

3 Materialien

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zellen

Die in allen Untersuchungen eingesetzten mikrovaskulären Endothelzellen wurden aus Corpora lutea von Schlachtrindern bezogen. Es wurden Endothelzellen aus Corpora lutea im Stadium der Anbildung und der Rückbildung verwendet. Diese Zellen waren bereits für vorgehende Untersuchungen im Labor von J. Plendl, teils im Zuge von Doktorarbeiten (Plendl, 1997; Budde, 1999; Fuchs-Schönleber, 1999; Schuster, 2002) isoliert worden. Mittels makroskopischer Untersuchungen war das Entwicklungsstadium der Gelbkörper bestimmt und gezielt ausgewählt worden. Zur Isolierung und selektiven Kultivierung der Endothelzellen wurden u.a. „limiting dilution cloning“, Gradientenzentrifugation und FACScan sorting angewandt. Die Identifizierung der Endothelzellen erfolgte nach der Isolierung und vor dem Einsatz im Experiment mittels der Untersuchung der *in vitro* Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL), der immunhistochemischen Lokalisation des von Willebrand-Faktors (vWF), des Angiotensin Converting Enzyms (ACE) und der zellulären Bindung des Lektins *Bandeiraea simplicifolia* Agglutinin I (BSA I) (Plendl et al., 1996a; Plendl et al., 1996b; Plendl, 1997; Budde, 1999; Fuchs-Schönleber, 1999; Schuster, 2002).

Für die vorliegende Studie wurden vier Endothelzellkulturen charakterisiert. Die ausgewählten Endothelzellkulturen zeigten trotz standardisierter Kultivierungsbedingungen unterschiedliche angiogene Potenz (Plendl et al., 1992b; Plendl et al., 1993; Plendl et al., 1996a; Plendl et al., 1996b; Plendl, 1997). Eine Endothelzellkultur stammte aus dem bovinen Corpus luteum cyclicum im Stadium der Anbildung. Diese Kultur zeigte hohe angiogene Potenz und wurde *BCI AA* benannt. Aus dem Corpus luteum cyclicum im Stadium der Rückbildung waren die angiogenen Endothelzellkulturen *BCI RA1* und *BCI RA2* isoliert worden sowie die Kultur *BCI RN*, die keine angiogene Potenz zeigte.

3.1.2 Geräte

Folgende Geräte wurden für die Zellkulturarbeiten eingesetzt:

Geräte	Bezugsfirma
Autoklav H+P Varioclav Typ 250T	Schembera München
Begasungsbrutschrank Memmert INCO 2	Memmert (Schwabach)
Dampfsterilisator H+P Varioklav 25T	H+P Labortechnik (München)
Invert-Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Jena)
Neubauer Zählkammer	GLW (Würzburg)
Pipette easypet	Eppendorf Hamburg
Pipettierhilfe Eppendorf easypet	Eppendorf Hamburg
Reinraumwerkbank (BDK-S100)	BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl Genkingen)
Stickstofftank (GT 38)	Air Liquide Kryotechnik (Düsseldorf)
Vakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger (Freiburg)
Videokamera Inteq 000610 (für Invert-Mikroskop Axiovert 25)	Inteq Berlin
Wasserbad (1083)	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Zentrifuge Variofuge RF	Hereus Sepatech (Osteorode)

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Folgende Materialien wurden bei den Zellkulturarbeiten verwendet:

Verbrauchsmaterialien	Bezugsfirma
Deckgläser, rund (Ø 12 mm)	Carl Roth (Karlsruhe)
Gewebekulturröhrchen, 5 ml steril	Zefa Labortechnik (Harthausen)
Kanülen	Lehnecke (Schortens)
Kryoröhrchen	Dunn Labortechnik (Asbach)
Membranfilter easypet (steril 0,45 µm)	Eppendorf (Hamburg)
Pasteurpipetten	Th. Geyer Berlin (Berlin)
Pipettenspitzen	Carl Roth (Karlsruhe)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Einwegpipetten	Carl Roth (Karlsruhe)
Spritzen (10 ml)	Lehnecke (Schortens)
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturschalen	Iwaki (Tokio, Japan)
24-Lochplatten (pro Vertiefung: Ø 15,5 mm)	

