

## **4 Methoden**

### **4.1 Zellkultur**

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Reinraumwerkbank durchgeführt. Die Endothelzellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97% inkubiert.

Alle Materialien und Geräte wurden, bevor sie zum Einsatz kamen, gereinigt bzw. desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert. Das Zellkulturlabor wurde mittels UV-Lampen während Ruhezeiten bestrahlt.

Wachstum und Morphologie der Zellen wurden täglich mit einem Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 25, Zeiss Jena) untersucht. Die Dokumentation erfolgte in Intervallen von 3 bis 4 Tagen mit einer PC-gesteuerten Videokamera (Inteq 000610, Berlin) mithilfe der Bildbearbeitungssoftware Axiovision, Version 3,0, Zeiss, Jena.

#### **4.1.1 Kultivierung der Zellen**

Die Endothelzellen wurden auf gelatinierte Zellkulturschalen verschiedener Größe ausgesät (siehe Tabelle 1). Als Nährstoffquelle diente das unter 3.1.4.3 beschriebene Selektivmedium oder das Erhaltungsmedium (3.1.4.2), welches im Abstand von drei bzw. vier Tagen gewechselt wurden. Nach dem Auftauen wurden die Zellen zunächst in 6-Lochplatten (Ø 34,6 mm) vermehrt. Zur Untersuchung wurden die Zellen dann in 24-Lochplatten, die mit Glasplättchen bestückt waren, subkultiviert.

#### **4.1.2 Subkultivierung**

Nachdem die Zellen den Kulturschalenboden einer 6-Lochplatte lückenlos bis zur Konfluenz bewachsen hatten, wurden sie bei Bedarf subkultiviert. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS kurz gespült und schließlich mit 0,5 ml Trypsin-EDTA beträufelt. Nach einigen Minuten Einwirkzeit im Brutschrank lösten sich die Zellverbände und die Kultur lag als Zellsuspension vor. Dieser Vorgang wurde mikroskopisch mehrfach kontrolliert. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde mit einer serologischen Pipette die Zellsuspension wiederholt aufgenommen und abgelassen. Je nach Verwendungszweck (siehe Tab.

1) wurden die Endothelzellen dann auf gelatinieren Zellkulturschalen bestimmter Größe mit bzw. ohne Glasplättchen gleichmäßig ausgesät.

Kulturschalentyp	Größe	Verwendungszweck
6-Lochplatte Iwaki (Tokio, Japan)	34,6 mm Durchmesser 17,5 mm Höhe	Kultivierung der Zellen zur Vermehrung
24-Lochplatte Iwaki (Tokio, Japan)	15,5 mm Durchmesser 17,3 mm Höhe	Induktion der Angiogenese Kultivierung auf Glasplättchen
Kulturschalen Iwaki (Tokio, Japan)	100 mm Durchmesser 20 mm Höhe	Kultivierung der S180-Zellen zur Herstellung des konditionierten Mediums (siehe 3.1.4.1)

**Tabelle 1: Liste der verwendeten Kulturschalen**

### 4.1.3 Kryokonservierung

Bei Subkultivierungen wurde stets ein Teil der Zellen kryokonserviert. Entsprechend Punkt 4.1.2 wurde eine Zellsuspension hergestellt und in ein Reagenzröhrchen, das mit 10 ml DMEM<sup>+</sup> gefüllt war, einpipettiert. Die Lösung wurde bei 200 U/M fünf Minuten lang zentrifugiert und der Überstand danach abgesaugt. Mit 1-1,5 ml Einfriermedium (siehe 3.1.4.4) wurde das Zellpellet resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (ca.  $2-3 \times 10^5$  Zellen pro Röhrchen) abgefüllt. Die Röhrchen wurden zunächst zwei bis drei Tage bei  $-80^\circ\text{C}$  zwischengekühlt, danach in Stickstofftanks dauerkonserviert.

### 4.1.4 Auftauen der Zellen

Der erste Arbeitsschritt, das zügige Auftauen der kryokonservierten Zellen aus dem Stickstofftank, wurde in einem Wasserbad ( $37^\circ\text{C}$ ) unter Schwenken durchgeführt. War die Zellsuspension aufgetaut, wurde sie mit einer serologischen Pipette aufgenommen und vorsichtig in ein mit DMEM<sup>+</sup> gefülltes Reagenzröhrchen geträufelt. Diese Lösung wurde bei 200 x g fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgesaugt, das Pellet mit einer serologischen Pipette in Selektivmedium (siehe 3.1.4.3.) aufgenommen und in ein bis zwei gelatinierte Vertiefungen einer 6-Lochplatte gleichmäßig verteilt. 24 Stunden später wurde das Kulturmedium gewechselt.

