

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Untersucht wurden einzelne Endothelzellen aus humanen Mesenterialarterien von Patienten mit einem Adenokarzinom oder einer unspezifischen entzündlichen Erkrankung des Kolons. Direkt nach der Durchführung einer Hemikolektomie bzw. Kolonteilresektion erhielten wir freundlicherweise von Prof. Dr. med. N. Runkel (Abteilung für Chirurgie des UK Benjamin Franklin, FU Berlin) das frische Darmresektat, aus dessen anliegendem Mesenterium ein Gewebestück mit arteriellen Blutgefäßen entnommen und bis zur Präparation in eiskalter PBS-Lösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} aufbewahrt wurde.

Die Entnahme von humanen Mesenterialarterien aus Tumorsektaten zur experimentellen Verwendung wurde von der Ethikkommission der Freien Universität Berlin genehmigt (Zeichen ek.Vhoyer/kmd).

2.1.1 Präparation

Die Mesenterialarterien mit einer Länge von 0,5 - 1 cm und einem Durchmesser von 0,4 – 1,1 mm wurden unter einer sterilen Werkbank vorsichtig vom Bindegewebe der Adventitia befreit und der Länge nach mit einer Mikrodissektionsschere aufgeschnitten. Die Blutgefäße mit intaktem Endothel wurden direkt untersucht oder für kurze Zeit im Kühlschrank in PBS-Lösung aufbewahrt.

Ein Gefäßstück von ca. 2 mm² wurde mit Histoacryl-Gewebekleber auf einer Halte-Glaskapillare befestigt und so in die Experimentierkammer des inversen Mikroskops eingespannt, dass die luminale Gefäßseite der Untersuchungspipette zugänglich war. Die Untersuchungskammer war aus Plexiglas gefertigt und hatte ein Fassungsvermögen von 1-2 ml. Durch einen eingelassenen Heizdraht konnte die Badlösung temperiert werden. Ein Zu- und Ablaufsystem ermöglichte den Wechsel der Badlösung.

2.1.2 Enzymatische Vorbehandlung

Für die Gewinnung von Endothelzellen konnten nach kurzer Vorinkubation des eingespannten Gefäßpräparates mit 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} bei 37°C für 15-20 Minuten einzelne EC mechanisch mit einer Glaskapillare (*Patchpipette*) herausisoliert werden. Dabei wurde unter optischer Kontrolle die Lockerung der Zellverbindungen der Endothelzellen beobachtet und nach Stoppen der enzymatischen Reaktion durch Spülung mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} für ca. 5 Minuten die an der *Patchpipette* haftende EC vorsichtig abgelöst.

2.1.3 Kombination der Patch-clamp-Technik mit molekularbiologischen Nachweismethoden

Direkt nach der Zellisolation wurde die einzelne EC mit Hilfe der Patch-clamp-Technik elektrophysiologisch charakterisiert. Anschließend wurde mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesen, welche Gene diese Zelle in mRNA transkribiert hat.

2.2 Patch-clamp-Untersuchungen

Die Patch-clamp-Technik (HAMILI *et al.*, 1981; NEHER UND SAKMANN, 1976) ermöglicht unter anderem die Untersuchung einzelner Ionenkanäle in Zellmembranen. Ein kleiner Membranfleck (*Patch*) kann durch das Aufsetzen einer sehr fein ausgezogenen Glaskapillare (*Patchpipette*) elektrisch von seiner Umgebung isoliert werden.

Am intakten Endothel wird unter mikroskopischer Kontrolle durch Steuerung von Mikromanipulatoren mit einer *Patchpipette* eine leicht abgerundete EC berührt. Bei Kontakt ändert sich sprunghaft der Pipetteneingangswiderstand. Durch Anlegen eines leichten Unterdruckes wird die elektrisch dichte Verbindung zwischen der Zellmembran und dem Pipettenrand (*seal*) bis zu einem Abdichtungswiderstand im Bereich von 5-10 Gigaohm (*Gigaohmseal*) hergestellt, wodurch Leckströme zwischen der Pipette und der Membran minimiert und eine sehr hohe Auflösung der

elektrischen Membranströme erreicht werden können. Mit einem elektronischen Verstärker kann das Membranpotential auf ein Sollpotential geklemmt und der Kompensationsstrom gemessen werden (*Voltage-clamp*-Messungen).

