

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Artikel folgender Hersteller kamen zur Anwendung:

Advanced Biotechnologies, Hamburg

- 25 mM MgCl-Lösung für PCR
- DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*
- PCR-Puffer

AGS GmbH, Heidelberg

- Agarose
- Ambion/ams Biotechnologie, Wiesbaden
- Agarose
- Psoralen-Biotin (BrightStar[®])
- RNaseZAP[®]

Amresco/Biometra GmbH, Göttingen

- Acrylamid (38%)/Bisacrylamid (2%)-Lösung,
- Borsäure
- Harnstoff
- Natriumcarbonat
- Natronlauge
- Silbernitrat.

Becton Dickinson, Berlin

- 50 ml Blue-Max[®]-Reaktionsgefäße
- Primaria[®]-Petrischalen
- Sterile Einwegpipetten

Biochrom KG/Seromed, Berlin

- Fibronectin-Globulin
- Hanks' Salt Solution (HSS)
- MCDB 131
- Phosphat Saline Puffer (PBS)
- Trypsin/EDTA Lösung (500 U Trypsin u. 180 µg EDTA/ml in PBS)

Biozym, Hess. Oldendorf

- Agarose
- Reaktionsgefäße

Böhringer, Mannheim

- DNase
- RNase-Inhibitor

Kimberley-Clark, Mülheim-Kärlich

- Fusselfreie Papiertücher (Kimwipe[®])

Kodak, Stuttgart

- X-OMAT Scientific Imaging Film, Format 24 cm x 30 cm

Life Technologies GmbH, Eggenstein

- Reverse Transkriptase (Superscript II[®])
- Puffer für die reverse Transkription.

Merck-Chemie KGaA, Darmstadt

- Dichlordimethylsilan (2% in 1,1,1-Trichlorethan)

MWG Biotech GmbH, Ebersberg

- Oligonukleotide als Primer für PCR und reverse-Transkription

New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus

- DNA-Ladder
- RNA-Ladder.

Novagen/Böhringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg

- 3 M-Natriumacetatlösung
- Promega/Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg
- Mineralöl für PCR
- Tris-Puffer.

Promega/Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg

- 25 mM MgCl-Lösung für PCR
- DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*
- PCR-Puffer

PromoCell, Heidelberg

- Supplement Pack MV[®] für MCDB 131

Roth-Chemie GmbH&Co., Karlsruhe

- Aceton
- Ammoniumsulfat
- Ammoniumperoxydisulfat (APS)
- Diethylcyanophosphonat (DEPC)
- Essigsäure
- Ethanol (70% und 95%)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
- Ethidiumbromid (1%)
- Formaldehyd (37%)
- Isopropanol
- Natriumthiosulfat
- n-Butanol
- N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)
- Sodiumdodecylsulfat (SDS)
- Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen

Schleicher & Schuell, Dassel

- Nylonmembran (Nytran SuPerCharge[®])
- Chromatographiepapier (Nytran TurboBlotter[®]-System)

Sigma-Chemie GmbH, Deisenhofen

- Bromophenolblau
- Ficoll[®]
- Harnstoff
- lineares Polyacrylamid (LPA)
- Natriumchlorid
- Xylencyanol
- 2-Mercaptoethanol

In der Abteilung selbst hergestellt wurden:

- Sechsfach konzentrierter Ladepuffer (10% Ficoll, 1 M Tris, 500 mM EDTA, 1% Bromophenolblau, 1% Xylencyanol)
- zehnfach konzentrierter TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 M Borsäure, 25 mM EDTA)

2.1.2. Geräte

Alle Arbeiten mit lebenden Zellen wurden auf einer Reinraumwerkbank durchgeführt (Laminair[®] HB 2448, Heraeus GmbH, Hanau), als CO₂-Begasungsbrutschrank diente ein Gerät vom Typ B 5060 EK/CO₂, ebenfalls von Heraeus GmbH, Hanau. Die Viskosität des verwendeten

Mediums wurde mit einem Quecksilber-Viscometer (Coulter Electronics LTD, Luton, Bedfordshire, Grossbritannien) bestimmt. Die Winkelgeschwindigkeit des Kegels wurde durch eine an der Kegelinnenseite angebrachte Infrarotlichtschranke (Siemens, Cupertino, Kalifornien, USA) gemessen. Ein Thermocycler vom Typ Thermoblock Uno-II (Biotron, Göttingen) wurde verwendet. Elektrophorese wurde mit einer Steuereinheit vom Typ BluePower 3000 (Boehringer Bioproducts, Ingelheim) durchgeführt. Für Acrylamidgele wurden Elektrophoresekammern vom Typ S2 (Life Technologies GmbH, Eggenstein) und vom Typ Mini-Protean II (Bio-Rad, München) verwendet. Für Agarosegele kam eine Elektrophoresekammer vom Typ 59665 (MWG-Biotechnologie, Ebersberg) zum Einsatz. Als Schüttler diente ein Wipptisch vom Typ „Rocking Platform“ (Amresco/Biometra GmbH, Göttingen). Eine Kombination aus Rühr- und Heizsystem der Firma Heidolph, Kelheim wurde für das Ansetzen und Durchmischen von Lösungen verwendet. UV-Licht wurde durch einen Leuchtschirm vom Typ OJ II (Victor Recker Krankenhaus- und Laborbedarf, Berlin) erzeugt. Sofortbilder wurden mit einer Stativkamera vom Typ MP 4 Land Camera (Polaroid, Offenbach) erstellt. Trocknungen von DNA-Proben wurden mit einer heizbaren und evakuierbaren Zentrifuge vom Typ Univapo 100 H (Uniequip, Martinsried) vorgenommen. Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden mit einem Autoklaven vom Typ Autoclav 23 (Melag, Berlin) dampfsterilisiert. Die optische Erfassung von gefärbten PCR-Produkten erfolgte mit einer GelPrint 2000i Workstation (MWG Biotechnologie, Ebersberg), die Auswertung mit dem Programm OneDScan (Scanalytics/CSDI, Fairfax, Virginia, USA). Alle temperaturabhängigen Hybridisierungen wurden in einem Hybridisierungsofen mit integrierten Wipp- und Schüttelvorrichtungen vom Typ Shake`n Stack[®] (Hybaid, Teddington, England) vorgenommen. RNA wurde mit einem Transferapparat vom Typ TurboBlotter[®] (12 cm x 16 cm, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. RNA- und DNA-Konzentrationen wurden mit einem Photometer vom Typ Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) bestimmt.

2.1.3. Kits

Folgende kommerziell erhältliche Kits wurden verwendet:

- RNA-Isolierung: Rneasy[®] (Qiagen, Hilden)

- DNA-Sequenzierung: SILVER SEQUENCE[®] (Promega/Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg)
- northern blotting: Lig'n Scribe[®], MEGAscript[®], UltraHyb[®] Hybridisierungslösung sowie NorthernMax[®] (Ambion/ams Biotechnologie, Wiesbaden)
- Nachweis von Sonden: Southern-Star[®]/CDP-Star[®]-Kit (Tropix/Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung und Kultivierung von HUVEC

Die Experimente wurden mit Endothelzellen aus Nabelschnurvenen durchgeführt. Um humane endotheliale venöse Endothelzellen (HUVEC) zu isolieren, wurden Nabelschnüre nach Trennung von der Plazenta in einer Flasche mit steriler Hanks' Salt Solution (HSS) maximal 24 Stunden bei 4°C bis zur Zellisolation aufbewahrt. Vor der Isolierung der Endothelzellen wurden Abschnitte mit Spuren von Nabelschnurklemmen abgetrennt und die Vene mit einer Knopfkanüle sondiert. Mit Hilfe einer Venenklemme wurde die Vene oberhalb der Knopfkanüle abgebunden. Zur Entfernung von Blutrückständen erfolgte die Perfusion mit 50 ml Phosphat-Saline-Puffer (PBS). Nabelschnüre mit rupturierten Venen wurden verworfen. Zur Ablösung der endothelialen Zellen wurde das untere Ende der Schnur durch eine weitere Venenklemme abgebunden und eine Lösung mit 0,2% Kollagenase Typ II aus *Clostridium histolyticum* eingefüllt. Es folgte eine Inkubation in sterilem PBS im Wasserbad bei 37°C für 15 Minuten. Nach der Inkubation wurde die äußere Seite der Schnur mit Ethanol (70%) abgespült. Anschließend wurde das untere Ende oberhalb der Venenklemme mit Hilfe eines Skalpell abgetrennt und die austretende Flüssigkeit in einem 50 ml Blue-Max[®]-Reaktionsgefäß aufgefangen. Um möglichst viele Endothelzellen aus der Vene zu gewinnen, erfolgten zwei weitere Spülungen mit jeweils 20 ml HSS. Das Reaktionsgefäß wurde bei Raumtemperatur 5 Minuten lang mit 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Das Zellkulturmedium bestand aus MCDB 131, welches mit Cell Growth Supplement Medium MV[®] supplementiert worden war. Bei MCDB 131 handelt es sich um ein speziell für Endothelzellen entwickeltes Kulturmedium (Knedler und Ham, 1987). Es enthält über 50 verschiedene

Aminosäuren, Vitamine, organische Verbindungen, anorganische Salze, Bikarbonat sowie Phenolrot als pH-Indikator. Cell Growth Supplement Medium MV[®] ist eine Ergänzungslösung zur Optimierung von Zellkulturmedium für die Endothelzellkultur mit fetalem Kälberserum, Antibiotika, Heparin, Kortison und Wachstumsfaktoren. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 99% relativer Luftfeuchtigkeit.

