

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Substanzen

Folgende Chemikalien wurden benutzt:

Acrylamid	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories (München, D)
3-[(4-Methylphenyl)sulfonyl]-2-Propenetril (BAY 11-7082)	Calbiochem (Darmstadt, D)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (München, D)
Cdc2-Like Kinase Inhibitor (TG003)	Calbiochem (Darmstadt, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (München, D)
Dithiothreitol (DTT)	Calbiochem (Darmstadt, D)
Edithidumbromid	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (München, D)
Humaner Faktor X	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Humaner rekombinanter Tissue Factor (lipidiert)	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich (München, D)
Interleukin-6	Sigma-Aldrich (München, D)
L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (PC)	Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)
L- $\alpha$ -Phosphatidylserin (PS)	Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)
Merckofix® Fixationsspray	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (München, D)
Natriumdesoxycolat	Sigma-Aldrich (München, D)
N,N-Bis (2-hydroxyethyl)-glycin (Bicin)	Sigma-Aldrich (München, D)
N,N'-(1,2-Dihydroxyethylen)-bisacrylamid	Bio-Rad Laboratories (München, D)
N,N'-Dimethyl-9,9'-bisacridiniumdinitrat (Lucigenin)	Fluka (Basel, CH)

n-Octyl- $\beta$ -D-Glycopyranosid	Calbiochem (Darmstadt, D)
NovoSeven®	NovoNordisk (Kopenhagen, DK)
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich (München, D)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (München, D)
Protein G-PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC)	Sigma-Aldrich (München, D)
SeaKem LE Agarose	BioWhittaker Molecular Application (Rockland, ME, USA)
Spectrozyme® Fxa	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$	Sigma-Aldrich (München, D)
Wasser, nukleasefrei	Promega (Mannheim, D)

### 3.1.2 Kits

Folgende „Testsysteme“ wurden verwendet:

BCA Protein Assay Kit	Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA)
ECL plus Detection Kit	GE Healthcare Bioscience (Little Chalfont, UK)
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Applied Science (Mannheim, D)
IMUBIND Tissue Factor ELISA Kit	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, D)
Mycoplasma Detection Kit 1296744	Roche Applied Science (Mannheim, D)
PAXgene Blood RNA Kit	Qiagen (Hilden, D)
QCL-1000® Chromogenic Endpoint LAL Kit	BioWhittaker Molecular Application (Rockland, ME, USA)
QIAquick Gel-Extraction-Kit	Qiagen (Hilden, D)
QIAshredder Columns	Qiagen (Hilden, D)
RNEasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, D)

### 3.1.3 Nukleotide, Primer und Sonden

Alle Primer und Sonden wurden von der Firma TIB-Molbiol GmbH (Berlin, D) synthetisiert. Mit Hilfe der BLAST-Software ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) wurden sie auf die Amplifikation von unerwünschten Fragmenten hin überprüft. Als Nukleotide wurde ein dNTP Mix (10 mM, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) verwendet.

In der nachfolgenden Tabelle sind die entsprechenden sequenzspezifischen Primerpaare und für die quantitative Realtime-PCR zusätzlich die dafür nötige Sondensequenz aufgeführt. Alle Sonden wurden mit 5'-FAM als Farbstoff und 3'-TAMRA als Quencher markiert.

Zielsequenz	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Sonde 5'-3'
asTF (real)	GGG ATG TTT TTG GCA AGG ACT TA	CCA GGA TGA TGA CAA GGA TGA TG	AAT CTT CAA GTT CAG GAA AGA AAT ATT CTA CAT CAT TGG A
TF (real)	GCG GTT CAC GCA CTA CAA AT	CCA CAA ATA CCA CAG CTC CA	TTC AAG CAG TGA TTC CCT CCC GAA CA
GAPDH (real)	CCA CCC ATG GCA AAT TCC	TCG CTC CTG GAA GAT GGT G	CAC CGT CAA GGC TGA GAA CGT
TF+asTF	CGC CGC CAA CTG GTA GAC	TGC AGT AGC TCC AAC AGT GC	
GAPDH	AGT ATG ATG ACA TCA AGA AGG	ATG GTA TTC AAG AGA GTA GGG	
GAPDH Standard	GCC ACA TCG CTC AGA CAC CAT	GGT TGA GCA CAG GGT ACT TTA TTG ATG	
TF+asTF Standard	CGC CGC CAA CTG GTA GAC	TGC AGT AGC TCC AAC AGT GC	

**Tabelle 1** Verzeichnis der verwendeten Primer und Sonden

### 3.1.4 Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Enzyme eingesetzt:

AmpliTaq®	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Platinum® Pfx DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
TaqMan Universal PCR Master Mix No	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
AmpErase® UNG	
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories (Pasching, A)

### 3.1.5 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in dieser Arbeit benutzt:

#### Primärantikörper

##### **Monoklonale Antikörper**

Anti-human E-Selectin (CD62E)- Fluorescein-konjugiert (Klon BBIG-E5, IgG1)	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Anti-human Tissue Factor (#4508)	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Anti-human Tissue Factor (Klon TFE280)	Enzyme Research Laboratories Ltd (Swansea, UK)
Anti-human Tissue Factor Pathway Inhibitor (#4903) (Klon 2H8)	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)

##### **Polyklonale Antikörper**

Anti-ACTIVE Caspase-3	Promega GmbH (Mannheim, D)
Anti-PARP p85 Fragment	Promega GmbH (Mannheim, D)
Anti-asHTF (C30)	Pineda Antikörper-Service (Berlin, D)

#### Sekundärantikörper

Goat anti-rabbit immunoglobulins-HRP- konjugiert (Klon DAK-GO1, IgG1)	DakoCytomation (Glostrup, DK)
Rabbit anti-mouse immunoglobulins- HRP-konjugiert (Klon DAK-RA1, IgG1)	DakoCytomation (Glostrup, DK)
MFP488 goat anti-mouse IgG (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)
MFP488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)
MFP555 goat anti-mouse IgG (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)
MFP555 goat anti-rabbit IgG (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)

### 3.1.6 Zelllinie

In der vorliegenden Arbeit verwendeten HUVECs wurden kryokonserviert von der Firma PromoCell (Heidelberg, D) bezogen.

