

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Insgesamt wurde bei dreizehn 3-4 Monate alten Sprague-Dawley-Ratten (450-500g) eine Ballonkatheterdilatation der linken *Arteria carotis communis* durchgeführt. Nach sechs Wochen wurde das Endothel dieser Gefäße untersucht.

Die Tiere wurden in Standardkäfigen gehalten und es stand ihnen Standardnagerkost und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

2.2 Ballonkatheterdilatation

Bei der Ballonkatheterdilatation wurde die linke *A. carotis communis* (ACC) mit einem 2F Fogarty-Embolektomiekatheter über eine Länge von 2,5 cm dilatiert. Dazu wurde der Katheter über eine Inzision der freipräparierten *A. carotis externa* (ACE) in die ACC eingeführt und unaufgeblasen vorgeschoben. Dann wurde er auf eine konstante Größe aufgeblasen und bis zur Bifurkation zurückgezogen. Dieser Vorgang wurde noch weitere fünf Male wiederholt.

2.3 Gefäßpräparation

Die Ratten wurden sechs Wochen nach der Ballondilatation unter Äthernarkose durch Genickbruch getötet. Die *Arteria carotis communis* wurde freigelegt, vorsichtig herauspräpariert und in eine eiskalte Ringerlösung überführt. Unter einem Stereomikroskop wurden die Blutgefäße von der Adventitia und Blutresten befreit und der Länge nach mit einer Mikrodissektionsschere aufgeschnitten. Anschließend wurden die Gefäße in 2-4 mm lange Segmente unterteilt. Diese Segmente wurden bis zur weiteren Verwendung maximal 4 Stunden in eiskalter Ringerlösung aufbewahrt.

Zur weiteren Untersuchung wurde das Gefäßsegment mit Histoacrylgewebekleber an einer Glaskapillare befestigt. Diese wurde so in eine Halterung eingespannt, dass das Gefäß in das

Experimentierbad eintauchte und die luminal Gefäßseite unter einem inversen Mikroskop betrachtet werden konnte.

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Ionenkanalfunktion des Endothels mit Hilfe der Patch-clamp-Technik. Anschließend wurde eine Einzelzell-RT-PCR zur Analyse der Ionenkanalexpression in einzelnen Endothelzellen durchgeführt.

