

## 5 MATERIALIEN UND METHODEN

### 5.1 Lösungen, Puffer, Medien und Gele

<p><b>DEPC-Wasser</b>            1 ml DEPC (1mg/ml)            ad 1 l <i>Aqua bidest.</i>            12 h bei Raumtemperatur inkubieren            dann autoklavieren</p>	<p><b>Hypotoner Lysierpuffer (HLP)</b>            1,58 g Tris-HCl            ad 500 ml <i>Aqua bidest.</i>            auf pH 7,5 einstellen</p>
<p><b>10 x MOPS-Puffer</b>            200 mM MOPS            50 mM Na-Azetat            10 mM EDTA            vor Licht geschützt aufbewahren</p>	<p><b>Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PIC)</b>            187,9 mg EDTA            87,71 mg PMSF            500 µg Leupeptin            10 µg Aprotinin            ad 100 ml HLP</p>
<p><b>20 x SSC</b>            175,3 g NaCl            88,2 g Na-zitrat            1 mg DEPC            ad 1000 ml <i>Aqua bidest.</i>            12 h bei Raumtemperatur inkubieren            dann autoklavieren</p>	<p><b>TAE-Puffer</b>            40 mM Tris-azetat            1 mM EDTA            pH auf 8,0 einstellen</p>
<p><b>TBE-Puffer</b>            1M Tris-Base            0,85M Borsäure            0,01M EDTA            auf pH 8,3 einstellen</p>	<p><b>BME/FCS</b>            BME            10% FCS            100 I.U./ml Penicillin            100 µg/ml Streptomycin</p>

<p><b>LB-Agar-Platten</b> 10 g Casein 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar ad 1000 ml <i>Aqua dest.</i> pH auf 7,5 einstellen</p>	<p><b>LB-Medium</b> 10 g Casein 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml <i>Aqua dest.</i> pH auf 7,5 einstellen autoklavieren ad 10 mg/ml Ampicillin</p>
<p><b>X% Agarosegel:</b> 1 x TAE-Puffer (pH 8,0) x% (w/v) Agarose aufkochen bei ca. 50 °C gießen</p>	<p><b>8% Sequenziergel</b> 30 ml 40% Acrylamid 63 g Harnstoff 15 ml 10 x TBE-Puffer 750 µl 10 % Ammoniumpersulfat 48 µl TEMED ad 150 ml <i>Aqua bideest.</i></p>

## 5.2 Zellkultur

### 5.2.1 Präparation der Astrozyten-Kulturen

Zur Herstellung von Astrozyten-Primärkulturen aus Gehirnen neugeborener NMRI-Mäuse (*Naval Medical Research Institute*) wurde die Methode von McCarthy und DeVillis angewendet (138), welche eine Modifikation der Methode von Booher und Sensenbrenner darstellt (68). Dabei wurden die Gehirne zunächst freipräpariert und isoliert. Nach Entfernung der Meningen wurde das Gewebe mechanisch zerkleinert und dann für 2 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 1,0% Trypsin- und 0,05% DNase-Lösung in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS wurde das Gewebe in *Basal Medium Eagle's* (BME) mit 10% hitzeinaktiviertem *Fetal Calf Serum* (FCS), Penicillin (100 I.U./ml) und Streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )(BME/FCS) resuspendiert und DNase in einer Endkonzentration von 0,05% hinzugefügt. Durch mehrmaliges Ansaugen dieser Suspension mittels einer Pasteur-Pipette können einzelne Zellen separiert werden. Diese Einzelzellsuspension wurde dann bei 800 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert und noch zweimal mit eisgekühlter HBSS gewaschen. Nach Resuspension in BME/FCS-Medium wurden Zellen eines Gehirns auf einer Poly-L-Lysin-beschichteten (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 75-cm<sup>2</sup>-Kulturflasche ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen zweimal mit HBSS gewaschen, um nichtvitale Gewebereste zu entfernen und dann für etwa 4 Tage in BME/FCS inkubiert, bis sie Subkonfluenz erreichten. Durch kräftiges Schütteln der Kulturflaschen wurden dann Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und Zelltrümmer vom Astrozytenrasen gelöst und durch dreimaliges Waschen mit HBSS entfernt.

Die Reinheit der Astrozytenkulturen wurde routinemäßig mittels Färbung mit einem GFAP-spezifischen Antikörper verifiziert, was regelmäßig mindestens 95% GFAP-positive Zellen zeigte (2). Zusätzlich wurden Astrozyten durch Phasenkontrastmikroskopie (Olympus CK2, OLYMPUS CORP., Japan) anhand morphologischer Kriterien als solche identifiziert. Auch die nachfolgend beschriebene *Stellation* der Zellen nach Behandlung mit DBcAMP wurde als Hinweis auf deren Identität als Astrozyten gewertet.

