

---

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid	Bio-Rad
Agarose	Seakem
AG 1295	Calbiochem
AG 1478	Calbiochem
Albumin, bovines	Sigma
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad
Ampicillin	Sigma
BAPTA-AM	Sigma
Bacto-Agar	Difco
BCA (Protein Assay Reagent)	Pierce
Bromphenolblau	Sigma
<sup>3</sup> H-Chloramphenicol	Life Science
Coomassie	Serva
DTT	Boehringer
Ethidiumbromid	Sigma
Glyzin	Gibco
Hefeextrakt	Difco
1 kb-DNA Leiter	Gibco BRL
L-Glutamin	Gibco BRL
Lumiglo	BioLabs

---

MEK-1-Inhibitor (PD 98059)	BioLabs
MEM	Gibco BRL
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva
Maxiprep-Kit	Qiagen
Miniprep-Kit	Qiagen
n-Butyryl Coenzym A	Sigma
PBS <sup>++</sup> -Dulbecco	Seromed
Penicillin/Streptomycin	Seromed
Phenol	Gibco BRL
Phospho-MEK-Antikörper	BioLabs
Phospho-MAPK-Antikörper	BioLabs
Reporter Lyse Puffer, 5fach	Promega
SDS	Roth
TEMED	Serva
Thrombin	Sigma
Tris	Gibco
Tryptose-Phosphat	Sigma
Tween 20	Sigma
Xylencyanol	Serva
Xylol (Isomerengemisch)	Aldrich

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen Merck Sigma, Riedel-de Haen oder Fluka bezogen.

### **2.1.2 Puffer**

#### Blockierungspuffer:

1x TBS, 0,1% Tween-20, 5% fettfreie Trockenmilch

#### Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris-Base, 0,19 M Glyzin, 0,1% SDS, H<sub>2</sub>O

#### Lysepuffer:

0,5 % Triton-X 100, 50 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat, pH 7,2, 0,1 mM Natriumorthovanadat,

2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mg/ml Leupeptin, 4 mg/ml Aprotinin

#### Elektrophorese-Probenpuffer:

0,125 mM Tris (pH 6,8 , 2% SDS, 10% Glycerin, 0,75 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,006%

Bromphenolblau)

#### TBS:

50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl

#### Transferpuffer:

25 mM Tris-Base, 0,2 M Glyzin, 20% Methanol; pH 8,5

### **2.1.3 Seren, Medien**

#### Komplettmedium (CM):

Minimum Essential Medium mit Earls Basal Salts (MEM-EBS, Gibco)

+ 10% fötales Kälberserum (Gibco-BRL)

+ 200 mM Glutamin (Gibco-BRL)

+ 10 mg/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco-BRL)

+ 10 ml Tryptose Phosphate Broth Medium (Sigma)

---

**Quiescence-Medium (QM):**

Minimum Essential Medium mit Earls Basal Salts (MEM-EBS, Gibco)

+ 200 mM Glutamin (Gibco-BRL)

+ 10 mg/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco-BRL)

+ 10 ml Tryptose Phosphate Broth Medium (Sigma)

+ Transferrin (25 µl einer 4 mg/ml Lösung), (Sigma)

+ 500 mg/l Rinderserumalbumin, (Sigma)

**2.1.4 Bakterienstämme**

*E.coli* DH5α      Gibco

**2.1.5 Zelllinien**

Die verwendeten Primärkulturen neonataler, aortaler glatter Gefäßmuskelzellen von neugeborenen Ratten (braune norwegischen Ratten 2-5 Tage nach der Geburt) wurden nach der von Ives und Mitarbeiter publizierten Vorschrift isoliert (52).

**2.1.6 Verwendete SM-MHC-Promotor-Konstrukte und weitere Plasmide**

Die pCAT-basic und pCAT-control Konstrukte bezogen wir von der Firma Promega. Das pCAT-1352 Konstrukt, enthält 1352 bp des SM-MHC-Promotors und wurde uns freundlicherweise von C.S. Madsen, Charlottesville, VA, USA zur Verfügung gestellt.