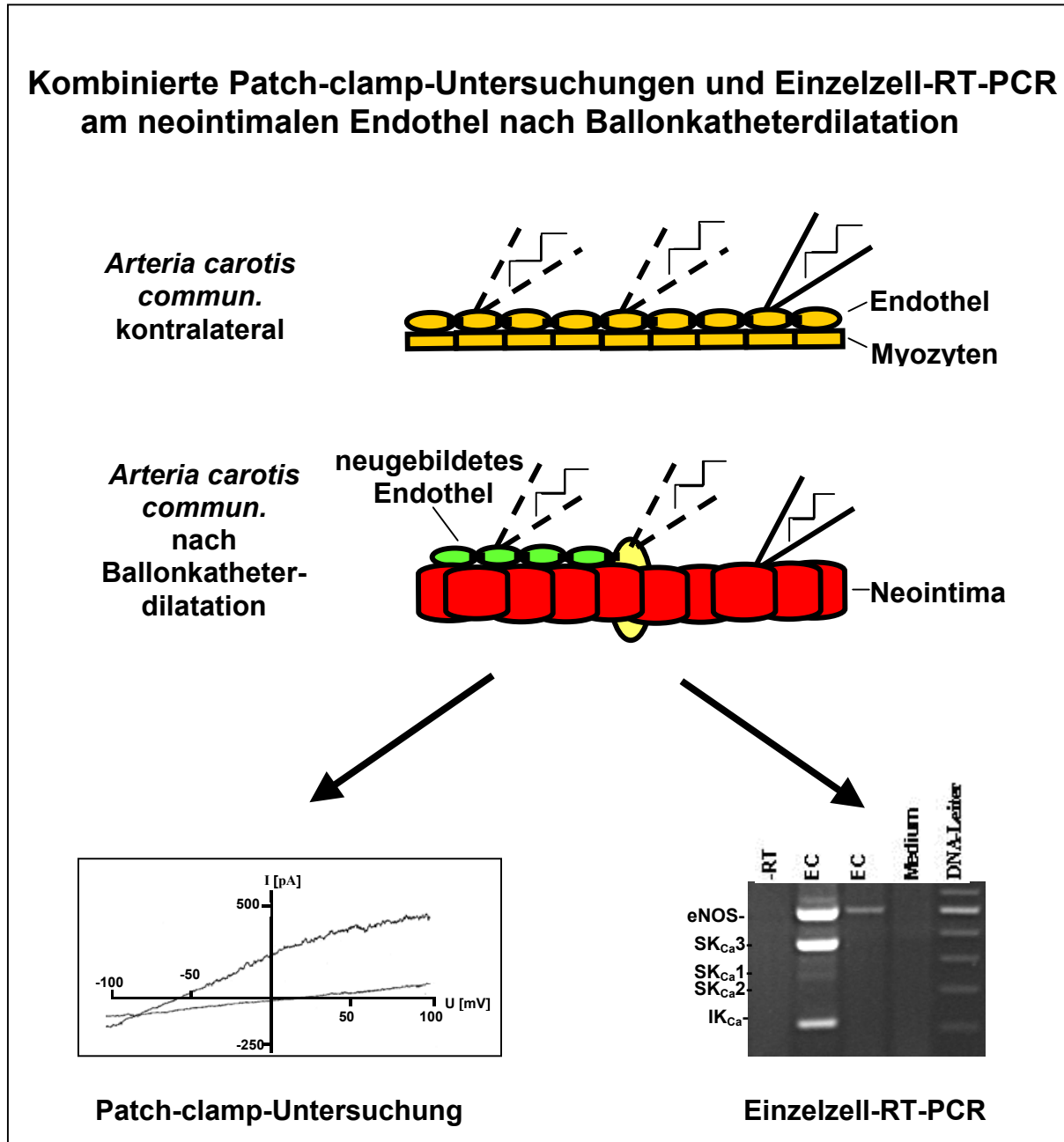


Abb.2: Schematische Darstellung der kombinierten Patch-clamp-Untersuchungen und Einzelzell-RT-PCR

2.4 Patch-clamp-Untersuchungen

Zunächst wurden am intakten Endothel einzelne Endothelzellen mit Hilfe der Patch-clamp-Technik elektrophysiologisch charakterisiert.

Die von Neher und Sakmann 1976 entwickelte Patch-clamp-Technik ermöglicht die Charakterisierung einzelner Ionenkanäle in Zellmembranen (Neher und Sakmann, 1976; Hamill et al., 1981). Dazu wird eine hauchfein ausgezogene Glaskapillare mit einem Durchmesser von 1 μm auf einen kleinen Abschnitt der Zellmembran aufgesetzt und ein leichter Unterdruck angelegt. Die dabei entstehenden hohen Adhäsionskräfte führen zu einer dichten Anlagerung der Zellmembran an die Glaskapillare mit einem Abdichtungswiderstand im $\text{G}\Omega$ -Bereich (*gigaseal*). Das Membranstück ist nun elektrisch effektiv von der Umgebung isoliert, und eine Auflösung von einzelnen Ionenkanalströmen in diesem Membranareal ist möglich.

Das Membranpotenzial wird mit Hilfe eines elektronischen Verstärkers auf ein Sollpotenzial geklemmt und der hierbei fließende Kompensationsstrom wird gemessen. Entsprechend dem ohmschen Gesetz lässt dieser Strom unmittelbare Schlüsse auf die Veränderungen der Leitfähigkeit der untersuchten Membran zu, die im Wesentlichen durch das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen bestimmt wird.