#### **4.1.5 Zellzählung der *in vitro* kultivierten Zellen**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einem Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer). Entsprechend Punkt 4.1.2 wurde eine Zellsuspension hergestellt. Diese wurde in Reagenzröhrchen, die mit DMEM<sup>+</sup> gefüllt waren, einpipettiert. Die Lösung wurde bei 200 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml Kulturmedium resuspendiert und ein Tropfen dieser Zellsuspension in die Zählkammer gefüllt. Es folgte die Zählung und Addition der Zellen von 16 kleinen Eckquadraten (16 kleine Eckquadrate entsprechen einem Großquadrat) im Phasenkontrastmikroskop. Aus der errechneten Summe wurde der Mittelwert (MW) bestimmt. Die Zellzahl in der Suspension konnte dann anhand folgender Formel ermittelt werden:

---

---

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{MW der Zellzahl aus 2 Großquadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante} (10^4)$$

---

---

#### **4.2 Bestimmung der Vitalität der Zellen**

Tote Zellen färben sich mit dem sauren Farbstoff Trypanblau, während bei lebenden Zellen (mit wenigen Ausnahmen) dieser Farbstoff nicht in das Zellinnere eindringen kann. Nach der Trypsinierung und Waschung in PBS wurde zur Zellsuspension Trypanblaulösung (0,5% in PBS) zugegeben und gemischt. Nach 5 Minuten wurde ausgewertet.

#### **4.3 Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen *in vitro* kultivierter Endothelzellen**

Die vaskuläre Entwicklung und Morphologie vier verschiedener Endothelzellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2* des bovinen Corpus luteum wurde in einem Zeitraum von 42 Tagen zwei mal wöchentlich dokumentiert. Hierzu wurden die Zellen jeweils auf 4 gelatinerte Vertiefungen von 24-Lochplatten ausgesät und unter identischen Bedingungen kultiviert. Nach Mediumwechsel, im Abstand von 3 bis 4 Tagen, wurde die morphologische Entwicklung mittels eines Phasenkontrastmikroskops untersucht. Hierzu wurden nach der Aussaat pro Vertiefung 3 bestimmte Punkte willkürlich ermittelt, die bei jeder Untersuchung aufgesucht und dokumentiert wurden. Zusätzlich wurden auch weitere, nicht festgelegte, markante Stellen in den Vertiefungen dokumentiert. Die Untersuchungen erfolgten an einem Invert-Mikroskop mit 50-, 100-, 200- und 320-facher Vergrößerung und die Photodokumentation mit einer PC-gesteuerten Videokamera (Inteq 000610) und dem Softwareprogramm Axiovision Version 3.0. Mit schrägem Lichteinfall kamen verschiedene Strukturen besonders deutlich und plastisch zum Vorschein.

#### 4.4 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen *in vitro* kultivierter Endothelzellen

Um die Zellmorphologie der vier verschiedenen Endothelzellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2* auf ultrastruktureller Ebene zu analysieren, wurden die Zellen in einem Zeitraum von 42 Tagen, im Abstand von zwei Wochen (14, 28, 42 Tage) untersucht. Hierzu wurden die Endothelzellen jeweils auf 4 gelatinierte, mit Glasplättchen bestückte Vertiefungen von 24-Lochplatten ausgesät und unter identischen Bedingungen angezchtet. Am Tag der Untersuchung wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (0,01 M, pH 7.4) und anschließend vorsichtig mit Cacodylat-Puffer (Cacodylsäure-Natriumsalz-Aqua bidest. 0,1 M, pH 7.2) gespült. Die Fixierung erfolgte bei 4°C in Karnovsky-Lösung (2% Paraformaldehyd und 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer). Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen. Es folgte die Kontrastierung unter Lichtabschluss, 2 Stunden bei 4°C mit 1% Osmiumtetroxid und 1,5% Kaliumferrocyanid (in 0,1 M Cacodylat-Puffer) und dreimaliges Spülen der Zellen für ca. 10 Minuten in 0,1 M Cacodylat-Puffer.

Da der Zellrasen zusammenhängend untersucht werden sollte, mussten im nächsten Schritt die Zellen vom Glasplättchen in der Vertiefung abgelöst werden. Dazu wurde im Labor eine eigene Methode entwickelt (Hirschberg und Plendl, 2005). Die Vertiefungen wurden mit 1,5%igem Agar für 30 min bei 4°C beschichtet. Anschließend wurde der Agar mit anhaftendem Zellrasen *in toto* vorsichtig mittels Glasspatel aus der Vertiefung herausgelöst.

Die Zellen wurden dann in 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 50%, 70%, 80% und 90% (je 15 Minuten) entwässert. Als Zwischenmedium diente reines Propylenoxid (100%, zweimal 15 Minuten). Es folgte die Einbettung in Epon. Hierfür wurden die Proben in einem Propylen-Epon-Gemisch (1:1) für mindestens zwei Stunden sowie schließlich in reinem Epon für vier Stunden inkubiert. In Beemkapseln eingebettet, polymerisierten dann die Proben bei 60°C für 24-48 Stunden.

Von den auspolymerisierten Epon-Blöckchen wurden mit einem Ultramikrotom 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, diese wurden gefärbt und lichtmikroskopisch, auch zur Vororientierung für das Anfertigen von Ultradünnschnitten, beurteilt (Richardson et al., 1960). Von geeigneten Proben wurden zuletzt Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt und auf Kupfergrids aufgelegt. Die anschließende Kontrastierung der Proben erfolgte mit Uranylacetat (Ultrastain I) und Bleicitrat (Ultrastain II) für jeweils 10 Minuten.

Die Auswertung erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop. Zur Photodokumentation wurden Kodak Electron Microscope Filme verwendet.

