

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank für Bakterienkultur	Heraeus
Cleanbench LaminAir HB2472	Heraeus
CO ₂ -Inkubator für die Zellkultur	Heraeus
Cryostat Jung Frigocut 2800E	Leica
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Fastblot Semi-Dry Blotter	Biometra
FPLC-System	Pharmacia
GeneArray Scanner 3000	Affymetrix
Homogenisiergerät Polytron PT 1200	Kinematica AG
Horizon 10.14 Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	GibcoBRL
Inkubationsschüttler für Bakterienkulturen	Infors AG
LumiCount	Packard
Microplate Fluorescence Reader Flx800	Bio-Tek Instruments
Mikroskop Axioskop 40	Zeiss
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Novex Mini-Cell Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)-Kammer	Invitrogen
Plattenschüttler Titramax 100	Heidolph
Photometer Smart Spec 3000	Bio-Rad
Pipetten Reference P10, P100, P1000	Eppendorf
PTC-200 Peltier thermal Cycler	MJ Research
Rotor SS-34	Sorvall
TaqMan ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultrazentrifuge RC 5B Plus	Sorvall
UV-Transilluminator UVT-20 M	Herolab
VICTOR Light 1420 Luminescence Counter	PerkinElmer
Wasserbad	GFL
Zellzähler CASY	Schärfe System
Zentrifugen	Heraeus

2.1.2. Kits

Blood & Cell Culture DNA Mini Kit	Qiagen
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega
DNeasy Tissue Kit	Qiagen
Herculase Hotstart (2x) PCR Master Mix	Stratagene
HG-U133-Plus-2.0 Chip	Affimetrix
Labeling Kit	Enzo
Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Kit	Pierce
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Pierce
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen
Protein And RNA Isolation System (PARIS)	Ambion
Rapid DNA Ligation Kit	Roche
Ready-To-Go PCR Beads	Amersham Biosciences
RNA 6000 Nano LabChip Kit	Agilent Technologies
RNA 6000 Nano Reagents & Supplies	Agilent Technologies
RNeasy Mini Kit	Qiagen
ProBond Purification System	Invitrogen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
SteadyLite HTS	PerkinElmer
SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen
TaqMan 2x PCR Master Mix	Applied Biosystems
TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor	Invitrogen
SigmaFast Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablet Sets	Sigma
Vectastain ABC-AP Kit	Vector Laboratories

2.1.3. Verbrauchsmaterial

10 ml Säule	Pharmacia
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Device (10 kDa NMWL)	Millipore
CulturePlate-96 (weiß)	PerkinElmer
Deckgläser	Menzel-Gläser
Einmal-Küvetten	Brand
Einmalpipetten (steril)	Falcon
Fettstift für Immunhistochemie	DakoCytomation
Filterpapier	Bio-Rad

Korkplättchen	Enno Vieth GmbH
Membranfilter 0,45 µm	Schleicher&Schuell
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
Nitrozellulose-Membran	Schleicher&Schuell
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel 1,5mm x 10 well	Invitrogen
Objekträger SuperFrost Plus	Menzel-Gläser
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems
Petrischalen Easy Grip, Durchmesser 10 cm	Falcon
Pipettenspitzen	Eppendorf
OptiPlate-96 (weiß)	PerkinElmer
QIAshredder	Qiagen
Reagenzgefäße 500 µl, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Rollerflaschen Cell Master	Greiner Labortechnik
Röntgenfilm Hyperfilm	Amersham Biosciences
Filter Unit 0,2 µm	Nalgene
TopSeal-A: 96-Well Microplates	PerkinElmer
UVette	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	TPP
Zellkulturflaschen Costar	Corning Inc.
Zellkulturschalen Easy Grip, Durchmesser 6 cm	Falcon
Zellkulturschalen Primaria, Durchmesser 10 cm	Falcon
Zellkulturplatten Costar 12, 24, 48, 96 well	Corning Inc.

2.1.4. Chemikalien

Aceton	Merck
Agar	Invitrogen
Agarose	GibcoBRL
AlamarBlue	Biosource
Ampicillin	Roth
Aquatex	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
Bio-Rad Protein Assay Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Calbiochem
Collagen G (4 mg/ml)	Biochrom AG
dH ₂ O	Reinstwasseranlage der

	Firma Millipore
dH ₂ O (DNase, RNase frei)	GibcoBRL
dNTP Set (je 100 mM)	Roche
DTT	Sigma
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
EDTA	Merck
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	GibcoBRL
Ethanol (pro analysi)	Merck
Formaldehydlösung (37 %)	Merck
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche
G418 (50 mg/ml)	Calbiochem
Glucose	Merck
Glycerin 87%	Merck
Hämatoxylin QS	Vector Laboratories
HCl 37%	Merck
Heparin	Sigma
Hygromycin B	CN biosciences
Imidazol (3 M, pH 6)	Invitrogen
Isopropanol	Merck
L-Ascorbinsäure	Sigma
L-Glutamin	PAA Laboratories
Lipofectin Reagent	GibcoBRL
Magermilchpulver	Fluka
Methanol	Merck
MgCl ₂	Merck
n-Pentan	Merck
NaCl	Merck
Na-Deoxycholat	Sigma
Na-Orthovanadat	Sigma
NaF	Merck
NaOH Plättchen	Merck
Na ₄ P ₂ O ₇	Merck
Natriumpyruvat	PAA Laboratories
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Nonidet P-40 Substitute	Fluka