Patch-clamp-Konfigurationen

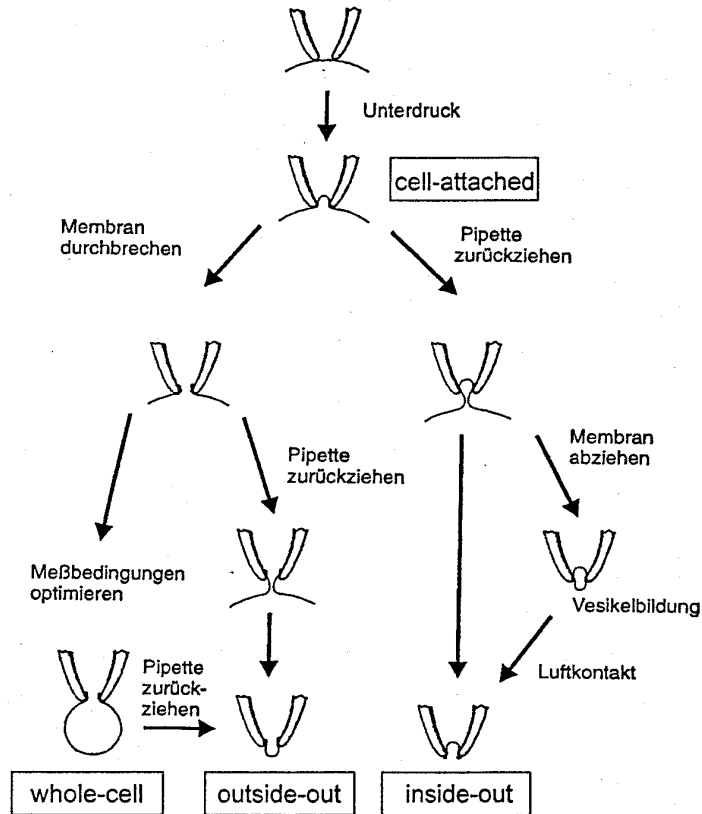


Abb.3: Schematische Darstellung der Patch-clamp-Konfigurationen

Nach der Bildung des *gigaseals* befindet sich das Präparat in der *cell-attached*-Messkonfiguration. Die Zellmembran ist intakt, daher bleiben *second-messenger*-Systeme und intrazelluläre Ionenkonzentrationen unbeeinträchtigt.

Ein Durchbrechen der Membran führt zur *whole-cell*-Konfiguration. Man misst nun den Strom, der durch die Membranfläche der gesamten Zelle fließt. Da sich nach kurzer Zeit das Zytoplasma mit der Pipettenlösung austauscht, erhält man eine definierte Zusammensetzung der Flüssigkeit im Zellinneren.

Membranpotenzialmessungen

Ausgehend von der *whole-cell*-Konfiguration kann in den *current-clamp*-Modus umgeschaltet werden. Dabei wird der durch die Membran fließende Strom fest vorgegeben und das Potenzial wird als Variable gemessen.