2.2.1 Patch-clamp-Konfiguration

In der vorliegenden Arbeit wurden vornehmlich *Voltage-clamp*-Messungen mit Aufzeichnung des Ganzzellstroms durchgeführt (*whole-cell-modus*). Zusätzlich wurde neben *Voltage-clamp*-Messungen im Ganzzellmodus in die sogenannte *Current-clamp*- oder Stromklemmanordnung umgeschaltet, in der der Strom durch die Membran fest vorgegeben wird, das Potential variabel bleibt und somit das Membranpotential gemessen werden kann (Membranpotential-Messungen).

Durch Etablierung der elektrisch sehr stabilen Verbindung im Gigaohm-Bereich sind die folgenden Messkonfigurationen der Abbildung 1 möglich (nach HAMILL *et al.*, 1981):

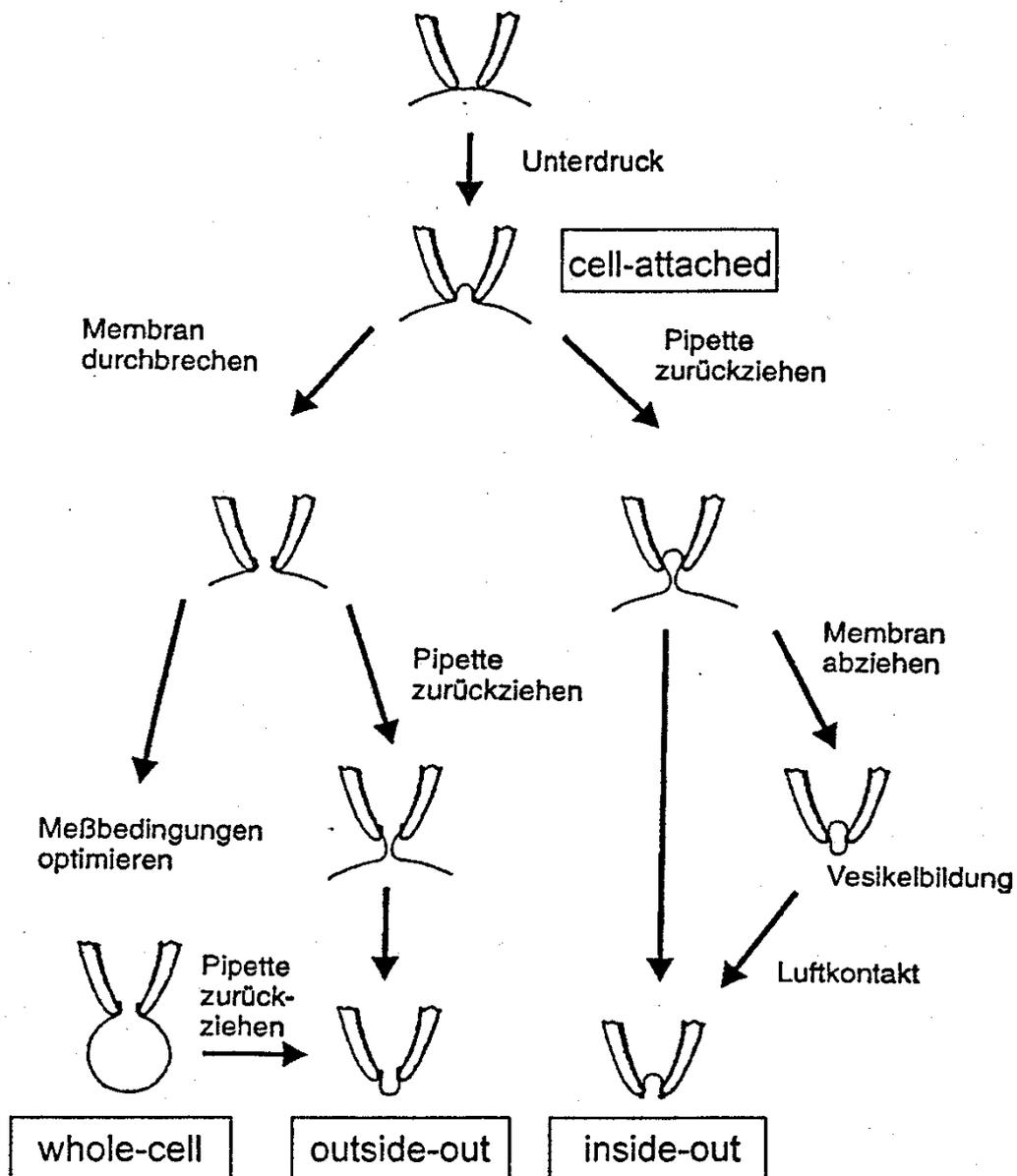


Abb. 1: Schematische Darstellung der Patch-clamp-Konfigurationen und ihre Herstellung

2.2.2 Patchpipetten und Elektroden

Aus 7,5 cm langen Borosilikatgaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,86 mm und einer Wandstärke von 0,32 mm wurden mit einem automatischen Pipettenziehgerät die *Patchpipetten* in drei horizontalen Erhitzungs- und

Zugintervallen gezogen und poliert. Der Eingangswiderstand der Pipetten betrug in symmetrischen 140 mM KCl-Lösungen 4-6 M Ω .

Als Mess- und Referenzelektrode diente ein chlorierter Silberdraht (Ag/AgCl-Elektrode).