Pefabloc SC-Protease Inhibitor (1M)	Roth
Pen/Strep (Penicillin-/Streptomycin)	PAA Laboratories
Pentan	Merck
Ponceau S	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail Tablets Complete (mit/ohne EDTA)	Roche
RNAlater	Ambion
RNAlater-ICE	Ambion
Roti-Block (10x)	Roth
SDS	Merck
TissueTek	Sakura
Topblock	Fluka
Tris (Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan)	Merck
Tris-HCl	Sigma
Triton-X100	Sigma
Tunicamycin	Sigma
Tween 20 (Polysorbat)	Merck
X-gal	Invitrogen
Xylencyanol	Fluka
Zn-Acetat	Merck

2.1.5. Zytokine und rekombinante Proteine

Activin A (rekombinant human)	R&D
Activin AB (rekombinant human)	R&D
Activin B (rekombinant human)	R&D
ActRIIA/Fc (rekombinant human)	R&D
ActRIIB/Fc (rekombinant human)	R&D
hALK1/Fc (rekombinant human)	R&D
mALK1/Fc (rekombinant murin)	R&D
bFGF (aufgereinigt aus Rinder-Hirn)	R&D
BMP-2 (rekombinant human)	R&D
BMP-6 (rekombinant human)	R&D
BMP-7 (rekombinant human)	R&D
BMPRII/Fc (rekombinant human)	R&D
Endoglin/Fc (rekombinant murin)	R&D
GDF-15 (rekombinant human)	R&D
IgG ₁ Fc (rekombinant human)	R&D

TGF- β 1 (rekombinant human)	R&D
TGF- β 1 (aufgereinigt aus Schweine-Blutplättchen)	R&D
TGF- β 2 (rekombinant human)	R&D
TGF- β 3 (rekombinant human)	R&D
T β RII/Fc (rekombinant human)	R&D
VEGF-A ₁₆₅	Reliatech (Braunschweig)

2.1.6. Antikörper

Bezeichnung	Art	Verdünnung	Hersteller
α -c-myc	Maus monoklonal (Klon 9E10)	1 :250	Roche
α -c-myc-Agarose-beads	Maus monoklonal (Klon 9E10)	1:50 (Fällung)	Roche
α -hCD105 (Endoglin)	Maus monoklonal (Klon SN6h)	1:100 (Luziferase-Assay)	Dako Cytomation
IgG ₁ Isotype Control	Maus	1:50 (Luziferase-Assay)	R&D
α -hALK1	Ziege polyklonal	1:500 (WB) 1:200 (IHC)	R&D
α -mALK1	Ziege polyklonal	1:500	R&D
α -pSmad1/5/8	Kaninchen polyklonal	1:1000	Cell Signaling
α -pSmad2/3	Kaninchen polyklonal	1:1000	Cell Signaling
α -Actin	Maus monoklonal (Klon C4)	1:30000	MP Biomedicals
α -mCD31	Ratte monoklonal (Klon MEC 13.3)	1:400	BD Pharmingen
α -Ratte-AP	Ziege polyklonal	1:300	Jackson ImmunoResearch
α -Ziege-Biotin	Kaninchen polyklonal	1:300	Jackson ImmunoResearch
Streptavidin-Biotin-AP		1:100	Vector Laboratories

2.1.7. Lösungen und Puffer

DNA-Probenpuffer (10x)	50% Glycerin 1 mM EDTA 0,4% Bromphenolblau 0,4% Xylencyanol
------------------------	--

Duschi-Lysepuffer	50 mM HEPES (pH 7,2) 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 100 mM NaF 10% Glycerin (v/v) 1,5% Triton-X100 1 Protease Inhibitor Cocktail Tablet Complete pro 50 ml
Formaldehydlösung	4 % Formaldehyd 4 mg/ml Glucose in PBS
Klenow-Puffer (10x)	500mM Tris-HCl (pH 8,0) 50mM MgCl ₂ 10mM DTT
PBST	0,05 % Tween-20 in PBS
RIPA-Lysepuffer	50 mM HEPES (pH 7,2) 10 mM EDTA 1% Nonidet P-40 0,5% Na-Deoxycholat 50 mM Na-Pyrosphosphat 100 mM NaF 1 mM Zn-Acetat 0,1% SDS 2 mM Na-Orthovanadat 1 Protease Inhibitor Cocktail Tablet Complete pro 50 ml
RT-Puffer (10x)	200 mM Tris-HCl (pH 8,4) 500 mM KCl
SDS Probenpuffer (4x)	1 ml Tris-HCl (pH 6,8) 0,8 ml Glycerin 10% SDS (v/v) 0,8 M β-Mercaptoethanol 1% Bromphenolblau ad 8 ml mit dH ₂ O
Western Blot Transferpuffer	50 ml NuPAGE Transfer Buffer (20x, Invitrogen) 100 ml Methanol ad 1 l mit dH ₂ O

Trypsin/EDTA-Lsg. (5g/l und 2g/l) in PBS (10x)	PAA Laboratories
Trypsin/EDTA Solution	PromoCell
Trypsin neutralizing solution	PromoCell
HEPES Pufferlösung (1 M)	Biochrom AG
HEPES Buffered Saline Solution (HepesBSS)	PromoCell
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen
PBS	Gibco BRL
PBS (10x)	PAA
PBS (mit Mg^{2+}/Ca^{2+})	Biochrom AG
Re-Blot Plus Strong Solution (10x)	Chemicon
Simply Blue SafeStain Färbelösung	Invitrogen
TAE-Puffer (50x)	Gibco
TCA-Lösung (50%)	Sigma