2.4.1 Versuchsaufbau

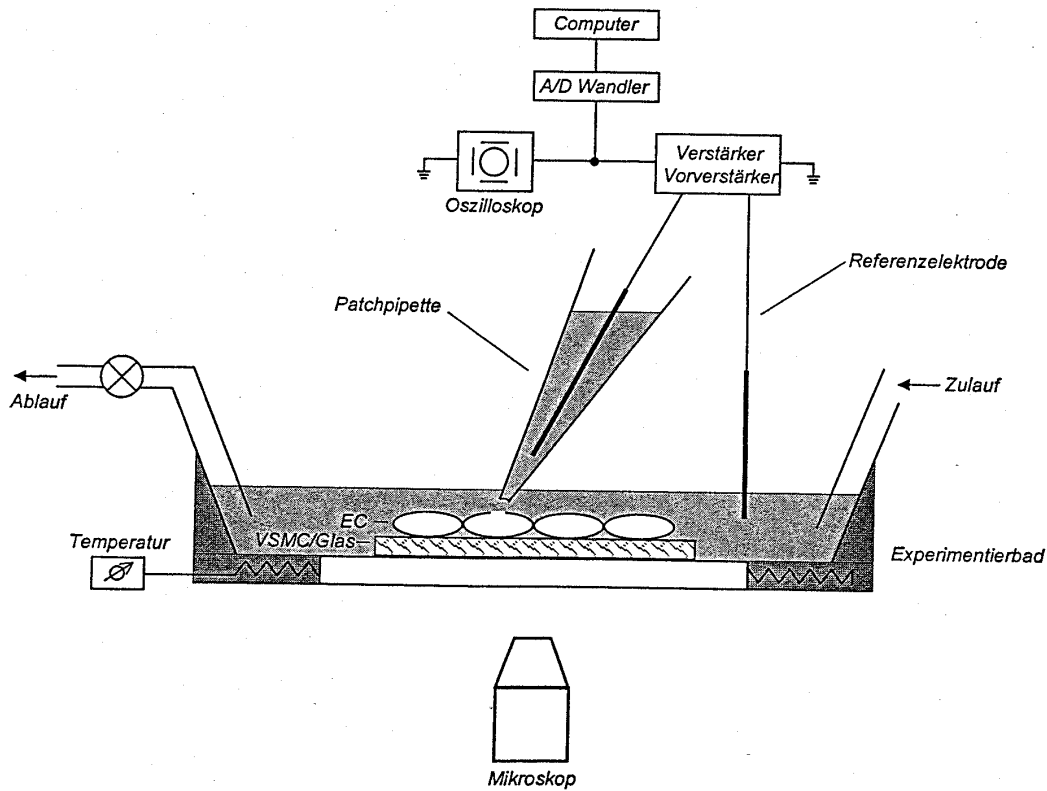


Abb.4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Die Versuchsanordnung und das Mikroskop waren auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert. Um eine elektrische Abschirmung zu gewährleisten, wurde der Messplatz von einem Faradaykäfig umgeben und alle leitenden Komponenten über einen gemeinsamen Massepunkt geerdet. Das Experimentierbad wurde auf dem Objektisch des inversen Mikroskops befestigt. Es besaß ein Zu- und Ablaufsystem, das einen schnellen Badwechsel ermöglichte. In den Plexiglasrand des Experimentierbades war eine Heizspirale eingelassen, die eine exakte Temperatureinstellung der Badlösung erlaubte. Die Experimente wurden bei 37°C durchgeführt.

Die Patchpipetten wurden aus 7,5 cm langen Borosilikatkapillaren mit einer Wanddicke von 0,3 mm und einem Innendurchmesser von 0,9 mm hergestellt. Sie wurden mit einem automatischen Pipettenziehgerät zunächst in drei Erhitzungs- und Zugintervallen gezogen und anschließend poliert. Dadurch erhielt man Patchpipetten mit einem elektrischen

Eingangswiderstand von 2-4 M Ω in symmetrischer 140-mmol-KCl-Lösung. Als Mess- und Referenzelektrode diente ein chlorierter Silberdraht.

Die Pipettenhalterung und der Patch-clamp-Vorverstärker waren auf einem Mikromanipulator befestigt, der eine grobe Positionierung der Patchpipette ermöglichte. Die Feineinstellung wurde unter optischer Kontrolle über Piezoelemente gesteuert.

Die Druckverhältnisse in der Patchpipette wurden über ein Schlauchsystem, das an eine Wassersäule gekoppelt war, reguliert.

2.4.2 Stromaufzeichnung und Datenauswertung

Mit dem Patch-clamp-Verstärker wurden die gemessenen Kompensationsströme verstärkt und in entsprechende Spannungen konvertiert. Diese konnten auf einem Speicheroszilloskop betrachtet werden. Das Klemmpotenzial wurde über einen internen Spannungsgeber auf Werte zwischen -100 und +100 mV eingestellt. Der zur Aufrechterhaltung des jeweils angelegten Klemmpotenzials notwendige Kompensationsstrom wurde registriert. Im *current-clamp*-Modus wurde der im Elektrodenkreis fließende Strom geklemmt, und damit das dazugehörige Potenzial gemessen. Die analogen Strom- und Spannungswerte wurden nach Tiefpassfilterung (-3dB, 1000 Hz mit einer *sample time* von 0,5 s) von einem A/D-Wandler digitalisiert und auf Wechselplatten (Syquest 44 MB) gespeichert.

Die Datenauswertung erfolgte für die Ganzzelleableitungen mit dem Auswerteprogramm M2Lab Analysis/Review (HEKA-Instrumente, Lambrecht).