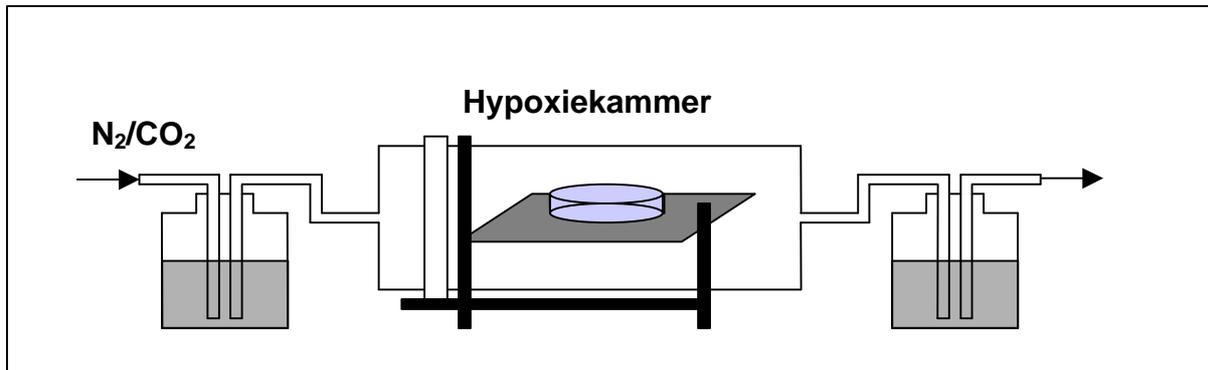
## 5.3 Experimentelles Protokoll

### 5.3.1 Vorbehandlung der Zellen

Nachdem die Zellen Subkonfluenz erreicht hatten, wurde das Zellkulturmedium durch serumfreies BME mit oder ohne 1 mM DBcAMP ersetzt. Dabei wurde besonderes Augenmerk darauf gerichtet, dass die einzelnen Kulturflaschen bei Versuchsbeginn eine ähnliche Zelldichte aufwiesen. Nach einer dreistündigen Vorinkubation bei 37°C unter normoxischen Bedingungen wurden die Kulturflaschen einem Arm des experimentellen Protokolls zugeordnet und entsprechend weiterbehandelt.

### 5.3.2 Hypoxie

In jedem Experiment wurden hypoxische Zellen mit normoxischen verglichen. Zur Induktion der Hypoxie wurde eine selbstkonstruierte Hypoxiekammer verwendet (2), die einen dichten Abschluss gegenüber der Außenatmosphäre gewährleistet und ihrerseits in einen Inkubator gestellt wird (**Abb. 5-1**). In der Hypoxiekammer wird bei kontinuierlichem Gasstrom eine 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C erzeugt. Vor Beginn der Experimente wurde das Medium durch solches ersetzt, das für 3 Stunden mit 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> begast worden war. Kontrollmedium wurde für die gleiche Zeit mit 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> begast. DBcAMP, ET-1, PD142893 und PD145065 wurden dem Medium je nach experimentellem Ansatz hinzugefügt. Unter diesen experimentellen Bedingungen konnte bei den hypoxischen Zellen die Sauerstoffsättigung auf ca. 0,3 % (O<sub>2</sub>-Messgerät Oxi320/Set, WTW, Weilheim) gesenkt werden. Für den Medienwechsel und die Überführung der Zellen in die Hypoxiekammer wurden 5 bis 10 Minuten benötigt, was von einer nur geringen Veränderung des Sauerstoffpartialdrucks begleitet war. Nach dem Verschluss der Hypoxiekammer wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Kontrollzellen wurden im gleichen Inkubator außerhalb der Hypoxiekammer inkubiert.



**Abb. 5-1** Schematische Darstellung der verwendeten Hypoxiekammer

### 5.3.2.1 Evaluation des Hypoxie-Modells

#### Analyse der 150 kDa Oxygen-Regulated Protein (ORP150) mRNA

ORP 150 ist ein nur in hypoxischen Astrozyten exprimiertes Stressprotein, das als Marker für das Vorliegen und das Ausmaß einer Hypoxie benutzt werden kann (139). Daher wurde das Vorhandensein von ORP 150 mRNA durch RT-PCR in hypoxischen und normoxischen Astrozyten überprüft, was weiter unten im Detail beschrieben wird.

#### Propidiumjodid-Färbung

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse der Hypoxie-Experimente die Folge einer Zellschädigung und damit unspezifisch sind, wurde in einem separaten Ansatz im Anschluss an die 24-stündige Hypoxie eine Färbung der Zellen mit Propidium-Jodid durchgeführt. Mit Hilfe dieser Färbung kann auf einfache Weise die Integrität zellulärer Membranen getestet werden und damit der Anteil geschädigter Zellen in einer Zellkultur quantifiziert werden. Dazu wurden hypoxische und normoxische Astrozyten mit Propidium-Jodid (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS) für 5 Minuten inkubiert, dann dreimal mit PBS gewaschen und mit 2% Paraformaldehyd fixiert. Mittels

Fluoreszenz-Mikroskopie (Carl Zeiss) wurde der Anteil von Zellen mit kompromittierter Membranfunktion anhand der roten Fluoreszenz quantifiziert. Als Positivkontrolle wurden Astrozyten verwendet, die für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet worden waren.

### 5.3.3 Morphologische Analysen

Nach der Induktion einer 24-stündigen Hypoxie bzw. Normoxie in Anwesenheit unterschiedlicher Substanzen entsprechend des experimentellen Protokolls wurden die Zellkulturflaschen aus dem Inkubator entfernt und phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Zu diesem Zweck wurden für jede Flasche drei zufällig ausgewählte Gesichtsfelder fotografiert. Die resultierenden Mikrophotographien wurden anschließend einer morphologischen Analytik unterzogen, wobei der Anteil „*stellate*“ Zellen ermittelt wurde. Als „*stellat*“ wurden nach den Kriterien von Kimelberg *et al.* (74) solche Zellen definiert, die mindestens zwei Fortsätze aufweisen, deren Länge mindestens der doppelten Länge des Zellkörperdurchmessers entspricht. Für jede experimentelle Bedingung wurden mindestens 500 Zellen aus mehreren unabhängigen Experimenten gezählt. Die Ergebnisse werden als Anteil „*stellate*“ Zellen an der Gesamtzellzahl präsentiert.