2.2.3 Apparativer Versuchsaufbau

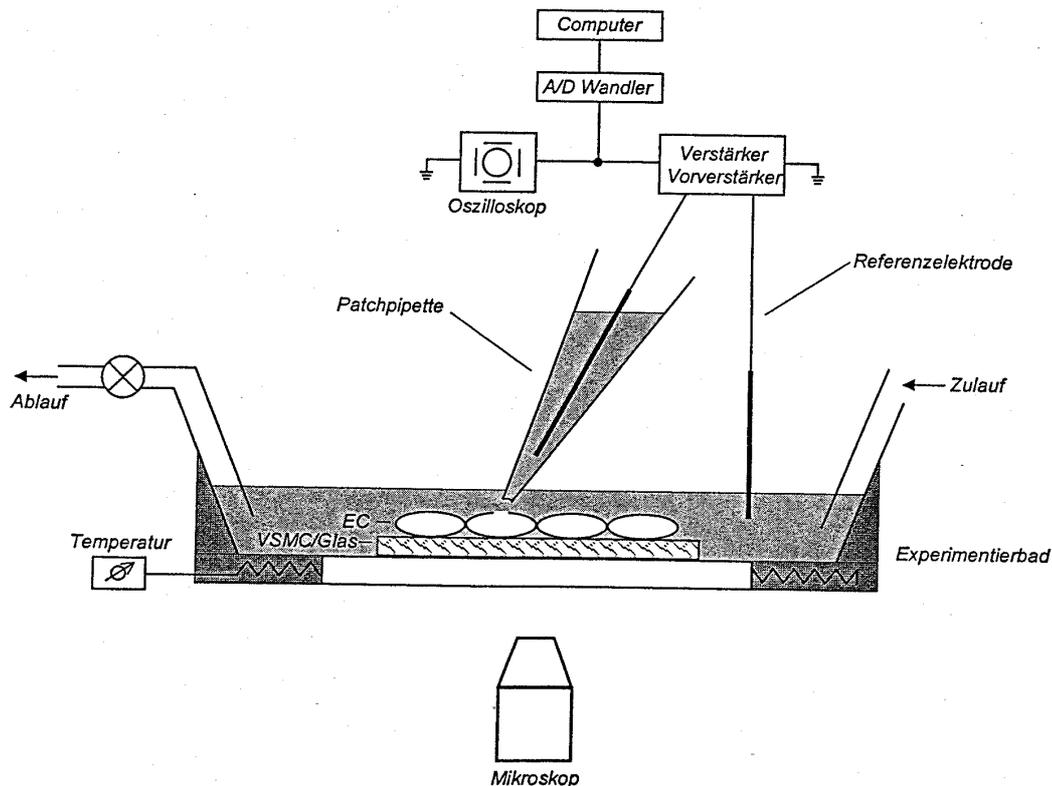


Abb. 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

Die Messanordnung war auf einem schwingungsgedämpften Tisch installiert und wurde durch einen Faraday-Käfig elektrisch abgeschirmt. Alle leitenden Gegenstände wurden durch einen gemeinsamen Massepunkt geerdet.

Zur optischen Kontrolle diente ein inverses Mikroskop, in dessen Kreuztisch die Untersuchungskammer mit dem Heizdraht und einem Zu- und Ablaufsystem eingelassen war. Die Pipettenhalterung mit dem Patch-clamp-Vorverstärker war an einem Mikromanipulator für die Grobpositionierung der *Patchpipette* in alle drei

Raumrichtungen befestigt. Die Feinpositionierung wurde über Piezoelemente gesteuert.

Alle Experimente wurden bei 37 °C durchgeführt.

2.2.4 Datenaufzeichnung

Mit einem EPC-9 Patch-clamp-Verstärker wurden die im Elektrodenmesskreis fließenden Ströme in entsprechende Messspannungen umgewandelt und verstärkt. Durch einen externen Spannungsgeber konnten die angelegten Klemmpotentiale auf Werte zwischen +100 und -100 mV geklemmt werden. Durch das Klemmen des im Messkreis fließenden Stroms auf null wurde auch das dazugehörige Membranpotential gemessen. Die Messdaten konnten nach Tiefpassfilterung (-3 dB, 1000Hz) mit einer *sample-time* von 0,5 msec auf einem Oszilloskop betrachtet bzw. von einem Analog/Digital Wandler digitalisiert und auf 44 MB-Wechselplatten gespeichert werden.