Die Berechnung der Leitfähigkeit, Ionenselektivität und Offenwahrscheinlichkeit der Ionenkanäle wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Hille, 1984, 1992; Hamill, 1981; Hoyer et al., 1991, 1994, 1996).

2.4.3 Lösungen

Tabelle 1: Pipettenlösung

KCL	135 mmol/l
MgCl ₂	4 mmol/l
EGTA	1 mmol/l
Hepes	5 mmol/l
CaCl ₂	0,955 mmol/l ([Ca ²⁺] _{frei} = 3 µmol/l)
pH-Wert	7,2

Tabelle 2: Badlösung

NaCl	137 mmol/l
Na ₂ HPO ₄	4,5 mmol/l
KCl	3 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,5 mmol/l
MgCl ₂	0,4 mmol/l
CaCl ₂	0,7 mmol/l
pH-Wert	7,4

Den Lösungen wurden 0,1% Diethyl-Pyrocbonat zugeführt, um RNA-zerstörende Enzyme zu entfernen.

2.5 Isolierung von einzelnen Endothelzellen

Zunächst erfolgte eine ca. 20-minütige Inkubation des Gefäßsegments bei 37°C mit 0,5% Trypsin und 0.02% EDTA in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, um eine Lockerung der Endothelzellen von der Basalmembran zu erreichen. Anschließend wurde das Gefäß für 5 Minuten mit PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ perfundiert. Dadurch konnte die enzymatische Reaktion gestoppt, und Trypsin sowie am Gefäßlumen haftende Zellen ausgewaschen werden.

Unter mikroskopischer Kontrolle wurden einzelne Endothelzellen mit der Patch-Pipette mittels Anlegen eines Unterdrucks fixiert und mechanisch von dem Gefäß abgelöst. Die an der Patch-Pipette haftende EC wurde samt der Pipettenlösung in ein Reaktionsgefäß mit dem RT-Ansatz überführt. Anschließend wurde mit einer modifizierten Einzel-Zell-PT-PCR (Lambolez et al., 1992) nachgewiesen, welche Gene die jeweilige Zelle in mRNA transkribiert hatten.

2.6 Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist ein enzymatisches Verfahren, mit dessen Hilfe sich die Expression geringer RNA-Mengen analysieren lässt. Die zu untersuchende mRNA wird mittels reverser Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben, und die so entstandene cDNA dient dann als Matrize für die anschließende Polymerase Kettenreaktion (PCR).

Die PCR erlaubt die selektive *in vitro* Amplifikation einer spezifischen DNA-Region. Sie besteht aus sich wiederholenden Reaktionszyklen mit den folgenden Schritten:

Zunächst wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen in Einzelstränge denaturiert. Nun wird die denaturierte DNA rasch auf die Hybridisierungstemperatur abgekühlt, bei der die verwendeten Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge anlagern (*annealen*) können. In einem letzten Schritt ergänzt die DNA-Polymerase in Anwesenheit von Desoxyribonucleosid-5'triphosphaten (dNTPs) den jeweiligen Einzelstrang ausgehend vom 3'OH-Ende der Primer zum Doppelstrang. Dazu wird das Reaktionsgemisch auf 72°C, dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase, erhitzt.

Jeder weitere Zyklus führt zu einer Verdopplung der neu synthetisierten Moleküle. Die Primer flankieren die DNA-Region, die amplifiziert werden soll. Deshalb ist eine

Voraussetzung für den Einsatz der PCR, dass von den entsprechenden Ziel-DNA-Abschnitten die Basensequenzen der beiden Enden bekannt sind.

Da bei den durchgeführten Versuchen einzelne Endothelzellen verwendet wurden, waren nur sehr geringe Mengen an cDNA vorhanden. Daher wurde, aufbauend auf dem Produkt der ersten, eine zweite PCR angeschlossen, um die Sensitivität zu erhöhen. Durch den Einsatz von *nested* Primern, die innerhalb des initial amplifizierten DNA-Abschnitts ansetzten, konnte auch die Spezifität erhöht werden.