## **5.4 Molekularbiologische Untersuchungen**

### **5.4.1 RNA-Isolation**

#### **5.4.1.1 Isolation von astrozytärer Gesamt-RNA**

Astrozytäre Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von TRIZOL®-Lösung entsprechend der Anleitung des Herstellers isoliert. Die Zellen wurden nach morphologischer Analyse und Gewinnung der Medienüberstände zunächst mit 5 ml PBS gewaschen und dann mit 2 ml TRIZOL®-Lösung lysiert und solublisiert. Nach Hinzugabe von 0,4 ml Chloroform und Zentrifugation bei 12,000 g und 4°C für 15 Minuten wurde die wässrige RNA-haltige Phase gewonnen, während die organische DNA- und proteinhaltige Phase verworfen wurde. Die RNA wurde mit Isopropanol präzipitiert, einmalig mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich in Diethyl-Pyrokarbonat(DEPC)-behandeltem Wasser gelöst.

#### **5.4.1.2 RNA-Isolation aus Geweben**

Gehirn-, Nieren- und Muskelgewebe von Mäusen (je ca. 300 mg) wurde in flüssigem Stickstoff gefroren, zermörsert und in 3 ml TRIZOL®-Lösung homogenisiert. Die RNA-Isolierung wurde dann wie oben beschrieben durchgeführt.

#### 5.4.1.3 Ermittlung von Konzentration, Reinheit und Integrität der isolierten RNA

##### **Konzentration:**

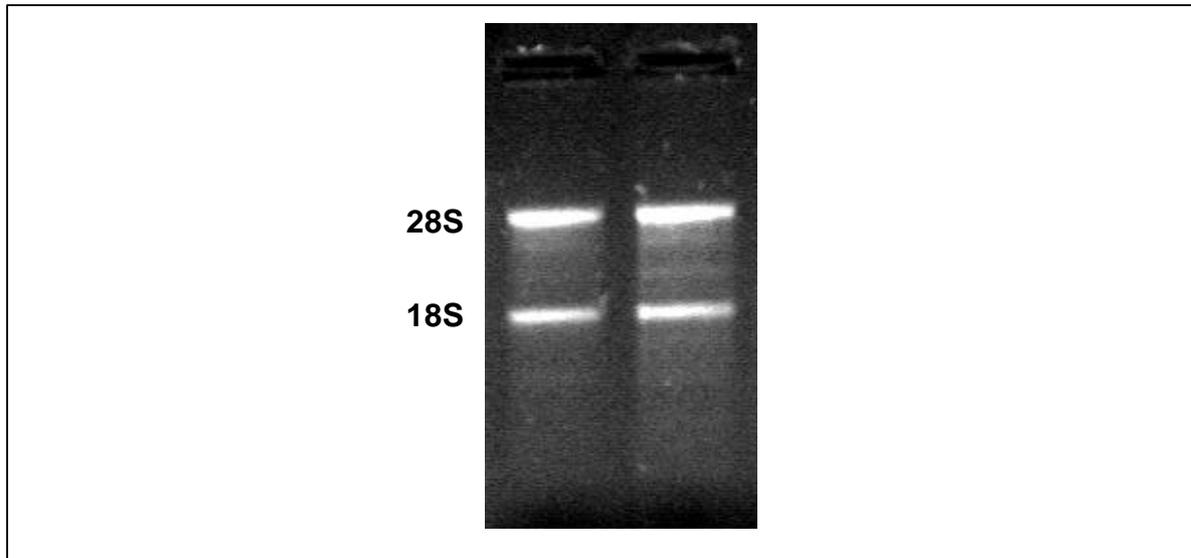
Die RNA-Konzentration wurde durch Spektrophotometrie (UV-VIS Spektrophotometer UV-1202, SHIMADZU Europa GmbH) bei 260 nm abgeschätzt, wobei eine Absorption ( $A_{260}$ ) von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht.

##### **Reinheit:**

Die Reinheit der isolierten RNA wurde durch den Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) abgeschätzt. Ein Quotient  $< 1,7$  deutet auf eine Protein-Kontamination hin. Bei diesen Proben wurde eine erneute Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dagegen zeigt ein Quotient zwischen 1,7 und 2,0 eine ausreichende Reinheit der isolierten RNA an, und nur solche Proben wurden weiterverarbeitet.

##### **Integrität:**

Die Integrität der isolierten RNA wurde routinemäßig durch Gel-Elektrophorese verifiziert. 15-20 µg denaturierter RNA wurden auf ein 1% Agarose/MOPS-Gel mit 6% Formaldehyd und Ethidiumbromid (EtBr; 1 µg/ml) aufgetragen und bei niedriger Spannung (ca. 45 V) für mehrere Stunden aufgetrennt. Die Banden wurden anschließend unter UV-Licht visualisiert. Hinweise für die weitgehende Integrität der RNA sind eine gegenüber der 18S-RNA-Bande etwa doppelt so hohe Intensität der 28S-RNA-Bande sowie die scharfe Abgrenzbarkeit der rRNA-Banden ohne auf Fragmentierung hindeutende Schmierspuren (**Abb. 5-2**).



**Abb. 5-2 RNA-Qualitätsanalyse** 28S und 18S ribosomale RNAs sind scharf abgrenzbar dargestellt und nur minimal degradiert. Der Schleier im Hintergrund stellt die Gesamtheit der Messenger-RNA dar, die nur durchschnittlich 5% der Gesamt-RNA ausmacht.

#### 5.4.2 Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird zunächst mit Hilfe des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase zur zellulären mRNA komplementäre DNA (*complementary DNA* = cDNA) synthetisiert, welche dann als *Template* zur Amplifikation eines interessierenden DNA-Fragments in einer PCR dient. Die Methode diente in dieser Arbeit einerseits dem semiquantitativen Nachweis der ORP 150 mRNA in hypoxischen Astrozyten. Andererseits konnten durch die RT-PCR unter Verwendung astrozytärer mRNA cDNA-Fragmente unterschiedlicher Komponenten des Endothelin-Systems synthetisiert werden, welche anschließend nach Klonierung in einen geeigneten Vektor zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden für die weiter unten beschriebenen *Northern Blot*-Hybridisierungen verwendet wurden.

