

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid	Bio-Rad
Agarose	Seakem
AG1295	Calbiochem
AG1478	Calbiochem
Albumin, bovines	Sigma
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad
Ampicillin	Sigma
Ap5A	Sigma
Bacto-Agar	Difco
Bisindolylmaleimid	Calbiochem
Bromphenolblau	Sigma
Coomassie	Serva
EGF	Calbiochem
ERK1/2-Antikörper	New England BioLabs
Fura-2	Molecular Probes
Glucose	Merck
Glycin	Gibco
Hepes	Roth
JNK1/2-Antikörper	New England BioLabs
Kaliumchlorid	Roth
Kalziumdichlorid	Merck
L-Glutamin	Invitrogen
Lumiglo	New England BioLabs
Lysophosphatidsäure	Calbiochem
Magnesiumdichlorid	Sigma
MEM	Invitrogen
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Roth

Paraformaldehyd	Sigma
PBS-Dulbecco	Seromed
PD98059	Calbiochem
PDGF BB	Calbiochem
p38-Antikörper	New Englands BioLabs
Penicillin	Seromed
Pertussistoxin	Calbiochem
Phalloidin	Sigma
Phospho-ERK1/2-Antikörper	New England BioLabs
Phospho-JNK1/2-Antikörper	New England BioLabs
Phospho-p38-Antikörper	New England BioLabs
Szintillationsflüssigkeit	Zinsser
SDS	Roth
TEMED	Serva
Trichloressigsäure	Roth
Thapsigargin	Sigma
Thrombin	Sigma
³ H-Thymidin	Perkin-Elmer
TMB8	Calbiochem
Tris	Invitrogen
Triton X-100	Sigma
Trockenmilch, fettfrei	Bio-Rad
Tryptose-Phosphat	Sigma
Tween 20	Sigma
U73122	Calbiochem

Nicht aufgeführte Standardchemikalien wurden von den Firmen Invitrogen (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Calbiochem (San Diego, CA, USA) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

Die Diadenosinpolyphosphate, die in den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten zum Einsatz kamen, wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hartmut Schlüter,

Charité- Universitätsmedizin, Campus Benjamin Franklin, Med. Klinik IV
Endokrinologie und Nephrologie, synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Puffer

Blockierungspuffer:

TBS (einfach), 0,1% Tween-20, 5% fettfreie Trockenmilch

Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris-Base, 0,19 M Glycin, 0,1% SDS, H₂O

Elektrophorese-Probenpuffer:

0,125 mM Tris (pH 6,8 , 2% SDS, 10% Glycerin, 0,75 mM β -Mercaptoethanol,
0,006% Bromphenolblau)

HBS-Puffer:

128 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5,5 mM Glucose, 10 mM Hepes, 1 mM
CaCl₂, 0,2% BSA

Phosphatpuffer PBS:

140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄

Puffer A:

140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 25 mM Glucose, 25 mM
Hepes, 0,05% BSA, 2 mM CaCl₂, pH 7,2

TBS (zehnfach):

50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl

TTBS:

TBS (einfach), 0,1% Tween20

Transferpuffer:

25 mM Tris-Base, 0,2 M Glycin, 20% Methanol, pH 8,5

2.1.3 Seren, Medien

Komplettmedium (CM) für GMZ:

Minimum Essential Medium mit Earls Basal Salts (MEM-EBS, Invitrogen)

- + 10% fötales bovines Serum (Invitrogen)
- + 200 mM Glutamin (Invitrogen)
- + 10 mg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)
- + 10 ml Tryptose Phosphate Broth Medium (Sigma)

Quiescence-Medium (QM) für GMZ:

Minimum Essential Medium mit Earls Basal Salts (MEM-EBS, Invitrogen)

- + 200 mM Glutamin (Invitrogen)
- + 10 mg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)
- + 10 ml Tryptose Phosphate Broth Medium (Sigma)
- + Transferrin (25 µl einer 4 mg/ml Lösung)
- + 500 mg/l Rinderserumalbumin, BSA (Sigma)

Komplettmedium (CM) für Swiss-3T3:

Dulbecco`s modifiziertes Eagle-Medium (DMEM)

- + 10% fötales bovines Serum (Invitrogen)
- + 200 mM Glutamin (Invitrogen)
- + 10 mg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)

Quiescence-Medium (QM) für Swiss-3T3:

Dulbecco`s modifiziertes Eagle-Medium (DMEM)

- + 200 mM Glutamin (Invitrogen)
- + 10 mg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)
- + Transferrin (25 µl einer 4 mg/ml Lösung)
- + 500 mg/l Rinderserumalbumin, BSA (Sigma)

2.2 Methoden

2.2.1 Protein-Gel-Elektrophorese und Westernblot

Die zuvor über drei Tage unter serumfreien Bedingungen in 60 mm breiten Kulturschalen kultivierten GMZ wurden mit den zu untersuchenden Agonisten stimuliert und daraufhin mit PBS (4 °C) zweimalig gewaschen. Mittels Probenpuffer (200 µl) wurden die GMZ aus den Kulturschalen abgekratzt und eingefroren.

Zur Auftrennung von Proteinen hinsichtlich ihrer Größe wurden 10% Polyacrylamid-Gele in einer Mini-Protean-Elektrophoresekammer (Bio-Rad, Life Science Group, USA) verwendet. Diesem Trenngel war ein 4% Polyacrylamid-Sammelgel aufgeschichtet, dessen Taschen zur Auftragung der Proteinproben dienten. Bei einer Temperatur von 4 °C wurden unter einer konstanten Spannung von 60 V die Proteine in das Sammelgel transferiert, bevor die Auftrennung des Proteingemisches im Trenngel bei gleicher Temperatur unter einer Spannung von 120 V erfolgte.

Die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden bei 4 °C innerhalb von 90 Minuten unter einer konstanten Spannung von 110 V im Tanksystem (Bio-Rad) auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Zur Überprüfung des vollständigen Transfers der Proteine während des Blottens wurden nach der Übertragung die Gele mit Coomassie Blue eingefärbt. Nachdem die Membranen zur Absättigung der freien Bindungsstellen für eine Stunde in einem Blockierungspuffer, der 5% fettfreie Trockenmilch enthielt, inkubiert wurden, erfolgte in einem zweiten Schritt über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem primären Antikörper, der im Blockierungspuffer verdünnt war. Die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper wurde innerhalb einer Stunde durchgeführt, bevor sich die Lumiglo-Chemolumineszenz-Reaktion zur Darstellung der mit Meerettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper anschloss. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Membranen dreimalig für jeweils 5 Minuten mit einem TTBS-Puffer gewaschen. Je nach Abhängigkeit des Signals wurden Kodak X-OMAT-Filme mit den Membranen über 30 Sekunden bis hin zu maximal 5 Minuten in Filmkassetten exponiert.

2.2.2 Zellkultur

Die verwendeten Primärkulturen glatter Gefäßmuskelzellen von neugeborenen Ratten (bis zu fünf Tagen nach der Geburt) wurden nach der von Ives und Mitarbeiter publizierte Methode (1978) isoliert und in einem MEM-Komplettmedium bei einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre von 5% CO₂ und einer Temperatur von 37 °C vermehrt. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte durch die Zugabe einer 1% Trypsin-EDTA-Lösung. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt, bis die Zellen eine Konfluenz erreichten. Bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten kamen Zellen der Passagen 12 bis 20 zum Einsatz.

Swiss 3T3-Zellen wurden in Dulbecco`s modifiziertem Eagle`s Medium (DMEM), das zusätzlich 10% fötales bovines Serum (FBS) beinhaltet, kultiviert. Um serumentzogene Swiss 3T3-Zellen zu erhalten, wurden die Zellkulturen nach Erreichen einer Konfluenz für 24 Stunden im modifizierten DMEM ohne FBS gezüchtet.

2.2.3 Intrazelluläre Kalziummessung

Die drei Tage unter serumfreien Bedingungen auf 24 mm breiten Glasplättchen kultivierten glatten Muskelzellen der neonatalen Ratte wurden unter Lichtschutz bei 37 °C mit dem in HBS-Puffer (Hepes-buffered saline) gelösten Kalziumsensitiven Farbstoff Fura-2 (2 µM) für 20 Minuten beladen. Nach einmaligem Waschen mit HBS-Puffer wurden die mit den Zellen bedeckten Glasplättchen in die Messkammer eines invertierten Mikroskops (Axiovert 100, Carl Zeiss, Oberkochen), an das ein Monochromator (TILL-Photonics) angeschlossen war, eingespannt. Alternierend wurde Fura-2 mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt, um das daraus resultierende Emissionslicht über einen 505 nm-Langpassfilter zu filtern und um dies mit einer 12-bit CCD-Kamera aufzunehmen. Nach Abzug des Hintergrundsignals wurden die intrazellulären Kalziumkonzentrationen nach Grynkiewicz und Mitarbeiter (1985) berechnet.