2.2.5 Datenauswertung

Die Datenauswertung für Einzelkanalableitungen erfolgte mit dem Auswerteprogramm „Patch“ (A. Rabe, Frankfurt) und von Ganzzelleableitungen mit M2Lab Analysis / Review (Heka, Lambrecht).

Die Datenanalyse mit Berechnung der Leitfähigkeit, Ionenselektivität und Offenwahrscheinlichkeit wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (HAMILL *et al.*, 1981; HILLE, B., 1984 u. 1992; HOYER *et al.*, 1991, 1994 u. 1996).

2.2.6 Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden in doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

Tabelle 1: Die Pipettenlösung enthielt, wenn nicht anders angegeben (in mmol/l):

KCl	135
MgCl ₂	4
EGTA	1
Hepes	5
pH-Wert	7,2

In einigen Experimenten beinhaltete die Pipettenlösung zusätzlich 1 mmol/l CaCl_2 , ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}=13 \mu\text{mol/l}$).

Tabelle 2: Die Badlösungen enthielten (in mmol/l):

	NaCl-Lösung	KCl-Lösung	"zytosolische"-Lösung für <i>inside-out-patches</i>
NaCl	137	-	-
Na_2HPO_4	4,5	-	-
KCl	3	140	140
KH_2PO_4	1,5	-	-
MgCl_2	0,4	1	1
CaCl_2	0,7	1	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$
Hepes	-	10	10
EGTA	-	-	10
pH-Wert	7,4	7,4	7,2

Um RNA-degradierende Enzyme zu entfernen, wurden alle Lösungen mit 0,1% Diethyl-Pyrocyanat behandelt.