### 3.1.7 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Folgende Medien und Reagenzien wurden zur Kultivierung der Zellen benutzt:

Accutase	PAA Laboratories (Pasching, A)
Attachment Factor	Tebu-Bio GmbH (Offenbach, D)
Endothelial Cell Growth Medium (Low Serum)	PromoCell GmbH (Heidelberg, D)
Endothelial Cell Basal Medium (phenolrotfrei)	PromoCell GmbH (Heidelberg, D)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories (Pasching, A)
Trypanblau	Invitrogen (Karlsruhe, D)

### 3.1.8 Größenmarker

In vorliegender Arbeit wurden die folgenden Größenmarker verwendet:

#### DNA-Größenmarker

Ready-Load 100 bp DNA ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ready-Load 250 bp DNA ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ready-Load 1 Kb DNA ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)

#### Protein-Größenmarker

Dual Color Protein Standard	Bio-Rad Laboratories (München, D)
-----------------------------	-----------------------------------

### 3.1.9 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden eingesetzt:

30% (w/v) Acryl-Bisacrylamid Lösung

29 % (w/v) Acrylamid, 1 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

Puffer für die TF-Aktivitätsmessung

10 mM HEPES, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 % (w/v) BSA, pH 7,5

### EDTA-Puffer

50 mM Bicin, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,1 % (w/v) BSA, pH 8,5  
1x Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)  
115 mM NaCl, 27 mM KCl, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

### Radio-Immunopräzipitations-Assay-Puffer (RIPA-Puffer)

50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Igepal CA-630, 0,5 % Na-Desoxycholat, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,0

### 1x SDS PAGE Laufpuffer

192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS

### 50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0

### 10x Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS)

100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5

### 10x Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (TBS-T)

100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Tween 20, pH 7,5

## **3.1.10 Geräte**

Folgende Geräte wurden in der vorliegenden Arbeit benutzt:

ABI 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
BioDoc Analyze	Biometra (Göttingen, D)
BioPhotometer	Eppendorf AG (Wesseling-Berzdorf, D)
Centrifuge 5415R	Eppendorf AG (Wessling-Berzdorf, D)
CO <sub>2</sub> -Inkubator C-200	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH (Göttingen, D)
Durchlichtmikroskop DMIL	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D)
Durchflußzytometer FACScan	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Fastblot B44	Biometra (Göttingen, D)

Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRBE	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D)
Minifuge GL	Heraeus Holding GmbH (Hanau, D)
Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad (München, D)
Mini SUBCELL GT	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Orion I Mikroplatten Luminometer	Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, D)
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research Inc. (South San Francisco, CA, USA)
PowerPac 1000	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Ultraschall-Bad Bandelin Sonorex RK31	Bandelin electronic GmbH (Berlin, D)
Versamax Microplate Reader	Molecular Devices GmbH (Ismaning, D)

### 3.1.11 Sonstige Materialien

Ferner wurden folgende Materialien eingesetzt:

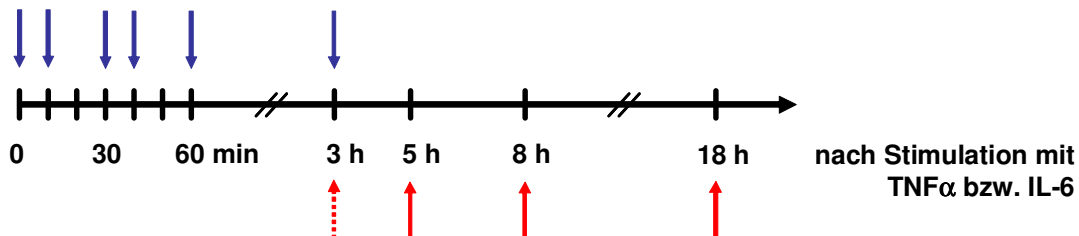
Hybond-P PVDF-Membran	GE Healthcare Bioscience (Little Chalfont, UK)
Hyperfilm ECL	GE Healthcare Bioscience (Little Chalfont, UK)
Sterilfilter 0,22 µm	Schleicher & Schüll (Nürnberg, D)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau, um das endotheliale Expressionsmuster der TF-Isoformen sowie ihre Thrombogenität nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) bzw. IL-6 (10 ng/L) zu beurteilen, ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Die einzelnen Methoden sind detailliert in den folgenden Abschnitten beschrieben. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte zu den in der Abbildung angegebenen Zeitpunkten mittels quantitativer Realtime-Polymerasekettenreaktion (PCR). TF-Protein und TFPI wurden per Western Blot bzw. durch Immunfluoreszenzmikroskopie detektiert. Die Aktivität der TF-Isoformen wurde mit einem chromogenen Aktivitätsassay bestimmt.

#### Analyse der mRNA-Expression von TF und asTF in HUVECs



#### Analyse der Protein-Expression und Aktivität von TF und asTF in HUVECs sowie im Zellkultur-Überstand

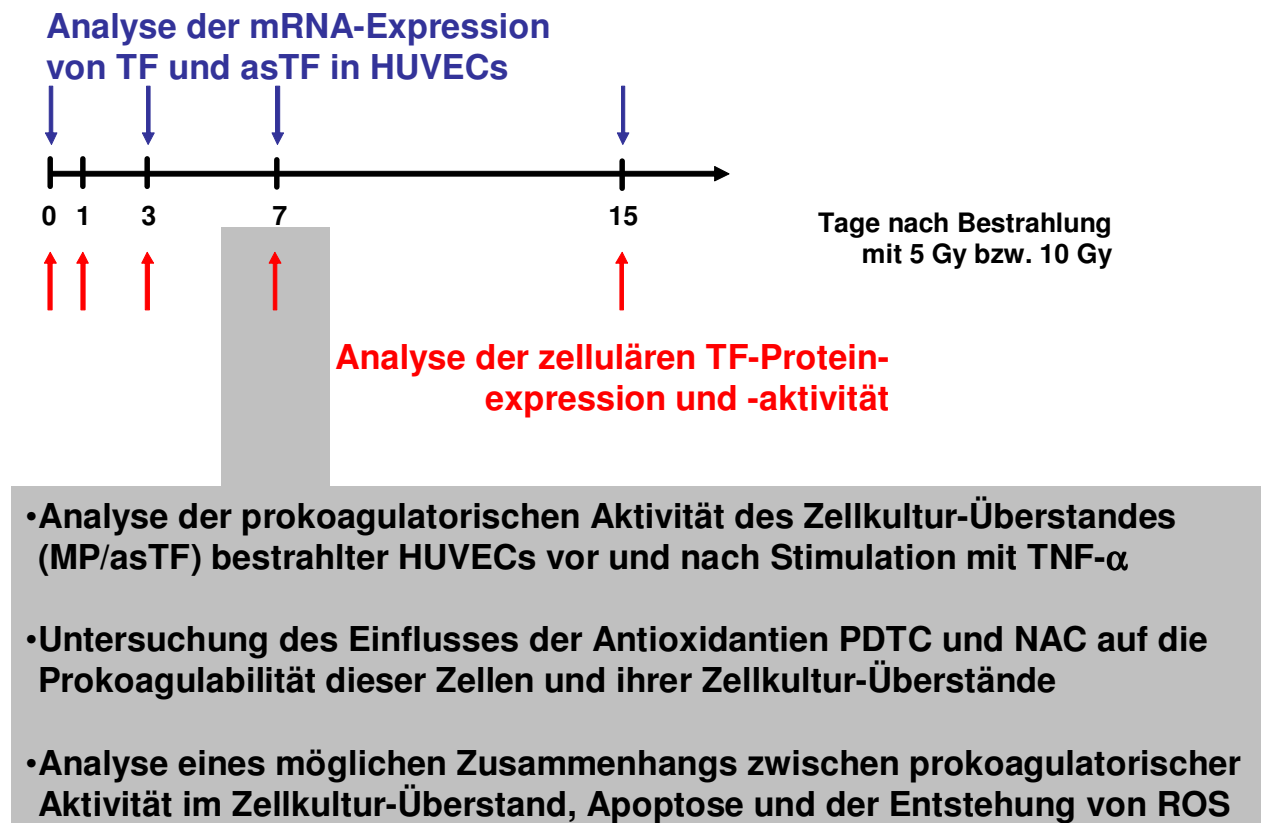
**Abbildung 5** Der Versuchsaufbau zur Untersuchung der TF-Expression und prokoagulatorischen Aktivität nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen

Der Einfluss des NF- $\kappa$ B- sowie des CLK-Inhibitors auf die Zytokin-induzierte mRNA-Expression der TF-Isoformen bzw. auf das Spleißverhalten des TF-Gens wurde ebenfalls mittels quantitativer Realtime-PCR zu zwei Zeitpunkten nach Stimulation untersucht.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, inwiefern ionisierende Bestrahlung auf die zelluläre Expression der TF-Isoformen in Endothelzellen sowie



auf die Thrombogenität des Zellkultur-Überstandes Einfluss nimmt. Abbildung 6 sind die Zeitpunkte nach Bestrahlung zu entnehmen, an denen die TF-mRNA- und Protein-Expression per Realtime-PCR und TF-ELISA untersucht wurden. Die TF-Aktivität wurde mit oben erwähntem Assay bestimmt.