#### **4.5 Immunzytochemische Untersuchung an Endothelzellen des bovinen Corpus luteum *in vitro***

Für immunzytochemische Untersuchungen wurden die Endothelzellen der vier Kulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2* jeweils auf separate, gelatinierte, mit Glasplättchen bestückte Vertiefungen von 24-Lochplatten ausgesät und unter identischen Bedingungen angezüchtet. Nach intensiver Überarbeitung des Färbeprotokolls wurden pro Antikörper zwei Vertiefungen eingeplant. Der Zeitpunkt der Untersuchungen variierte, je nachdem welche Antikörper angewandt wurden. Markierungen mit Stammzellmarkern wurden nach 3 Tagen *in vitro*-Kultivierung durchgeführt. Progenitorzellen benötigen spezifische Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation und eine linienuntergeordnete Differenzierung induzieren (Gehling et al., 2000). Die Substitution von fetalem bovinem Serum (FBS) ist essentiell für endotheliales Wachstum *in vitro*. Aus diesem Grund wurden die Zellen, um eine mögliche Differenzierung der frischen Aussaat zu verzögern, mit dem FBS-reduzierten Erhaltungsmedium DMEM<sup>+</sup>, welches keine weiteren Wachstumsfaktoren enthält, inkubiert. Der Nachweis von Integrinen fand nach 28 bzw. 42 Tagen *in vitro*-Kultivierung im Selektivmedium P0 statt. Alle Untersuchungen, welche im Kapitel Ergebnisse beschrieben werden, wurden vierfach durchgeführt. Wie Tabelle 2 zeigt wurden dazu parallel zwei indirekte Detektionssysteme angewandt (Biotin-gekoppelter Sekundärantikörper, EnVision+TM-Kit). Experimente mit Antikörpern, welche nach vielfach wiederholtem Überarbeiten des Färbeprotokolls zu keinen spezifischen Ergebnissen führten, wurden aus der Endauswertung ausgeschlossen. Die Mengenangaben bei den immunzytochemischen Untersuchungsmethoden beziehen sich jeweils auf eine Vertiefung der 24-Lochplatte.

Anzahl der Kultivierungstage	Primärantikörper	Sekundärantikörper
28 und 42	Monoklonaler Antikörper Maus anti-Integrin $\beta 1$ (CD 29) Verdünnung 1: 100	Sekundärantikörper Ziege anti-Maus, Biotin konjugiert, Verdünnung 1:200 EnVision+TM
28 und 42	Monoklonaler Antikörper Maus anti-Integrin $\alpha_v\beta_3$ (CD 51/61) Verdünnung 1:50	Sekundärantikörper Ziege anti-Maus, Biotin konjugiert, Verdünnung 1:200 EnVision+TM
28 und 42	Monoklonaler Antikörper Maus anti-human CD49e	keine Kreuzreaktion
3 und 7	Monoklonaler Antikörper Maus anti-CD31 Verdünnung 1:50	Sekundärantikörper Ziege anti-Maus, Biotin konjugiert, Verdünnung 1:200 EnVision+TM
3	Monoklonaler Antikörper Maus anti-Schaf CD31	keine Kreuzreaktion
3	Monoklonaler Antikörper Maus anti-CD34 (DPC Biermann) Verdünnung 1:150	Sekundärantikörper Ziege anti-Maus, Biotin konjugiert, Verdünnung 1:200 EnVision+TM
3	Monoklonaler Antikörper Maus anti-CD34 (DAKO Diagnostika)	keine Kreuzreaktion
3	Monoklonaler Antikörper Maus anti-VEGF-R2 Verdünnung 1:400	Sekundärantikörper Ziege anti-Maus, Biotin konjugiert, Verdünnung 1:200 EnVision+TM
3	Polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-Tie-2	unspezifisch
3	Polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-CD117 (c-kit) Verdünnung 1:200	Sekundärantikörper Ziege anti- Kaninchen, Biotin konjugiert, Verdünnung 1:200 EnVision+TM

**Tabelle 2: Verdünnungen angewandter Primär- und Sekundärantikörper und Kultivierungstage, an dem die immunzytochemische Markierung der vier verschiedenen Endothelzellkulturen des bovinen Corpus luteum durchgeführt wurden.**

#### **4.5.1 Problematik bei der Durchführung immunzytochemischer Untersuchungen mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern**

Ursprünglich war geplant fluoreszierende Sekundärantikörper einzusetzen. Da Endothelzellen autofluoreszierende Komponenten in ihrem Zytoplasma beinhalten, war die exakte Auswertung der Experimente nicht möglich. Unabhängig davon ob grün- (FITC) oder rot- (Rhodamin) fluoreszierende Konjugate angewandt wurden, ließ sich die Eigenfluoreszenz nicht oder nur schwer von der Fluoreszenz des Epitops unterscheiden. Zahlreiche Vorversuche, im Ausschlussverfahren durchgeführt, bestätigten, dass keine für die Reaktion angewandte Chemikalie diese falsch-positive Fluoreszenz verursachte. Aus diesem Grund wurde schließlich für alle immunzytochemischen Tests auf das Biotin-Konjugat zurückgegriffen.