06-Lochplatten (pro Vertiefung: \varnothing 17,5 mm)

Zentrifugenröhrchen (15 ml) Zefa Labortechnik (Harthausen)

Zentrifugenröhrchen (50 ml) Zefa Labortechnik (Harthausen)

3.1.4 Zusätze und Medien

3.1.4.1 Zusätze

Medien/ Medienzusätze	Bezugsfirma
BME-Vitamine (Basal Eagle Vitamin Solution)	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium)	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement)	Schubert & Weiß (München)
FBS (Fetales bovines Serum)	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
Heparin (0,25%)	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
S180-konditioniertes Medium	durch murine Fibrosarkomzellen konditioniertes DMEM ⁺ -Medium (siehe 3.1.4.2)

3.1.4.2 Nährmedium (Erhaltungsmedium DMEM⁺)

DMEM⁺ wurde zur Kultivierung von bovinen Endothelzellen und murinen Fibrosarkomzellen eingesetzt. Es wurde im Labor frisch zubereitet und bestand aus folgenden Komponenten:

L-Glutamin (200 mM)	1%
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml, 10 mg/ml)	1%
FBS	10%
DMEM (mit 4500 mg Glukose /l, HCl, NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin)	88%

3.1.4.3 Selektivmedium zur Induktion der Angiogenese (P0)

Mit P0 wurden die bovinen Endothelzellen kultiviert und zur Gefäßbildung angeregt. Es wurde im Labor je nach Bedarf frisch zubereitet und bestand aus folgenden Komponenten:

BME-Vitamine (100x)	1%
Heparin (0,25%)	1%
ECGS (2,5 mg/ml DMEM)	2%
FBS	10%
S180-konditioniertes Medium	20%
DMEM ⁺	66%

3.1.4.4 Medium zur Kryokonservierung der Endothelzellen

Das Medium zur Kryokonservierung enthält Nährstoffe für den Erhaltungsbedarf und dient den Zellen zum Schutz beim Einfrieren und Auftauen:

DMSO (siehe 3.1.5)	10%
Kulturmedium	90%

3.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/ Reagenzien	Bezugsfirma
Bacto-Gelatine	Difco Laboratories (Detroit/USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	ICN Biomedicals (Eschwege)
PBS (Phosphate buffered saline solution, ohne Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -Ionen)	Biochrom (Berlin)
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
Trypsin/EDTA-Lösung (0,25%)	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)

3.1.6 Software

Software	Bezugsfirma
Axiovision Version 3.0 (Bildverarbeitungssoftware in Verbindung mit Videokamera Inteq 000610)	Zeiss Jena
Win Freeze (Anwendungssoftware zur Verwaltung von kryokonserviertem Untersuchungsmaterial)	Rechteinhaber: Marco Manago und Jasmin Lienau (Berlin)

3.2 Immunzytochemie, histologische Präparation und Apoptosetest

3.2.1 Geräte

Geräte	Bezugsfirma
Feuchtkammer	Roth (Karlsruhe)
Fluoreszenzmikroskop Diaplan Leitz	Leika Mikrosystems (Wetzlar)
Pipetten Eppendorf Reverence Variabel	Eppendorf (Hamburg)
Videokamera DXM 1200 (für Fluoreszenzmikroskop Diaplan Leitz)	Nikon (Düsseldorf)

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsfirma
Deckgläser, rund, Ø 12 mm	Carl Roth (Karlsruhe)
Pasteurpipetten	Th. Geyer Berlin (Berlin)
Pipettenspitzen	Carl Roth (Karlsruhe)