**Abbildung 6** Der Versuchsaufbau zur Untersuchung der TF-Expression und der prokoagulatorischen Aktivität nach ionisierender Bestrahlung

Neben der Messung der TF-Aktivität wurden die Auswirkungen der antioxidativen Behandlung mit PDTC und NAC vor Bestrahlung der Endothelzellen anhand der Parameter Apoptose (durch Bestimmung von aktiver Caspase-3) und ROS-Bildung durchflusszytometrisch bzw. chemiluminometrisch untersucht.

## **3.2.2 Die Experimente an humanen Endothelzellen**

### **3.2.2.1 Die Zellkultur von HUVECs**

Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgte in einem befeuchteten Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98 %. Ein Mediumwechsel wurde im Abstand von 2-3 Tagen vorgenommen. Der konfluente Monolayer zeigte im Phasenkontrastauflicht-Mikroskop das für Endothelzellen typische Erscheinungsbild polygonaler, pflastersteinartiger Zellen. Nach erreichter Konfluenz wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen mit 4 mL PBS gewaschen und die Zellen durch Zugabe von 2 mL Trypsin/EDTA trypsinisiert. Durch Zugabe des gleichen Volumens FCS-haltigen Kulturmedium wurde die Trypsinreaktion gestoppt, die Zellen in ein 15 mL-Röhrchen überführt und zentrifugiert (150x g, 5 min). Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:2 oder 1:3 auf neue, mit Attachment Factor beschichtete Kulturgefäße ausgesät. Die Kultivierung der HUVECs erfolgte in Endothelial Cell Growth Medium (Low Serum), dem 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin zugesetzt wurden.

Zur Konservierung wurden die Endothelzellen in flüssigem Stickstoff gelagert. HUVECs wurden bis zur Konfluenz in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert, mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zentrifugation (150 x g, 5 min) wurden die Zellen erneut mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in eiskaltem Kryokonservierungs-Medium (95 % FCS, 5 % DMSO) resuspendiert, die Zellsuspension in Kryoröhrchen aliquotiert und mit einem Einfriergerät („Mr. Frosty“, Nalgene Nunc) langsam (1 °C/min) auf –80 °C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen in einem 37 °C-Wasserbad aufgetaut, in ein 15 mL-Röhrchen überführt und das im Einfriermedium enthaltene DMSO durch Zugabe von 10 mL PBS herausverdünnt. Nach Zentrifugation (150x g, 5 min) wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ausgesät, die zuvor mit 0,1% Gelatine-Lösung beschichtet wurde.

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte durch Versetzen von 50 µl Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Trypanblau-Lösung (0,4 %) und anschließender lichtmikroskopischer Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer. Als tote Zellen wurden blau gefärbte Zellen definiert, da lebende Zellen wegen ihrer intakten Membran den Farbstoff Trypanblau nicht aufnehmen.

### **3.2.2.2 Methoden zum Nachweis von Endotoxinen und Mykoplasmen**

Endotoxine induzieren die Expression von TF in einer Vielzahl von Zellen. Um auszuschließen, dass die in dieser Arbeit gemessene TF-Expression auf eine Induktion durch Endotoxine zurückzuführen war, wurde ihre Konzentration im Kulturmedium mittels des Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mit dem QCL-1000® Test entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

Mykoplasmen beeinflussen die Expression von verschiedenen Proteinen und anderen Stoffwechselfvorgängen in den Zellen und führen so zu einer Verfälschung von Versuchsergebnissen. Eine Kontamination der HUVECs mit Mykoplasmen wurde anhand eines ELISA (Mycoplasma Detection Kit), der Mykoplasmen-spezifische Enzyme im Zellkultur-Überstand nachweist, ausgeschlossen. Der ELISA wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt.

### **3.2.2.3 Die Stimulation der Zellen mit inflammatorischen Zytokinen**

Für Stimulationsexperimente des ersten Versuchsteils wurden HUVECs zunächst in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert. Bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zwecks Serumentzugs für wenigstens 2 h mit Basalmedium versetzt. Anschließend wurde das alte Basalmedium gegen frisches, den Stimulus TNF- $\alpha$  (10ng/mL) bzw. IL-6 (10ng/L) enthaltendes Basalmedium gewechselt und für die in Abbildung 5 angegebenen Zeiträume bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt, der Überstand abgenommen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen bzw. die Zellkulturüberstände wurden sofort für die entsprechenden Versuche weiterverwendet.



### **3.2.3 Molekularbiologische Methoden zum Umgang mit RNA und DNA**

#### **3.2.3.1 Methoden zur Quantifizierung der RNA und ihrer Qualitätskontrolle**

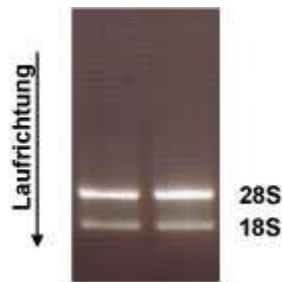
Zur RNA-Isolation wurde das RNEasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Nach der Zellyse wurde die Probe zunächst in einer QIAShredder-Säule homogenisiert. Durch einen stark denaturierenden, Guanidinisothiocyanat-haltigen Puffer wurden RNAsen effizient inaktiviert, um eine Isolierung intakter RNA zu gewährleisten. Durch Zugabe von Ethanol wurden optimale Bedingungen hergestellt, sodass die Gesamt-RNA spezifisch an die die Silicagel-Membran binden konnte, während übrige Substanzen wie DNA und Proteine effizient ausgewaschen wurden. Zum Schluss wurde die reine RNA mit 30  $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die Konzentration und Reinheit einer wässrigen RNA-Lösung wurde spektralphotometrisch in einem UV-Meter unter der Verwendung von UV-durchlässigen Küvetten bestimmt. Zyklisch konjugierte  $\pi$ -Elektronen der Pyrimidin- und Purinbasen lassen sich durch UV-Licht anregen. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Absorptionswert bei 260 nm ( $A_{260}$ ) dient als Grundlage für die Berechnung der Konzentration. Bei einer Schichtdicke von 1 cm wird der Absorptionswert mit der Gerätekonstanten (40) und der Verdünnung multipliziert, um die Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) zu erhalten. Zu beachten ist, dass der Absorptionswert zwischen 0,1 und 1 liegen sollte, da nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz nur in diesem Bereich Absorption und Konzentration proportional zueinander sind.