2.1.8. Medien

DMEM / Ham's F-12 (1:1) Medium	PAA Laboratories
Earle's Medium M199	PAA Laboratories
FCS (fötale Kälberserum)	GibcoBRL
HS (Humanserum)	Eigenherstellung (Sandra Zickelbein/ Kirstin Valdix, Schering AG, Berlin)
LB-Medium	20 g/l LB Broth Base Lennox L (Invitrogen) ad 1 l mit dH ₂ O autoklaviert
S.O.C. Medium (Invitrogen)	2% Trypton 0.5% Hefe Extrakt 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
Serumfreies Einfriermedium für HUVEC und HPAEC	Cryo-SFM (PromoCell)

Protein- und Serumfreies Medium für CHO-Zellen	HyQ PF CHO (Perbio HyClone)
MVEC-Vollmedium	Earle´s Medium M199 10% FCS 10% HS 2mM L-Glutamin 1% Non Essential Amino Acids (PAA) 1mM Natriumpyruvat 0,01% ECGS (Sigma) 5U/mL Heparin 1,27 mM Ascorbinsäure 0,5% Biotect Schutzmedium (Biochrom AG) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
MVEC-Magermedium	Earle´s Medium M199 2% HS
HPAEC- und HUVEC-Vollmedium	Endothelial Cell Growth Medium 2 (PromoCell) zur Kultur, Endothelial Cell Growth Medium 1 (PromoCell) vor Proliferationsassays
HPAEC- und HUVEC-Magermedium	Endothelial Cell Basal Medium ohne Zusätze (PromoCell) 0,5% FCS
Zelllinien-Vollmedium	DMEM/Ham´s F-12-Medium 10% FCS 2mM L-Glutamin 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin
Zelllinien-Magermedium	DMEM/Ham´s F-12-Medium 0-1% FCS 2mM L-Glutamin 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin
Serumfreies Transfektionsmedium	OptiMem (Gibco)

2.1.9. Enzyme

Acc65 I (10 U/µl)	New England BioLabs
Alkalische Phosphatase (1 U/µl)	Roche

Apa I (10 U/μl)	Roche
BamH I (20 U/μl)	New England BioLabs
Benzonase	Merck
EcoR I (20 U/μl)	New England BioLabs
Hind III (10 U/μl)	Roche
Klenow Enzyme (2 U/μl)	Roche
Kpn I (10 U/μl)	Roche
Mung Bean Nuclease (100 U/μl)	Roche
Not I (10 U/μl)	New England BioLabs
Proteinase K	Qiagen
Pvu II (10 U/μl)	Boehringer Mannheim
RNase A (10 mg/ml)	Qiagen
RNase-Free DNase (im Set mit Puffer RDD)	Qiagen
Sma I (10 U/μl)	Roche
Xba I (20 U/μl)	New England BioLabs
Xho I (10 U/μl)	Roche

2.1.10. Plasmide

pBluescriptR-TβRII	rzpd
pcDNA3.1/myc-HIS A	Invitrogen
pcDNA3.1-ALK1	Gregor Fachinger/Andrea Sturz (Schering AG, Berlin)
pcDNA3.1-ALK1-Q/D	Gregor Fachinger/Andrea Sturz (Schering AG, Berlin)
pcDNA3.1-ALK1-K/R	Gregor Fachinger/Andrea Sturz (Schering AG, Berlin)
pcDNA3.1-hALK1.ec	Gregor Fachinger/Andrea Sturz (Schering AG, Berlin)
pCMV-SPORT6-Smad3	rzpd
pCMV-SPORT6-BMPRII	rzpd
pSport1_Sfi-BMP-9	rzpd
pCRII-TOPO	Invitrogen
pGL3-Basic	Promega
pGL3-Control	Promega
pXP2	Promega
pOTB7-Endoglin	rzpd

pSecTag2/Hygro B	Invitrogen
------------------	------------

2.1.11. Primer, Sonden und RT-PCR-Primer/Sonden-Mix

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
Oligo(dT) ₂₀ Primer	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	Invitrogen
T7 forward	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Invitrogen
pcDNA3mcsR	5'-AGCGGGTTTAAACTCAATGGT-3'	MWG Biotech AG
ALK_Kin for	5'-ATGGGATCCCATGTCCGACGGAGGCAGGA-3'	TIB Molbiol
ALK_Kin for	5'-TAGGAATTCCTATTGAATCACTTTAGGCT-3'	TIB Molbiol
mALK1-ec_for	5'-AAGCTTGACTTGCGAAGGCCTTCCAA-3'	MWG Biotech AG
mALK1-ec_rev	5'-CTCGAGATCAATGCGGCCTTCAATAGGCAGAT GGGCATCAACTT- 3'	MWG Biotech AG
mALK1_for	5'-G TTCAGGCTCCCACAGCCCCGATAGACCTG-3'	MWG Biotech AG
mALK1_rev	5'-CAGGTCTATCGGGGCTGTGGGAGCCTGAAC-3'	MWG Biotech AG
TM-pSec_for	5'-ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT-3'	MWG Biotech AG
TM-pSec_rev	5'-CCGCCACTGTGCTGGATAT-3'	MWG Biotech AG
TM-hALK1_rev	5'-TCTCACACGTGCAGGTCACC-3'	MWG Biotech AG
TM-mALK1_rev	5'-TGTGGGCTCTCACAAGTGCAG-3'	MWG Biotech AG
TM-pSec Sonde	5'FAM-TTCCAGGTTCCACTGGTGACGCG- 3'TAMRA	MWG Biotech AG
hALK1 (Hs00163543_m1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems
hALK5 (Hs00610319_m1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems
hKDR (Hs00176676_m1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems
hId1 (Hs00704053_s1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems
hId2 (Hs00747379_m1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems
hTβRII (Hs00559661_m1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems
hBMPRII (Hs00176148_m1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems
hEndoglin (Hs00164438_m1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems

hNoggin (Hs00271352_s1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems
hGDF-15 (Hs00171132_m1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems
hIL1RL1 (Hs00249389_m1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems
hSmad6 (Hs00178579_m1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems
hSmad7 (Hs00178696_m1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems
mCD31 (Mm00476702_m1)	Primer + FAM/TAMRA-Sonde (20x Assay on Demand)	Applied Biosystems
hGAPDH (4310884E)	Primer + VIC/TAMRA-Sonde (20x Endogenous Control)	Applied Biosystems
Eukaryotic 18S rRNA (4310893E)	Primer + VIC/TAMRA-Sonde (20x Endogenous Control)	Applied Biosystems