Die Suspension wurde mit Hilfe einer sterilen 10 ml Einwegpipette vom Reaktionsgefäß in eine mit Fibronectin beschichtete Zellkulturflasche übertragen. Die Beschichtung erfolgte durch Benetzung der Flascheninnenseite mit 1 ml Fibronectin-Lösung (10 µg/ml), dreissigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließendem Ausgießen der verbliebenen Fibronectin-Lösung. Nach ca. 2 Stunden zeigten die Zellen Adhärenz an der Flascheninnenseite, daraufhin wurde das Medium erneuert. Nach Erreichen von Konfluenz (in der Regel 4 bis 5 Tage nach Aussaat) wurde das Medium entfernt und der verbleibende Zellrasen mit 20 ml sterilem PBS gespült. Nach Ablösung der Zellen durch fünfminütige Inkubation mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (0,5% Trypsin/0,2% EDTA) bei 37°C erfolgte wiederum eine fünfminütige Zentrifugation in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit 300 g bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment erneut in 10 ml Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf zwei Primaria[®]-Petrischalen verteilt, nach Adhärenz wurde das Medium erneuert. 24 Stunden nach Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen durch Wandschubspannung stimuliert (vergleiche Abbildung 4).

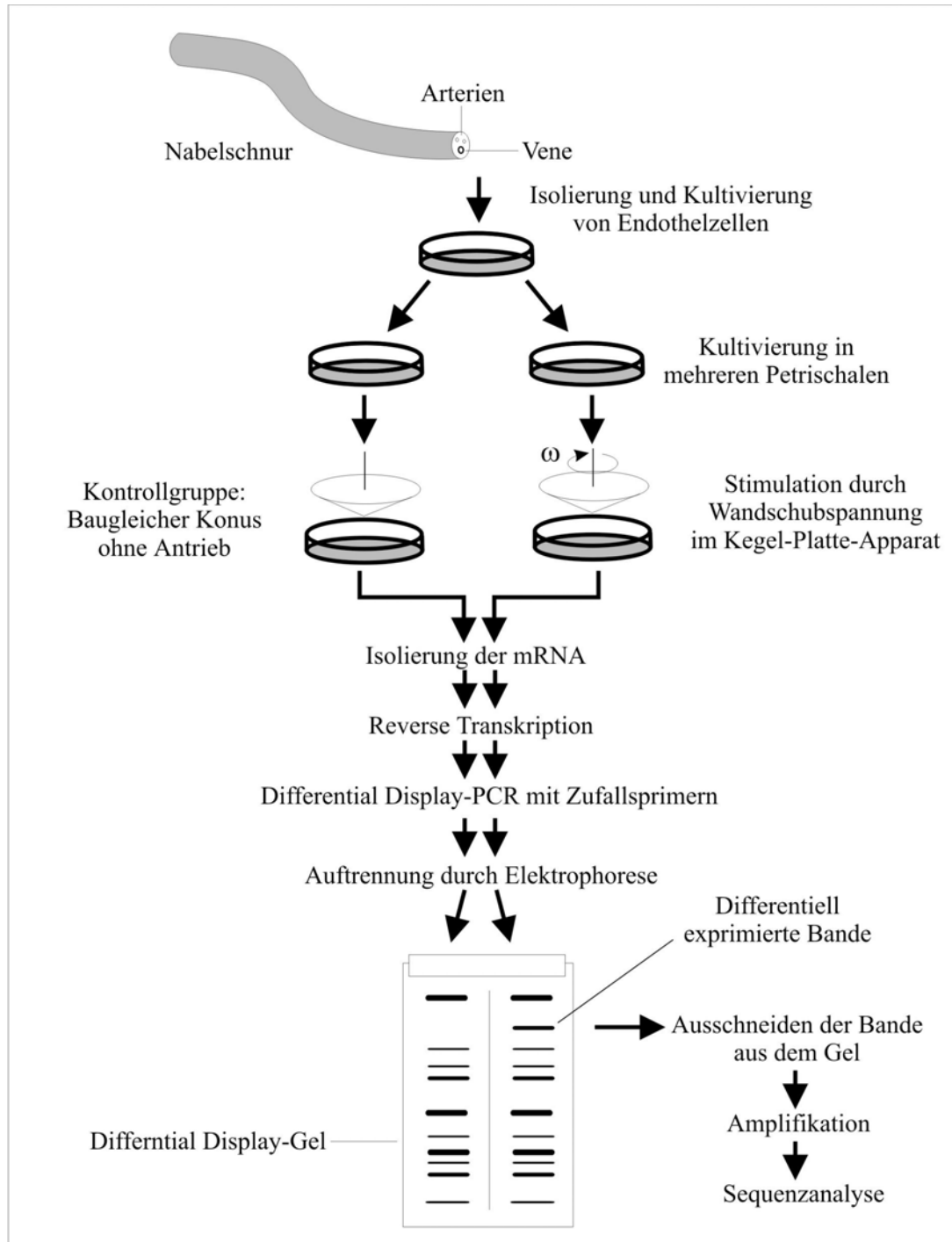


Abbildung 4: **Versuchsablauf**

Aus der Vene einer Nabelschnur wurden spätestens 24 h *post partum* Endothelzellen isoliert und kultiviert. Nach Verteilung auf zwei Petrischalen und erneuter Anzuchtug erfolgte die Stimulation durch Wandschubspannung ($5,4 \text{ dyn/cm}^2$, 24 h). Anschließend wurden die Zellen geerntet, ihre RNA wurde isoliert und Differential Display unterzogen. Durch dieses Verfahren entstanden differenziell exprimierte Banden, die ausgeschnitten, amplifiziert und sequenziert wurden.

2.2.2. Stimulation der Endothelzellen durch Wandschubspannung

Zur Erzeugung von Wandschubspannung wurde in Zusammenarbeit mit der Feinmechanikabteilung des Institutes ein Kegel-Platte-System konstruiert, dessen Aufbau sich an den Vorgaben von Bussolari und Dewey orientiert (Bussolari und Dewey, 1982). Ursprünglich bestand die Aufgabe derartiger Vorrichtungen in der Untersuchung rheologischer Eigenschaften von Flüssigkeiten, insbesondere in der Bestimmung der Viskosität (McKenell, 1953; Mooney und Ewart, 1934). Den verschiedenen Typen ist ein Kegel gemeinsam, welcher in einer Flüssigkeit über einer ebenen Bodenplatte rotiert. Aufgrund dieser Anordnung werden solche Geräte auch als „Cone-and-plate Viscometer“ bezeichnet. Durch Messung derjenigen Kraft, die nötig ist, um den Kegel in der Flüssigkeit mit einer definierten Winkelgeschwindigkeit rotieren zu lassen, ist eine Bestimmung der Viskosität möglich.

Eine schematische Darstellung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Apparates ist in Abbildung 5 wiedergegeben.