Zur Sicherstellung der Qualität der isolierten RNA wurde der Absorptionsquotient bestimmt. Das Verhältnis  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  (Absorptionsmaximum von Proteinen) lässt auf die Reinheit der RNA schließen und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen. Verunreinigungen mit Proteinen bzw. Salzurückständen, die beim Umschreiben in komplementäre DNA (cDNA) und bei Realtime-PCRs zu Ungenauigkeiten führen, werden durch einen kleineren Absorptionsquotienten angezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Proben mit einem Zahlenwert größer als 1,6 verwendet.

Weiterhin diente zur Kontrolle die elektrophoretische Auftrennung von 1  $\mu\text{g}$  RNA auf einem 1% TAE-Agarose-Gel. Dabei sollen die Banden der mitochondrialen Untereinheiten 18S und 28S durch die Einlagerung von Ethidiumbromid im UV-Licht

sichtbar werden (Abbildung 8). Rückstände von DNA-Verunreinigungen bzw. Degradation der RNA lassen sich durch dieses Verfahren visuell nachweisen.



**Abbildung 8** RNA-Qualitätskontrolle anhand eines TAE-Agarose-Gels

### 3.2.3.2 Die Durchführung der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Da RNA nicht direkt in einer PCR amplifiziert werden kann, muss sie zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde die RNA 5 min bei 55 °C denaturiert. Die anschließende cDNA-Synthese (reverse Transkription) erfolgte gemäß Herstellerangaben mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV), das die Avian-Myeloblastosis-Virus-Reverse Transkriptase (AMV-RT) verwendet. Als Nukleotide dienten Oligo(dT)-Primer, die im Bereich des Poly(A)-Schwanzes der eukaryotischen mRNA hybridisieren, sodass selektiv alle mRNA-Moleküle in cDNA umgeschrieben werden.


Dieser Reaktionsansatz wurde dann für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und danach entweder bei -20 °C eingefroren oder sofort auf Eis für die Analyse der cDNA weiter verarbeitet.

<b>Standardprotokoll: Reverse Transkription</b>		<b>Thermocycler- Einstellung</b>	
10x Reaktionspuffer	2 µL	25 °C	10 min
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µL	42 °C	60 min
Desoxynukleotid-Mix (je 10 mM)	2 µL	99 °C	5 min
Oligo-p(dT) <sub>15</sub> -Primer (0,8 µg/µL)	2 µL	4 °C	5 min
RNase Inhibitor (50 U/µL)	1 µL		
AMV-RT	0,8 µL		
RNA	1 µg		
Nukleasefreies Wasser	ad 20 µL		

**Abbildung 9** Standardprotokoll zur Reversen Transkription mit den dazugehörigen Thermocycler-Einstellungen

### 3.2.3.3 Die Amplifikation von DNA mittels PCR und ihre Auftrennung mittels Gelelektrophorese

Die PCR dient der enzymatischen Amplifikation eines durch spezifische Oligonukleotide (Primer) definierten linearen DNA-Abschnitts. Die Amplifikation wird durch sequentielles Denaturieren, Hybridisieren und Elongieren erreicht. Die Hybridisierungstemperatur variiert dabei in Abhängigkeit der Länge und Komplementarität der Oligonukleotide: Die Synthesedauer ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Alle Polymerasen wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Zur Amplifikation der DNA-Standards für die Realtime-PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

<b>Standardprotokoll: Polymerase-Kettenreaktion</b>		<b>Thermocycler- Einstellung</b>		
10x <i>Pfx</i> Amplification Buffer	5 µL	94 °C	2 min	
50 mM MgSO <sub>4</sub>	1 µL	94 °C	15 s Denaturierung	 weitere 33 Zyklen
Desoxynukleotid-Mix (je 10 mM)	1,5 µL	57 °C	30 s Hybridisierung	
Sequenzspezifische Primer (je 10µM)	1,5 µL	68 °C	90 s Elongation	
Platinum <i>Pfx</i> DNA Polymerase	0,4 µL	4 °C	5 min	
DNA Template (10 pg -200 ng)	≥1 µL			
Nukleasefreies Wasser	ad 50 µL			

**Abbildung 10** Standardprotokoll zur Polymerase-Kettenreaktion mit dazugehöriger Thermocycler-Einstellung

Für alle weiteren konventionellen PCR-Ansätze wurde als DNA-Polymerase AmpliTaq mit dem dazugehörigen Puffer gemäß Herstellerangaben verwendet.

Nach erfolgter Amplifikation wurden die doppelsträngigen DNA-Moleküle in 1 % Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente dabei 1x TAE. Die aufzutrennende DNA (4 Teile) wurde zuvor mit 5 x DNA-Ladepuffer (1 Teil) versetzt. Die Auftrennung erfolgte standardmäßig bei 80 Volt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,2 µg/mL Gel) zur

Gelmasse wurde die DNA während der Elektrophorese angefärbt und hinterher auf einem Durchlichtschirm mit UV-Licht sichtbar gemacht.

### 3.2.3.4 Die Extraktion von DNA aus dem Elektrophorese-Gel und Berechnung der DNA-Standards für die Realtime-PCR

Auf einem UV-Durchlichtschirm wurden die Gelbereiche, die die DNA-Banden einer gewünschten Größe enthielten, mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel-Extraction-Kits entsprechend den Herstellerangaben. Die DNA-Konzentration wurde anschließend spektralphotometrisch bestimmt. Der Berechnung der Anzahl an DNA-Kopien in den Eluaten lag folgende Formel zugrunde:

$$\frac{\text{DNA-Konzentration [g/}\mu\text{L}]}{\text{Amplikongröße x 660}} \times 6,022 \times 10^{23} = \text{Kopienzahl/}\mu\text{L}$$