2.1.12. DNA-, RNA- und Proteinstandards

50 bp DNA Ladder	2652, 800, 700-50 bp in 50 bp-Schritten	Invitrogen
DNA Molecular Weight Marker XIV	2642, 1500-100 bp in 100 bp-Schritten	Roche
1 kb Plus DNA Ladder	12000-2000 bp in 1000 bp-Schritten, 1650, 1000, 850, 650, 500-100 in 100 bp-Schritten	Invitrogen
RNA 6000 Ladder	4000, 2000, 1000, 500, 200 nt	Agilent Technologies
BenchMark Pre-Stained Protein Ladder	170,8; 109,5; 78,9; 60,4 (rot); 47,2; 35,1; 24,9; 18,3; 13,7; 5,7 kDa	Invitrogen
Precision Plus Protein Standard All Blue	250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa	Bio-Rad

2.1.13. Bakterienstämme, eukaryontische Zelllinien und Primärzellen

Bezeichnung	Genotyp/ Beschreibung	Herkunft
One Shot TOP10 chemically competent <i>E. coli</i>	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80/lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 ara\Delta 139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R)$	Invitrogen (TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor)

	<i>endA1 nupG</i>	
XL10-Gold ultracompetent <i>E. coli</i>	Tet ^r $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lac^fZAM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r</i>] ^a	Stratagene (QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit)
CHO	Ovarialzelllinie des chinesischen Hamsters	ATCC, Nr. CCL-61
A375	humane Melanoma-Zelllinie	ATCC, Nr. CRL-1619
A549	humane Lungenkarzinom-Zelllinie	ATCC, Nr. CCL-185
HepG2	humane Hepatoma-Zelllinie	ATCC, Nr. HB-8065
MS1	murine Endothelzelllinie "Mile Seven 1"	ATCC, Nr. CRL-2279
MCF7	humane Mammakarzinom-Zelllinie	ATCC, Nr. HTB-22
PAEC	Schweineaorta-Endothelzelllinie (Malassagne, Taboit et al. 1998)	Dr. Waltenberger (Universität Maastricht)
MVEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen	Eigenherstellung (Sandra Zickelbein, Schering AG, Berlin), wie bei Piossek, Schneider-Mergener et al. (1999) beschrieben aus Vorhäuten isoliert
HUVEC	humane venöse Nabelschnur-Endothelzellen	PromoCell, Nr. C-12200
HPAEC	humane arterielle Lungen-Endothelzellen	PromoCell, Nr. C-12241

2.1.14. Mäuse

Stamm: Nacktmäuse NMRI *nu/nu*

weiblich, 6-7 Wochen alt

Herkunft: Moellegard

Haltung: keimfrei (Schering AG)

2.1.15. Software

Vector NTI 9.0

Genedata Expressionist Analyst Pro

2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.1. Kultivierung und Lagerung von *E. coli*-Stämmen

Zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen aus Glycerinstocks oder aus einzelnen Bakterienkolonien von Agarplatten (siehe 2.2.2.) wurden üblicherweise 100 ml LB-Medium mit dem Bakterienstamm angeimpft („Midi-Präp“). Die Bakterienkulturen wurden über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37°C und 180 rpm mit den entsprechenden Antibiotika -Zusätzen (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) kultiviert. Die dauerhafte Konservierung von Bakterienstämmen erfolgte durch Zusatz von 0,4 ml Glycerin zu 1,6 ml einer Übernachtskultur und Lagerung bei -80°C.

2.2.2. Transformation von *E. coli*

Für die Herstellung der Agarplatten wurde LB-Medium vor dem Autoklavieren mit 1,5 % Agar versetzt. Das Agarmedium wurde zum Gießen der Platten in der Mikrowelle verflüssigt und mit dem benötigten Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) ergänzt. Bei einer Transformation mit pCRII-TOPO wurden die Platten zusätzlich mit 40 µl X-Gal-Lösung (40 mg/ml) bestrichen, so dass am Tag nach dem Ausplattieren weiße oder hellblaue Kolonien, die das Plasmid mit dem Insert (siehe 2.3.12.) enthalten, gepickt werden können.

2 µl der DNA-Lösung aus einem Ligationsansatz (siehe 2.3.12.) oder 20 ng DNA aus einer Plasmidpräparation (siehe 2.3.1) wurden mit 50 µl Suspension chemokompetenter One Shot TOP10 *E. coli* Zellen versetzt. Bei einer Transformation nach einer PCR-Mutagenese (siehe 2.3.7.3.) wurden 45 µl XL10-Gold *E. coli*-Suspension verwendet, zu denen nach Zugabe von 2 µl β-Mercaptoethanol-Mix und Inkubation auf Eis für 10 min ebenfalls 2µl DNA-Lösung hinzugefügt wurden. Die TOP10-Zellen wurden anschließend 5 min auf Eis inkubiert, die XL10-Gold-Zellen 30 min. Der anschließende Hitzeschock erfolgte für 30 sec bei 42°C, worauf eine 2-minütige Abkühlung auf Eis folgte. Nach Zusatz von 250 µl (bzw. 500 µl bei den XL10-Gold-Zellen) S.O.C. Medium und Inkubation für 60 min bei 37°C unter Schütteln wurden 25-250 µl der Bakteriensuspension auf Agarplatten mit Selektionsmedium und bei Bedarf X-gal ausplattiert. Die Platten wurden zur Anzucht über Nacht umgekehrt im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die Einzelkolonien wurden in einer analytischen PCR überprüft (siehe 2.3.7.1.) oder zum Animpfen von Übernachtskulturen verwendet (siehe 2.2.1.).