**pCAT-basic:** 4364 bp, β-Laktamase-Gen, pUC/M13 reverse primer-Bindungsstelle, MCS (HindIII-XbaI), CAT-Gen, SV40 small T Antigen, pUC/M13 forward primer Bindungsstelle

pCAT-control: 4750 bp, pUC/M13 forward primer Bindungsstelle, SV40 Promotor-Region, CAT-Gen, , SV40 small T Antigen, SV40 enhancer-Region, MCS (HindIII-PstI), pUC/M13 reverse primer-Bindungsstelle,  $\beta$ -Laktamase-Gen

weitere Plasmide:

G $_{\alpha q}$ (pCIS-G $_{\alpha q}$ R183C)	S. Offermans, Heidelberg, Deutschland
G $_{\alpha 12}$ (pCIS-G $_{\alpha 12}$ Q229L)	S. Offermans, Heidelberg, Deutschland
G $_{\alpha 13}$ (pCIS-G $_{\alpha 13}$ Q226L)	S. Offermans, Heidelberg, Deutschland
G $_{\alpha i}$ Q205L	S. Offermans, Heidelberg, Deutschland
G $_{\beta 1 \gamma 2}$ -Untereinheit	L. Birnbaumer, M.I. Simon, Los Angeles, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die generierten Zellen wurden in MEM-Komplettmedium (s.o.) in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C vermehrt. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt bis die Zellen Konfluenz erreichten. Die Zellen wurden subkultiviert durch Zugabe von 1%iger Trypsin-EDTA-Lösung. In den hier beschriebenen Experimenten kamen Zellen der Passagen 14 bis 20 zum Einsatz.

### 2.2.2 Transformation von *E.coli* Bakterien

Zur Transformation von Bakterien wurden kommerziell erhältliche Bakterien verwendet (DH5 $\alpha$ ). Die Zellen wurden bis zu ihrem Einsatz bei -80°C aufbewahrt. In sterilen 1.5-ml-Reaktionsgefäßen wurden 1  $\mu$ g Plasmid-DNA mit 10  $\mu$ l kompetenten Zellen gemischt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 1-minütiger Hitzeschritt bei 37°C. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l LB-Medium wurden Zellen für 1 Std. bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die

Zellen wurden nun in zwei Aliquots (A: 10  $\mu$ l, B: restl. Volumen) auf LB-Amp.-Selektionsplatten (75 g/l Luria broth base, pH 7,5, 18 g/l Agar, 0,1 % Ampicillin) ausplattiert und im Inkubator über Nacht bei 37°C aufbewahrt.

### **2.2.3 Plasmid-DNA-Präparation in kleinem Maßstab ("Mini"-Prep.)**

Zur Isolation von kleineren Mengen Plasmid-DNA (z.B. für Restriktionsverdau) wurden jeweils 4-6 Klone von den entsprechenden Selektionsplatten steril gepickt und in vorbereitete Röhrchen mit 3 ml LB-Amp.-Medium überführt. Diese Vorkulturen wurden dann im 37°C-Schüttler über Nacht geschüttelt. Bei erfolgreicher Vermehrung der Bakterien wurden pro Kultur 2 ml Zellsuspension bei 5.000 x g abzentrifugiert und anschließend gemäß dem Protokoll der Fa. Qiagen die Plasmid-DNA über Mini-Säulchen isoliert. Eine Quantifizierung der DNA erfolgte mittels Vergleichabschätzung bekannter DNA auf einem 1%igen Agarose-Gel. Verbleibende Restvolumina der Zellsuspensionen wurden bei 4°C bis zu einer Woche aufbewahrt.

### **2.2.4 Plasmid-DNA-Präparation in großem Maßstab ("Maxi"-Prep.)**

Erwies sich die in "Mini-Präparationen" isolierte DNA gemäß Restriktionsverdau als korrekt, wurde eine Großkultur (300 ml LB-Amp.-Medium) durch Zugabe von 1 ml Zellsuspension angeimpft. Die Großkultur wurde dann über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA gemäß dem Protokoll der Fa. Qiagen unter Einsatz des "Maxi-Prep.-Kits" isoliert. Die präzipitierte DNA wurde in TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert. Reinheit und Menge der isolierten DNA wurden spektrophotometrisch bei 260/280 nm bestimmt.

### **2.2.5 Restriktionsverdau von DNA**

Die Verifizierung der DNA-Sequenzen der verwendeten Plasmide erfolgte durch einen Restriktionsverdau. Je nach Enzym wurden 1-5 U/ $\mu$ g DNA eingesetzt. Der Verdau wurde in dem vom Hersteller angegebenen Puffer angesetzt und je nach Enzym bei 25°C bzw. 37°C für 1-4 Std. inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/5 Vol. Bromphenolblau-Lösung gestoppt. Die entstandenen Fragmente konnten durch Auftrennung in einer Agarose (1-2%)-Gel-Elektrophorese (120 Volt) in TBE-Puffer aufgetrennt werden und durch anschließende Färbung in Ethidiumbromidlösung unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### **2.2.6 Sequenzierung**

Alle smooth muscle-myosin heavy chain-CAT-Promotor-Konstrukte wurden zur nochmaligen Überprüfung der Intaktheit der Sequenz vor dem Einsatz in Transfektionsstudien unter Einsatz eines ABI-Sequencers überprüft.