#### 5.4.2.1 Reverse Transkription (RT)

Die Reaktion wurde mit Hilfe der Superscript-RT entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde 1 µg Gesamt-RNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 10 µl First Strand Buffer, 2,5 µg Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer, 0,5 mM dNTPs, 100 nM DTT, 1U RNAsin, 50 U Superscript RT in DEPC-Wasser bei 42°C für 60 Minuten inkubiert, gefolgt von einer 5-minütigen Denaturierung und Enzym-Inaktivierung bei 94°C. Die resultierende cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt. Als Kontroll-Reaktionen wurden ein Ansatz ohne RT sowie ein Ansatz ohne RNA-*Template* verwendet, um eventuelle Kontaminationen durch genomische DNA bzw. durch RNA zu detektieren.

#### 5.4.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation der interessierenden DNA-Fragmente wurde die cDNA als *Template* für eine Polymerasekettenreaktion verwendet. Alle PCR-Ansätze enthielten in einem Volumen von 50 µl neben 5 µl des entsprechenden RT-Ansatzes 1,25 U Taq-DNA-Polymerase, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM cDNA-spezifische *Primer* (**Tabelle 5-1**), 5 µl 10-fach-PCR-Puffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub> und *Aqua bidest*. Der Amplifikationszyklus umfasste einen einleitenden Denaturierungsschritt bei 94°C für 150 s, 40 Zyklen mit jeweils 30 s Denaturierung bei 94°C, 45 s Annealing (Anlagerung) bei 64°C und 45 s Extension bei 72°C sowie einen abschließenden Extensionsschritt von 6 min bei 72°C (PTC-100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc., USA). Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese in Ethidiumbromid-gefärbtem, 1,5- bis 2-prozentigem Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden durch Anregung im UV-Licht visualisiert und dokumentiert. Als molekularer Massenstandard wurden 100-bp-DNA-Größenmarker verwendet. Kontrollreaktionen zur Identifizierung von durch DNA-Kontamination entstandenen falsch positiven Banden wurden durchgeführt, indem die Kontrollen aus der RT-Reaktion bzw. *Aqua bidest* als *Template* bei der PCR eingesetzt wurden.

### 5.4.2.3 *Primerdesign*

Zur Auswahl der Nukleotidsequenz der einzelnen *Primer* wurde eine detaillierte Datenbankrecherche nach den publizierten genomischen bzw. cDNA-Sequenzen in der Gendatenbank auf dem Server des *National Center for Biotechnology* (NCBI) durchgeführt. Sequenzinformation über murine ECE-1 und ECE-2-cDNA wurde durch Klonierung partieller cDNAs - wie in Abschnitt 5.4.5 beschrieben - gewonnen. Auf der Basis dieser Sequenzen wurden computergestützt *Primerpaare* ermittelt, die folgende Kriterien erfüllten:

1. Die *Primerlänge* liegt zwischen 20 und 25 bp.
2. Die *Primersequenzen* sind spezifisch für die interessierende cDNA ohne Kreuzreaktivität mit anderen Sequenzen.
3. Die *Primer* überspannen mindestens ein Intron, so dass eine Amplifikation aus genomischer DNA entweder nicht stattfindet oder eine Bande größerer Länge produziert.
4. Die Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb eines *Primers* ist minimal.
5. Die gegenseitige Bindung der *Primer* (*Primer-Dimer-Formation*) ist minimal, wobei insbesondere Komplementaritäten am 3'-Ende vermieden werden.
6. Die optimale Annealing-Temperatur beider *Primer* eines Paares ist ungefähr gleich, wobei darauf geachtet wurde, dass das Verhältnis von [Adenin (A) + Thymin (T)] / [Cytosin (C) + Guanin (G)] ungefähr 1:1 ist.

Die *Primer* für ORP 150-cDNA sowie die cDNAs der Komponenten des ET-Systems sind in **Tabelle 5-1** zusammengefasst.

Genprodukt	Quellsequenz	Nucleotidpositionen	Oligonukleotid-Primer	Produktlänge
<b>ET-1</b>	D43775	F 487-506	aagcgctgttcctgttcttc	
		R 851-70	cttgatgctattgctgatgg	384 bp
<b>ET-3</b>	U32330	F 511-30	tgagaggattgtgtcccaa	
		R 947-66	gacatcaaccttgacgtgg	456 bp
<b>ECE-1</b>	s. Abb. 5-3	F 13-32	gaaaacaacctgggctttgc	
		R 257-76	gggaactgctgtgtagtcac	264 bp
<b>ECE-2</b>	s. Abb. 5-3	F 109-28	gcacctacttgagaacacca	
		R 459-78	gtccaggtaggcagtgagaa	333 bp
<b>ETA-R</b>	L20340	F 13-32	accgccattgaaatcgtctc	
		R 313-32	acagtctttgccacttctcg	578 bp
<b>ETB-R</b>	U32329	F 936-56	tcggactacaaaggaaagccc	
		R 1247-67	ggattgctctggtcatacagg	305 bp
<b>ORP 150</b>	U41853	F 210-29	ctacagtaaggaggcagagg	
		R 923-42	gtttgtaggtcacgatggt	733 bp

**Tabelle 5-1 Oligonukleotidprimer für die PCR-Analyse** Zusammenfassende Darstellung der verwendeten *Forward* (F) bzw. *Reverse* (R) Primer unter Angabe der Nucleotidpositionen in der Quellsequenz, auf die entweder in Form der *GenBank Accession Number* oder innerhalb dieser Arbeit verwiesen wird.