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen erfolgte mit Hilfe des QIAfilter Plasmid Midi Kits. Dazu wurde eine 100 ml Übernachtskultur (siehe 2.2.1.) für 15 min in der Heraeus-

Kühlzentrifuge bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert, der 0,1 mg/ml RNase A enthält, um bakterielle RNA abzubauen. Die alkalische Lyse der Zellen wurde durch Zugabe von 4 ml Puffer P2 bewirkt. Nach Neutralisation mit 4 ml Puffer P3 wurden Zelltrümmer und Präzipitate durch Filtrieren durch eine QIAGEN-tip 100 Säule entfernt. Die Säule wird gewaschen und anschließend die DNA mit Puffer QF eluiert. Danach wurde die DNA mit 3,5 ml Isopropanol (0,7 Volumen-Einheiten) gefällt, zentrifugiert und das DNA-Pellet mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation, nach der das luftgetrocknete DNA-Pellet in 100 µl dH₂O (DNase, RNase frei) aufgenommen wurde. Die DNA-Ausbeute wurde wie unter 2.3.2. beschrieben spektrophotometrisch bestimmt.

2.3.2. DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA- bzw. RNA-Proben wurden 1:10 bis 1:100 mit dH₂O (DNase, RNase frei) in UVetten verdünnt und ihre Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm BioPhotometer aufgenommen. Um die Verunreinigung der Präparation mit Proteinen zu ermitteln, wurde außerdem die Absorption bei 280 nm gemessen. Die Konzentration der Nukleinsäuren ergibt sich nach den folgenden Formeln:

$$\text{dsDNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} * 40 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.3.3. RNA-Isolation

Die RNA-Aufreinigung bei gleichzeitiger Protein-Isolation aus Tumorproben erfolgte mit Hilfe des PARIS-Kits. Tumore wurden entweder direkt nach der Entnahme im 10-fachen Volumen an RNAlater bei +4°C gelagert, oder, wenn bereits bei -80°C eingefroren, über Nacht bei -20°C im 10-fachen Volumen an kaltem RNAlater-ICE inkubiert. In 2 ml Cell Disruption Buffer wurden die Tumore mit Hilfe des Homogenisiergeräts Polytron PT 1200 homogenisiert. Die Hälfte des Homogenats wurde zur Protein-Isolation 5-10 min auf Eis gestellt und anschließend bei -80°C gelagert (siehe 2.5.1.). Zur anderen Hälfte des Homogenats wurden 1 ml 2x Lysis/Binding Solution mit 1,5% β-Mercaptoethanol und 1 ml 100% Ethanol gegeben, und diese Mischung auf die Filter Cartridge pipettiert. Nach einem ersten Waschschrift wurde die DNA durch Zugabe von 10 µl RNase-Free DNase I in 70 µl Puffer RD direkt auf der Säule abgebaut. Es folgten zwei weitere Waschschrift mit steigender Salzkonzentration. Die RNA wurde mit 100 µl 95°C heißer Elution Solution eluiert und bei -80 °C gelagert.

Die reine RNA-Aufreinigung aus Gewebekulturzellen und Tumoren erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits. Die Tumore wurden wie oben beschrieben erst in RNAlater bzw. RNAlater-ICE inkubiert. Pro Tumor wurden 15-30 mg in 600 µl RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol aufgenommen und mit Hilfe des Homogenisiergeräts Polytron PT 1200 homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat zentrifugiert und der Überstand wie untenstehend für

Zellen beschrieben weiterbehandelt. Zur RNA-Isolierung aus Gewebekulturzellen wurden 10^6 bis 10^7 Zellen in 600 μ l RLT-Puffer mit 1% β -Mercaptoethanol aufgenommen, lysiert und mittels QIAshredder homogenisiert. Nach Zugabe von 600 μ l 70% Ethanol wurde das Tumor- oder Zelllysat auf die RNeasy Mini Säule pipettiert. Die Membran wurde ebenfalls drei Mal mit steigender Salzkonzentration gewaschen, und die DNA wie oben beschrieben mittels DNase-Abbau entfernt. Die RNA wurde mit 50 μ l RNase-freiem dH₂O eluiert und bei -80°C gelagert. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese im Agilent Bioanalyzer überprüft (siehe 2.3.4.) und die Ausbeute der RNA-Isolation spektrophotometrisch bestimmt (siehe 2.3.2.).

2.3.4. Bestimmung der RNA-Qualität

Die Analyse erfolgte durch Gelelektrophorese mit dem RNA 6000 Nano LabChip Kit und den RNA 6000 Nano Reagents & Supplies im Agilent 2100 Bioanalyzer.