Reverse Transkription (RT)

Die Endothelzelle und der Inhalt der Patchpipette (ca. 6 µl) wurden in ein Reaktionsgefäß mit 1 µl *first strand* Puffer, 0,5 µl dNTPs (10 mmol/l each), 1 µl Random Hexanucleotid Primern (100 µmol/l), 1 µl DTT (0,1 M) und 0,5 µl RNase-Inhibitor überführt. Sofort wurde der Reaktionsansatz auf Trockeneis eingefroren, um ein Aufbrechen der Zellmembran zu erreichen. Nach dem Auftauen wurden 0,5 µl reverse Transkriptase (200 U/µl) hinzugefügt. Die RT-Ansätze mit einem Volumen von 10 µl wurden daraufhin in einem Cycler 10 Minuten bei 21°C, 60 Minuten bei 37°C und abschließend 4 Minuten bei 94°C inkubiert.

Als Kontrollproben wurden bei jeder RT-PCR Proben der Badlösung nahe den Endothelzellen aspiriert und identisch weiterverarbeitet.

Da nach der Ernte der einzelnen Endothelzellen auch noch der Zellkern im Reaktionsansatz vorhanden war, musste sichergestellt werden, dass bei der nachfolgenden PCR keine genomischen DNA-Fragmente amplifiziert wurden. Es wurden daher pro Ansatz 1-2 Zellproben ohne Hinzufügen der reversen Transkriptase mitbearbeitet.

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Analyse der Ionenkanalexpression wurde die cDNA in zwei aufeinander folgenden PCR-Schritten mit spezifischen Primerpaaren und sog. *nested* Primerpaaren für die mRNA des K_{Ca} -Kanals mit intermediärer Leitfähigkeit (IK_{Ca}) und für die mRNA der Subtypen des K_{Ca} -Kanals mit geringer Leitfähigkeit (SK_{Ca1} , SK_{Ca2} , SK_{Ca3}) amplifiziert. Als Endothelzellmarker wurde in derselben PCR die Expression der endothelialen NO-Synthase detektiert. Die Kombination verschiedener Primerpaare in einem Reaktionsansatz bezeichnet man als *multiplex* PCR. Einen Überblick über die verwendeten Primer und ihre Sequenzen gibt Tab. 1.

Die effizientesten PCR-Bedingungen, wie MgCl₂-Konzentration, Anzahl der Zyklen, Annealingtemperatur und Primerkombination, wurden zuvor mit cDNA von aortalen Endothelzellen der Ratte ermittelt. Sequenzspezifische Oligonukleotidprimer wurden so ausgewählt, dass sie Intronsequenzen überspannten und somit eine Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen wurde. Die PCR-Produkte hatten eine Länge von 125 bis 512 Basenpaaren.

Die erste *multiplex* PCR wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz mit 10 µl RT-Produkt, 5 µl PCR-Puffer (10x), 2 µl dNTPs (10 mmol/l each), 3 µl MgCl₂ (50 mmol/l), 1 µl von jedem *sense*-Primer, 1 µl von jedem *antisense*-Primer und 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/l) durchgeführt. Die Proben wurden in einem programmierbaren Thermocycler mit folgendem Temperaturprofil inkubiert: Einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 Minuten folgten 50 Zyklen der Denaturierung (94°C, 30 Sekunden), der Hybridisierung (*annealing*, 55°C, 1 Minute) und Elongation (72°C, 1 Minute). In einem letzten Schritt wurden die Proben 10 Minuten bei 72°C inkubiert. In einer zweiten PCR mit den *nested* Primern wurden jeweils 5 µl des ersten PCR-Produkts reamplifiziert. Dabei wurden 45 Zyklen mit einer erhöhten Annealingtemperatur von 60°C durchgeführt, um die Spezifität der PCR zu verbessern. Zur Analyse der amplifizierten cDNA wurden die Reaktionsprodukte mit 20 µl PCR-Probenpuffer versetzt und auf ein 2 %iges, ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (in 1x TBE-Puffer) aufgetragen. Als DNA-Längenstandard diente eine 50-bp-DNA-Leiter.