### 5.4.3 Subklonierung der RT-PCR-Produkte

Die in den RT-PCR-Reaktionen erhaltenen cDNA-Fragmente von Komponenten des ET-Systems wurden mit Hilfe des TA-Cloning Kits in den mitgelieferten Vektor pCR 2.1 kloniert und in kompetente Zellen transformiert. 200 µl der transformierten Zellsuspension wurden auf LB-Agar-Platten, die 50 µg/ml Ampicillin enthielten und mit je 40 µl 100 mM Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid und 40 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid inkubiert worden waren, ausplattiert. Positive Klone wurden ausgewählt und kleinere Mengen Plasmid-DNA in einer Mini-Präparation gewonnen. Hierzu wurden 5 ml LB-Medium mit den transformierten kompetenten Zellen angeimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln kultiviert. Danach wurde die Plasmid-DNA nach den Anweisungen des Herstellers mit dem QIAprep® Spin Plasmid Kit aufgereinigt.

### 5.4.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung der subklonierten DNA-Fragmente erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren (140) gemäß den Herstellerangaben mit ABIPRISM™ DYE Terminator Cycle Sequencing Kit unter Verwendung des *Primers* für die M13-DNA. Dabei wird die Sequenzierreaktion mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden durchgeführt. Die DNA-Fragmente aus den Sequenzieransätzen wurden in einem 8-prozentigen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe eines automatisierten DNA-Sequenziergeräts (ABIPRISM™ 377 DNA Sequencer, PERKIN ELMER) ermittelt und mit Hilfe der „GenBank“-Datenbank mit den jeweils publizierten Sequenzen verglichen.

### 5.4.5 Klonierung und Sequenzierung von partiellen Sequenzen muriner ECE-1- und ECE-2-cDNA

Da publizierte Sequenzen für murine ECE-1 und ECE-2 cDNA zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente nicht verfügbar waren, wurde Sequenzinformation

auf der Basis der publizierten Sequenzen für Ratten-ECE-1 und für bovines ECE-2 erhoben. Zu diesem Zweck wurden teilweise degenerierte, zu den publizierten Sequenzen komplementäre *Primer* synthetisiert (**Tab. 5-2**), und in PCR-Ansätze eingesetzt, die murine Gehirn-cDNA als *Template* verwendeten. Die resultierenden Banden wurden aufgereinigt, subkloniert und sequenziert. Die so erhaltene murine partielle ECE-1-Sequenz weist zur Ratten-ECE-1-Sequenz eine 98-prozentige Homologie auf, während die murine partielle ECE-2-Sequenz zur bovinen ECE-2-Sequenz eine 87-prozentige Homologie aufweist (**Abb. 5-3**). Die in den oben beschriebenen PCR-Ansätzen verwendeten *Primer* für ECE-1- und ECE-2-cDNA wurden auf der Basis der so erhaltenen Sequenzen hergestellt.

Genprodukt	Quellsequenz	Nucleotidpositionen	Oligonukleotid- <i>Primer</i>	Produktlänge
<b>Ratten ECE-1</b>	D29683	F 1256-1275	gctcctttctcgaccagcgc	
		R 1927-1946	gagttctccaccagggccg	691 bp
<b>Bovines ECE-2</b>	U27341	F 521-540	gtgagcccctgtgaggaytt	
		R 1019-1038	atcccagctcctccatrra	518 bp

**Tabelle 5-2 Zur Klonierung muriner ECE-1- und ECE-2-cDNA verwendete Primer**

Die *Forward* (F) und *Reverse* (R) *Primer* basieren auf den durch die *GenBank Accession Number* identifizierten Quellsequenzen. Bei den ECE-2-*Primern* war am 3'-Ende eine geringfügige Degeneration erforderlich. Das Nukleotid y bedeutet dabei, dass die Primer an dieser Stelle zu je 50% die Pyrimidinbasennukleotide t und c enthalten. Analog steht r für die Purinbasennukleotide g und a.

**ECE-1-cDNA**

```

Murin: 1   gtgagtgacacagaaaacaacctgggctttgcc-tgggcacccatgtttgtgaaagcaac 59
          |||
Ratte: 1354 gtgagtgacacagaaaacaacctgggctttgccctgggc-cccatgtttgtgaaagcaac 1412

Murin: 60   ctttgccggaggacagcaagaacatagccagcgagatcatccatggagatcaagaaggcat 119
          |||
Ratte: 1413 ctttgccggaggacagcaagaacatagccagcgagatcatcc-tggagatcaagaaggcat 1471

Murin: 120  tcgaggagagcctgagcaccctgaaatggatggatgaagatactcggaggtcagccaagg 179
          |||
Ratte: 1472 tcgaggagagcctgagcaccctgaaatggatggatgaagatactcggaggtcagccaagg 1531

Murin: 180  agaaggcggacgcattctacaacatgataggtaccaccaacttcatcatggacccaagg 239
          |||
Ratte: 1532 agaaggcggacgcattctacaacatgataggtaccaccaacttcatcatggacccaagg 1591

Murin: 240  agctggacaagtgttcaatgactacacagcagttcctgatctctactttgagaacgcca 299
          |||
Ratte: 1592 agctggacaagtgttcaatgactacacagcagttcccgatctctactttgagaacgcca 1651

Murin: 300  tgcgatttttcaacttctcatggagggtcacagccgaccagctcaggaaagccc 353
          |||
Ratte: 1652 tgcgatttttcaacttctcattgagggtcacagccgaccagctcaggaaagccc 1705