Hierzu wurde der Chip mit einer Mischung aus 65 μ l Gel Matrix und 1 μ l Farbstoffkonzentrat beladen, und danach 5 μ l des Markers in jede Vertiefung pipettiert. Nach Denaturierung bei 70°C wurde je 1 μ l der RNA-Proben und des Größenstandards RNA 6000 Ladder auf den Chip gegeben. Anschließend wurde im Bioanalyzer die Gelelektrophorese durchgeführt und die Daten ausgewertet. Aus dem Verhältnis von 18S rRNA (Peak bei ca. 40 sec.) und 28S rRNA (Peak bei ca. 46 sec.) können Rückschlüsse auf den Grad der Degradierung der RNA geschlossen werden. Der Quotient muss zwischen 1,8 und 2,0 liegen, damit die RNA eine ausreichend gute Qualität hat, um in der RT-PCR (siehe 2.3.7.4.) eingesetzt werden zu können.

2.3.5. Reverse Transkription

Die mRNA der bei der RNA-Isolation gewonnenen Gesamt-RNA wurde mit dem SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 5 μ g RNA mit 1 μ l 50 μ M Oligo(dT)₂₀ Primern versetzt. Für eine anschließende Real-Time PCR (RT-PCR) wurden nur 120 ng RNA und 1 μ l 5 μ M Oligo(dT)₂₀ Primer eingesetzt. Nach Zugabe von 1 μ l 10 mM dNTP Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) wurde die Lösung mit DEPC-behandeltem Wasser auf 10 μ l aufgefüllt und für 10 min bei 70°C denaturiert. Zu dieser Lösung wurden auf Eis 2 μ l 10x RT-Puffer, 4 μ l 25 mM MgCl₂, 2 μ l 0,1 M DTT, 1 μ l RNaseOUT (40 U/ μ l) und 1 μ l Superscript III RT (200 U/ μ l) zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte bei 50°C für 50 min, und anschließend wurde der Ansatz für 5 min auf 85°C erhitzt. Um vor einer RT-PCR die RNA zu entfernen, wurde 1 μ l *E. coli* RNase H (2 U/ μ l) zugefügt und 20 min bei 37°C inkubiert. Die erzeugte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.6. DNA-Isolation

Geasmt-DNA wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit isoliert. Dazu wurden 5×10^6 Zellen in 200 μ l PBS resuspendiert und nacheinander mit 20 μ l Proteinase K und Puffer AL versetzt, um

sowohl Zellmembran als auch Kernmembran aufzulösen. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol wurde die Lösung durch die DNeasy Mini spin column zentrifugiert, an deren Silicagel-Membran die DNA bindet. Im Anschluss an zwei Waschschriffe mit je 500 µl Puffer AW1 und AW2 wurde die DNA mit 200 µl Puffer AE eluiert.

Ausbeute und Qualität der DNA-Isolation wurde spektrophotometrisch (siehe 2.3.2.) bestimmt und die DNA-Lösungen bei -20 °C gelagert.

2.3.7. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation definierter DNA- bzw. cDNA-Fragmente. Als Primer für die DNA-Synthese werden synthetische Oligonukleotide von ca. 20 nt Länge verwendet, die komplementär zu Anfang und Ende des zu amplifizierenden Bereichs sind. Zunächst muss die doppelsträngige DNA (dsDNA) in Einzelstrang-DNA (ssDNA) überführt werden (Denaturierung). Darauf folgt die „Annealing“-Phase, in der die Primer mit den komplementären Bereichen auf der DNA hybridisieren. Während der „Extension“ wird durch die Reaktion der DNA-Polymerase mit den dNTPs neue DNA synthetisiert. In jedem Zyklus wird die gesamte vorhandene DNA verdoppelt. Der abschließende Extensionsschritt dient der Vervollständigung der DNA-Fragmente.

Die PCR erfolgte in einem PTC-200 Peltier thermal Cycler in der Regel nach folgendem Programm:

Denaturierung: 5 min 95°C	} 30 Zyklen
Denaturierung: 30 sec 95°C	
Annealing: 1 min 51-60°C	
Extension: 2 min 72°C	
Extension: 8 min 72°C	

Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Basenzusammensetzung der Primer. Je höher der GC-Gehalt, desto höher sollte die Annealing-Temperatur gewählt werden. Da mit steigender Annealing-Temperatur die Spezifität der Primer-Bindung zunimmt, kann durch Veränderung dieses Parameters der Grad der Stringenz bestimmt werden.

2.3.7.1. Analytische PCR

Um den Erfolg einer Klonierung zu überprüfen, wurden Einzelkolonien der zu untersuchenden Bakterien (siehe 2.2.2.) als Ausgangs-DNA verwendet und mit Primern für das Insert oder komplementär zur DNA auf beiden Seiten der multiple cloning site (MCS) des Vektors amplifiziert. Zur Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener Zelltypen wurde die RNA aus den Zellen isoliert (siehe 2.3.3.), die mRNA in cDNA umgeschrieben (siehe 2.3.5.) und eine PCR mit Primern spezifisch für das zu untersuchende Gen durchgeführt.

Es wurden hierbei Ready-To-Go PCR Beads verwendet, die in 0,2 ml-Reagenzgefäßen als getrocknete Kügelchen vorliegen. Nach Aufnahme in 25 µl enthielt ein Ansatz 1,5 U *Taq* DNA-Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, und 200 µM von jedem dNTP. Zuerst wurden die Beads bei 37°C in 15 µl dH₂O (DNase, RNase frei) gelöst, dann pro Ansatz je 10 pmol (entspricht 0,4 µM) forward und reverse Primer hinzugefügt und mit dH₂O (DNase, RNase frei) auf 25 bzw. 23 µl aufgefüllt. Die zu untersuchenden Bakterienkolonien wurden mit einer 100 µl-Pipettenspitze gepickt und in die vorgelegten PCR-Ansätze übertragen, oder 2 µl cDNA hinzupipettiert. Die PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt und die PCR-Produkte anschließend auf einem Agarose-Gel (siehe 2.3.10.) analysiert.