2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

2.3.1 Gewinnung einzelner Endothelzellen

Einzelne HMAEC konnten nach Beendigung der Patch-clamp-Untersuchungen mit einem erhaltenen Gigaseal mechanisch von der Gefäßwand abgelöst werden. Durch Erhöhung des Unterdruckes in der Pipettenspitze wurde die HMAEC leicht aspiriert und durch vorsichtiges Zurückziehen der Pipette mit Hilfe der Mikromanipulatoren langsam von der Gefäßwand getrennt. Durch schnelles Herausheben und wieder Hineinfahren der Pipette in die Badlösung wurde optisch und durch den konstanten elektrischen Widerstand sichergestellt, dass die HMAEC an der Pipettenspitze fixiert blieb.

2.3.2 Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Durch die RT-PCR-Methode können geringste Mengen von RNA aus einer einzelnen Zelle analysiert werden. Zunächst wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase die RNA in cDNA umgeschrieben (RT). Die cDNA bestimmter RNA-Abschnitte wird in der darauffolgenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in mehreren Reaktionszyklen unter Verwendung spezifischer Primer vervielfältigt. Die Reaktionszyklen setzen sich aus drei Reaktionsschritten zusammen. Im ersten Schritt (Denaturierungsschritt) wird die zu vervielfältigende DNA durch Hitze denaturiert und in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Im zweiten Schritt wird die Temperatur soweit gesenkt, dass die Primer spezifisch an die komplementären Bereiche der DNA binden können (*annealing*). Im dritten Schritt wird der Reaktionsansatz auf 72 °C, die optimale Reaktionstemperatur der hitzestabilen *Taq*-DNA-Polymerase, erhitzt. Die DNA-Polymerase verlängert mit Desoxyribonucleosid-5'-triphosphaten (dNTPs) die Primer vom 3'OH-Ende aus, wodurch aus den Einzelsträngen der Matrize doppelsträngige DNA-Moleküle entstehen. Diese Reaktionsschritte werden in vielen Zyklen zur Vervielfältigung der DNA wiederholt.

Um größere DNA-Mengen, die gleichzeitig eine höhere Spezifität aufweisen, für die gelelektrophoretische Auftrennung zu erhalten, wird eine zweite PCR, aufbauend auf dem Produkt der ersten, mit *nested* Primern angeschlossen, deren Bindungsstellen innerhalb der Enden des initial amplifizierten DNA-Abschnittes liegen.

2.3.2.1 Reverse Transkription (RT)

Nach der Zellisolation wurde die *Patchpipette* mitsamt der anhaftenden EC in ein Reaktionsgefäß überführt und zusammen mit der Pipettenlösung (5,5 µl) mit Hilfe einer Spritze in das Reaktionsgefäß gedrückt. Dieses Reaktionsgefäß enthielt den Reaktionsansatz von 1 µl 'first strand' buffer, 0,5 µl dNTPs (10 mmol/l je), 1 µl 'random'-hexamer primer (100 µmol/l), 1 µl DTT (0,1 M), und 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl). Das Reaktionsgefäß wurde auf Trockeneis schockgefroren, um die Zellmembran der HMAEC aufzubrechen. Anschließend wurde dem Reaktionsansatz 0,5 µl Superscript®RT (200 U/µl) hinzugefügt und das Endvolumen (10 µl) in einen Biozym Maxicycler PTC 9600 gegeben. Der RT-Ansatz wurde 10 Minuten bei 21 °C,

60 Minuten bei 37 °C und abschließend 4 Minuten bei 94 °C inkubiert. Das RT-Produkt wurde sofort in einer PCR weiterverarbeitet.

Um eine Kontamination mit nicht-endothelialer mRNA auszuschließen, wurden Kontrollproben der Badlösung nahe der Endothelzellschicht aspiriert.

