

3 Zellen und Materialien

3.1 Zellen

Die in allen Untersuchungen eingesetzten mikrovaskulären Endothelzellen stammen aus dem bovinen Corpus luteum.

Die Isolierung der Endothelzellen erfolgte aus Gelbkörpern verschiedener Entwicklungsstadien von Schlachtrindern [PLENDL et al., 1996; PLENDL, 1997; BUDDE, 1999]. Die Identifizierung der Endothelzellen erfolgte nach der Isolierung und vor dem Einsatz im Experiment mittels der Untersuchung der in vitro-Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL), der immunhistochemischen Lokalisation des von Willebrand-Faktors (vWF) und des Nachweises der zellulären Bindung des Lektins Bandeiraea simplicifolia Agglutinin I (BS-I) [PLENDL, 1997]. Als Negativkontrollen dienten Granulosazellen aus dem bovinen Corpus luteum.

3.2 Lösungen für die Zellkultur

Lösungen	Hersteller
Bacto Gelatine	Difco Laboratories, Detroit
BME-Vitamine	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid	ICN Biomedicals, Eschwege
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	Schubert & Weiss GmbH, München
Fetales Bovines Serum (FBS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Heparin-Lösung (0,25%)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
L-Glutamin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom KG, Berlin
S180-konditioniertes Medium	siehe unten
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

Zur Herstellung des S180-konditionierten Mediums wurden murine Sarkomzellen (zur Verfügung gestellt von Prof. R. Auerbach, University of Wisconsin, Madison/USA) in DMEM+ kultiviert. Das Medium wurde nach erfolgtem Farbumschlag abgesaugt, 5 min bei 1050 U zentrifugiert, der Überstand mit 0,2 µm Filtern steril filtriert und bis zur Verwendung bei – 20°C tiefgefroren.

3.3 Kulturmedien

3.3.1 Zusammensetzung des Erhaltungsmediums (DMEM+)

Komponente	Menge
L-Glutamin	0,5 ml
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	0,5 ml
Fetales Bovines Serum	5,0 ml
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	ad 50 ml

3.3.2 Zusammensetzung des Selektivmediums (P0)

Komponente	Menge
BME-Vitamine	0,5 ml
Heparin-Lösung (0,25%)	0,5 ml
Fetales Bovines Serum	5,0 ml
Endothelial Cell Growth Supplement (2,5 mg/ml)	1,0 ml
S 180-konditioniertes Medium	10,0 ml
DMEM+	ad 50 ml

3.4 Lösliche pro- und antiangiogene Faktoren

Lösliche Faktoren	Hersteller
Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF), Human, Rekombinantes Antigen	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Bovin, aus der Hypophyse	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
Angiostatin K 1 - 3, Human	Calbiochem – Novabiochem GmbH, Schwalbach / Ts
Suramin, Sodium Salt	Calbiochem – Novabiochem GmbH, Schwalbach / Ts

3.5 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Biesterfeld, Dahlwitz- Hoppegarten
Agarlösung	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Azur II-Lösung (1%ig)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Borax-Lösung (1%ig)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
2-Dodeceny succinic-acid-anhydride (DDSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
2, 4, 6 Tri (dimethylaminomethyl)phenol (DMP-30)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Epon-Glycidether	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Fluorostab	ICN Pharmaceuticals, Ohio, USA
Glutaraldehyd	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Kaliumferrocyanid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Methanol	Th. Geyer GmbH, Berlin
Methylenblau	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Methyl Nadic Anhydride (MNA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Osmiumtetroxid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Propylenoxid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Proteinblockierungsreagenz, serumfrei	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Ultrastain I	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Ultrastain II	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Ziegennormalserum, Vollserum	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark

3.6 Lösungen für transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

3.6.1 Cacodylat-Puffer

Komponente	Menge
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	8,56 g
Aqua dest.	ad 200 ml
HCl (0,1 M)	damit auf ph 7,2 - 7,4 einstellen