#### **4.5.2 Immunzytochemische Untersuchungsmethode der Endothelzellen mit Biotin-konjugiertem Sekundärantikörper**

Nach dem festgelegten Kultivierungszeitraum wurden die Zellen in den Versuch einbezogen. Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt und die Endothelzellen zweimal mit PBS gespült. Es folgte eine 5 Minuten dauernde Fixierung mit gekühltem Methanol-Aceton (1:1). Nach Absaugen des Fixierungsreagenzes erfolgten zwei Waschungen mit PBS. Um endogene Enzymreaktionen zu eliminieren, wurden die Zellen mit Methanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (140:1) 5 Minuten lang behandelt und danach mit PBS zweimal gewaschen. Die anschließende Inkubation mit einem Proteinblocker sollte weitere unspezifische Proteinbindungen einschränken. Der Proteinblocker wurde nach 20 Minuten abgesaugt. Alle bisher beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur, die Zellen wurden mit den Lösungen jeweils so überschichtet, dass sie bedeckt waren (ca.150 µl). Nach Verdünnung der Stammlösung des entsprechenden Primärantikörpers mit PBS, wurde exakt 150 µl dieses Ansatzes auf die Zellen pipettiert. Der Antikörper wirkte 24 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4°C auf die Zellen ein.

Dann wurden die Zellen zur Entfernung von nicht gebundenem Antikörper dreimal mit PBS gewaschen und 150 µl des mit PBS verdünnten Biotin-gebundenen Sekundärantikörpers aufgetragen. Nach 30 Minuten Inkubation (Raumtemperatur) wurde mit PBS zweimal gespült und 150 µl des Streptavidin-Biotin-Komplexes hinzupipettiert. Die Einwirkzeit betrug 30 Minuten. Es folgten zwei weitere PBS-Spülungen. Zur sichtbaren Darstellung der Reaktion kam Diaminobenzidin (DAB) zum Einsatz. Hierfür wurden 10 mg DAB mit 50 ml TRIS-Puffer (pH 7,6) und 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) zu einem Ansatz vermischt. 100 µl dieses Ansatzes wurden auf die Zellen aufgetragen. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde das Ende der Reaktion festgestellt (Dauer ca. 5 Minuten). Mit einem Hämalaun-Reagenz konnten im

Anschluss die Zellkerne farblich kontrastiert werden (Einwirkzeit, unter lichtmikroskopischer Kontrolle, ca. 3 Minuten). Nach einer letzten Spülung der Zellen mit Aqua dest., wurden die Glasplättchen mit einer Pinzette aus der Kulturschale sehr vorsichtig abgehoben und mit der bewachsenen Seite auf einen Objektträger gelegt. Als Einbettmedium für die bewachsenen Glasplättchen diente Glycerin-Gelatine. Die Ermittlung des Testergebnisses erfolgte an einem Phasenkontrastmikroskop. Eine Videokamera (DXM 1200) mit angeschlossener Bildbearbeitungssoftware (ACT-1 Version 2,20) diente der Dokumentation.

#### **4.5.3 Immunzytochemische Untersuchungsmethode der Endothelzellen mit EnVision+TM-Kit**

Der erste Teil des Prozedere (Anzucht der Zellen, Vorbehandlung mit Primärantikörper) entsprach dem unter 4.5.2 beschriebenen.

Zur Entfernung von nicht gebundenem Primär-Antikörper wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 150 µl des EnVision+TM-Kits aufgetragen. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit PBS zweimal gespült. Zur sichtbaren Darstellung der Reaktion kam (entsprechend Punkt 4.5.2) Diaminobenzidin (DAB) zum Einsatz. Hierfür wurden 10 mg DAB mit 50 ml TRIS-Puffer (pH 7,6) und 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) zu einem Ansatz vermischt. 100 µl dieses Ansatzes wurden auf die Zellen aufgetragen. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurde das Ende der Reaktion festgestellt (Dauer der Reaktion ca. 5 Minuten). Mit einem Hämalaun-Reagenz konnten im Anschluss die Zellkerne farblich kontrastiert werden (Einwirkzeit, unter lichtmikroskopischer Kontrolle, ca. 3 Minuten). Nach einer letzten Spülung der Zellen mit Aqua dest., wurden die Glasplättchen mit einer Pinzette aus der Kulturschale vorsichtig abgehoben und mit der bewachsenen Seite auf einen Objektträger gelegt. Als Einbettmedium für die bewachsenen Glasplättchen diente Glycerin-Gelatine. Die Ermittlung des Testergebnisses erfolgte an einem Phasenkontrastmikroskop. Eine Videokamera (DXM 1200) mit angeschlossener Bildbearbeitungssoftware (ACT-1 Version 2,20) diente der Dokumentation.

#### **4.5.4 Kontrollen der immunzytochemischen Untersuchungen**

Jeweils 2 mitgeführte Negativkontrollen sollten die Zuverlässigkeit der Ergebnisse sichern. Der Primärantikörper wurde zum einen durch PBS, zum anderen durch Maus- bzw. Kaninchenserum (normal, IgG1) ersetzt. Alle anderen Schritte des Prozedere entsprachen denen der Kapitel 4.5.2 bzw. 4.5.3. Für Positivkontrollen kamen *in vitro* kultivierte Granulosazellen, oder je nach eingesetztem Antikörper, auch paraffineingebettete Gewebeschnitte (Lymphknoten, Nabelschnur, Ovar, Gehirn, Haut, Lunge) zum Einsatz.