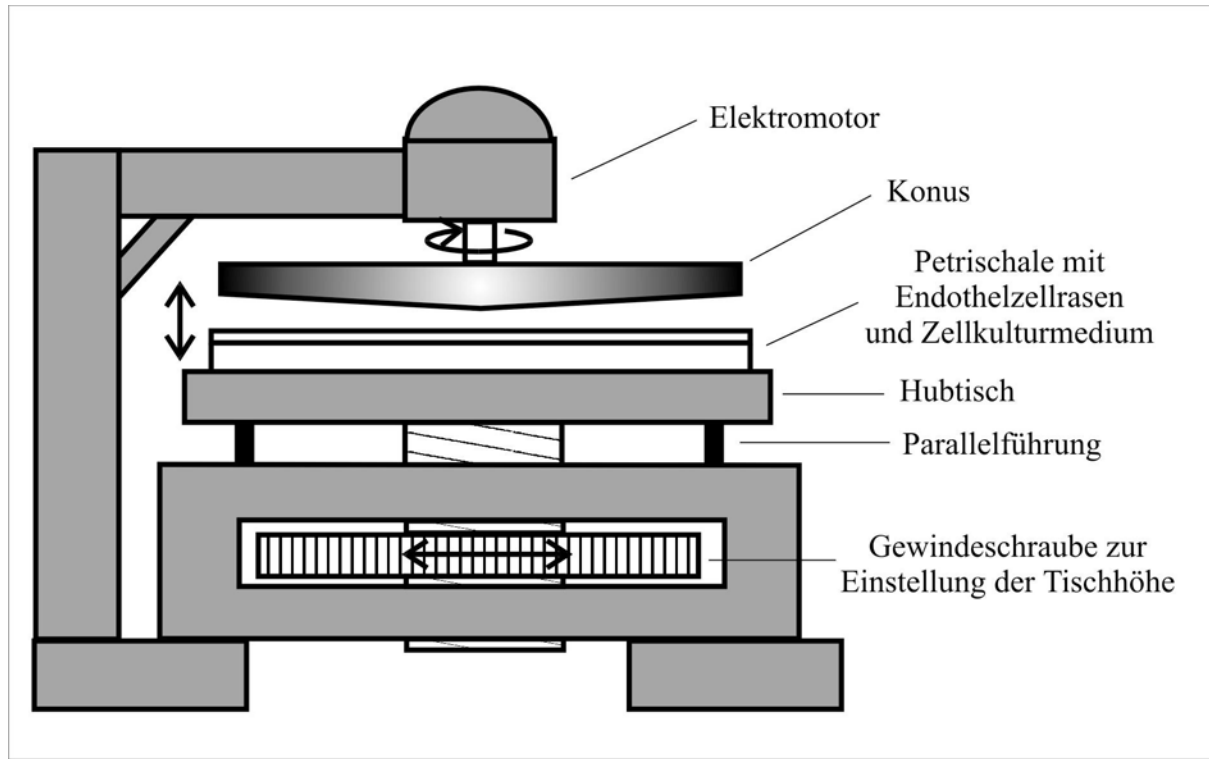


Abbildung 5: **Kegel-Platte-System**

Auf einem justierbaren Hubtisch ist eine Haltevorrichtung für eine Petrischale angebracht. Nach Positionieren der Petrischale wird der Konus durch den Motor im Zellkulturmedium gedreht. Die Messung der Winkelgeschwindigkeit erfolgt durch eine Infrarotlichtschranke (nicht abgebildet), deren Signalgeber am Konusrand angebracht ist.

Bei dieser Anordnung entstehen durch den rotierenden Zylinder Scherkräfte in der Flüssigkeit. Wenn die Bodenplatte durch eine mit einem Monolayer aus Endothelzellen bewachsene Petrischale bedeckt ist, erfolgt durch die viskösen Eigenschaften des Zellkulturmediums eine Übertragung der Bewegungsenergie des Zylinders auf die darunterliegenden Zellen in Form von Wandschubspannung.

Die in derartigen Apparaturen herrschenden Strömungsbedingungen waren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Bussolari und Dewey, 1982; Miller und Hoppmann, 1963; Sdougos et al., 1984). Liegt eine Newtonsche Flüssigkeit vor, so wird ihr Fließverhalten durch zwei Einflußgrößen bestimmt, nämlich durch die auf die Flüssigkeit wirkende Zentrifugalkraft und die visköse Kraft. Wenn die Zentrifugalkraft klein gegenüber der viskösen Kraft ist, dann ist die Strömung laminar und es liegen Linien gleicher Flusstärke in konzentrischen Kreisen vor. In diesem Fall besteht ein linear von der Bodenplatte zum Konus ansteigender Gradient der Flusgeschwindigkeiten. Sowohl die Höhe $h(r)$ als auch die Geschwindigkeit des Konus $v_0(r)$ wachsen linear mit steigender Entfernung vom Zentrum (vergleiche Abbildung 6).

Dabei gilt die Bedingung, daß der Schergrad

$$\frac{dv}{dz} = \frac{v_0}{h} \quad (1)$$

an jedem Punkt innerhalb der Flüssigkeit und an ihren Grenzflächen zu Konus und Bodenplatte identisch ist. Die an der Bodenplatte wirkende Wandschubspannung τ_w kann unter diesen Bedingungen durch folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$\tau_w = \mu \frac{\partial v}{\partial z} = \mu \frac{v_0}{h} = \mu \frac{\omega r}{r \tan \alpha} \quad (2)$$

Hierbei ist μ die Viskosität der Flüssigkeit und z die rechtwinklig auf der Bodenplatte stehende vertikale Koordinate. Wenn der Winkel α genügend klein ist, so kann $\tan \alpha$ durch α ersetzt werden. Die Gleichung lässt sich somit zu

$$\tau_w = \mu\omega/\alpha \quad (3)$$

vereinfachen. Die Wandschubspannung ist also von der Entfernung zum Zentrum unabhängig und über die gesamte Bodenplatte hinweg konstant.

Die angeführte Formel gilt nur, wenn der Abstand zwischen Kegelspitze und Petrischale Bodenplatte null beträgt. Um diese Bedingung regelmäßig zu gewährleisten, wurden zwei Anschlagbolzen über dem Hubtisch angebracht. Bei Erreichen dieser Begrenzungen setzte der Konus genau auf dem Boden der Petrischale auf. Durch den Konus wurden kleine konzentrische Kreise in die Petrischale geschliffen. Die mikroskopische Ausmessung dieser Kreise ergab einen Durchmesser von ≤ 2 mm. Der Fehler in der Höheneinstellung des Kegels betrug somit $< 0,043$ mm oder 0,2 % des Abstandes zwischen Petrischalenboden und Konus bei $r=50$ mm und wurde daher vernachlässigt.

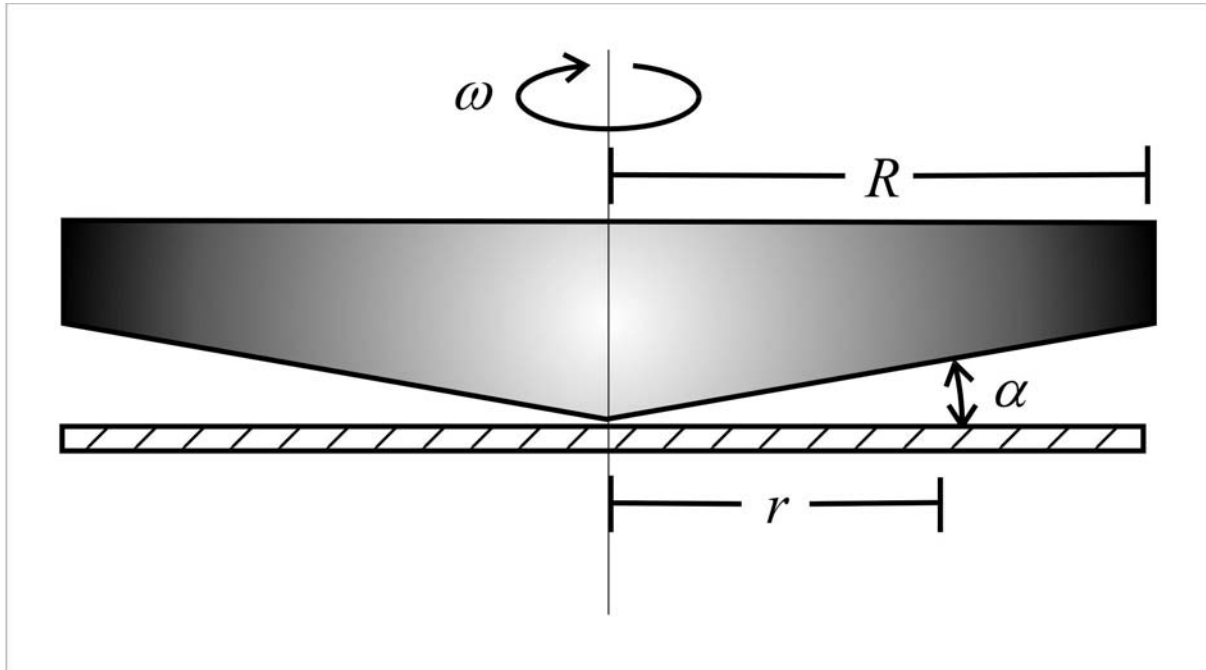


Abbildung 6: **Konusgeometrie**

R : Radius des Konus

r : Entfernung zur Spitze des Konus

ω : Winkelgeschwindigkeit des Konus

α : Winkel zwischen Konus und Bodenplatte

z : Koordinate senkrecht zur Bodenplatte

Die durch die obige Gleichung beschriebene Strömung wird als primäre Strömung bezeichnet. Durch zentrifugale Kräfte wird zugleich eine sekundäre Strömung erzeugt. Steigen der Winkel α oder die Winkelgeschwindigkeit ω , so erhöht sich der Anteil der Zentrifugalkraft. Die pro Einheit Flüssigkeit wirkende Zentrifugalkraft wird durch die Formel

$$F_Z = \frac{\rho v_0^2}{r} = \rho r \omega^2 \quad (4)$$

beschrieben, wobei ρ für die Dichte der Flüssigkeit steht. Die entsprechende Visköse Kraft wird durch die Gleichung

$$\frac{\tau_w}{h} = \frac{\mu v_0}{h^2} \quad (5)$$

dargestellt. Setzt man diese zwei auf die Flüssigkeit einwirkenden Kräfte zueinander ins Verhältnis, so erhält man den Quotienten

$$\frac{\text{Zentrifugalkraft}}{\text{VisköseKraft}} = \frac{r^2 \omega \alpha^2}{\nu} \quad (6)$$

wobei ν die kinematische Viskosität ist ($\nu = \mu/\rho$). Wenn bei dieser dimensionslosen Gleichung SI-Einheiten eingesetzt werden, muß der Nenner auf der linken Seite um den Faktor 12 erweitert werden (Sdougos et al., 1984). Analog zur Reynoldszahl für die Strömung in Röhren kann der durch diese Gleichung beschriebene Parameter

$$\tilde{R} = \frac{r^2 \omega \alpha^2}{12\nu} \quad (7)$$

genutzt werden, um abzuschätzen, ob die Strömung in einem Kegel-Platte-Apparat eher laminar oder eher turbulent ist. Nach den von Sdougos erweiterten Navier-Stokes-Gleichungen liegt bei Werten von $\tilde{R} < 0,5$ laminare Strömung vor (Sdougos et al., 1984). Turbulente Strömung wird bei $\tilde{R} \geq 4$ beobachtet.