Die für diese Berechnungen notwendigen Werte R_{max} , R_{min} und $F^{380}(max/min)$ wurden mittels Fura-2-beladenen Zellen nach Zugabe von 1 µM Ionomycin und 10 mM $CaCl_2$ bzw. 10 mM EGTA bei einem pH von 7,8 ermittelt.

2.2.4 Fluoreszenz-Mikroskopie

Swiss 3T3 Zellen wurden auf 8-Lochplatten ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz in modifizierten DMEM mit 10% fötalen bovinen Serum kultiviert. 24 Stunden vor dem Beginn der Experimente wurden die jeweiligen Zellkulturen mit serumfreien modifizierten DMEM inkubiert.

Zur Stressfaserinduktion fand eine 30-minütige Stimulation mit den entsprechenden Agonisten statt, bevor sich ein dreimaliges Waschen mit dem PBS-Phosphatpuffer anschloss. Die gewaschenen und die durch diverse Stimuli aktivierten Zellen wurden daraufhin 20 Minuten mit 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert und anschließend 5 Minuten lang durch den Zusatz von 0,1% Triton X-100/PBS permeabilisiert. Einem weiteren dreimaligen Waschen folgte eine 25-minütige Inkubation der Zellen mit 1% BSA/PBS, um eine Absättigung freier Bindungsstellen zu erreichen. Dem wiederholten Waschvorgang schloss sich zur Lokalisation des polymerisierten Aktins unter Lichtausschluss eine 40-minütige Inkubation mit 5 U/ml ALEXA-Phalloidin an.

Sämtliche Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem Inversmikroskop (Axiovert 100, Carl Zeiss, Oberkochen).

2.2.5 ³H-Thymidin-Einbau

Glatte Gefäßmuskelzellen (GMZ) wurden auf einer 24-Lochplatte kultiviert und vor Beginn des Experimentes drei Tage unter serumfreien Bedingungen subkultiviert. Die Aktivierung der Zellen erfolgte mit entsprechenden Agonisten über 24 Stunden. Während der letzten 6 Stunden der eintägigen Aktivierung der Zellen durch die jeweiligen Agonisten wurden die Zellen zusätzlich mit radioaktiv markierten Thymidin (1 μ Ci/ml) exponiert. Das im Rahmen einer Proliferation der GMZ eingebaute radioaktiv markierte Thymidin diente bei dessen Quantifizierung im späteren Verlauf als Nachweis einer stimulierten DNA-Synthese der untersuchten Zellkulturen.

Nach der eintägigen Stimulation der GMZ wurden die Zellen drei Mal mit Puffer A gewaschen und darauf für 30 Minuten mit 15% Trichloressigsäure (TCA) behandelt. Nach einem zweimaligen Waschen der GMZ mit destilliertem Wasser wurden sie für 20 Minuten getrocknet. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch die Zugabe einer 1 M NaOH (0,5 ml), zu der nach weiteren 20 Minuten zusätzlich 0,5 ml 1 M HCl gegeben wurde.

Die nun in Wasser gelösten Zellen wurden mit einer Szintillationsflüssigkeit gemischt und die Radioaktivität mit Hilfe eines „Liquid Scintillation Analyzer“ gemessen.

2.2.6 Zellzählung

Die neonatalen GMZ der Ratte wurden über drei Tage unter serumfreien Bedingungen kultiviert und in den sich anschließenden acht Tagen mit den entsprechenden Agonisten stimuliert. Während der achttägigen Aktivierung erfolgte alle 24 Stunden ein Wechsel des Kulturmediums, in dem die untersuchten Agonisten mit definierten Konzentrationen gelöst waren. An jedem zweiten Tag wurden aus den entsprechenden Kulturschalen mittels Trypsin die GMZ gelöst und deren Zahl in einer Neubauer Zellzählkammer bestimmt. Dazu wurden jeweils vier Quadranten der

Zählkammer in doppelter Ausführung ausgezählt, um aus den sich daraus ergebenden acht Werten den Mittelwert mit den dazu gehörenden Standardabweichungen zu ermitteln.