Da bei der Aspiration der vollständigen HMAEC der Zellkern mit aufgesaugt wird, musste die Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen werden. Durch den Einsatz intronüberspannender Primerpaare wurde dies verhindert. Eine zusätzliche Kontrolle in jedem Versuchsablauf war die Durchführung einer identischen RT ohne Superscript®RT-Zugabe, so dass Amplifikation genomischer DNA nicht möglich war.

2.3.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Es wurde eine Einzelzell-PCR nach LAMBOLEZ *et al.*, 1992, durchgeführt. In einer Einzelzellprobe wurde cDNA von den Kaliumkanälen hIK1 und hSlo, vWF (von Willebrand-Faktor) und eNOS (endotheliale NO-Synthase) als Endothelzellmarker und MyHC (*myosin heavy chain*) -cDNA zum Ausschluss einer Kontamination mit Zellen der glatten Muskulatur ko-amplifiziert (*Multiplex-PCR*). Einen Überblick über die verwendeten Primer und ihre Sequenzen gibt Tabelle 3. Es handelt sich um sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer, die Introns überspannen und PCR-Produkte mit einer Länge von 181-451 bp hervorbringen.

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

Primername	Primersequenzen	Position	Produktlänge
vWF	5'GTTGTGGGAGATGTTTGCCT 3'	61-80	366 bp
	5'TGGAGTACATGGCTTTGCTG 3'	426-407	
eNOS	5'ATGTTTGTCTGCGCGATGT 3'	3382-3401	280 bp
	5'AGGGGCTGTTGGTGTCTGAG 3'	3661-3642	
hIK	5'GAGAGGCAGGCTGTTAATGC 3'	1075-1094	326 bp
	5'TGAGACTCCTTCCTGCGGAGT 3'	1400-1381	
hSlo	5'GGACTTAGGGGATGGTGGTT 3'	3237-3256	297 bp
	5'GGGATGGAGTGAACAGAGGA 3'	3533-3514	
MyHC	5'AAGTTCAAGTCCACCATCGC 3'	2159-2178	451 bp
	5'GAGTGTCCGTTTCCTCCTCA 3'	2611-2590	

Die aufgeführten Primer besitzen folgende Genbank-Nummern:

vWF: K03028; eNOS: L26914; hIK: AF022797; hSlo: U13913; MyHC: X69292

Der gesamte Inhalt (10 µl) des RT-Produkts mit der gewonnenen cDNA wurde in einer ersten *Multiplex*-PCR mit einem Endvolumen von 50 µl mittels *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert. Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 5 µl PCR-Puffer (10x), 2 µl dNTPs (10 mmol/l je), 3 µl MgCl₂ (50 mmol/l), je 1 µl des *sense*- und des *antisense*-Primers (10 pmol), 10 µl RT-Produkt und 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl).

Das PCR-Temperaturprofil wurde ebenfalls mit einem Biozym Maxicycler PTC 9600 durchgeführt und setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

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 der Elongation (72 °C, 1 Minute). Zuletzt wurden die Proben 10 Minuten bei 72 °C inkubiert.

In einer zweiten *Multiplex*-PCR wurden wiederum Intron-übergreifende Oligonukleotid-Primer verwendet, deren Sequenzen in Tabelle 4 aufgeführt sind. Diese *nested*-Primer setzten innerhalb der DNA-Produkte der ersten PCR an.

Tabelle 4: *Nested*-Primer und ihre Sequenzen, jeweils *sense* und *antisense*.