Folgende Bedingungen wurden für die verwendete Versuchsanordnung gewählt:

$$\alpha = 2,5^\circ$$

$$R = 5 \cdot 10^{-2} \text{ m}$$

$$\mu = 0,75 \text{ cP} = 7,5 \cdot 10^{-4} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$\rho = 1,0 \cdot 10^3 \text{ kg m}^{-3}$$

$$\omega = 31,42 \text{ s}^{-1}$$

In der medizinischen Forschung haben sich die Einheiten N/m^2 für Wandschubspannung nicht durchsetzen können. Üblicherweise wird Wandschubspannung in dyn/cm^2 angegeben. Als Umrechnungsfaktor gilt, daß

$$10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2} = 1 \frac{\text{N}}{\text{m}^2} \quad (8)$$

Unter Berücksichtigung der oben genannten Gleichungen wird bei den gewählten Versuchsbedingungen eine Wandschubspannung von

$$\tau_w = \frac{\mu \omega}{\alpha} = \frac{7,5 \cdot 10^{-3} \text{ dyn s}^{-1} \text{ cm}^{-2} \cdot 31,42 \text{ s}^{-1}}{0,043} = 5,4 \text{ dyn cm}^{-2} \quad (9)$$

erzeugt. Darüber hinaus ergibt sich für \tilde{R} mit $r=5\text{cm}$ der Wert

$$\tilde{R} = \frac{r^2 \omega \alpha^2}{12\nu} = \frac{r^2 \omega \alpha^2}{12 \frac{\mu}{\rho}} = \frac{(5 \cdot 10^{-2} \text{ m})^2 \cdot 31,42 \text{ s}^{-1} \cdot 0,044^2}{12 \frac{0,75 \text{ kgm}^{-1} \text{ s}^{-1}}{1 \cdot 10^3 \text{ kgm}^{-3}}} = 16,616 \quad (10)$$

Es liegt also am Rand des Konus turbulente Strömung vor. Soll geprüft werden, ab welcher Radiusgröße r in etwa der Übergang von laminarer in turbulente Strömung erfolgt, so muß $\tilde{R}=1$ gesetzt und obige Gleichung nach r aufgelöst werden:

$$r = \sqrt{\frac{R \cdot 12 \frac{\mu}{\rho}}{\omega \alpha^2}} = \sqrt{\frac{1 \cdot 12 \frac{7,5 \cdot 10^{-4} \text{ kgm}^{-1} \text{ s}^{-1}}{1 \cdot 10^3 \text{ kgm}^{-3}}}{31,42 \text{ s}^{-1} \cdot (0,044)^2}} = 1,20 \text{ cm} \quad (11)$$

Hieraus ergibt sich, daß für $r < 1,2$ cm vorwiegend laminare Strömung und für $r > 1,2$ cm vorwiegend turbulente Strömung besteht.

Bei einem Radius der Petrischale von $r=5$ cm ergibt sich eine Kreisfläche von

$$F = r^2 \eta = 78,54 \text{ cm}^2 \quad (12)$$

bzw. für $r=1,2$ cm eine Kreisfläche von

$$F' = 4,52 \text{ cm}^2 \quad (13)$$

Somit beträgt der Anteil derjenigen Fläche, auf die vorwiegend laminare Strömung einwirkt

$$\frac{F'}{F} = \frac{4,52 \text{ cm}^2}{78,54 \text{ cm}^2} = 5,76\% \quad (14)$$

Ca. 6% der Zellen werden somit vorwiegend laminarer Strömung ausgesetzt. Die restlichen Zellen unterliegen einer laminaren Strömung mit turbulenten Komponenten. Diese Bedingungen

wurden gewählt, um die Strömungsbedingungen im Gefäß möglichst wirklichkeitsnahe zu simulieren.

Die Petrischalen wurden bei Stillstand des Motors in das Kegel-Platte System eingesetzt. Um ein Abreißen des Endothel-Monolayers zu vermeiden, wurde die Rotationsgeschwindigkeit des Kegels kontinuierlich über drei Minuten auf den Zielwert gesteigert. Auch bei Beendigung der Stimulation nach 24 Stunden wurde der Motor über drei Minuten allmählich heruntergefahren. Für die Kontrollgruppe wurde für 24 Stunden ein identischer Konus ohne Antrieb in einer Petrischale mit HUVECs aus der gleichen Nabelschnur plaziert.

2.2.3. Zellernte

Nach der Strömungsexposition erfolgte die Ernte. Das Zellkulturmedium wurde abgossen und der Zellrasen zweifach mit 5 ml PBS gespült. Nach Ablösung durch fünfminütige Inkubation mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (0,5‰ Trypsin/0,2‰ EDTA) bei 37°C wurden die Zellen in ein 50 ml Blue-Max[®] Reaktionsgefäß übertragen und fünf Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in einem Milliliter PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Kryogefäß übertragen und erneut mit 300 g fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Kryoröhrchen mit dem Sediment bei -196°C in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.2.4. RNA-Isolierung

Alle Arbeiten mit RNA wurden unter möglichst RNase-freien Bedingungen verrichtet. Hierzu zählten insbesondere die Verwendung von Einweghandschuhen und das Autoklavieren von Pipettenspitzen und Reaktionsgefäßen. Arbeitsflächen wurden mit dem RNase-deaktivierenden Spray RNaseZAP[®] vorbehandelt. In Aqua bidest. enthaltene RNasen wurden durch DEPC inaktiviert. Zu diesem Zweck wurde Aqua bidest. mit 0,5 % DEPC über Nacht auf dem Rüttler versetzt. Am nächsten Tag wurde DEPC durch zweimaliges Autoklavieren bei 2 bar inaktiviert.

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde ein kommerzielles Kit (Rneasy[®]) der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Bei dieser Methode werden die Zellen durch ein mildes Detergens unter Zusatz von β -Mercaptoethanol lysiert. Die freiwerdende RNA adsorbiert bei der anschließenden

Zentrifugation an Silicongelmembranen. Nach mehreren Reinigungsschritten wird die adsorbierte RNA ebenfalls durch Zentrifugation mit 90 µl RNase-freiem Wasser ausgewaschen. Anschließend wurde die RNA durch dreissigminütige Inkubation mit 10 Units RNase-Inhibitor und 10 Units DNase bei 37°C von DNA-Fragmenten und RNA-spaltenden Enzymen gereinigt. Abschliessend wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.5. Differential Display RT-PCR

Differential Display RT-PCR ist ein Verfahren, mit dem die unterschiedliche Expression von Genen auf RNA-Ebene untersucht werden kann (Liang et al., 1995). Die Methode beruht auf der Verwendung von Primern mit zufällig gewählten Sequenzen für reverse Transkription und PCR unter niedrig-stringenten Bedingungen. Das Ergebnis sind primerspezifische PCR-Produkte, die zu Fragmenten der eingesetzten mRNA komplementär sind. Nach der elektrophoretischen Auftrennung erhält man einen reproduzierbaren „mRNA-Fingerabdruck“ der untersuchten Zellen. Nun durchlaufen zwei mRNA-Pools gleicher Zellen, die unter unterschiedlichen Bedingungen kultiviert wurden, diese Prozedur. Durch die Zufallsprimer wird dann idealerweise auch ein Gen erfasst, welches in einem der beiden mRNA-Pools verstärkt oder vermindert exprimiert wird. Durch Isolierung der Fragmente und Sequenzanalyse können dann weitergehende Aussagen über die differentiell exprimierte mRNA gemacht werden (vergleiche Abbildung 4).

Die 3'-Primer für die reverse Transkription tragen die Bezeichnung „HP“ für Hin-Primer (vergleiche Tabelle 2) und bestehen aus drei Untereinheiten. Die am 5'-Ende gelegene Sequenz 5'-TGC CGA AGC-3' trägt die Bezeichnung „HindIII“ und ist eine Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen, die ein späteres Klonen der synthetisierten Sequenz ermöglicht (Maarten und Villeponteau, 1995). Der folgende Abschnitt mit elf Thyminresten (T₁₁) bewirkt eine Bindung am Poly-A-Ende, das nahezu allen mRNAs von Eukaryoten gemeinsam ist. Durch das Anhängen einer weiteren, von Thymin verschiedenen Base wird der mRNA-Pool der lysierten Zellen kategorisiert. Entsprechend der auf die T₁₁-Kette folgende Base erfolgt jeweils nur die Transkription von mRNAs, die nach dem Poly-A-Ende die komplementäre Base aufweisen. Zusätzlich wurde ein weiterer Primer mit zufälliger Sequenz bestimmt (HP-4). Durch

diesen vierten, ergänzenden Primer war die volle Auslastung von Thermocycler und Reaktionsgefäßen möglich, deren Kapazität in der Regel als Vielfaches von Vier ausgelegt ist.