Amplikongröße	
TF:	931 bp
asTF:	842 bp
GAPDH:	1227 bp

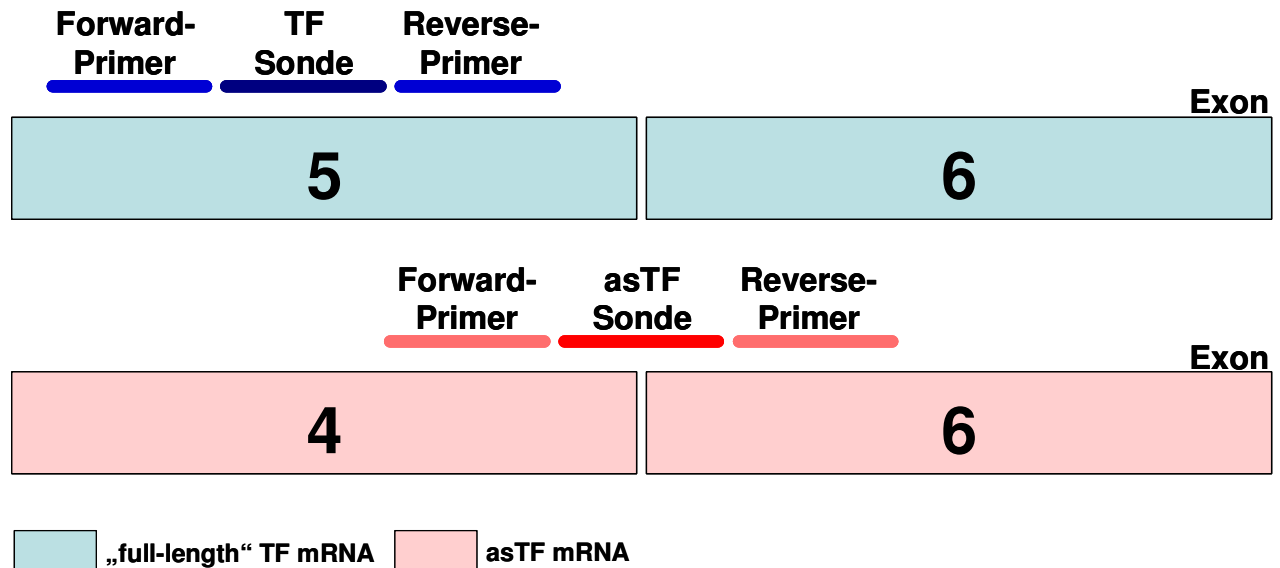
Die Lösungen wurden auf eine bestimmte Kopienzahl eingestellt, aus denen für jedes Gen eine Standard-Verdünnungsreihe (Verdünnungsverhältnis 1:10) erstellt wurde.

### 3.2.3.5 Die Durchführung der Realtime-PCR mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden

Ziel der quantitativen PCR war es, aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt Rückschlüsse auf die eingesetzte Menge RNA bzw. cDNA zu ziehen und so die Transkriptionshäufigkeit der gewünschten Ziel-Gene zu bestimmen. Während des Annealing-Schrittes binden nicht nur sequenzspezifische Primer an die Zielsequenz, sondern auch sequenzspezifische Fluoreszenzsonden. Diese sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM) als Reporter und einem Quencher-Molekül (TAMRA) markiert. Da der Quencher die Fluoreszenzemission des Reporters unterdrückt, erhält man anfangs kein Fluoreszenzsignal. Während der Zweitstrangsynthese erreicht die Taq-DNA-Polymerase die Sonde. Durch ihre 5'-3'-Exonucleaseaktivität wird die Sonde hydrolytisch gespalten, wodurch Reporter und Quencher getrennt werden. Durch die Anregung des Reporters konnte die Fluoreszenzemission messtechnisch erfasst werden. Die gemessene Intensität der Fluoreszenz war dabei direkt proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Stränge und damit proportional zur DNA-Ausgangsmenge. Zur Messung wurde ein ABI 7000 Sequence Detection System verwendet. Die anschließende Auswertung erfolgte mit der firmeneigenen SDS-Software Version 2.0.



Um Aussagen über die mRNA-Expression beider TF-Isoformen zu treffen, wurden die Primer so platziert, dass nur eine der beiden Isoformen amplifiziert und detektiert wird. Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung der Lage der Primer, die in dieser Arbeit Verwendung fanden.




**Abbildung 11** Schematische Lage der Realtime-PCR-Primer zur Quantifizierung der TF-Isoformen

Um unbekannte Proben zu quantifizieren, müssen DNA-Standards mit bekannter Kopienzahl eingesetzt werden. Ist die Fluoreszenzzunahme größer als der Schwellenwert (Threshold), d.h. der Bereich, der sich aus der Schwankungsbreite der Basisfluoreszenz der PCR-Reaktionen während der ersten Zyklen errechnet, und auch mehrere Zyklen messbar ist, so wird dieser Zyklus der jeweiligen Probe als  $C_t$  Wert (Threshold Cyclus) zugewiesen. Mittels der  $C_t$  Werte für die Standards lässt sich eine Korrelationsgerade (Standardkurve) ableiten.

Nach Ende der Realtime-PCR wurden die amplifizierten Fragmente jeweils mittels Agarosegelen auf die richtige Größe hin kontrolliert. Es erfolgte pro Probe eine mindestens dreimalige Quantifizierung der Ziel-mRNA, welche im Anschluss auf die Expression eines stabil exprimierten Genes (= Houskeeping-Gen), in diesem Fall auf die Expression von GAPDH, bezogen wurde.

Das nachfolgende Protokoll zeigt das Temperaturprogramm des Realtime-PCR-Thermocyclers auf:

<b>Protokoll: Realtime-PCR</b>		<b>Thermocycler- Einstellung</b>	
2x TaqMan Universal PCR Master Mix		50 °C	2 min
No AmpErase® UNG	12,5 µL	95 °C	10 min
Primer-Mix (je 20 µM)	0,5 µL	95 °C	15 s
Sonde (10µM)	0,3 µL	60 °C	1 min
cDNA Template (10 ng - 1 µg)	3 µL		 weitere 39 Zyklen
Nukleasefreies Wasser	ad 25 µL		

**Abbildung 12** Protokoll zur Realtime-PCR

### **3.2.4 Die Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität von Tissue Factor**

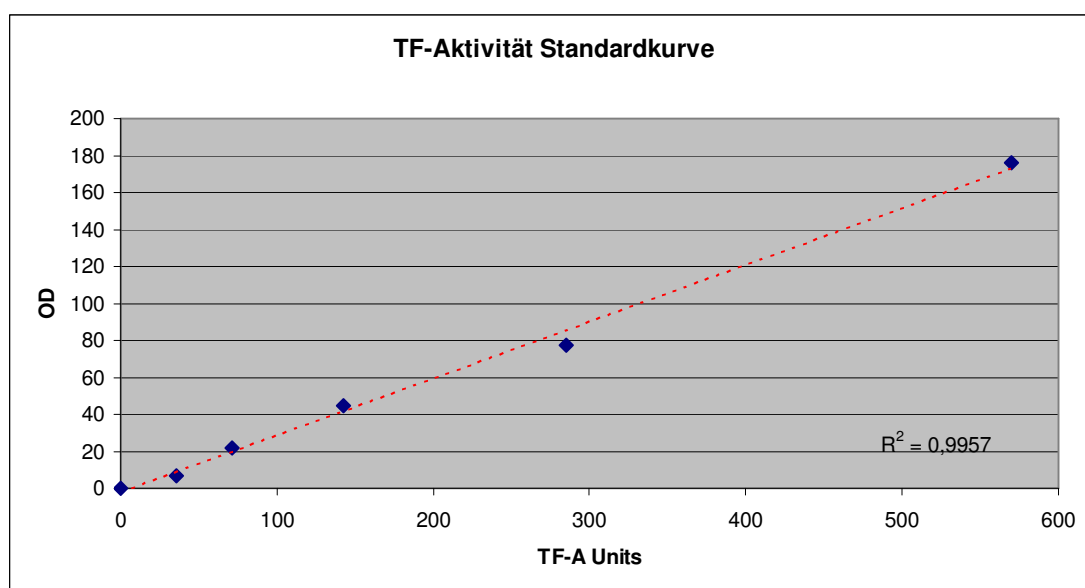
#### **3.2.4.1 Die Bestimmung der zellulären und Mikropartikel-assoziierten Tissue Factor-Aktivität**

Die funktionelle Aktivität von TF lässt sich aus der Bildung des aktivierten F X (F Xa) bestimmen. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, spaltet der TF/F VIIa Komplex F X entweder direkt oder indirekt über eine F IX Aktivierung. Der hier verwendete Aktivitätstest beruht auf der direkten Aktivierung von F X durch den TF/F VIIa Komplex. Der gebildete F Xa spaltet das chromogene Substrat Spectrozyme fXa, wobei der Farbstoff p-Nitroanilin abgespalten wird, dessen spezifische Extinktion bei 405 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die Bildung von F Xa ist hierbei zur TF-Aktivität der Probe direkt proportional. Die Blutgerinnungsfaktoren wurden dabei in Form des Arzneimittels NovoSeven® (rekombinanter F VIIa) bzw. durch humanen F X zugefügt.