2.3.7.2. Präparative PCR

Da hierbei das PCR-Produkt in Klonierungen weiterverarbeitet wurde, musste die Fehlerrate der DNA-Amplifikation durch Verwenden einer Polymerase mit hoher ‚proof-reading‘ Aktivität (z.B. *Pfu* DNA-Polymerase) minimal gehalten werden. Dazu wurde der Herculase Hotstart (2x) PCR Master Mix verwendet, der aus optimiertem PCR Reaktionspuffer, Magnesium, dNTPs und einer DNA-Polymerase-Komposition (0,1 U/µl) besteht, die überwiegend *Pfu*-Polymerase enthält. Pro PCR-Ansatz wurden zu 12,5 µl des 2x Master Mix 1-10 ng cDNA oder Plasmid-DNA und je 10 pmol forward und reverse Primer pipettiert und mit dH₂O (DNase, RNase frei) auf 25 µl aufgefüllt. Die PCR wurde wie in 2.3.7. beschrieben durchgeführt und die erhaltenen DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.3.11.) aufgetrennt und anschließend isoliert.

2.3.7.3. PCR-Mutagenese

Diese Art der PCR wurde verwendet, um gezielt Mutationen in Plasmide einzuführen oder unerwünschte Punktmutationen zu korrigieren. Mit komplementären Primern, die die gewünschte Mutation enthalten, wurde eine PCR auf dem Plasmid durchgeführt, wodurch Plasmide mit der mutierten Sequenz amplifiziert wurden. Ein PCR-Mutagenese-Ansatz wurde mit dem QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit wie folgt angesetzt:

5 µl 10x reaction buffer
10 ng DNA Template (pCRII-TOPO-mALK1.ec mit Punktmutation)
125 ng Primer 1 (mALK1_for)
125 ng Primer 2 (mALK1_rev)
1 µl dNTP mix
3 µl QuikSolution
ad 50 µl dH₂O (DNase, RNase frei)
1 µl *PfuTurbo* DNA-Polymerase

Die PCR wurde im PTC-200 Peltier thermal Cycler nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung:	1 min 95°C	} 18 Zyklen
Denaturierung:	50 sec 95°C	
Annealing:	50 sec 60°C	
Extension:	4 min 68°C	
Extension:	7 min 68°C	

Als Extensionszeit wurde für das Plasmid pCRII-TOPO-mALK1.ec 4 min gewählt, da vom Hersteller pro kb Plasmidlänge 1 min vorgeschrieben wird.

Nach der PCR wurde der Ansatz 2 min auf Eis gekühlt, bevor er mit 1 µl *Dpn* I (10 U/µl) für 60 min bei 37°C inkubiert wurde. Durch die für methylierte DNA spezifische *Dpn* I Endonuklease wurde das Parental-Plasmid abgebaut, da es in *E. coli* synthetisiert wurde und daher methyliert war.

Anschließend wurde das mutierte Plasmid direkt in der Transformation von XL10-Gold *E. coli* (siehe 2.2.1.) verwendet.

2.3.7.4. Real-Time PCR (RT-PCR)

RT-PCR detektiert die Akkumulation eines PCR-Produkts während der PCR-Reaktion, wodurch eine semiquantitative Abschätzung der Menge der Ausgangs-cDNA und daher der Transkriptmenge eines bestimmten Gens in der RNA-Präparation möglich ist. Beim sogenannten TaqMan wird dazu eine Sonde verwendet, die am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporter (z.B. FAM, VIC) trägt, dessen Emission durch den Quencher (z.B. TAMRA, MGB) am 3'-Ende verhindert wird. Die Sonde bindet an eine Sequenz auf der Template-DNA zwischen forward und reverse Primer. Wenn die AmpliTaq Gold DNA Polymerase das PCR-Produkt synthetisiert, spaltet sie dabei aufgrund ihrer 5'-Exo-Nuklease-Aktivität die Sonde, und die Fluoreszenz des Reporters kann detektiert werden.

Es wurden die Gene ALK1, ALK5 (TβRI), KDR, Id1, Id2, TβRII, BMPRII, Endoglin, Noggin, GDF-15, IL1RL1, Smad6, Smad 7, CD31, exogenes hALK1.ec bzw. mALK1.ec und hGAPDH oder eukaryontische 18S rRNA als Referenzgen (zur relativen Quantifizierung der Genexpression) betrachtet. Zur Durchführung des TaqMan wurde der TaqMan 2x PCR Master Mix verwendet, der die Enzyme AmpliTaq Gold DNA Polymerase und AmpErase Uracil N-Glycosylase (zur Entfernung von PCR-Produkten aus vorhergehenden PCRs), sowie dNTPs mit dUTP, Passive Referenz I (zur Signalnormierung in allen 5'-Nuklease Assays) und Pufferkomponenten enthält. Der 20x Assay on Demand (TaqMan Gene Expression Assay) enthielt eine Mischung aus den jeweiligen Primern (18 µM) und der FAM/TAMRA- oder FAM/MGB-markierten Sonde (5 µM) für das zu untersuchende Gen. Auch die hGAPDH und 18S rRNA Endogenous Control (VIC/TAMRA-markierte Sonden) wurden als 20x-Mix erhalten.