In der anschließenden PCR erfolgt dann eine erneute Verwendung des Primers HP mit einem 5'-Primer (Rückprimer „RP“), dessen Sequenz zufällig gewählt wurde. Lediglich zwei Einschränkungen wurden bei der Wahl von Rück-Primern berücksichtigt. Die Sequenz sollte eine Länge zwischen 18 und 25 Basenpaaren haben, da Primer dieser Größenordnung eine reproduzierbare und doch nicht zu restriktive Amplifikation bewirken (Rothschild et al., 1997). Außerdem wurden unwahrscheinliche Nukleotidwiederholungen, d.h. mehr als drei gleiche Nukleotide in Folge, ausgeschlossen. Durch die Verwendung des gleichen Hin-Primers in reverser Transkription und PCR wird die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse deutlich erhöht (Liang et al., 1995).

2.2.5.1. Reverse Transkription (RT)

Zur Synthese von zu mRNA komplementärer DNA (cDNA) wurde die isolierte Gesamt-RNA einer reversen Transkription mit oligo-dT-Primern unterzogen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgelistet. Der Ansatz für die Reaktion beinhaltete 2 µg Gesamt-RNA, 200 Units Reverse Transkriptase, 500 µM dNTP, 3 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Dithiothreitol (DTT) und 2,5 µM oligo-dT-Primer. Das Volumen des Ansatzes betrug 25 µl. RNA-Lösung und Primer wurden 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz mit RT-Puffer, Nucleotiden und DTT versetzt und für 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Die reverse Transkription erfolgte nach Zusatz der reverse Transkriptase bei 42°C für 60 Minuten. Die Reaktion wurde durch Denaturierung des Enzyms durch zehnmütige Inkubation bei 70°C gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit 15 µl Wasser auf 40 µl Gesamtvolumen verdünnt. Abschließend erfolgte eine photometrische Bestimmung der Konzentration von cDNA.

2.2.5.2. PCR

Für die PCR wurden 200 ng cDNA aus der reversen Transkription in 4 µl Wasser verdünnt. Darüber hinaus beinhaltete der Reaktionsansatz 5 Units DNA Polymerase Enzym, 0,2 mM dNTP, 25 mM magnesiumfreier PCR-Puffer, 1,5 mM Magnesiumchlorid sowie jeweils 1 µM

Hin-Primer (HP) und Rück-Primer (RP). Die cDNA wurde zunächst durch dreiminütiges Erhitzen auf 94°C denaturiert. Durch eine Mineralölschicht wurde der Reaktionsansatz vor Verdunstung geschützt. Der Thermocycler durchlief folgendes Programm:

3 Zyklen mit 94°C für 2 min 30 sec, 40°C für 2 min, 72°C für 1 min 30 sec

30 Zyklen mit 94°C für 1 min 30 sec, 55°C für 2 min, 72°C für 1 min 30 sec

1 Zyklus mit 70°C für 5 min

Die PCR-Produkte wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 2: Primer für reverse Transkription und PCR

Bezeichnung	Sequenz
HP-1	5`-TGC CGA AGC TTT TTT TTT TTA-3`
HP-3	5`-TGC CGA AGC TTT TTT TTT TTC-3`
HP-3	5`-TGC CGA AGC TTT TTT TTT TTG-3`
HP-4	5`-TCA ACA CTC CCG AGC ACG TT-3`
RP-1	5`-TTC ATA GAC ATT GAG GTT GC-3`
RP-2	5`-CAG GTG AAA AGC AGA ATC AGG-3`
RP-3	5`-TTG AGC ACT TAC CAT GTG CC-3`
RP-4	5`-TGG TCT CTT CCA TAA AAT GGG-3`
RP-5	5`-CGA AGC TAT CTA GAG TTG GG-3`
RP-6	5`-GTT TGT CTT AGG TGT TCC TC-3`
RP-7	5`-TAC ACC AGT GAG GAG AGT AC-3`
RP-8	5`-GTC TTG GGT TCT CTT CCA-3`
RP-9	5`-CGA AGC TTC TGG (AGT)AG (CT)GG-3`
RP-10	5`-CGA AGC TTC TGG (AGT)TC GG-3`
RP-11	5`-GCT TCC TTC ATC CTT CTT-3`
RP-12	5`-TGG CCT TCC TGA ATA TTC-3`
RP-13	5`-ACT CCA CCA GCA ATG ACA-3`
RP-14	5`-CTT CTA GGA CCT GGC AAT-3`
RP-15	5`-ATC AGG GCA GTT TGA ATA G-3`
RP-16	5`-CGG GAA GCT TAT CTT TCT ACC C-3`
RP-17	5`-CGA AGT TT(GCT) AG(CT) TCG TCT T-3`
RP-18	5`-CGA AGC TAT CTA GAG TTG GG-3`
RP-19	5`-CGA AGC TGT AGA A5G G(AGCT)G G-3`
RP-20	5`-CGA AGC TAC CAC C5T T(CT)T A-3`
RP-21	5`-GAA TTC TCT GGC TCA GGT-3`
RP-22	5`-GTG TCC TCT TCC CGA TAA TC-3`
RP-23	5`-GAA GCA TGG AGG AAG CTG TC-3`
RP-24	5`-CAC CTC CGA GGC ATC TTC AAC TG-3`

Die Primer mit der Bezeichnung Hin-Primer (HP) wurden in der reversen Transkription verwendet. Die PCR wurde mit dem bereits in der reversen Transkription verwendeten HP und einem Rück-Primer (RP) durchgeführt. In Klammern angegebene Basen bedeuten ein Primergemisch mit einer der angegebenen Basen an der entsprechenden Stelle.

2.2.6. Isolierung und Reamplifikation differentiell exprimierter Banden

Die Trennung der PCR-Produkte erfolgte unter nichtdenaturierenden Bedingungen in einer S2-Elektrophoresekammer. Bei diesem System polymerisiert das Gel zwischen zwei Glasplatten, die durch Abstandhalter mit definierter Dicke getrennt werden. Um das Zerreißen des Gels beim späteren Trennvorgang der beiden Platten zu verhindern, wurde jeweils eine der beiden Platte mit 1,5 µl des antiadhäsiven Dichlordimethylsilans beschichtet. Der Ansatz für die Gelsubstanz bestand aus 80 ml Aqua bidest. mit 3,5% Acrylamid und 15% Harnstoff. Nach Lösung der Substanzen in einem Reaktionsgefäß wurde die Polymerisierung durch Hinzufügen von 20 µl TEMED und 250 µl 10%igem Ammoniumpersulfat initiiert und katalysiert. Die Gelsubstanz wurde vor der Aushärtung in die Gelkammer gegossen. Auf diese Weise wurden Gelplatten vom Format 40 cm x 32 cm mit einer Schichtdicke von 0,4 mm hergestellt. Als Elektrophoresepuffer diente 0,6 fach konzentrierter TBE-Puffer.

Jeweils ein Differential Display RT-PCR-Produkt aus mRNA einer durch Wandschubspannung stimulierten Zellkultur und ein Differential Display RT-PCR-Produkt aus der zugehörigen Kontroll-Zellkultur wurden nebeneinander aufgetragen. 10 µl PCR Produkt wurden mit 2 µl 6 fach konzentriertem Ladepuffer versetzt, das Ladevolumen betrug 3,5 µl. Nach Auftragen der Proben auf dem Gel wurde für ca. 10 min eine Spannung von 450 V angelegt, um eine Abdiffusion des Probenmaterials in den Ladepuffer zu vermeiden. Anschließend wurden 100 V Betriebsspannung angelegt. Die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe Bromophenolblau und Xylen-Zyanol werden bei den gewählten Bedingungen wie cDNA-Fragmente mit ca. 65 bp und ca. 250 bp aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem Bromophenolbau bzw. cDNA-Fragmente mit Länge unter 65 bp die Gelfläche verlassen hatten. Dies trat in der Regel nach sechzehn Stunden ein. Mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens konnten insbesondere PCR-Produkte mit einer Länge zwischen 100 und 1000 bp aufgetrennt werden. Ein Gel ermöglichte die Auftrennung von ca. 30 Proben, d.h. von ca. 15 Paaren aus stimulierten und unstimulierten Zellen.

Unmittelbar nach Trennung der Glasplatten wurde die DNA im Gel durch 45 minütiges Waschen der geltragenden Platte mit 10%iger Essigsäure in einer Tauchwanne auf dem Wipptisch fixiert.