#### **4.5.5 Auswertung der immunzytochemischen Untersuchungen**

Die Auswertung der immunzytochemischen Untersuchungen erfolgte im Fall des Nachweises der Integrine CD29 und CD51/61 auf qualitativer Ebene. Es wurde beurteilt, ob negative oder positive Reaktionen vorlagen und wo diese lokalisiert waren. Um die Potenz zur Ausbildung dreidimensionaler tubulärer Strukturen darzustellen und zu dokumentieren, wurde eine Fokussierungsmethode entwickelt. Dabei wurden chronologisch verschiedene Ebenen des Präparats am Lichtmikroskop fokussiert und jede einzelne Ebene mit einer Videokamera (DXM 1200) mit angeschlossener Bildbearbeitungssoftware (ACT-1 Version 2,20) dokumentiert. Mit der Power Point Software (Standardprogramm im Microsoft Office Packet von Windows) wurde durch Übereinanderlagerung und Verknüpfung der einzelnen Aufnahmen eine filmische Sequenz produziert, welche erlaubte, die Dreidimensionalität, wenn vorhanden, deutlich darzustellen. Der Film wurde auf eine CD-ROM gebrannt und als Bestandteil der Arbeit beigelegt.

Die Auswertung der immunzytochemischen Untersuchungen der Epitope CD31, CD34, CD117 und KDR wurde auf zwei verschiedene Weisen durchgeführt. Zunächst wurde eine Einschätzung des Anteils positiv markierter Zellen im Vergleich zu den immunonegativen Zellen praktiziert. Dafür wurden 20 Gesichtsfelder (Vergrößerung 1 x 400) willkürlich ausgewählt. Die Gesamtfläche eines Gesichtsfeldes betrug  $0,3 \text{ mm}^2$ .

Danach wurden die Zellen ausgezählt. Die immunopositiven und immunonegativen Zellen wurden gegen die Gesamtanzahl der Zellen pro Gesichtsfeld ( $0,3 \text{ mm}^2$ ) prozentual verrechnet. In die Auswertung wurden die Ergebnisse von vier Versuchswiederholungen miteinbezogen. Pro Versuchsdurchlauf, Kultur und Antikörper wurden ca. 1300 Zellen ausgezählt.

#### **4.6 Histologische Untersuchung mittels May-Grünwald-Giemsa-Färbung**

Für jede Untersuchung wurden die Endothelzellkulturen in jeweils 4 gelatinierte, mit Glasplättchen bestückte Vertiefungen separater 24-Lochplatten ausgesät.

Die Glasplättchen wurden nach 14, 28 bzw. 42 Tagen aus den Kulturschalen entfernt. Danach folgte eine Fixierung der Proben mit Methylalkohol-Aceton (1:1). Nach 5 Minuten erfolgte eine Spülung mit PBS, dann wurden die Präparate luftgetrocknet. Danach folgte eine Überschichtung der Glasplättchen mit 20-30 Tropfen May-Grünwald-Färbelösung, die nach 3 Minuten mit Aqua dest. gründlich abgespült wurde. Dann wurden die Präparate mit verdünnter Giemsa-Gebrauchslösung (3% in Aqua dest.) überschichtet. Nach 20 Minuten Inkubation wurde die Giemsalösung abgegossen. Es erfolgte Trocknung der Proben an der Luft. Schließlich wurden die Glasplättchen mit der bewachsenen Seite auf Objektträger gelegt und in Kanadabalsam eingebettet.

#### 4.6.1 Apoptosen im Ablauf der *in vitro* Kultivierung

Das Vorkommen von Apoptosen wurde in den vier Endothelzellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2* am 14., 28. und 42. Kultivierungstag untersucht. Für jede Untersuchung wurden die Endothelzellkulturen in jeweils 4 gelatinierte, mit Glasplättchen bestückte Vertiefungen separater 24-Lochplatten ausgesät. Die Präparate wurden nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt (siehe 4.6), so dass die lichtmikroskopische Auszählung apoptotischer Zellen möglich wurde. Je Präparat (12 mm  $\varnothing$ ) wurden 20 Gesichtsfelder mit einer Gesamtfläche von 0,3 mm<sup>2</sup> ausgezählt.

#### 4.7 RT-PCR *in vitro* kultivierter Endothelzellen

RT-PCR steht für Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion, einer Kombination aus zwei Methoden der Molekularbiologie um die Genexpression von spezifischen Genen nachzuweisen. Die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, schreibt zuerst die RNA in cDNA um, welche im Anschluss als Ausgangsprodukt für die PCR verwendet wird. Die PCR dient der Vervielfältigung (Amplifikation) der Ziel-DNA-Sequenz. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer) binden am 5'- und 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz. Eine DNA-abhängige DNA-Polymerase repliziert die Ausgangssequenz (Template). Wiederholte Zyklen von Einzelstrangbildung (Denaturierung), Primeranbindung (Annealing) und Neustrangsynthese (Elongation) führen zu einer exponentiellen Vermehrung des von den Primern flankierten Bereichs der Template-DNA. Als Endprodukt wird in vielfacher Kopie doppelsträngige lineare DNA gebildet.

##### 4.7.1 Zellzählung

Der Vorgang entsprach der unter 4.1.5 beschriebenen Durchführung.

##### 4.7.2 Molekularbiologisches Labor

Im molekularbiologischen Labor, wo mit freier RNA gearbeitet wird, sind Kontaminationen mit Ribonukleasen und freier DNA zu vermeiden. Daher wurde eine strikte Trennung der Arbeitsvorgänge vor und nach der Transkription der RNA eingehalten. Einmalhandschuhe wurden mehrfach gewechselt, alle Geräte und Behälter mit Reagenzien wurden 24 Stunden vor Gebrauch mit RNase-Away-Lösung, einem Fremd-DNA- und Ribonukleasen-zerstörendem Reagenz behandelt und unter Luftabschluss inkubiert. Es wurde nur mit zertifiziert RNase- und DNasefreien Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen gearbeitet. Während der Transkription wurde die RNA zusätzlich mit einem RNasehemmer geschützt.