Für Bestimmung der Mikropartikel-assoziierten TF-Aktivität müssen die Mikropartikel zunächst aufbereitet werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellkulturüberstände (2 mL) stimulierter und unstimulierter HUVECs zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Reaktionsgefäße überführt. Nach der Zentrifugation der Proben (200x g, 10 min), um tote Zellen und Zellrückstände zu entfernen, wurden die verbleibenden Überstände anschließend bei 17000x g für wenigstens 30 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und für weitere Untersuchungen (s. Abschnitte 3.2.4.2 und 3.2.6) verwendet. Der Mikropartikelpräparation folgte umgehend die Messung der TF-Aktivität.

Zur Messung der prokoagulatorischen Aktivität wurden nach Stimulation 50000 Zellen bzw. die präparierten Mikropartikel in Aktivitätspuffer aufgenommen, dem 0,1 M n-Octyl-β-D-Glycopyranosid zum Lysieren zugesetzt wurde, und für 15 min bei 37 °C vorinkubiert. Bei Zugabe von Antikörpern wurde für weitere 10-20 min bei 37 °C inkubiert. In einer 96 Well-Mikrotiterplatte erfolgte eine 10 minütige Inkubation der Zellsuspension mit einer F VIIa-Lösung (Endkonzentration 2 nM) bei 37 °C. Direkt nach der Zugabe von F X (Endkonzentration 150 nM) wurde über einen Zeitraum von

4 min jede Minute ein Teil der Probe in eine 25 mM EDTA-Lösung pipettiert. Durch die Komplexierung des Calciums kam die Bildung von F Xa zum Erliegen. Der Anstieg der optischen Dichte wurde nach Zugabe von Spectrozyme fXa (0,5 mM Endkonzentration) 30 min lang in einem ELISA-Reader photometrisch bei 37 °C bestimmt. Der Umrechnung der optischen Dichte (OD) in Units (U), die ein Maß für die Umsetzung von F X zu Xa darstellt, lagen Messungen von Konzentrationsreihen unter Verwendung von lipidiertem, rekombinant hergestelltem TF zugrunde. 1 Aktivitäts-Unit entspricht dem Absolutwert 5,7 pg lipidiertem, rekombinantem TF (Abbildung 13).



**Abbildung 13** Standardkurve zur Berechnung der TF-Aktivitäts-Units (TF-A Units) aus der optischen Dichte (OD)

### 3.2.4.2 Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Tissue Factor im zellfreien Überstand

Um im extrazellulären Raum überhaupt eine enzymatische Aktivität von TF bestimmen zu können, ist die Anwesenheit von Phospholipidvesikeln zwingend erforderlich. Für ihre Herstellung wurden die Phospholipide L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (PC) und L- $\alpha$ -Phosphatidylserin (PS) im molaren Verhältnis 80:20 gemischt, getrocknet und anschließend in HBS-Puffer (Phospholipid-Endkonzentration 1 mM) resuspendiert. Die entstandenen multilamellaren Vesikeln wurden anschließend im Ultraschall-Bad in kleine, unilamellare Vesikel zerteilt. Die Ultraschall-Behandlung

wurde solange fortgesetzt bis die anfangs milchige Lösung fast klar war. Die Phospholipidvesikel wurden bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Vor der Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität im Zellkultur-Überstand wurde anhand einer durchflusszytometrischen Analyse (s. Abschnitt 3.2.6) überprüft, ob der im vorherigen Abschnitt gewonnene Überstand frei von Mikropartikeln ist. Alsdann wurde der Überstand mit einer 1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung auf eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 5 mM eingestellt und anschließend gleichmäßig auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Der eine Teil wurde einer Immunpräzipitation mit anti-humanen asTF Antikörpern unterzogen wie in Abschnitt 3.2.5.2 beschrieben. Der andere Teil blieb unverändert. Die TF-Aktivität beider Überstände wurde sowohl mit als auch ohne Zusatz von anti-TFPI-Antikörpern (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) nach Zugabe von Phospholipidvesikeln (10  $\mu\text{M}$  PC:PS, 80:20) bestimmt. Hierzu wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  der beiden Überstände mit je 50  $\mu\text{L}$  F VIIa-Lösung inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden wie in Abschnitt 3.2.4.1 beschrieben durchgeführt.

### **3.2.5 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.2.5.1 Die Isolation und quantitative Bestimmung von Proteinen**

Nach entsprechender Stimulation wurden die HUVECs zweimal mit PBS (4 °C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (500x g, 5 min) wurde der Überstand entfernt, das Pellet in eiskaltem RIPA-Puffer resuspendiert, dem zuvor sowohl Protease- als auch Phosphatase-Inhibitor-Cocktail laut Herstellerangaben hinzugefügt wurde, und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 30 min bei 12000x g zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Gehaltsbestimmung bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung des gesamten Proteingehalts einer Probe erfolgte mit Hilfe des BCA-Protein Assay Kits. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass das Natriumsalz der Bicinchoninsäure mit Cu-Ionen, die durch die Aminosäuren Serin, Cystein oder Threonin der Proteine von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert werden, in alkalischer Lösung einen farbigen Komplex bildet. Dieser Komplex kann anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch detektiert werden. Mittels einer Standardkurve wurde der Proteingehalt der zu untersuchenden Probe errechnet. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

#### **3.2.5.2 Die Immunpräzipitation der Tissue Factor-Isoform**

50 µg Gesamtprotein in RIPA-Puffer bzw. 2 mL des Zellkultur-Überstandes wurden entweder mit einem monoklonalen anti-human TF-Antikörper oder mit einem monoklonalen anti-human TFPI-Antikörper bzw. mit dem entsprechenden Präimmenserum über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurden 20 µL Protein-G-PLUS-Agarose hinzugegeben und für 1 h bei 4 °C ebenfalls rotierend inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit RIPA-Puffer wurden die gebundenen Proteine in 30 µL Probenpuffer aufgenommen.