Anschliessend wurden drei zweiminütige Waschvorgänge mit Aqua bidest. durchgeführt. Die Färbung erfolgte durch ein 45 minütiges Tauchbad in Silbernitratlösung (Aqua bidest. mit 1 g/l Silbernitrat und 1,5 ml/l Formaldehyd (37%)) auf dem Wipptisch. Nach der Färbung wurde die Gelplatte erneut fünf Sekunden in Aqua bidest. auf dem Wipptisch gewaschen. Als Entwicklerlösung diente Aqua bidest. mit 30 g/l Natriumbikarbonat, 1,5 ml/l Formaldehyd (37%) und 2 mg/l Natriumthiosulfat. Um die Entwicklung zu verzögern, wurde die Entwicklerlösung auf 4°C gekühlt. Es erfolgten drei ca. zweiminütige Entwicklungsschritte mit jeweils frischer Entwicklerlösung auf dem Wipptisch. Nachdem die gefärbten Banden sichtbar geworden waren, wurde die Entwicklung durch kurzes Eintauchen in gekühltem Aqua bidest. mit 1%iger Essigsäure beendet. Nach einem weiteren kurzen Waschgang mit Aqua bidest. für einige Sekunden wurde das Gel mindestens eine Stunde an Raumluft getrocknet.

Anschließend wurde das Gel zur Dokumentation photographiert. Die nebeneinander aufgetragenen Produkte der Differential Display RT-PCR aus stimulierter und unstimulierter Zellkultur wurden auf unterschiedlich exprimierte Banden hin untersucht. Derartige Banden wurden mit Pipettenspitzen aus dem Gel herausgelöst und mit 50 µl Wasser in 0,5 ml Reaktionsgefäßen bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

Zur Elution von DNA aus den isolierten Gelstücken wurden die Proben 20 Minuten lang auf 94°C erhitzt. Von dieser Lösung wurden unter Vermeidung der Mitnahme von Gelstücken 20 µl als Ausgangsmaterial für eine Reamplifikations-PCR verwendet. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes für die Reamplifikations-PCR betrug 40 µl, darin enthalten waren außer der DNA 2 Units DNA-Polymerase, 2 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM dNTP, 25 mM magnesiumfreier PCR-Puffer sowie 0,5 µM Primer. Es wurde die Primerkombination benutzt, mit der die jeweilige Sequenz im ersten PCR Schritt amplifiziert worden war. Um eine Verunreinigung der Proben durch Reamplifikation falsch positiver Banden zu minimieren, wurde folgendes Thermocyclerprogramm mit für die Primeranlagerung stringenten Bedingungen gewählt :

1 Zyklus mit 94°C für 2 min

35 Zyklen mit 94°C für 30 sec, 55°C für 45 sec, 72°C für 30 sec

1 Zyklus mit 72°C für 5 min

Die Produkte der Reamplifikations-PCR wurden in einer Elektrophoresekammer (Gelfläche 10,2 cm x 7,6 cm x 0,1 cm) aufgetrennt. Als Gelsubstanz diente Aqua bidest. mit 6% Acrylamid und 15% Harnstoff. Die Polymerisierung wurde durch 6 µl TEMED und 60 µl 10%iges APS initiiert und katalysiert. Die Betriebsspannung betrug 80 V, die Laufzeit zwei bis drei Stunden. Als Elektrophoresepuffer diente 0,6 fach konzentrierter TBE. Nach Beenden der Auftrennung wurden die PCR-Produkte durch fünfminütiges Tauchbad auf dem Wipptisch in Aqua bidest. mit 0,5% Ethidiumbromidlösung gefärbt. Anschliessend wurde das Gel einige Sekunden in Aqua bidest. gewaschen. Die Visualisierung erfolgte durch UV-Licht (254 nm). Nach der Dokumentation mit der Sofortbildkamera wurden erfolgreich reamplifizierte Banden mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten und in Reaktionsgefäße übertragen. Als Elutionspuffer wurde Aqua bidest. mit 0,5 M Ammoniumacetat, 1 mM EDTA und 0,2% SDS verwendet. Nach Hinzufügen von 800 µl dieser Lösung wurden die Proben bei 37°C im Hybridisierungssofen rotierend über Nacht ausgewaschen. Am nächsten Morgen wurde der Elutionspuffer mit der darin enthaltenen DNA unter Vermeidung der Mitnahme von Gelstücken in neue Reaktionsgefäße übertragen. Die DNA wurde mit 2 µl LPA und 1150 µl 100% Ethanol ausgefällt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die DNA wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes erfolgte die Trocknung in der Vakuumentrifuge. Das getrocknete Sediment wurde in 20 µl Wasser resuspendiert und der Gehalt an DNA photometrisch bestimmt.

2.2.7. Sequenzierung der Amplifikationsprodukte

Für die Sequenzanalyse der differentiell exprimierten Banden wurde das kommerzielle Silver Sequence[®]-System der Firma Promega/Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg GmbH verwendet. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Version des enzymatischen

Kettenabbruchverfahrens (Sanger, 1981). Ursprünglich wurde dieses Verfahren für radioaktive Nukleotide entwickelt. Die im Silver Sequence[®] angewendete Silberfärbung ist jedoch kostengünstiger und ermöglicht die Ablesung der DNA-Sequenz noch am selben Tag.

Das Kettenabbruchverfahren nach Sanger beruht auf der Eigenschaft von DNA-Polymerase, als Substrat für die DNA-Elongation nicht nur 2'-Deoxynukleotide sondern auch 2',3'-Dideoxynukleotide verwenden zu können. Der Einbau eines 2',3'-Dideoxynukleotides führt aber zum Abbruch der Elongation, da aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe kein weiteres Nukleotid angehängt werden kann.

Das Verfahren beginnt mit dem Denaturieren eines DNA-Fragmentes und dem Hinzufügen eines komplementären Oligonukleotides, welches als Primer für die DNA-Polymerase dient. Dieser Reaktionsansatz wird in vier Aliquots aufgeteilt. Jedes Aliquot enthält die vier Deoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP, und dTTP. Darüber hinaus ist jedem Aliquot jeweils eines der Dideoxynukleotide ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP beigefügt. Jedesmal wenn die DNA-Polymerase ein solches „defektes“ Dideoxynukleotid einbaut, kommt es zum Kettenabbruch. Nach Durchlaufen mehrerer PCR-Amplifikationszyklen erhält man in den einzelnen Aliquots DNA-Spezies verschiedener Länge, die an ihrem 5'-Ende die Sequenz des Primers zeigen. Am 3'-Ende findet sich das Dideoxynukleotid, welches zum Abbruch der Elongation geführt hat. Werden die PCR-Produkte der vier verschiedenen Ansätze nebeneinander auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, so lässt sich die Sequenz der ursprünglichen DNA ablesen. Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung. Die mit diesem Verfahren ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST Programms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) des National Center for Biotechnology (NCBI), Bethesda, Maryland, USA auf Homologien zu publizierten Sequenzen geprüft (Altschul et al., 1997).