### 4.7.3 RNA-Extraktion

Für die Isolierung der RNA wurden die vier Zellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1*, *BCI RA2* 30 Tage lang auf 6-Lochplatten in jeweils 3 Vertiefungen kultiviert. In entsprechend geringer Anzahl ausgesät, entwickeln Endothelzellkulturen keine tubulären Strukturen, sie verbleiben im Monolayer-Stadium.

Die folgende Beschreibung der Methode und die Mengenangaben beziehen sich auf eine Kultur.

In einer Laborwerkbank mit Abzug wurde das Medium aus den Vertiefungen abgesaugt. Die Zellen wurden mit PBS dreimal gewaschen. Danach wurde das PBS aus den Kulturschalen gründlich auf ein sauberes Tuch abgeklopft. In jede Vertiefung wurde 335 µl Tri-Reagenzlösung einpipettiert. Um eine vollständige Zellyse und Homogenisierung erreichen zu können, wurden die Zellen nach 5 Minuten Inkubation durch Aufsaugen und Ablassen mit einer Pipette gelöst. Das Lysat aller Vertiefungen wurde anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Homogenisierung diente der DNA-Zerteilung und der Viskositätserniedrigung des Lysats. Lysis führt zur Zerstörung von Zellwänden und zur RNA-Freisetzung. Zu den lysierten Zellen wurde 0,2 ml Chlorophorm hinzugegeben. Dieses Gemisch musste zuerst 15 Sekunden lang geschüttelt, dann 10 Minuten bei Raumtemperatur ruhen und dann zentrifugiert werden (20 Minuten, 10.000 x g, 4°C). Dadurch entstanden im Reaktionsgefäß drei Phasen, eine rötliche Proteinphase, darüber die trüb-weiße DNA-Phase und die klare RNA-Phase als oberste Schicht. Von der RNA-Phase wurden 500 µl vorsichtig abgenommen, wobei wichtig war, keine Kontamination durch die DNA-Phase zu verursachen. Die folgenden Waschungen reinigten die RNA. Die RNA wurde zusammen mit 500 µl Isopropanol in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach leichtem Schwenken und einer Ruhezeit von 10 Minuten, wurde die Lösung bei 10.000 x g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Mit 1 ml Ethanol (75%) wurde das Pellet durch Schwenken aufgelöst. Es folgte ein letztes Zentrifugieren (10.000 x g, 4°C, 20 Minuten) sowie Dekantieren des Überstandes. Das RNA-Pellet am Grunde des Eppendorfgefäßes sollte nun bis zur Trocknung geöffnet in einer mit RNase-Away-Lösung gereinigten Kammer stehen. Nach vollständigem Trocknen und Zugabe von 50 µl DEPC-behandeltem Aqua bidest. konnte die RNA-Stammlösung bei -80°C über Monate aufbewahrt werden. Dies gewährleistet einen Schutz der labilen RNA vor unspezifischen Abbauprozessen.

### 4.7.4 Mengenbestimmung der RNA

Der tatsächliche RNA-Anteil in der Stammlösung wurde mit Hilfe eines Photometers, über die Messung der optischen Dichte, bei einer Absorption von 260 nm ermittelt. Anhand der Extinktionswerte bei definierten Wellenlängen (230 nm, 260 nm, 280 nm, 320 nm) konnte die

Reinheit der RNA näherungsweise kontrolliert werden. Ein Reinheitsoptimum liegt vor, wenn maximale Extinktionswerte bei 260 nm gemessen werden können.

Es wurde eine Verdünnung aus 5 µl der Stammlösung und 50 µl DEPC-behandeltem Aqua bidest. hergestellt, in einem Eppendorfgefäß gemischt und danach in eine Küvette überführt. Als Leerwert-Kontrolle dienten 55 µl DEPC-behandeltes Aqua bidest. Die Messung wurde dreimal wiederholt. Nachdem photometrisch die RNA-Konzentration in der Stammlösung bestimmt worden war, konnte die benötigte µl-Menge von 1,5 µg Endkonzentration für die qualitative RT-PCR berechnet werden.

#### **4.7.5 Reverse Transkription**

Die als Template dienende genomische RNA musste vor der PCR mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden (Erststrangsynthese = first-strand-synthesis). Diese fungiert für die anschließende PCR als Template-DNA. In die Reaktion der Reversen Transkription wurde 1,5 µg RNA eingesetzt.

Für den Probenmix wurde die RNA zunächst mit 1,5 µl Oligo-dT und DEPC-behandeltem Aqua bidest. gemischt. Die Menge des DEPC-behandelten Aqua bidest. ist dabei variabel und hängt von der RNA-Konzentration der Stammlösung ab. Es wurde soviel DEPC-behandeltes Aqua bidest. hinzugefügt, dass das Gesamtvolumen eines einfachen Ansatzes der Reversen Transkription 20 µl betrug. RNA, Oligo-dT und das DEPC-behandelte Aqua bidest. wurden 10 Minuten lang bei 65°C im Thermocycler inkubiert.