3.2.3 Antikörper, Immunreagenzien und Reaktionskits

Immunreagenzien	Bezugsfirma
Monoklonaler Antikörper Maus anti- β_1 -Integrin (CD 29)	Acris, DPC Biermann (Bad Nauheim)
Monoklonaler Antikörper Maus anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (CD 51/61)	Acris, DPC Biermann (Bad Nauheim)
Monoklonaler Antikörper Maus anti-human CD31	RD Systems (Wiebaden-Nordenstadt)
Monoklonaler Antikörper Maus anti-Schaf CD31	Acris, DPC Biermann (Bad Nauheim)
Monoklonaler Antikörper Maus anti-CD34	DAKO Diagnostika (Hamburg)
Monoklonaler Antikörper Maus anti-CD34	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg)
Monoklonaler Antikörper Maus anti-VEGF-R2	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
Polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-c-kit-G	Santa-Cruz-Biotechnology (Heidelberg)
Monoklonaler Antikörper Maus anti-human CD49e	Acris, DPC Biermann (Bad Nauheim)
Polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-Tie-2	Santa-Cruz-Biotechnology (Heidelberg)
Sekundärantikörper Ziege anti-Maus, Biotin konjugiert	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg)
EnVision+TM, Peroxidase, Ziege anti-Maus, Kaninchen Peroxidase-Kit	DAKO Diagnostika (Hamburg)
3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Tabletten (DAB)	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
SteptABComplex/HRP	DAKO Diagnostika (Hamburg)
Sekundärantikörper Ziege anti-Maus IgM+IgG+IgA(H+L), Fluorescein (FITC) konjugiert	BIOZOL Diagnostika Vertrieb GmbH (Eching)
Sekundärantikörper Ziege anti-Maus IgM+IgG+IgA(H+L), Rhodamine (TRITC) konjugiert	BIOZOL Diagnostika Vertrieb GmbH (Eching)
Proteinblockierungsreagenz, serumfrei	DAKO Diagnostika (Hamburg)
Mausserum (normal), IgG1	DAKO Diagnostika (Hamburg)
Kaninchenserum (normal), IgG1	DAKO Diagnostika (Hamburg)

Apo-Alert Annexin V-EGFP-Kit	BD Bioscience Clontech (Heidelberg)
Annexin VEGF-P (40 mg/ml)	
Propidiumjodid (50 µg/ml)	
Binding Buffer	

3.2.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Bezugsfirma
Aqua Poly-Mount Mounting Medium	Polysciences Europe (Eppelheim)
Aceton	Biesterfeld (Dahlwitz-Hoppegarten)
Fluorostab	ICN Pharmaceuticals (Ohio/USA)
Giemsa-Lösung	Fluka-Chemie (Buchs/Schweiz)
Glycerin-Gelatine	Th. Geyer (Berlin)
Hämalaun nach Mayer	Fluka-Chemie (Buchs/Schweiz)
Methanol	Th. Geyer (Berlin)
PBS (Phosphate buffered saline solution, ohne Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -Ionen)	Biochrom (Berlin)
TRIS-Puffer	Fluka-Chemie (Buchs/Schweiz)

3.2.5 Software

Software	Bezugsfirma
ACT-1 Version 2,20 (Bildverarbeitungssoftware in Verbindung mit Videokamera DXM 1200)	Nikon (Düsseldorf)

3.3 Transmissionselektronenmikroskopie

3.3.1 Geräte

Geräte	Bezugsfirma
Transmissionselektronenmikroskop EM 10CR	Zeiss (Jena)
Ultramikrotom Ultracut E	Reichert-Jung (Wien/Österreich)

3.3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsfirma
Beemkapseln	Plano (Marburg)

Kodak Electron Mikroskop Film (4489)	Kodak (Stuttgart)
Kupfergrids	Plano (Marburg)

3.3.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Bezugsfirma
Agar	Merk Eurolab (Darmstadt)
Azur II	Merk Eurolab (Darmstadt)
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merk Eurolab (Darmstadt)
DDSA (Dodecenylocsuccinic-Acid Anhydride)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Di-Natriumtetraborat	Merk Eurolab (Darmstadt)
DMP-30 (2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl) Phenol)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Epon-Glycidether Methanol	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Glutaraldehyd	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Kaliumferrocyanid	Merk Eurolab (Darmstadt)
May-Grünwald-Lösung	Fluka Chemie (Buchs/Schweiz)
Methylenblau	Merk Eurolab (Darmstadt)
MNA (Methyl Nadic Anhydride)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Osmiumtetroxid	Merk Eurolab (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Merk Eurolab (Darmstadt)
Propylenoxid	Serva Electrophoresis (Heidelberg)