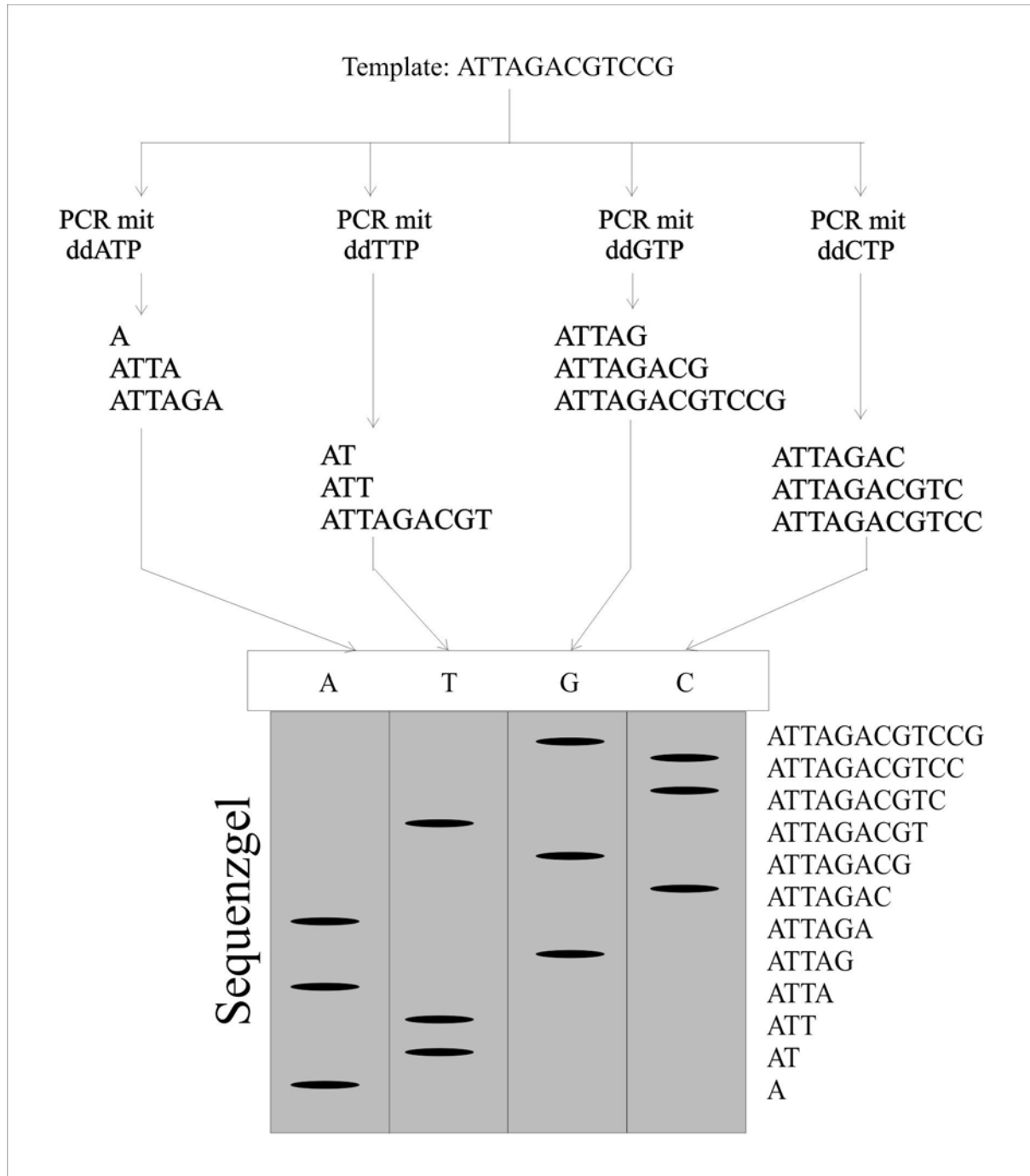


Abbildung 7: **Schematische Darstellung eines Sequenzgels**

Um ein DNA-Fragment zu sequenzieren, werden vier verschiedene PCR durchgeführt. Durch Hinzufügen eines Dideoxynukleotides (ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP) kommt es in der jeweiligen Reaktion regelmäßig zu Kettenabbrüchen. Nach elektrophoretischer Auftrennung kann anhand der Verteilung der Fragmentlängen die Sequenz abgelesen werden.

2.2.8. Semiquantitative RT-PCR

Die Ergebnisse der Untersuchung der Genexpression mit Differential Display RT-PCR wurden durch spezifische, semiquantitative RT-PCR verifiziert. Mit diesem Verfahren können unterschiedliche Konzentrationen von cDNA durch PCR nachgewiesen werden (Aschoff et al., 1994; Jenkins et al., 1998). Die verschieden stark exprimierten mRNAs bzw. deren cDNAs werden bei Verwendung von für die untersuchte Sequenz spezifischen Primern durch PCR amplifiziert. Die Länge des Produktes ist durch die Auswahl der Primer definiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung gibt die optische Dichte des PCR-Produktes Aufschluss über die ursprüngliche Konzentration der cDNA. Um mit semiquantitativer RT-PCR valide Aussagen treffen zu können, müssen zwei Bedingungen erfüllt sein.

Die erste Bedingung besagt, daß die semiquantitative PCR die Amplifikation im linearen Bereich ermöglichen muss. Bei niedriger Zyklenzahl wird eine für die Densitometrie zu geringe Konzentration des PCR-Produktes erzeugt. Eine hohe Zyklenzahl bedeutet hingegen, daß ein Sättigungswert erreicht wird. Unterschiedliche Konzentrationen der cDNA führen dann immer zu ähnlichen, maximalen Konzentrationen an PCR-Produkt. Eine Zyklenzahl im linearen Bereich bewirkt jedoch mit jedem Amplifikationszyklus eine nahezu lineare Zunahme der Konzentration des PCR-Produktes. Um diese Voraussetzung zu erfüllen, wurden die Bedingungen der semiquantitativen RT-PCR für jede einzelne Sequenz abgestimmt. Diese Bedingungen sind im Ergebnisteil im Abschnitt 3.5 aufgeführt. Die Suche nach geeigneten Primern wurde mit dem „Primer3“-Programm (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) des Whitehead Institute for Biomedical Research in Cambridge, Massachusetts, USA durchgeführt (Rozen und Skaletsky , 1996). Es wurden Oligonukleotidsequenzen bestimmt, die komplementär waren entweder zu einem Stück einer differentiell exprimierten Sequenz oder zu einer bereits publizierten mRNA-Sequenz mit hoher Homologie zu einer differentiell exprimierten Sequenz.

Die zweite Bedingung besagt, daß Konzentrationschwankungen des cDNA-Pools berücksichtigt werden müssen. Auch geringe Konzentrationsunterschiede des cDNA-Pools haben nämlich durch die Amplifikation eine starke Verzerrung des Ergebnisses zur Folge. Um diese Voraussetzung zu gewährleisten, muss die Konzentration der cDNA durch die Kontrolle eines konstant exprimierten Gens überprüft werden. Üblicherweise dient als solches „House-Keeping-Gene“ die

für Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) kodierende mRNA (Wang et al., 1989). Die Primer sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die PCR-Bedingungen zur Amplifikation der cDNA für GAP-DH waren :

1 Zyklus mit 94°C für 1 min

26 Zyklen mit 94°C für 30 sec, 60°C für 45 sec, 72°C für 1 min 30 sec

1 Zyklus mit 72°C für 5 min,1

Tabelle 3 Spezifische Primer für GAP-DH, CNP und ET-1

Gen	Primer	Produktlänge
GAP-DH	5`-GGT CGG AGT CAA CGG ATT TGG T-3`	977
	5`-TGT GGG CCA TGA GGT CCA CCA C-3`	
CNP	5`-TGC GCG TGG ACA CCA AGT CG-3`	167
	5`-GGG GCG CCG CAC TAA CAT CC-3`	
ET-1	5`-GTT TGT CTT AGG TGT TCC TC-3`	308
	5`-TCA ACA CTC CCG AGC ACG TT-3`	

Die Primer sind spezifisch für Fragmente der mRNAs der Gene von Glyceraldehydphosphatdehydrogenase (GAP-DH), C-type natriuretic peptide (CNP) und Endothelin-1 (ET-1). Die Primersequenzen wurden mit dem „Primer3“-Programm (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) des Whitehead Institute for Biomedical Research in Cambridge, Massachusetts, USA bestimmt (Rozen und Skaletzky, 1997).

Das Produkt dieser PCR ist eine Sequenz mit einer Länge von 977 Basenpaaren, die einem Intron-übergreifenden Abschnitt der mRNA von GAP-DH zwischen den Nukleotiden 73 und 1051 entspricht. Wenn nach der Amplifikation nur ein Produkt vorliegt, kann eine Kontamination durch genomische DNA ausgeschlossen werden (Wang et al., 1989).

Wird das zu untersuchende Produkt ins Verhältnis zu diesem Standard gesetzt, so werden Fehler durch eventuell ungleiche Konzentrationen des cDNA-Ausgangsmaterials korrigiert.

Die Produkte der semiquantitativen RT-PCR wurden in einer Elektrophoresekammer (7,0 cm x 8,5 cm) aufgetrennt. Die Schichtdicke der Gele betrug 5 mm. Als Elektrophoresepuffer diente 0,6-fach konzentrierter TBE. Die Gele wurden aus Aqua bidest. mit 3%iger Agarose gegossen. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Betriebsspannung betrug 80 Volt, die Laufzeit ca 2 h. Die Gele wurden durch ein fünfminütiges Tauchbad in Aqua bidest. mit 0,5% Ethidiumbromid auf dem Wipptisch gefärbt. Nach einem weiteren fünfsekündigen Tauchbad in Aqua bidest. erfolgte die digitale Erfassung der Banden sowie ihre densitometrische Auswertung.

Zunächst wurde eine semiquantitative RT-PCR mit für die mRNAs von C-type natriuretic peptide (CNP) und Endothelin (ET-1) spezifischen Bedingungen durchgeführt. Die Auswirkungen von Strömung auf die Expression dieser Gene ist gut erforscht und ermöglicht eine Kontrolle der Versuchsbedingungen (Chun et al., 1997; Sharefkin et al., 1991). Die Primer sind in Tabelle 3 angeführt, der Thermocycler durchlief folgende Zyklen:

1 Zyklus mit 94°C für 1 min

20, 25 und 30 Zyklen mit 94°C für 30 sec, 60°C für 45 sec, 72°C für 1 min 30 sec

1 Zyklus mit 72°C für 5 min,

2.2.9. Northern blot

Die Überprüfung der Ergebnisse der Differential Display RT-PCR kann über den indirekten Nachweis durch semiquantitative RT-PCR hinaus auch direkt auf mRNA-Ebene durch northern blot erfolgen.

Bei diesem Verfahren werden aus Zellen isolierte RNA-Spezies in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend werden diese RNA-Spezies unter Erhaltung ihrer relativen Position zueinander auf ein festes Medium übertragen. Dieses Medium ist in der Regel eine Nylonmembran. Nach dem Transfer wird die RNA immobilisiert. Das Ergebnis ist ein Membranstreifen mit darauf nach ihrer Größe getrennten RNAs, der northern blot. Der northern

blot wird dann mit einer markierten RNA- oder DNA-Sonde, deren Sequenz komplementär zu der zu untersuchenden RNA ist, hybridisiert. Die Sonde ist entweder mit Markerenzymen verbunden oder kann durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Das Signal der Sonde gibt Aufschluß über Größe und Menge einer RNA-Spezies.