Tabelle 3: Verwendete Primer und ihre Sequenzen, jeweils *sense* und *antisense*

<i>Primername</i>	<i>GenBank- Nummer</i>	<i>Primersequenzen</i>	<i>Produktlänge</i>
reNOS	AJ011116	5' GAGAGGCAGGCTGTCAATG 3' 5' GGGAGTCCTTCCTTCGAGTG 3'	512 bp
reNOS <i>nested</i>	AJ011116	5' CCAGCTCTGTCCTCAGAAGG 3' 5' ATGGATGAGCCAACTCAAGG 3'	356 bp
rIK _{Ca1}	AF156554	5' GAGAGGCAGGCTGTCAATG 3' 5' GGGAGTCCTTCCTTCGAGTG 3'	325 bp
rIK _{Ca1} <i>nested</i>	AF156554	5' CATCACGTTTCCTGACCATTG 3' 5' GTGTTTCTCCGCCTTGTTGA 3'	157 bp
rSK _{Ca1}	AF000973	5' GCACACCTACTGTGGGAAGG 3' 5' AGCTCCGACACCACCTCATA 3'	399 bp
rSK _{Ca1} <i>nested</i>	AF000973	5' GCTGAGAAACACGTGCACAA 3' 5' TTGGCCTGATCATTACCTT 3'	236 bp
rSK _{Ca2}	U69882	5' GGAATAATGGGTGCAGGTTG 3' 5' TTTGTTTCCAGGGTGACGAT 3'	404 bp
rSK _{Ca2} <i>nested</i>	U69882	5' CTTGGTGGTAGCCGTAGTGG 3' 5' GAATTTCCGTTGATGCTTCC 3'	205 bp
rSK _{Ca3}	U69884	5' AACCCCTCCAGCTCTTCAGT 3' 5' TGTGGTAGGCGATGATCAAA 3'	399 bp
rSK _{Ca3} <i>nested</i>	U69884	5' GATAACCATGCCACACAGAC 3' 5' ATTCAGGGCCAACGAAAAC 3'	286 bp

2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durchgeführt, um die Identität der amplifizierten PCR-Fragmente zu verifizieren. Die Nukleotidsequenzen wurden dabei mit dem von Sanger entwickelten Kettenabbruchverfahren ermittelt (Sanger et al., 1977): Die zu sequenzierende DNA wird gereinigt und mit Hilfe einer DNA-Polymerase und dNTPs repliziert. Zusätzlich enthält das Reaktionsgemisch noch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonucleosid-5'-triphosphate (ddNTPs), die mit den dNTPs konkurrieren. Der Einbau dieser Analoga blockiert das weitere Wachstum der Kette, da ihnen die Desoxy-3'-OH-Gruppe fehlt, um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. Jeder durch die DNA-Polymerase synthetisierte Strang endet also an einem zufälligen Nukleotid der Sequenz. Die hierbei entstehende Leiter aus DNA-Fragmenten wird elektrophoretisch getrennt und über ein Polyacrylamid-Gel sichtbar gemacht.

Versuchsdurchführung

Die DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und dann über den Säulen eines Quiagen-Gel-Extraktions-Kits nach der Anleitung des Herstellers gereinigt. Der 20 µl Reaktionsansatz für die Sequenzierung enthielt 60 ng der gereinigten DNA, 0,5 µM Primer der jeweiligen PCR-Reaktion (siehe Tabelle) und 4 µl der Sequenzierlösung, bestehend aus dNTPs, fluoreszenzmarkierten ddNTPs und der DNA-Polymerase. Dieser Reaktionsansatz wurde in 25 Zyklen bei 95°C für 10 Sekunden und 60°C für 4 Minuten inkubiert. Die dabei entstandenen Replikationsprodukte wurden nun über Centri-Seps-Säulen gereinigt, in einem Vakuumtrockner getrocknet und in 3 µl Probenpuffer resuspendiert. Einer Denaturierung für 2 Minuten bei 90°C folgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente über ein Polyacrylamid-Gel. Nun wurden die Fluoreszenzsignale ausgewertet und damit die Sequenz der PCR-Produkte bestimmt.

2.8 Statistische Auswertung

Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die beiden Gruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests verglichen. P-Werte <0.05 wurden als signifikant erachtet.