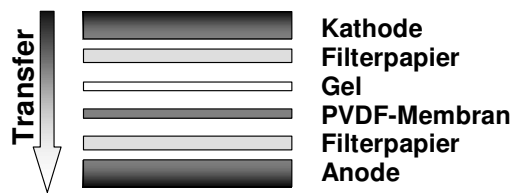
### **3.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins im elektrischen Feld hängt neben seiner Größe auch von seiner Ladung ab. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine mit Natriumdodecylsulfat denaturiert und erhalten dadurch eine definierte negative Ladung. Um zusätzlich eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wird über dem Trenngel ein Sammelgel gegossen, in dem die Proteine fokussiert werden. Da die zu trennenden Proteine ein Molekulargewicht von 47 kDa aufweisen, wurde in den meisten Fällen ein Gel mit einem Acrylamid-Anteil von 12 % eingesetzt. Nach erfolgter Immunpräzipitation der Proben mit den jeweiligen Antikörpern wurden die gebundenen Proteine in einem Reaktionsgefäß mit 30 µL Probenpuffer gemischt, kurz zentrifugiert und 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Sammelgels (Acrylamid-Gehalt 4 %) aufgetragen. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde ein Farbmarker verwendet, in dem Proteine mit definiertem Molekulargewicht enthalten sind. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 35 mA. Nachdem die Bromphenolblaubande des Probenpuffers in das Trenngel gelaufen war, wurde eine Stromstärke von 60 mA angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblaubande den Boden des Trenngels erreicht hatte.

### **3.2.5.4 Western Blot**

Als Western Blot bezeichnet man den Transfer und die Immobilisierung von Proteinen auf die Oberfläche einer immobilisierten Membran mit anschließender Identifizierung von Proteinen in komplexen Proteingemischen mittels spezifischer Antikörper.

Nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE wurde das Gel ebenso wie die Filterpapiere ca. 5 min im Transferpuffer äquilibriert. Die hydrophobe PVDF-Membran wurde durch ein 30 sec Waschen in Methanol benetzbar gemacht, da beim Proteintransfer hydrophile Lösungen verwendet wurden. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser wurde auch sie für 5 min in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurden die Bestandteile wie in folgender Abbildung auf die Anode gelegt:



**Abbildung 14** Aufbau des Semi-Dry-Verfahrens

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in der Regel innerhalb von 30 min bei 5 W. Die Effizienz des Transfers wurde durch eine Färbung mit Ponceau S-Lösung überprüft. Nach dem Entfärben der Membran mit TBS-T wurde zum Verhindern von unspezifischen Bindungen die Membran 60 min in 5 % Magermilch-Lösung gelegt. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T für 5 min gewaschen und für weitere 60 min mit dem ersten Antikörper (siehe Tabelle 2) bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene und unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit TBS-T Puffer für 5 min entfernt. Der Peroxidase gebundene Sekundärantikörper (1:5000 verdünnt in 5 % Magermilch-Lösung) wurde 60 min mit der Membran inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit TBS-T in eine Plastikfolie gelegt. Zur Visualisierung der spezifischen Proteinbanden wurde das ECL plus Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm für 30 s - 5 min belichtet und im Filmentwicklungsgerät (Kodak) entwickelt.

Primärantikörper	Verdünnung
anti-asHTF (p)	1:50
anti-human TF (m)	1:300
anti-human TFPI (m)	1:300

**Tabelle 2** Primärantikörper-Verdünnungen für Western Blot; (m) monoklonal, (p) polyklonal

### 3.2.5.5 Die Quantifizierung des Tissue Factor-Proteins per ELISA

Zur quantitativen Bestimmung von humanem TF in den Zellen wurde das IMUBIND® Tissue Factor ELISA Kit verwendet. Als Fangantikörper diente hierbei ein muriner monoklonaler Antikörper, der sowohl TF-Apoprotein, TF als auch den TF/F VII-Komplex detektiert. Zur Detektion wird ein Biotin-markierter Antikörper eingesetzt, der wiederum spezifisch die gebundenen TF-Varianten erkennt. Dieser bildet nach Zugabe eines Horseradish-Peroxidase (HRP)-Enzym-Konjugats (Meerrettich-Peroxidase) einen Antikörper-Enzym-Komplex, der die Farbreaktion des Substrats

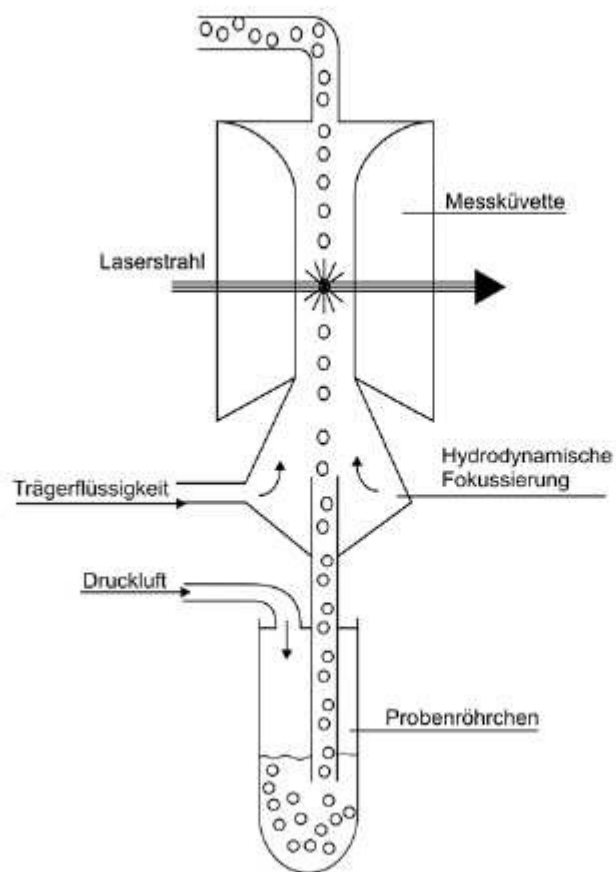


Tetra-Methylbenzidin katalysiert. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, wobei sich die blaue Lösung gelb verfärbt. Der Gehalt an TF-Protein wird durch Messung der Lichtabsorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 10 pg/mL TF-Protein. Der ELISA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für jeden Lauf wurde eine Standardkurve im Bereich von 0 pg/mL bis 1000 pg/mL erstellt, auf Grund derer die Konzentration der zumessenden Proben durch Interpolation ermittelt wurde.

### **3.2.6 Die Durchflusszytometrie zur Detektion von Mikropartikeln und Apoptose**

Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurden die in Abschnitt 3.2.4.1 gewonnenen Überstände auf Mikropartikel-Freiheit überprüft. Endotheliale Mikropartikel wurden durch monoklonale FITC-konjugierte Antikörper (1,5 µg/L) gegen E-Selektin, einem Adhäsionsmolekül aktivierter Endothelzellen, identifiziert. Zur Detektion apoptotischer Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit PE-gekoppelten Antikörper gegen aktive Caspase-3 (1,5 µg/L), einem Apoptose-Marker, eingesetzt.

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein optisches Messsystem zur fluoreszenzabhängigen multiparametrischen Analyse von Zellen bzw. Zellpartikeln in Suspension. Die Grundlage des Funktionsprinzips beruht auf der simultanen Messung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Zell- bzw. Partikelsuspensionen, die mit Fluoreszenzfarbstoffen versetzt sind. Die Bestimmung von Größe und Granularität der Zelle über die Lichtstreuung und die Untersuchung von Zelleigenschaften durch Assoziation von Fluoreszenzfarbstoffen ist parallel ausführbar. Die mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Zellen bzw. Partikel werden durch hydrodynamische Fokussierung am Laserstrahl vorbeitransportiert (Abbildung 15). Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/ Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen bzw. der Partikel gewonnen.

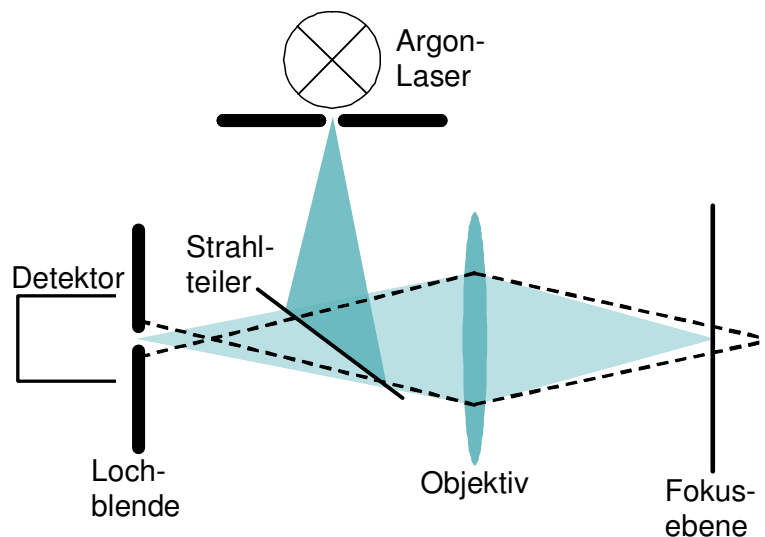


**Abbildung 15** Prinzip der Durchflusszytometrie (hydrodynamische Fokussierung), entnommen aus der Gebrauchsinformation des FACScan

Parameter, die einen hohen Empfindlichkeitsbereich erfordern, wie in dieser Arbeit die Messung von Mikropartikeln, sollten im logarithmischen Modus gemessen werden, da Signale mit geringer Intensität hierbei gespreizt und mit höherer Intensität gestaucht werden. Die Auswertung der Versuche wurde durchgeführt mit Hilfe der CellQuest®-Software.

### 3.2.7 Die Methode der Fluoreszenzfärbung und der Konfokalmikroskopie

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie baut auf dem Prinzip der Auflichtfluoreszenzmikroskopie auf. Allerdings wird nur das Licht aus einem definierten Fokus des Präparates von Photomultipliern detektiert und anschließend aus den Signalen der abgerasterten Ebenen vom Computer ein Bild berechnet. Dieses stellt die Strukturen einer Bildebene ohne Überlagerung durch die anderen Bildebenen des Präparates dar (Abbildung 16).



**Abbildung 16** Strahlengang im konfokalen Mikroskop

Zur Kollokalisierung verschiedener Fluoreszenzmarker wird das Fluoreszenzlicht in verschiedene spektrale Bereiche zerlegt, die simultan mit verschiedenen Detektoren verarbeitet werden können. Die digitalisierten Fluoreszenzsignale von jedem Detektor werden als getrennte Kanäle im Computer gespeichert und können mittels der TCS-NT Software überlagert werden. Zur Anregung der Fluorochrome wurden ein Ar/Kr- und ein He/Ne-Laser verwendet.

HUVECs wurden ca. 80 % konfluent in Chamber Slides™ (Objektträger mit Kammerstruktur) ausgesät. Nach erfolgter Adhärenz und Stimulation der Zellen je nach Versuchsanordnung wurden das Stimulationsmedium abgesaugt, die Kammer vom Objektträger entfernt und die Zellen mit Merckofix® Fixations spray fixiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Präparate für 45 min bei Raumtemperatur mit

einer 2 % BSA- und 5 % Ziegen Serum-PBS-Lösung geblockt. Nach erneutem Waschen erfolgte eine 60 minütige Inkubation der Objektträger mit den Primärantikörpern bei Raumtemperatur. Als Negativkontrolle wurden Normalimmunglobuline entsprechend der Spezies verwendet, aus der der Primärantikörper stammte. Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper dienten zur Detektion (Inkubation für 45 min im Dunklen). Die Kernfärbung erfolgte mit TO-PRO-3. Die Präparate wurden anschließend mit Gelatine eingedeckelt. Die Verdünnungen der Primärantikörper sind in Tabelle 3 angegeben, die Sekundärantikörper wurden 1:100 verdünnt. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Leica DM IRBE angefertigt. Alle Bilder in dieser Arbeit entstanden mit einem Ölimmersionsobjektiv (Vergrößerung 63x).

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-ACTIVE-Caspase-3 (p)	1:250
anti-asHTF (p)	1:50
Anti-PARP p85 fragment (p)	1:100
anti-human TF (m)	1:100
anti-human TFPI (m)	1:100

**Tabelle 3** Die Verdünnungen der Primärantikörper; (m) monoklonal, (p) polyklonal

### 3.2.8 Die Chemilumineszenz- Messung der Superoxidradikal-Bildung

Die Bestimmung der zellulären Bildung bzw. Freisetzung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) erfolgte mittels Chemilumineszenz. Dabei wurde der Chemilumineszenz-Farbstoff Lucigenin verwendet, der mit einer hohen Spezifität und Sensitivität Superoxidradikale nachweisen kann. Folgender Mechanismus wird für die Reaktion von Lucigenin mit Superoxidradikalen diskutiert: Das Lucigenin-Kation ( $\text{Luc}^{2+}$ ) nimmt zunächst ein Elektron auf und wird zum Radikal reduziert ( $\text{Luc}^{\cdot+}$ ) (Reaktionsgleichung 1). Dieses Radikal reagiert mit dem Superoxidradikal zu einem instabilen Dioxethan-Intermediat. Bei seinem Zerfall entsteht ein angeregtes Acridon, das beim Rückfall in den Ruhezustand Licht emittiert (Reaktionsgleichung 2).



Die emittierten Photonen werden mittels Photomultiplier im Luminometer erfasst. Als Rohdaten erhält man so genannte relative Lichteinheiten (RLU = relative light units), die aus den direkt gezählten Impulsen berechnet werden.

Zur Messung wurden HUVECs isoliert und in einer Zellzahl von 500000 HUVECs/200  $\mu\text{L}$  0,5 M Glycin-Puffer (pH 9,0) eingestellt. Nach Zugabe von Lucigenin in einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  wurde die Superoxid-Radikal-Produktion der behandelten und unbehandelten Zellen über einen Zeitraum von 30 s gemessen. Zur Validierung der spezifischen, extrazellulären Superoxid-Radikal-Bestimmung diente die Zugabe von Zell-impermeabler Superoxiddismutase (SOD). SOD katalysiert die Dismutation von Superoxid-Radikalen und führt so zu einem vollständigen Erlöschen des Chemilumineszenz-Signals.

### **3.3 Statistische Auswertung**

Alle Daten sind soweit nicht anders gekennzeichnet als arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt und entstammen aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Zur Prüfung, ob zwischen den Mittelwerten signifikante Unterschiede vorlagen, wurden bei normalverteilten Daten ungepaarte t-Tests durchgeführt. In den Experimenten, die mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurden Einweg-ANOVA-Tests mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS Version 11.0.1 (SPSS Inc., Software, Chicago, IL, USA). Für alle Ergebnisse wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  als minimales Signifikanzniveau angenommen.