```

**ECE-2-cDNA**

```

Murin: 1   ttaccagttctcctgtggaggctggattcgaagaaaccctctaccaatggacgttctcg 60
          ||
Bovin: 541  ctatcagttctcctgctggaggctggattcggagaaaccctctacctgatgggcttctcg 600

Murin: 61   ctggaacaccttcaacagcctctgggaccagaaccaggccatactgaagcacctacttga 120
          |||
Bovin: 601  ctggaacaactccaacagctctctgggaccagaatcaagccatcctgaagcacctgcttga 660

Murin: 121  gaacaccactttcaattccagcagtgaaagctgagaggaagactcggagtttctacctgtc 180
          |||
Bovin: 661  aaacaccaccttcaactccagcagtgaaagctgaacggaagacgcagcgcttctacctctc 720

Murin: 181  ctgcctacagtcggagcgcattgagaagctaggagccaagccacttagagacctcattga 240
          |||
Bovin: 721  ctgcttacaggtggagcgcattgagaagctaggagccaagccacttagagacctcattga 780

Murin: 241  caagatcgggtggttgaacataacggggccttgggacgaggacagcttcatggatgtgct 300
          |||
Bovin: 781  caagattggtggctggaacgttacggggccttgggaccaggacaacttcatggaggtgct 840

Murin: 301  caaggcagtcgcagggacctaagagccacccccttcttaccgtctacgtcagtgctga 360
          |||
Bovin: 841  gaaggcagtgccagggacgtatagggccacccccttcttactgtctacgtcagtgccga 900

Murin: 361  ttctaagagttctaacagcaatattatccagggtggaccagtcctgggctttttctgccctc 420
          |||
Bovin: 901  ctctaagagttccaacagcaatattatccagggtggaccagtcctgggctctttctacctc 960

Murin: 421  tcgagattactatctaataagaactgccaatgagaaagttctcactgcctacctggac 478
          |||
Bovin: 961  tcgagattactacctaacaggaccgccaatgagaaagtgcttactgcctacctggac 1018

```

**Abb. 5-3** Sequenzen der murinen ECE-1- und ECE-2-cDNAs Vergleich der klonierten cDNAs für murines ECE-1 und ECE-2 mit den publizierten Sequenzen von Ratten-ECE-1 (*GenBank* D29683) bzw. bovinem ECE-2 (*GenBank* U27341)

## 5.4.6 Northern-Blot-RNA-Analyse

Durch *Northern-Blot*-RNA-Analyse kann die mRNA Menge eines bestimmten Transkripts quantifiziert werden. Dazu wird die interessierende Gesamt-RNA zunächst elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und schließlich mit einer zum interessierenden Transkript komplementären, radioaktiv markierten cDNA-Sonde hybridisiert. Die autoradiographisch ermittelte Bandenintensität verhält sich in einem bestimmten Bereich proportional zur Menge der interessierenden mRNA.

### 5.4.6.1 Northern Blot

15 bis 20 µg der astrozytären Gesamt-RNA sowie muriner Gehirn- und Nieren-RNA als Positivkontrollen wurden in einer Lösung mit 6% Formaldehyd, deionisiertem Formamid und 1x MOPS-Puffer durch Inkubation bei 65°C für 15 min denaturiert. Die Lösungen wurden dann auf Eis platziert, und 0,1 µg Ethidiumbromid wurde zu jeder Probe hinzugefügt. Die so erhaltene Probe wurde durch Gelelektrophorese (30-40 V) auf einem 1-prozentigen Agarose/MOPS-Gel mit 6% Formaldehyd aufgetrennt und dann nach der Methode von Alwine *et al.* (141) auf eine Hybond™ N-Membran transferiert. Das Gel wurde vor dem Transfer und die Membran nach dem Transfer unter UV Licht fotografiert, um die RNA-Menge sowie die Effizienz des Transfers zu dokumentieren. Die transferierte RNA wurde durch einen UV Stratalinker™ 2400 Crosslinker (STRATAGENE, Heidelberg) kovalent an die Membran fixiert.

### 5.4.6.2 Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden

Die klonierten cDNA-Fragmente wurden durch Restriktionsverdau aus dem Vektor geschnitten und aufgereinigt. Die radioaktive Markierung mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP wurde mit Hilfe des Rediprime™ DNA Labelling Kits entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Bei der Reaktion wird mit Hilfe der Klenow DNA-Polymerase [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-

dCTP in die Sonde eingebaut. Dazu wurden etwa 10 ng der jeweiligen cDNA in einem Gesamtvolumen von 45 µl *Aqua bidest* durch Erhitzung auf 100°C für 5 min denaturiert und anschließend der lyophilisierten Reaktionsmischung hinzugefügt, die dATP, dGTP, dTTP, exonuclease-freie Klenow Polymerase und Zufalls-Primer enthält. Nach Hinzugabe von 500 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP wurde die Lösung für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der nicht-inkorporierten Nukleotide wurden Sephadex® G-50-Säulen verwendet. Die spezifische Aktivität der so gewonnenen Sonden betrug  $1 \times 10^8$  bis  $1 \times 10^9$  cpm/µg DNA.

#### 5.4.6.3 Hybridisierung

Die Membranen wurden bei 68°C für 15 min in QuickHyb®-Lösung prähybridisiert. Die radioaktiv markierte cDNA-Sonde (50 µl) und 100 µl Lachsspermien-DNA wurden zunächst bei 100°C für 5 min denaturiert, dann auf Eis kurz abgekühlt und der Hybridisierungslösung beigemischt. Die Hybridisierung erfolgte dann bei 68°C für eine Stunde. Schließlich wurde die Membran zweimal in 2 x SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur für 20 min und anschließend für jeweils 15 min bei 60°C in 1 x SSC/0,1% SDS, 0,5 x SSC/0,1%SDS und 0,1 x SSC/0,1%SDS gewaschen.

#### 5.4.6.4 Autoradiographie

Die Membranen wurden mit Röntgenfilmen bei -80°C für unterschiedliche Zeitintervalle (3 h bis 7 d) exponiert, um das Verhältnis des spezifischen Signals zum Rauschen zu optimieren. Nach der Entwicklung wurden die Röntgenfilme eingescannt und mittels NIH-Image Software analysiert.