Zum Screening für hALK1.ec- bzw. mALK1.ec- und pSecTag2/Hygro B-Vektor-RNA in Tumorproben wurden forward und reverse Primer und eine FAM/TAMRA-markierte Sonde selbst entworfen und bei MWG bestellt. Untersuchtes Gen und Referenzgen wurden gleichzeitig in einem Reaktionsansatz betrachtet, um Pipettierungenauigkeiten zwischen den Ansätzen auszuschließen. Diese so genannte Multiplex-RT-PCR konnte durchgeführt werden, da die spezifischen Sonden für die endogene Kontrolle und für das untersuchte Gen Reporter mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen trugen, also VIC- bzw. FAM- markiert waren. In Vorexperimenten wurden die optimalen cDNA-, Primer- und Sonden-Konzentrationen ermittelt, bei denen sich in einer Multiplex-RT-PCR die verschiedenen Primer und Sonden gegenseitig nicht beeinflussen.

Ein 25 µl PCR-Ansatz bestand aus:

cDNA	5	µl (entspricht ca. 3 ng cDNA)
TaqMan 2x PCR Mastermix	12,5	µl
20x Assay on Demand	1,25	µl
Endogenous Control (20x)	1,25	µl
dH ₂ O (DNase, RNase frei)	5	µl

Der Ansatz zum Screening für hALK1.ec bzw. mALK1.ec und pSec-RNA bestand aus:

cDNA	5	µl
TaqMan 2x PCR Mastermix	12,5	µl
Forward Primer TM-pSec_for (10 µM)	0,5	µl
Reverse Primer TM-pSec_rev, TM-hALK1_rev oder TM-mALK1_rev (10 µM)	0,5	µl
Sonde TM-pSec Sonde (10 µM)	0,3	µl
Endogenous Control hGAPDH (20x)	1,25	µl
dH ₂ O (DNase, RNase frei)	4,95	µl

Jeder PCR-Ansatz wurde in Tripletts in eine MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate pipettiert, die mit einer durchsichtigen Folie (Optical Adhesive Covers) verschlossen wurde. Die Ansätze wurden folgendem PCR-Programm unterzogen:

Denaturierung: 10 min 95°C	} 40 Zyklen
Denaturierung : 15 sec 95°C	
Annealing und Extension: 1 min 60°C	

Zur Bestimmung der relativen Expression wurde die Differenz (ΔC_t) aus dem Schwellenwert (C_t) des untersuchten Gens und des Referenzgens GAPDH oder 18SrRNA gebildet. Die relative Expression des Gens lässt sich mit der folgenden Formel berechnen:

$$\text{rel. Expression} = 2^{-\Delta C_t}$$

Um diese ΔC_T -Auswertung verwenden zu dürfen, musste zuvor überprüft werden, ob die PCR-Reaktion von Primern und Sonde für das untersuchte Gen bei verschiedenen cDNA-Konzentrationen genauso effizient sind wie die der Primer und Sonde des Referenzgens. Dazu wurden RT-PCRs mit der endogenen Kontrolle hGAPDH und den Primern und Sonden für hALK1.ec und mALK1.ec und den Assays on Demand mit cDNA-Konzentrationen über 4 log-Stufen ausgeführt. Trägt man nun ΔC_T in Abhängigkeit vom log der Konzentration auf, müssen Geraden entstehen, die sich zwischen Gen und Referenzgen um nicht mehr als 0,1 in der Steigung unterscheiden.

2.3.8. Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsverdau bezeichnet das Schneiden von DNA mit Hilfe von bakteriellen Restriktionsendonukleasen. Für molekularbiologische Experimente werden vor allem Typ II Enzyme eingesetzt, wie z.B. Acc651, Apa I, BamH I, EcoR I, Hind III, Not I, Pvu II, Sma I, Xba I und Xho I. Diese spalten die DNA an spezifischen Stellen innerhalb einer meist palindromischen Erkennungssequenz, wobei entweder glatte Enden („blunt ends“) oder überhängende Enden („sticky ends“) entstehen können. Analytische Spaltungen erfolgten üblicherweise in 10 μ l-Ansätzen, die 2 U des Enzyms, 1 μ l vom Hersteller mitgelieferten 10xPuffer und 1 μ g DNA enthielten. Für eine präparative Restriktion wurden 5-10 μ g DNA in 20-40 μ l eingesetzt, und die Volumina des Enzyms und Puffers entsprechend erhöht. Der Verdau erfolgte bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur, meist 37°C, für mindestens 2 Stunden. Der Restriktionsverdau wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.3.11.) überprüft, und bei einer präparativen Spaltung anschließend aus dem Gel isoliert. Wenn nach der Spaltung nur ein Fragment entstand, wurde dieses mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.3.9. DNA-Modifikationen durch Enzyme

Um nach dem Restriktionsverdau sticky ends in blunt ends umzuwandeln, wurden die überhängenden Nukleotide entweder mit der Mung Bean Nuclease abgebaut, oder 5'-Enden mit dem Klenow Enzyme aufgefüllt.

Der Abbau erfolgte in einem 100 μ l-Ansatz, der 10 μ g DNA, 10 U Mung Bean Nuclease (verdünnt in Mung Bean Dilution Buffer) und 10 μ l des mitgelieferten 10x Mung Bean Nuclease Buffer enthielt und mit dH₂O (DNase, RNase frei) aufgefüllt wurde. Die Reaktion wurde bei 37°C für 30 min durchgeführt, und anschließend mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Zum Auffüllen der 5'-Enden wurden 5 μ g DNA, 4 μ l 10x Klenow-Puffer, 0,2 μ l 10 mM dNTP-Mix und 10 U Klenow Enzyme Fragment mit dH₂O (DNase, RNase frei) auf 40 μ l aufgefüllt. Nach

Inkubation bei 37°C für 10 min wird das Enzym bei 70°C 10 min hitzeinaktiviert und die DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits aufgereinigt.

2.3.10. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese in 1%igen Agarosegelen. