°C in 10 ml ULTRAhyb Puffer unter drehender Bewegung für 1 h prähybridisiert, um durch Absättigung unspezifischer Bindungsstellen den Hintergrund zu minimieren. Anschließend wurde die Membran bei 68°C in 10 ml ULTRAhyb Puffer mit der zuvor hitzedenaturierten (96°C, 2 min) Sonde (10 ng Sonde pro ml Puffer) für 16 h (über Nacht) inkubiert. Nach der Entnahme der Membran aus dem Hybridisierungsröhrchen (Blue Max) erfolgte ein Waschvorgang mit Waschlösung 1 (niedrig-stringent, um Hybridisierungspuffer und im Überschuss vorhandene Sonde zu entfernen) bei 68°C für 2 x 10 min. auf dem Wipptisch, dann in Waschlösung 2 (hoch-stringent) bei 68°C für 2 x 20 min.

2.2.4.7 Nachweisreaktion

Zum Nachweis der Biotin-markierten Sonde wurde mit Streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase inkubiert und die mit CDP-Star™ als Substrat ausgelöste Chemilumineszenz detektiert.

Die Membran wurde zweimal in Blockierungspuffer (je 30 ml) gewaschen (je 2 min, 40 Upm auf dem Wipptisch, Raumtemperatur). Danach wurde die Membran mit einem Konjugat aus Streptavidin und Alkalischer Phosphatase (Avidx-AP™, Southern-Star/CDP-Star-Kit, Tropix/Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) inkubiert. Dazu wurden 6 µl des Konjugats in 30 ml Blockierungspuffer gelöst und die Membran darin für 30 min auf dem Wipptisch bei 8 Upm und Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges Streptavidin-AP-Konjugat wurde durch Waschen der Membran einmal in Blockierungspuffer (30 ml, 8 min, 40 Upm, RT) und darauf folgend viermal in Waschpuffer (30 ml, 5 min, 40 Upm, RT) entfernt. Anschließend wurde die Membran zweimal mit einfach-Assay Puffer äquilibriert (25 ml, 2 min, 40 Upm, RT), der Assay Puffer verworfen und die Membran gleichmäßig mit ca. 1,5 ml CDP-Star™ für 5 min benetzt. Nach Abtropfen der Lösung wurde die Membran in eine Klarsichtfolie eingeschlagen. Die Chemilumineszenz

wurde autoradiographisch und nicht früher als 15 min nach Beginn der Nachweisreaktion detektiert.

Durch Aufnahme mit einer CCD-Kamera wurden die entwickelten Filme digitalisiert und die nachweisbaren Banden densitometrisch (One-D-Scan) ausgewertet. Die Werte wurden in Relation zur korrespondierenden 18S- oder 28S-Bande als Quotient angegeben, um durch diese interne Standardisierung eventuelle kleinere Ungleichmäßigkeiten in der Beladung des Gels zu kompensieren.