Danach wurden die noch fehlenden Komponenten des Ansatzes hinzupipettiert (siehe Tabelle 3). Die Reverse Transkription fand nach Abkühlung auf 4°C, 60 Minuten lang bei 42°C statt. Die entstandene cDNA wurde danach sofort für die PCR benutzt oder bei -20°C aufbewahrt.

Für die Negativkontrolle wurde anstatt RNA DEPC-behandeltes Aqua bidest. eingesetzt.

Der **RT-Mix** enthielt folgende Komponenten:

Enzyme und Reagenzien im RT-Mix RT	Volumen	Endkonzentration
RNA	variabel	1,5 µg
Oligo-(Deoxythymidin) 20, biotin-labeled	1,5 µl	1,5 µg
DEPC-behandeltes Aqua bidest.	variabel	
Expand Reverse Transcriptase Puffer, 5x konzentriert (ohne MgCl <sub>2</sub> )	4,0 µl	1x
DTT (Dithiothreitol-Lösung)	2,0 µl	10 mM
d`NTP`s Nucleotide Mix (Desoxynucleosidtriphosphate)	1,5 µl	0,75 mM
MgCl <sub>2</sub>	2,4 µl	3 mM
RNase-Hemmer	0,75 µl	30 Einheiten
Expand <sup>TM</sup> Reverse Transcriptase	1,0 µl	50 Einheiten

**Tabelle 3: Volumen- und Konzentrationsangaben der Reagenzien für einen RT-Reaktionsansatz.**

#### 4.7.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Eine DNA-Polymerase ist ein Enzym, welches die Synthese von DNA aus Desoxyribonucleotiden an einer DNA-Matrize katalysiert. Die DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase bei RNA, DNA-abhängige DNA-Polymerase bei DNA) nutzt dabei einen bestehenden DNA-Einzelstrang als Matrize für die Synthese eines komplementären neuen Strangs. Das Ablesen der DNA-Sequenz gelingt durch Basenpaarung der eingebauten Nucleotidbasen mit der DNA-Matrize, vermittelt durch Wasserstoffbrücken. Die Synthese der DNA erfolgt vom 5` zum 3`-Ende des Tochterstranges. Bei der PCR wird ein genau definierter Teil des DNA-Stranges vervielfältigt und exponentiell vermehrt. Dazu werden Primer von der DNA-Polymerase als Startpunkt benötigt. Diese Startermoleküle hybridisieren spezifisch eine einsträngige RNA- oder DNA-Matrize. Bei einer RNA-Matrize (Einzelstrang) bindet zum ersten Zyklus nur ein Primer (antisense Primer), wohingegen bei einer DNA-Matrize (Doppelstrang) gleich beide Primer binden können. Sie flankieren die Sequenz des zukünftigen PCR-Produktes. Da das Primerpaar (sense und antisense Primer) einen spezifischen RNA- bzw. DNA-Bereich hybridisieren soll, muss dieser Sequenzbereich bekannt sein. Die RNA- und DNA-Sequenzen sowie deren komplementäre Aminosäuresequenzen können über Internetseiten der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information of the Institute of Health, USA) recherchiert werden. Dabei wird darauf geachtet, dass die Primer einen Sequenzbereich von 500-1000 Basenpaaren (bp) flankieren. PCR-Produkte dieser Größe las-

sen sich gut darstellen. In der codierenden Sequenz identifizierte Primer sollten einen für die PCR geeigneten Schmelzpunkt, eine geringe Neigung zur Aneinanderlagerung untereinander sowie nur kurze zusammenhängende Abschnitte eines Nukleotids (Runs) besitzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Zellkulturen *BCI AA*, *BCI RN*, *BCI RA1* und *BCI RA2* die Expression der Rezeptoren des Wachstumsfaktors Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) VEGF-R1 und VEGF-R2 untersucht. Für die Amplifizierung der nachzuweisenden DNA-Sequenzen wurden kommerziell hergestellte Primer benutzt.

#### Ansatz eines **PCR-Mixes**:

Das Gesamtvolumen eines einfachen Ansatzes der PCR betrug 40  $\mu$ l, es waren folgende Komponenten enthalten:

Enzyme und Reagenzien im PCR-Mix	Volumen	Endkonzentration
cDNA	5,0 $\mu$ l	
DEPC-behandeltes Aqua bidest.	24,4 $\mu$ l	1,5 $\mu$ g
PCR-Reaktionspuffer, 10x konzentriert (ohne MgCl <sub>2</sub> )	4,0 $\mu$ l	1x
d`NTP`s Nucleotide Mix (Desoxynucleosidtriphosphate)	4,0 $\mu$ l	0,3 mM
MgCl <sub>2</sub>	2,7 $\mu$ l	1,5 mM
Primer 1 forward	1,0 $\mu$ l	0,75 mM
Primer 2 reverse	1,0 $\mu$ l	3,0 mM
Taq-Polymerase	0,7 $\mu$ l	3,5 Einheiten

**Tabelle 4: Volumen- und Konzentrationsangaben der Reagenzien für einen PCR-Reaktionsansatz.**

Die cDNA und das DEPC-behandelte Aqua bidest. wurden zunächst in ein PCR-Tube pipettiert und danach 10,6  $\mu$ l des restlichen, vorgefertigten Reaktionsansatzes zugefügt. Für die Negativkontrolle wurde anstatt 5  $\mu$ l cDNA 5  $\mu$ l der Negativkontrolle aus der RT eingesetzt. Als Positivkontrollen dienten cDNAs von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Plendl in denen die gesuchten Sequenzen bereits nachgewiesen wurden. Die PCR-Produkte dieser Untersuchung wurden schließlich von der Firma Gen-Express, Berlin, Deutschland sequenziert und auf Übereinstimmung mit den angewandten Primern überprüft.