#### 5.4.6.5 „Stripping“ der Membranen und Rehybridisierung

Um die gebundene Radioaktivität von den Membranen zu entfernen, wurde die Membran in zwei Waschschritten für jeweils 30 min in kochendem 0,1 x SSC/0,1%SDS inkubiert. Die gebundene RNA wurde daraufhin nochmals mittels

Stratalinker fixiert. Auf diese Art und Weise konnte eine Membran bis zu fünfmal rehybridisiert werden.

#### **5.4.6.6 Statistische Analyse der *Northern Blots***

Um die initial geladene RNA-Menge auf jeder Spur zu ermitteln, wurde die Methode der Ethidiumbromidfärbung verwendet (142). Bei dieser Methode wird die geladene RNA-Menge durch densitometrische Analyse der Ethidiumbromid-gefärbten 18S- und 28S-rRNA-Banden quantifiziert. Die Intensität der *Northern-Blot*-Banden wurde dann separat für jede Probe auf die entsprechende RNA-Menge standardisiert. Die mRNA-Menge in Kontrollzellen wurde anschließend auf 100% festgelegt. Die mRNA-Mengen der restlichen experimentellen Gruppen wurden relativ zum Kontrollwert berechnet. Für jede Versuchsbedingung werden die mRNA-Mengen als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Zur Berechnung statistischer Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurde der zweiseitige Student's t-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Dabei gilt ein p-Wert unter 0,05 als statistisch signifikant.

## 5.5 Biochemische Untersuchungen

### 5.5.1 Endothelin-Radioimmunoassay (RIA)

Zur Quantifizierung des Endothelins in den Medienüberständen der Astrozyten wurde ein ET-spezifischer *Radioimmunoassay* verwendet. Das Prinzip des *Radioimmunoassay* beruht auf der Competition einer zu messenden Substanz mit einem radioaktiv markierten Analogon bekannter Konzentration um die Bindung durch einen spezifischen Antikörper. Dabei verhält sich die Menge der an den Antikörper gebundenen Radioaktivität umgekehrt proportional zur Konzentration der gesuchten Substanz. Zur Messung des Endothelins wurde ein kommerziell erhältliches Endothelin 1-21-spezifischer [<sup>125</sup>I]-*Radioimmunoassay* der Firma Amersham entsprechend den Anweisungen des Herstellers verwendet. In diesem System wird [<sup>125</sup>I]-ET-3 als Kompetitor zusammen mit einem hochspezifischen anti-ET-Kaninchen-Serum eingesetzt. Mit Hilfe eines Sekundärantikörpers, der an magnetisierbare Polymerpartikel gebunden ist (Amerlex-M), kann die antikörpergebundene Fraktion von der freien Radioaktivität magnetisch separiert werden. Komponenten dieses Systems sind:

**Reaktionspuffer:** 0,02 M Borsäure/0,1% Natriumazid in *Aqua dest.* pH 7,4

**Standard ET-1:** 320 fmol/ml synthetisches ET-1 zur Herstellung einer Standard-Verdünnungsreihe (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 fmol/ml)

**Antiserum:** Kaninchen-Anti-ET-Serum

**Kompetitor:** synthetisches [<sup>125</sup>I]-ET-3, 41 kBq, 1,1 µCi

**Amerlex-M-Sekundärantikörper-Präparation:** Esel-Anti-Kaninchen-Serum gebunden an magnetisierbare Polymerpartikel

#### 5.5.1.1 Extraktion von ET aus den Medienüberständen

Amprep™ 500 mg-C2-Säulen wurden zunächst mit 2 ml 100%igem Methanol, dann mit 2 ml *Aqua bidest.* äquilibriert. Jeweils 2 ml des Medienüberstandes wurden mit

0,5 ml 2M HCl angesäuert, bei 10,000 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend auf die Säule pipettiert. Anschließend wurden die Säulen mit 5 ml 0,1 %iger Trifluoressigsäure (TFA) gewaschen. Das Peptid wurde dann mit 2 ml 80% Methanol/0,1% TFA in *Aqua bidest.* in Polypropylenröhrchen eluiert, getrocknet und in einen Reaktionspuffer aufgenommen.

### 5.5.1.2 ET-RIA

Alle Proben wurden gleichzeitig in einem RIA in Doppelansätzen gemessen. Jeweils 100 µl der Proben bzw. Standards wurden zunächst mit 100 µl Antiserum für 4 h bei 4°C inkubiert. Dann wurden 100 µl [125I]-ET-3 hinzugefügt und für weitere 24 h bei 4°C inkubiert. Nach 10-minütiger Inkubation mit 250 µl der Amerlex-M-Sekundärantikörper-Präparation bei Raumtemperatur wurde die antikörpergebundene Fraktion mit Hilfe der „*Amerlex-M Separator Base*“ von der freien Radioaktivität getrennt. Die Radioaktivität der einzelnen Proben wurde mit Hilfe eines *Gamma-Counters* (LKB-1277 GammaMaster-System, LKB Wallac, Turku, Finnland) gemessen. Anschließend wurde mit Hilfe des Softwarepakets RiaCalc™ die Endothelin-Konzentration der Proben berechnet.

### 5.5.1.3 Qualitätskontrolle

Der verwendete RIA weist eine Kreuzreaktivität von 100% mit ET-1, 144% mit ET-2, 52% mit ET-3 sowie <0,4% mit humanem oder porcinem *Big-ET* auf. Die Detektionsgrenze liegt bei 0,2 fmol/Probe. Durch Messung von 4 Proben gleicher Konzentration in Doppelansätzen wurde eine Intragruppen-Variabilität von 5,1% ermittelt. Die Extraktionseffizienz der Amprep™ 500mg-C2-Säulen für eine bekannte Menge synthetischen ET-1 aus Medium lag bei  $84,1 \pm 11,5\%$  (n=4).