2.9 Chemikalien

Acetylcholin (Sigma)

Agarose (Life Technologies, Eggenstein)

Apamin

Charybdotoxin (ICN, Meckenheim)

Clotrimazol

Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dNTPs) (Promega, Madison)

Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphate (ddNTPs) (Sigma, St.Louis)

Diethyl-Pyrocbonat (Sigma, Deisenhofen)

Dithiothreitol (DTT) (Life Technologies, Eggenstein)

50 bp DNA-ladder (Life Technologies, Eggenstein)

DNA-Polymerase (Sigma, St.Louis)

1-Ethyl-2-Benzimidazolinon (1-EBIO)

EDTA/Dextranblau: 25 mM EDTA, 5% (w/v) Dextranblau, pH 8,0

Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt)

Ethylenglykol-bis (β -aminoethylether) N, N, N', N'-tetraessigsäure, EGTA (Sigma)

'first strand'-Puffer (Life Technologies, Eggenstein)

N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'(2-ethan-sulfonsäure), Hepes (Sigma)

Iberiotoxin

Kulturmedium: *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), (Biochrom, KG, Berlin)

MgCl₂ (Life Technologies, Eggenstein)

PBS

10x PCR-Puffer (Life Technologies, Eggenstein)

PCR-Probenpuffer: 15% (w/v) Ficoll 400, 0,02% Bromphenolblau in 1x TBE-Puffer

Phosphat gepufferte Saline, PBS (Biochrom, KG, Berlin)

Primer-Paare (TIB MOL BIOL, Berlin)

Probenpuffer für Sequenzierung: 100 µl Formamid, 20 µl EDTA/Dextranblau

Random Hexanucleotid Primer (Boehringer, Mannheim)

RNasin-Ribonuclease-Inhibitor (Promega, Madison)

Sequenziergel: 18 g Harnstoff, 7,5 ml Acrylamid/N,N`Methylen-Bisacrylamid (30% / 0,8% w/v), 6 ml 10x-Puffer, 23 ml H₂O, 350 µl 10% Ammoniumpersulfat, 15 µl TEMED

Sequenzierlösung *Dye terminator ready reaction mix* AmpliTaq, FE (Perkin Elmar, Weiterstadt)

Superscript RT (Life Technologies, Eggenstein)

Taq-DNA-Polymerase (Life Technologies, Eggenstein)

TBE-Puffer (10x): 0,9 M Borsäure, 10 mM EDTA

Trypsin 0,5% (Biochrom KG, Berlin)

Wenn nicht anders angegeben, wurden die herkömmlichen Chemikalien von Sigma (St. Louis) oder Merck (Darmstadt) mit analytischer Reinheit bezogen.

2.10 Materialien und Geräte

Präparierbesteck: Pinzetten, Skalpelle, Mikrodissektionsschere

Histoacrylgewebekleber (Braun Melsungen AG, Melsungen)

Borosilikatkapillaren für Pipetten und Halte-Glaskapillaren (Clark electromedic Instruments, Pangbourne)

DMZ-Universal Puller (Zeitz-Instrumente, Augsburg)

Mikroskop (Nikon, TMS)

Experimentierbad mit 2-Kanal Regelgerät für Bad- und Zulaufheizung (Wolfgang Hampel, Neu Isenburg)

Patch-clamp-Mikromanipulator (Luigs und Neumann GmbH, Raitingen)

Schwingungsisolierter Tisch (Physik Instrumente, Waldborn)

EPC 9 computergesteuerter Patch-clamp-Verstärker mit 4 Pol Besselfilter für Atari Mega-ST4
(HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz)

Biozym Maxicycler PTC 9600 (MJ Research, Inc., Watertown, USA)

Powerpack P 24-Spannungsgeber (Biometra, Göttingen)

Gelkammer BIO-RAD WIDE MINI SUB TM CELL (BIO-RAD, Hercules)

ABI 377 automatic sequenzer (Perkin Elmar, Weiterstadt)

QIAquick *gel extraction kit* (Quiagen, Hilden)

Centri-Steps *spin columns* (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Speed vac *concentrator* mit Kühlfalle (Backhofer, Reutlingen)