Die PCR-Tubes mit dem kompletten Ansatz wurden in den Thermocycler verbracht.

Der PCR-Prozess besteht aus einer Serie von Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Hauptschritten.

Zunächst wurde die doppelsträngige DNA erhitzt um die Stränge zu trennen (Melting = Schmelzen). Im ersten Zyklus wurde die DNA für längere Zeit erhitzt um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt hatten und nur noch Einzelstränge vorlagen.

- Initiale Denaturierung: bei 94°C 4 Minuten lang
- Denaturierung: bei 94°C 45 Sekunden lang

Nach der Trennung wurde die Temperatur gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen Stränge der DNA anlagern konnten (Annealing = Anlagerung). Die Temperatur dieser Phase hängt im Allgemeinen von dem Schmelzpunkt der Primer ab. Wird die Temperatur falsch gewählt, kann das dazu führen, dass die Primer sich nicht oder an der falschen Stelle an der Ausgangs-DNA anlagern.

- Annealing bei 62°C 30 Sekunden lang

Schließlich füllte die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auf. Sie begann am angelagerten Primer und folgte dem DNA-Strang (Elongation = Verlängerung). Generell hängt dabei die Temperatur von der DNA-Polymerase ab und die Zeit, die dieser Schritt benötigt, hängt von der DNA-Polymerase und der Länge des Fragments ab, das vervielfältigt werden soll.

- Elongation: bei 72°C 45 Sekunden lang, bei jedem Zyklus Verlängerung um 1 Sekunde

Die beiden entstandenen DNA-Stränge bildeten die Vorlage für den nächsten Durchlauf, die Menge der DNA verdoppelte sich also bei jedem Durchlauf. Der Zyklus (Denaturierung, Annealing, Elongation) wurde 35-fach wiederholt. Es folgte die finale Extension.

- Finale Extension: bei 72°C 7 Minuten lang

Als Endprodukt wurde in vielfacher Kopie doppelsträngige lineare DNA gebildet. Das PCR-Produkt konnte einige Stunden bei der Haltetemperatur (4°C) bis zur Auswertung im Thermocycler aufbewahrt werden.

Die Teilschritte der PCR sind in Tabelle 5 aufgelistet.

**VEGF-R1, VEGF-R2**

Reaktion	Reaktionsvorgang	Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierung	94°C	4 Minuten
2	Denaturierung	94°C	45 Sekunden
3	Annealing	62°C	30 Sekunden
4	Elongation	72°C	45 Sekunden, bei jedem Zyklus Verlängerung um 1 Sekunde
5	35-fache Wiederholung des Zyklus (Reaktionsschritte 2-4)		
6	Finale Extension	72°C	7 Minuten

**Tabelle 5: Teilschritte bei der Amplifizierung des VEGF-R1 und VEGF-R2 in der PCR.**

#### 4.7.7 Auswertung der PCR

Um zu überprüfen, ob die Amplifikation des PCR-Produkts erfolgreich war, wurde die horizontale Gelelektrophorese zur Größenfraktionierung der Nukleinsäuren genutzt. Dementsprechend wurden die PCR-Produkte anhand ihrer Größe differenziert. Als Längenstandard diente eine DNA-Leiter (Gemisch aus Oligonukleotiden bekannter Größe).

Die Agarose wurde in einer Konzentration von 2% verwendet. Dazu wurde sie in Reaktionspuffer (siehe Kapitel 3.4.5.1) in einer Mikrowelle gelöst. Es ist dabei darauf zu achten, dass ein weithalsiges, großes Gefäß (z.B. Erlenmeyer-Kolben) hierfür benutzt wird, weil die Lösung sonst leicht überkocht. Das Gel sollte erst in die Kammer gegossen werden, wenn es luftblasen- und schlierenfrei ist. War das Gel gehärtet, wurde es mit Reaktionspuffer ca. 0,75 cm überschichtet.

Als Längenstandard diente eine DNA-Leiter (100 bp Super Ladder-low), die der zu erwartenden Größe der DNA entsprach. Für die Befüllung von einem Slot wurden 4 µl Ladder, 8 µl DEPC-behandeltes Aqua bidest. und 4 µl Blaupuffer (Gel Loading Buffer 6x) zusammen gegeben und 15 µl des Größenmarkers aufgetragen. Schließlich wurden 15 µl des jeweiligen PCR-Produkts zusammen mit 3 µl Blaupuffer in die Slots gefüllt. Die Elektrophorese verlief zuerst bei einer Spannung von 40 Volt 10 Minuten lang, danach bei 80 Volt ca. 105 Minuten. Nach Beendigung des Laufs wurden die DNA-Banden mittels einer UV-Lampe sichtbar gemacht. Die Banden der zu untersuchenden DNA wurden mit der DNA-Leiter verglichen, so dass die Spezifität des PCR-Produkts anhand der Basenpaaranzahl bestimmt werden konnte. Die Dokumentation erfolgte mit einer Polaroidkamera (Gelcam Electrophoresis Hood 0.7) und Polaroid Schwarz-Weiß-Filmen (Instance 667).