Primername	Primersequenzen	Position	Produktlänge
vWF nested	5' CACCATTCAGCTAAGAGGAGG 3'	89-119	310 bp
	5' GCCCTGGCAGTAGTGGATA 3'	398-380	
eNOS nested	5' ATGGCAACCAACGTCCTG 3'	3406-3423	181 bp
	5' AAAAGCTCTGGGTGCGTATG 3'	3586-3567	
hIK nested	5' CATCACATTCCTGACCATCG 3'	1131-1150	159 bp
	5' ACGTGCTTCTCTGCCTTgTT 3'	1289-1270	
hSlo nested	5' TTTACCGGCTGAGAGATGCT 3'	3314-3333	174 bp
	5' GTGGGAGGAATGGGACAG 3'	3487-3469	
MyHC nested	5' GCCAAGATTGCACAGCTAGA 3'	2189-2209	328 bp
	5' GCCTGAGCTTGCTCTTGAGT 3'	2516-2497	

Aus dem Produkt der ersten PCR wurden 5 µl für eine Reamplifikation mit 45 Zyklen und einer erhöhten *annealing*-Temperatur von 60 °C, um die Spezifität der PCR zu erhöhen, weiterverarbeitet.

Die Reaktionsprodukte wurden mit PCR-Probenpuffer versetzt und auf einem 2 % Agarosegel (in 1x TBE-Puffer) mittels Elektrophorese analysiert. Das Gel enthielt zur Färbung der DNA-Fragmente 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Als Längenstandart wurde ein 50 bp DNA-Leiter verwendet.

2.3.2.3 Sequenzierung

Die Nukleotidsequenzen gereinigter DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des Kettenabbruchverfahrens (SANGER *et al.*, 1977) bestimmt. Eine Sequenzanalyse wurde durchgeführt, um die Identität der amplifizierten PCR-Fragmente zu verifizieren. Die DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel (2.3.2.2.) geschnitten und über Säulen eines Quiagen-Gel-Extraktions-Kits nach Anleitung des Herstellers gereinigt. Für die Sequenzierung wurden 60 ng der gereinigten cDNA in einem 20 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Des weiteren enthielt der Ansatz 0,5 µM Primer der jeweiligen PCR-Reaktion (Tabelle 3 und 4) und 4 µl der Sequenzierlösung mit dNTPs, fluoreszenzmarkierten ddNTPs und DNA-Polymerase. Bei den ddNTPs fehlt die Desoxyribose-3'-OH-Gruppe der normalen Nukleotide. Der Einbau eines solchen Nukleotids in die DNA-Kette verhindert das Anheften des nächsten Nukleotids. Die ddNTPs konkurrieren mit einem Überschuss an dNTPs, so dass die durch die Polymerase synthetisierten Stränge zufällig an unterschiedlichen Nukleotiden enden. Dieser Reaktionsansatz wurde in einem Cyclyer in 25 Zyklen bei 95 °C für 10 Sekunden und 60 °C für 4 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente über Centri-Seps-Säulen gereinigt, in einem Vakuumtrockner getrocknet und in 3 µl Probenpuffer resuspendiert. Nach einer Denaturierung für 2 Minuten bei 90 °C wurden die Proben über ein Polyacrylamid-Gel getrennt, so dass eine Leiter aus DNA-Fragmenten über Fluoreszenzsignale sichtbar gemacht werden konnte.

2.4 Tumorpatienten und Kontrollgruppe

In der vorliegenden Arbeit wurden Mesenterialarterien (MA) aus Gefäßarkaden von Patienten verwendet, die sich aufgrund eines Adenokarzinoms (n=8) einer Kolonresektion unterziehen mussten. Als Kontrollgruppe (n=7) dienten Patienten, die aufgrund einer Stenose durch eine entzündliche Ursache (Divertikulitis, nicht-spezifische muköse Entzündung) im entzündungsfreien Intervall operiert wurden.

MA von Tumorpatienten wurden im Resektat tumornah freipräpariert.

Die Kolonproben von vier Patienten mit Divertikulitis und einem Patienten mit einer unspezifischen mukösen Entzündung zeigten keine Anzeichen einer Entzündung im umliegenden Gewebe des Darms während der Operation. Die MA von zwei Patienten mit Divertikulitis, die während der Operation bestehende Entzündungszeichen aufwiesen, wurden fern vom betroffenen Gewebe entnommen.