### **2.2.7 Transfektion glatter Gefäßmuskelzellen**

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen entsprechend Standardvorschriften in 6-Lochplatten subkultiviert, so dass am Tag der Transfektion eine ca. 60-80 % Konfluenz der Zellen vorlag. Für eine Standardanwendung wurden folgende Regeln beachtet:

Eine entsprechende Menge DNA (1  $\mu$ g) in einem sterilen Reaktionsröhrchen in MEM verdünnen (40  $\mu$ l MEM pro Loch auf 6-Loch-Platte). Dann für jedes  $\mu$ g DNA 10  $\mu$ l Superfekt (Qiagen) dazufügen. 10-20 Sekunden auf dem Vortexer mischen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen. Nach 10 Minuten soviel QM zum vorbereiteten Ansatz geben, dass es für jedes Loch 1 ml Transfektionsansatz ergibt. Diesen Transfektionsansatz

sorgfältig durch mehrmaliges vorsichtiges Pipettieren mischen. Die zu transfizierenden Zellen werden einmal mit PBS gewaschen, anschließend wird das Transfektionsgemisch auf die Zellen gegeben und für 4 h inkubiert. Nach 4-stündiger Inkubation wird das Transfektionsgemisch durch Mediumwechsel entfernt. Weitere 48-72 h später erfolgt die Auswertung mittels CAT-Assay und Proteinbestimmung. Abweichungen von diesem Standardprotokoll sind bei den einzelnen Experimenten erwähnt.

### **2.2.8 Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Die Promotor-Aktivität in transfizierten eukaryontischen Zellen wird im allgemeinen untersucht, indem man die Promotor-Sequenz mit einem Gen verbindet, welches für ein leicht detektierbares Reporter-Protein codiert. Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) ist ein zur Untersuchung von eukaryontischer Genexpression weit verbreiteter Reporter. Die Methode zur histochemischen Anfärbung von CAT bedient sich des katalytischen Transfers einer Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf Chloramphenicol unter Bildung von Coenzym A (CoA) und einem Acetylerster. Die freie Sulfhydryl-Gruppe von CoA reduziert Ferricyanid zu Ferrocyanid, welches mit Kupferionen unter Bildung eines braunen Präzipitates komplexiert. Die histochemische Färbung ist zur Bestimmung des Prozentanteils transfizierter Zellen sowie auch zur Optimierung von Transfektionsprotokollen geeignet. Hierzu werden die Zellen nach der Transfektion fixiert, mit PBS gewaschen und mit Färbelösung gefärbt. Zur routinemäßigen Anfärbung und Auswertung der Transfektionseffizienz wurde das "CAT-Staining Set" der Fa. Boehringer Mannheim eingesetzt und gemäß den Vorschriften des Herstellers angewendet. Eine weitere Methode zur Bestimmung der Transfektionseffizienz ist die Koftransfektion mit dem *lacZ*-Reporter-Gen. Dieses Gen codiert für die ersten 146 Aminosäuren der  $\beta$ -Galaktosidase. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Umwandlung von Laktose in

Glukose und Galaktose im normalen *E.coli*-Bakterium. Die Enzymaktivität kann durch ein chromogenes Substrat, wie z.B. X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid) detektiert werden. X-Gal selbst ist farblos, wird aber als Ergebnis der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in ein intensives Blau umgewandelt.

### 2.2.9 CAT-Assay

Mit Hilfe des CAT-Assays kann die Aktivität eines Promotors, der die Transkription des CAT-Gens innerhalb eines Plasmids reguliert, bestimmt werden. Das CAT-Gen codiert für die Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT), die in Bakterien die Antibiotikaresistenz gegenüber Chloramphenicol vermittelt, indem es den Transfer von Butyryl-Gruppen von *n*-Butyryl-CoA auf Chloramphenicol katalysiert. Das CAT-Gen kommt auf natürliche Weise nicht in eukaryontischen Zellen vor.