3.6.2 Karnovsky-Lösung

Komponente	Menge
Paraformaldehyd	2,0%
Glutaraldehyd	2,5%
Cacodylat-Puffer, 0,1 M	ad 100%

3.6.3 Kontrastierungslösung

Komponente	Menge
Osmiumtetroxid	1,0%
Kaliumferrocyanid	1,5%
Cacodylat-Puffer, 0,1 M	ad 100%

3.6.4 Epon

Komponente	Menge
Epon-Glycidether	23,10 g
DDSA	14,25 g
MNA	12,55 g
DMP-30	0,75 g

3.6.5 Richardson-Lösung

Komponente	Menge
Azur II-Lösung (1%ig)	25%
Methylenblau (1%ig)	25%
Borax-Lösung	50%

3.7 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Kaninchen Anti-Ziege, Immunglobulin, FITC-konjugiert	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark
Ziege Anti-Kollagen Typ IV, Polyklonaler Antikörper	Chemicon International, Temecula, CA, USA

3.8 Apoptose Kit: ApoAlert Annexin V-EGFP

Komponente	Hersteller
Annexin V-EGFP (40 µg/ml)	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Propidium Iodid (50 µg/ml)	
Binding Buffer	

3.9 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
24-Lochplatten (pro Vertiefung: Ø 15,5 mm)	Iwaki, Tokyo, Japan
6-Lochplatten (pro Vertiefung: Ø 34,6 mm)	Iwaki, Tokyo, Japan
Beem-Kapseln	PLANO, Marburg
Deckgläser, rund, Durchmesser: 12 mm	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Gewebekulturröhrchen 5 ml, steril	Zefa Labortechnik GmbH
Kodak Electron Microscope Film	Kodak GmbH, Stuttgart
Kryoröhrchen	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach

Kupfergrids	PLANO, Marburg
Membranfilter Easypet	Eppendorf, Köln
Pasteurpipetten 150 mm	Th. Geyer Berlin GmbH, Berlin
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH & CI, Karlsruhe
Reaktionsgefäß (Kunststoffröhrchen) 1,5 ml	Eppendorf, Köln
Serologische Pipetten	Carl Roth GmbH & CI, Karlsruhe
Sterilfilter 0,2 µm	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Zefa Labortechnik GmbH, Harthausen
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Zefa Labortechnik GmbH, Harthausen

3.10 Geräte und Software

Geräte / Software	Hersteller
Absaugvorrichtung für Zellkulturen	NeoLab Migge Laborbedarf, Berlin
Bildbearbeitungssystem (Axiovision, Version 3.0)	Zeiss, Jena
Bildbearbeitungssystem (Lucia M, Version 2.04)	Nikon GmbH, Düsseldorf
Dampfsterilisator (H+P Varioklav 25 T)	H+P Labortechnik AG, München
Fluoreszenzlichtmikroskop (Nikon Optiphot 2)	Nikon GmbH, Düsseldorf
Hämozytometer	GLW, Würzburg
Invert-Mikroskop (Axiovert 25)	Zeiss, Jena
Kohlendioxid-Begasungsbrutschrank (INCO2/1)	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach

Pipette (Easypet 4420)	Eppendorf, Köln
Pipette (Eppendorf Reference, variabel)	Eppendorf, Köln
Reinraumwerkbank (BDK-S100)	Laborteam Schultheiss GmbH & Co. KG, München
Schüttler (KL-2)	Edmund Bühler, Thübingen
Stickstofftank (GT 38)	Air Liquide Kryotechnik GmbH, Düsseldorf
Transmissionselektronenmikroskop (EM 10CR)	Zeiss, Jena
Ultramikrotom (Ultracut S)	Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich
Videokamera (Inteq 000610)	Inteq, Berlin
Videokamera (Sony DXC 930P)	Sony Deutschland GmbH, Köln
Wasserbad (1083)	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge (Varifuge RF)	Heraeus Sepatech, Osterode