#### 5.5.1.4 Gesamtproteinbestimmung in Astrozyten-Extrakten

Die Zellen wurden zunächst in hypotonem Puffer mit Proteinase-Inhibitoren homogenisiert. Die Proteinkonzentration wurde dann mit Hilfe des Bio-Rad *DC (Detergent Compatible) Protein Assay*<sup>™</sup>, basierend auf der colorimetrischen Methode nach Lowry (143), entsprechend der Anleitung des Herstellers bestimmt. Die Methode beruht auf der Eigenschaft divalenten Kupfers unter Komplexbildung mit Peptidbindungen zu monovalentem Kupfer reduziert zu werden. Das monovalente Kupferion und die Radikalgruppen von Tyrosin, Tryptophan und Cystein reagieren anschließend mit Folin-Reagenz. Dadurch bildet sich ein instabiles Reaktionsprodukt, das zu Molybdän-Tungsten-Blau reduziert wird. Es wurden 5 µl Proteinextrakt bzw. BSA-Standard für 15 min bei Raumtemperatur mit der Reaktionslösung inkubiert. Die resultierende Färbung wurde mittels Spektrophotometrie (MRX Microplate Reader, DYNEX Tech., Chantilly, USA) bei 650 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Standard-Kurve mit Hilfe des Softwarepakets *Revelation*<sup>®</sup> berechnet.

#### 5.5.1.5 Statistische Analyse der Ergebnisse

Die ET-Konzentrationen werden in fmol/mg Protein als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Zur Berechnung statistischer Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurde der zweiseitige Student's t-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Dabei gilt ein p-Wert unter 0,05 als statistisch signifikant.

## 5.6 Materialliste und Bezugsquellen

<i>ABIPRISMä DYE Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit</i>	PERKIN ELMER APPLIED
Agarose	SIGMA, Steinheim
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP	AMERSHAM, UK
Amerprep™ 500 mg C2-Säule	AMERSHAM, UK
Ammoniumpersulfat	SIGMA, Steinheim
Aprotinin	SIGMA, Steinheim
Bacto-agar	DIFCO, Detroit, USA
Bacto-Tryptone	DIFCO, Detroit, USA
<i>Basal Medium Eagle´s (BME)</i>	SEROMED, Berlin
<i>BioRad Protein DC Kit</i>	BioRad, Hervules, USA
Borsäure	MERCK, Darmstadt
Dibutryl cyclic AMP (DBcAMP)	SIGMA, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	SIGMA, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	STRATAGENE, Heidelberg
<i>DNA ladder (100 bp)</i>	GIBCO BRL, Eggenstein
DNase	Worthington Biochem. Corp. , Freehold, USA
dNTPs	PROMEGA, Mannheim
E.coli DH5 $\alpha$	GIBCO BRL, Eggenstein
Endothelin 1-21-spezifischer [ <sup>125</sup> I] Assay	AMERSHAM, UK
Essigsäure	SIGMA, Steinheim
Ethidiumbromid	MERCK, Darmstadt
<i>Fetal Calf Serum (FCS)</i>	GIBCO, Gaitersburg, USA
First Strand Buffer	GIBCO BRL, Eggenstein
Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid	Carl Roth, Karlsruhe
<i>High Salt Buffer</i>	AMERSHAM, UK
<i>Hank´s Balanced Salt Solution (HBSS)</i>	GIBCO, Gaitersburg, USA
HCl (37%)	Carl Roth, Karlsruhe

Hybond™ N Membran	AMERSHAM, UK
Isopropanol	MERCK, Darmstadt
Leupeptin	SIGMA, Steinheim
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	GIBCO BRL, Eggenstein
Methanol	MERCK, Darmstadt
Natriumazetat	SIGMA, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
3-(N-Morphilino)Propansulfonsäure (MOPS)	SIGMA, Steinheim
Oligonukleotid- <i>Primer</i>	TIB-MOLBIOL, Berlin
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
PCR-Puffer (10X)	GIBCO BRL, Eggenstein
PD142893	SIGMA, Steinheim
PD145065	SIGMA, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	SIGMA, Steinheim
<i>Phosphate-buffered Solution (PBS)-Dulbecco</i>	SEROMED, Berlin
Poly-L-Lysin	SIGMA, Deisenhofen
Propidiumjodid	MERCK, Darmstadt
<i>QIAEXâ Gel Extraction Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>QIAprepâ Spin Plasmid Kit</i>	QIAGEN, Hilden
QuickHyb® Hybridisierungslösung	STRATAGENE, Heidelberg
Quick Spin™ Säulen Sephadex® G-50	BOEHRINGER, Mannheim
<i>Random Hexamers</i>	GIBCO BRL
<i>Rediprimeâ DNA Labeling System</i>	AMERSHAM, UK
Restriktionsendonukleasen (EcoRI, Sall, XbaI)	AMERSHAM, UK
RNAasin	Molecular Bio-Products Inc., CA, USA
Sodium-Dodecylsulfat (SDS)	BioRad, Hercules, USA
<i>Superscriptâ Reverse Transcriptase</i>	GIBCO BRL, Eggenstein
<i>TA-Cloningâ Kit</i>	INVITROGEN BV, Niederlande
Taq DNA Polymerase	GIBCO BRL, Eggenstein
N, N, N', N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED)	GIBCO BRL, Eggenstein

Trifluoressigsäure (TFA)	MERCK, Darmstadt
Tris-Base	MERCK, Darmstadt
Tris-HCl	MERCK, Darmstadt
TRIZOL®	GIBCO BRL, Eggenstein
Trypsin	Worthington Biochem. Corp., Freehold, USA
X-gal	Carl Roth, Karlsruhe