Tabelle 5: Charakteristika der einzelnen Patienten.
Bei keinem der Patienten lag ein Diabetes mellitus vor.

	Alter in Jahren	Geschlecht	Diagnose	Tumor-Grading	Entzündungs-zeichen	Hypertension
Karzinom-Patienten						
1	70	M	Ca Sigmaideum	T ₄ N ₁ M ₁	-	-
2	76	W	Ca Sigmaideum	T ₃ N ₁ M ₁	-	-
3	78	M	Ca Caecum	T ₃ N ₁ M ₀	-	-
4	55	M	Ca Sigmaideum	T ₃ N ₀ M ₀	-	-
5	52	W	Ca Sigmaideum	T ₃ N ₂ M ₁	-	-
6	76	W	Ca Sigmaideum	T ₃ N ₁ M ₀	-	-
7	65	W	Ca Caecum	T ₃ N ₀ M ₁	-	-
8	67	M	Ca Sigmaideum	T ₂ N ₀ M ₀	-	-
MW ± SD	67 ± 10					
Kontrollgruppe						
1	47	W	Divertikulitis	-	-	-
2	62	W	Divertikulitis	-	+	-
3	67	M	Unspezifische Entzündung	-	-	-
4	41	M	Divertikulitis	-	+	-
5	72	W	Divertikulitis	-	-	-
6	73	W	Divertikulitis	-	-	+
7	35	W	Divertikulitis	-	-	-
MW ± SD	57 ± 15					

Die Kolonresektate aller Patienten wurden histologisch im Institut für Pathologie des UKBF analysiert.

2.5 Statistische Auswertung

Die beiden Patientengruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-test (Wilcoxon Rank sum test), einem nicht-parametrischen Test für kleine Testpopulationen, verglichen. Bei einem P-Wert von $< 0,05$ wurden die Testpopulationen als signifikant unterschiedlich erachtet. Die Werte werden, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

2.6 Chemikalien

Agarose (Life Technologies, Eggenstein)

Apamin (Sigma, St. Louis)

Bradykinin

Charybdotoxin (ICN, Meckenheim)

Clotrimazol (Sigma, St. Louis)

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

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

Diethyl-Pyrocyanat (Sigma, Deisenhofen)

Dithiothreitol (DTT) (Life Technologies, Eggenstein)

50 bp DNA-ladder (Life Technologies, Eggenstein)

DNA-Polymerase (Sigma, St. Louis)

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

Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt)

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

Iberiotoxin

Kulturmedium : „*Dulbecco`s modified Eagle`s medium*“ (DMEM),
(Biochrom KG, Berlin)

MgCl₂ (Life Technologies, Eggenstein)

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: 100 µl Formamid, 20 µl EDTA/Dextranblau

Random HexaNukleotid 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 TBE-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 Tris-Base, 0.9 M Borsäure, 10 mM EDTA

Trypsin 0,05% (Biochrom KG, Berlin)

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

2.7 Geräte und Materialien

Präparierbesteck: Pinzetten, Skalpelle, Mikrodissektionsschere

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

Histoacrylgewebekleber (Braun Melsungen AG, Melsungen)

DMZ-Universal Puller (Zeitz-Instrumente, Augsburg)

EPC 9 computergesteuerter Patch-clamp-Verstärker mit 4 Pol Besselfilter für
Atari Mega-ST4 (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz)
Experimentierbad mit 2 Kanal Regelgerät für Bad- und Zulaufheizung
(Wolfgang Hampel, Neu Isenburg)
Mikroskop (Nikon, TMS)
Patch-clamp-Mikromanipulator (Luigs und Neumann GmbH, Raitingen)
Schwingungsisolierter Tisch (Physik Instrumente, Waldborn)
Biozym Maxicyler 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-Seps „spin columns“ (Applied Biosystems, Foster City, USA)
Speed vac „concentrator“ mit Kühlfalle (Backhofer, Reutlingen)