Nachdem 80  $\mu$ l lysierte transfizierte Zellen, in denen CAT exprimiert wurde, mit  $^3\text{H}$ -Chloramphenicol und *n*-Butyryl-CoA inkubiert wurden, wird im CAT-Assay die Bildung von acyliertem Chloramphenicol gemessen. Für die Messung müssen acyliertes Chloramphenicol und nicht acyliertes Chloramphenicol voneinander getrennt werden. Dies geschieht durch die Zugabe von Xylol, indem das lipophilere Acyl-Chloramphenicol sich in der Xylol-Phase anreichert, während das nicht acylierte Chloramphenicol in der wässrigen Phase verbleibt. Die Xylol-Phase wird anschließend mit einer Szintillationsflüssigkeit gemischt und die Radioaktivität mit Hilfe eines „Liquid Scintillation Analyzer“ gemessen. Die gemessene Radioaktivität korreliert mit der Menge an acyliertem  $^3\text{H}$ -Chloramphenicol, die sich wiederum linear zu der Menge an vorliegendem CAT verhält. Die Menge der CAT hängt von der Häufigkeit der Transkription des CAT-Gens ab, die wiederum eine Funktion der Aktivität

des Promotors ist, der im Plasmid enthalten ist. So lässt sich anhand der gemessenen Radioaktivität indirekt die Promotoraktivität bestimmen.

Die CAT-Aktivität eines Konstruktes wird aus Triplikaten ermittelt und in cpm gemessen. Anschliessend werden die CAT-Werte mit der Proteinbestimmung verrechnet, um die Ungenauigkeit bei der Aussat der Zellen zu korrigieren.

### **2.2.10 Proteinbestimmung**

Grundlage der Bestimmung ist die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine in alkalischer Lösung und die spektrophotometrische Messung des  $\text{Cu}^+$ -Komplexes mit Bicinchonin-Säure (BCA) bei 562 bzw. 570 nm.

Zur Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung wurden 10  $\mu\text{l}$  der Lösung bzw. des BSA-Standards (Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in Lysepuffer) mit 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenz in eine Mikrotiterplatte pipettiert und 30 Min. bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen (Elisa-Reader MR 600, Dynatech). Der Proteingehalt der zu bestimmenden Probe ergibt sich aus dem Vergleich der Extinktion der Probe mit den aus den Standardwerten ermittelten Eichgeraden.

### **2.2.11 Protein-Gel-Elektrophorese**

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden vor dem Abkratzen aus den jeweiligen Kulturschalen 2 mal mit PBS (4°C) gewaschen, anschließend für 4 Min. bei 3.000 x g zentrifugiert und das Pellet mittels Lysepuffer (0,5% SDS in PBS) aufgelöst. Nach erneuter Zentrifugation bei 10.000 x g wurde der Proteingehalt des Überstandes mittels des BCA-Kit (Pierce) bestimmt. Aliquote wurden dann in Elektrophorese-Probenpuffer für 5 Min. bei 100°C aufgekocht. Danach wurden 10  $\mu\text{g}$  Protein pro Spur auf ein 10% SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und mittels

---

Elektrophorese in 8x10 cm Minigelen (BioRad) bei 4°C mit Hilfe des Laemmli-Puffer-Systems aufgetrennt.

### **2.2.12 Westernblot**

Die mittels der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden für 2-3 h bei konstanter Stromstärke (200 mA) im Tanksystem (Bio-Rad) auf Nitrozellulose-Membranen elektrogeblottet. Nach dem Blotten wurden die Gele mit Coomassie Blue gefärbt, um den vollständigen Transfer der Proteine zu überprüfen. Die Membranen wurden für 5 min mit TBS gespült und dann in einem ersten Schritt mit Trockenmilch (fettfrei) in TTBS-Puffer zur Absättigung freier Bindungsstellen inkubiert. Nach einem weiteren Spülschritt für 5 min in TBS wurde im zweiten Inkubationsschritt im gleichen Puffer (TTBS mit Trockenmilch) der erste Antikörper (1:1000) für ca. 12 h bei 4°C zu den Membranen dazugegeben. Nach dreimaligem Waschen in TTBS erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem entsprechenden sekundären HRP-gekoppelten Antikörper (1:2000) ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur. Nach wiederholtem Waschen erfolgte zuletzt die Zugabe des Lumiglo-Chemilumineszens-Reaktionsgemisches. Nach einer Minute Inkubation wurde die Membran in Frischhaltefolie luftblasenfrei eingepackt und mit einem Film für 5 Sekunden bis hin zu 10 Minuten, je nach Intensität des zu erwartenden Signals, in einer Filmkassette exponiert.