3.4 PCR

3.4.1 Geräte

Geräte	Bezugsfirma
DNA Pocket block Elektrophoresekammer	Biozym Diagnostics (Hess. Oldendorf)
Elektrophoresestation	Biorad Laboratories (Hercules, USA)
Power Supply Modell 1000/500	
Eppendorf BioPhotometer 6131	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Pipetten Reference	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf-Zentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg)
Polaroidkamera gelcam	Polaroid (Offenbach)
Electrophoresis Hood 0.7x	
UV-Lampe Vilber Lourmat TXC-20.M	Marne-La Vallée (Frankreich)
Mikrowelle M1712N	Samsung Electronics, Schwalbach

Thermocycler Mastercycler	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Biofuge 22R	Kendro Laboratory Products (Langenselbold)
Zentrifuge Variofuge RF	Hereus Sepatech (Osteorode)

3.4.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsfirma
Küvetten (Uvette 80)	Eppendorf (Hamburg)
Parafilm M	Carl Roth (Karlsruhe)
PCR Reaktionsgefäße (Softtubes)	Biozym Diagnostik (Oldendorf)
Reaktionsgefäße (DNase-, RNase-, DNA-, Pyrogenfrei)	Biozym Diagnostik (Oldendorf)
Pipettenspitzen (Multi-Guard-Filter Tips)	Carl Roth (Karlsruhe)
Polaroid-Filme Instance 667	Foto-Kino-Kundt (Berlin)

3.4.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Bezugsfirma
Agarose high resolution 50-100 Bp	Carl Roth (Karlsruhe)
Blaupuffer (Gel Loading Solution, Typ 1, 6x)	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
Chloroform/Trichlormethan > 99%	Carl Roth (Karlsruhe)
DEPC-behandeltes Aqua bidest.	Carl Roth (Karlsruhe)
DNA-Marker Kit SLL 100	Carl Roth (Karlsruhe)
d`NTP`s Nucleotide Mix	Roche Diagnostics (Mannheim)
DTT	Roche Diagnostics (Mannheim)
Ethanol	Th. Geyer (Berlin)
Ethidiumbromid-Lösung 1%	Carl Roth (Karlsruhe)
Expand TM Reverse Transcriptase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Expand Reverse Transcriptase Puffer, 5x konzentriert (ohne MgCl ₂)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Isopropanol 99%	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)
MgCl ₂	Roche Diagnostics (Mannheim)
Oligo-(dT) 20, biotin-labeled	Roche Diagnostics (Mannheim)
PBS (Phosphate buffered saline solution, ohne Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -Ionen)	Biochrom (Berlin)
PCR-Reaktionspuffer, 10x konzentriert (ohne MgCl ₂ ²⁺)	Roche Diagnostics (Mannheim)
RNAse-Away-Lösung	Carl Roth (Karlsruhe)

RNAse-Hemmer	Roche Diagnostics (Mannheim)
Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics (Mannheim)
TBE-Puffer 10x	Carl Roth (Karlsruhe)
Tri-Reaktionslösung	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen)

3.4.4 Primer

Primer	Primersequenz	Schmelzpunkt
Boviner VEGF-R1 forward	5' - CAC CAA gAg CgA CgT gTg	57 °C
Boviner VEGF-R1 reverse	5' - AAg AAg TCC TCg gAg AAg gC	66,6 °C
Boviner VEGF-R2 forward	5' - gCA gTg ATg gCg TCT TCT g	56,6 °C
Boviner VEGF-R2 reverse	5' - CAg AgT gAC ACA TTg Agg TCT gA	55,4 °C

Die Primer wurden vom TIB MOLBIOL Syntheselabor (Berlin) bezogen. Aus den Primern wurde jeweils eine Stammlösungen mit einer Konzentration von 25 µM hergestellt.

3.4.5 Lösungen zur Auswertung

3.4.5.1 Reaktionspuffer

TBE-Puffer 10x	100 ml
Ethidiumbromid	100 µl
DEPC-behandeltes Aqua bidest.	ad 1000 ml

3.4.5.2 Agarosegel

Agarosegelpulver	2 g
Reaktionspuffer	100 ml

3.4.5.3 Größenmarker

DNA-Ladder, 100 Basenpaare	4 µl
DEPC-behandeltes Aqua bidest.	8 µl
Blaupuffer	4 µl