Ursprünglich war das Verfahren von Southern 1975 für den spezifischen Nachweis von DNA-Sequenzen entwickelt worden (Southern, 1975). Zwei Jahre später gelang mit Modifikationen auch der Nachweis von RNA-Sequenzen (Alwine et al., 1977). Aufgrund der Verwandtschaft der beiden Techniken hat sich die Bezeichnung „northern blot“ eingebürgert.

2.2.9.1. RNA-Sonden

Die Herstellung von RNA-Sonden für northern blots erfolgte in zwei Schritten.

Mit dem Lig'n Scribe[®]-Kit wurden zunächst durch eine Ligase DNA-Fragmente mit RNA-Polymerase T7-Promotor verbunden. Dieser Vorgang erfolgt sowohl am 5`- als auch am 3`-Ende. Durch Verwendung eines zur DNA-Sequenz spezifischen Primers für die folgende PCR kann die Ausrichtung der resultierenden Sonden bestimmt werden. Ist der Primer komplementär zu einer Antisense-DNA, so werden nur Antisense-Sequenzen amplifiziert, entsprechend führt die Wahl eines zur Sense-DNA spezifischen Primers zur Synthese von DNA mit Sense-Ausrichtung. Eine angeschlossene PCR erzeugt dann mit RNA-Polymerase T7-Promotor verbundene DNA-Sequenzen.

Aus diesen Substraten wurden dann mit dem MEGAscript[®]-Kit RNA-Sonden hergestellt. MEGAscript[®] ist ein Set mit den für *in vitro* Transkription benötigten Substanzen und RNA-Polymerase. Die RNA-Synthese erfolgte bei 37°C für sechs Stunden. Danach wurde das Transkriptionsprodukt durch RNase-freie DNase von DNA gereinigt. Die RNA-Sonden wurden mit Psoralen-Biotin markiert. Zu diesem Zweck wurden die Proben durch fünfzehnminütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert. Danach wurden die Sonden zügig in die Fächer einer in Eis eingelegten Mikrotiterplatte pipettiert. Unter minimaler Lichtexposition wurde 1 µl Psoralen-Biotin zugefügt. Die Konjugation erfolgte durch 45 minütige Exposition mit UV-Licht (366 nm). Das nichtkonjugierte Psoralen-Biotin wurde durch Mischen mit n-Butanol und anschließendes

Abzentrifugieren extrahiert. Abschliessend erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA-Sonden.

2.2.9.2. Auftrennung, Übertragung und Hybridisierung von RNA

Für die Auftrennung von mRNA und die Übertragung auf Nylonmembranen wurde das kommerzielle NorthernMax[®]-Kit verwendet. Vorher wurde RNA von nicht-stimulierten und stimulierten Zellkulturen mit dem Rneasy[®]-Kit (vergleiche Abschnitt 2.2.4.) eluiert. Diese RNA wurde in denaturierendem Agarosegel (Rnasefreies Aqua bidest. mit 1,2% Agarose und 2,2 M Formaldehyd) aufgetrennt. Die Übertragung der aufgetrennten RNA vom Gel auf die Nylonmembran erfolgte mit einem Transfergerät, dessen Aufbau sich an der Beschreibung eines „downward transfer apparatus“ von Chomczynski orientiert (Chomczynski, 1992). In dieser Vorrichtung findet ein Transfer von RNA durch Kapillarkräfte statt (vergleiche Abbildung 8). Als Transferpuffer diente zehnfach konzentriertes SSC. Nach Beendigung der Prozedur wurden die Blots entweder bei –20°C gelagert oder unmittelbar hybridisiert.

Alle Hybridisierungsvorgänge erfolgten mit UltraHyb[®]-Lösung. Der eigentlichen Hybridisierung ging eine einstündige Prähybridisierung bei 68°C voraus. Die Hybridisierung wurde mit 10 bis 20 ng Sonde pro ml UltraHyb[®] bei 68°C im Hybridisierungsöfen durchgeführt. Die Membranstreifen wurden zu diesem Zweck in 10 ml Reaktionsgefäßen zwischen 16 und 24 h geschwenkt. Anschließend wurden die Streifen zweimal 30 min in Aqua bidest. mit 0,1 fach konzentriertem SSC und 0,1% SDS bei 68°C gewaschen.

2.2.9.3. Nachweis der Sonden

Mit dem Blot hybridisierte Sonden wurden durch Southern-Star[®] dargestellt. Dabei handelt es sich um ein kommerzielles System zum Nachweis von mit Psoralen-Biotin markierten Sonden. Nach mehreren Spülungen auf dem Wipptisch mit Waschpuffer (PBS mit 0,5% SDS) und Blockierpuffer (PBS mit 0,5% SDS und 0,2% I-Block[®]-Reagenz) wurde 2 µl/10 ml Blockierpuffer Avidx-AP[®] (mit Alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin) zugefügt. Nach weiteren Spülungen mit Wasch- und Blockierpuffer erfolgte die Benetzung der Streifen mit CDP-Star[®], einem Substrat der Alkalischen Phosphatase, das nach enzymatischer Spaltung

luminesziert. Nach ungefähr fünfminütiger Einwirkzeit wurde CDP-Star[®] wieder entfernt. Die Membranstreifen wurden in Polypropylenumschlägen konserviert. Die Chemilumineszenz zeigt nach ca 10 min. ein Maximum, danach fällt die Intensität über Tage ab. Ein geeignetes Verhältnis von Signal und Hintergrund wurde in der Regel in den ersten Stunden nach Aktivierung nach fünf bis zehnminütiger Exposition erreicht. Die Dokumentation erfolgte durch Direktbelichtung eines Filmes in einer lichtundurchlässigen Röntgenkassette.

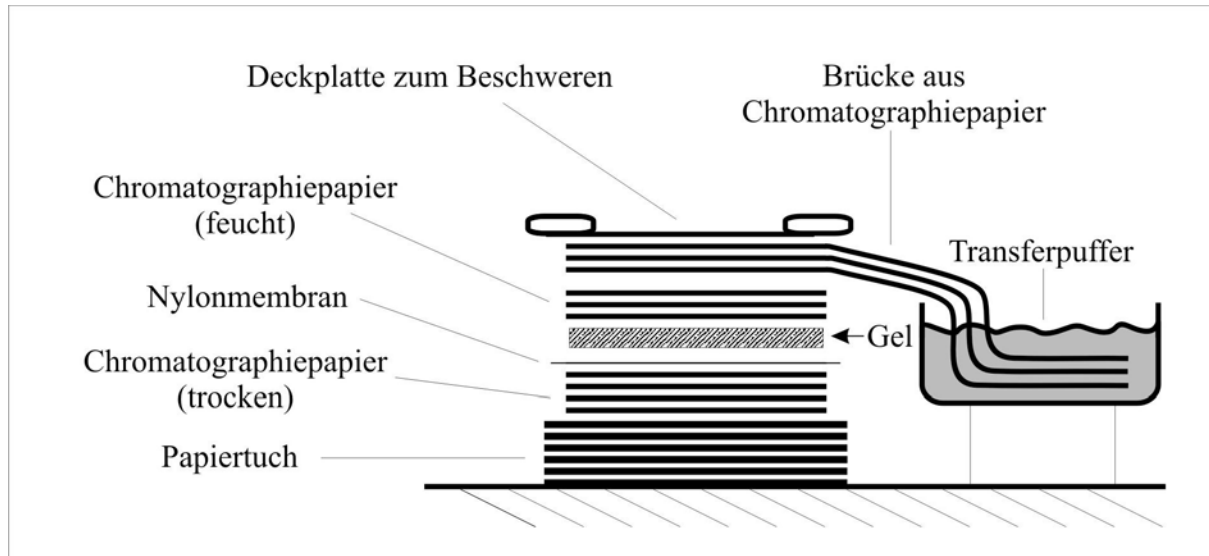


Abbildung 8: **Systematischer Aufbau des blot-Apparates**

Das Gel mit der darin aufgetrennten RNA und die Nylonmembran befinden sich in einer Grenzschicht zwischen mit Transferpuffer befeuchtetem und trockenem Chromatographiepapier. Durch diese Anordnung entstehen Kapillarkräfte mit Richtung von oben nach unten, die eine Diffusion von Transferpuffer mit Übertragung von RNA auf die Zielmembran bewirken.

2.2.10. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der differentiellen Expression der PCR-Produkte erfolgte durch den Vergleich der gemessenen optischen Dichten (OD) mit dem Student T-Test für ungepaarte Proben. Zwei Gruppen wurden als statistisch signifikant unterschiedlich gewertet, wenn $p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$ war. Die graphische Darstellung ist in Abbildung 14 im Ergebnisteil wiedergegeben.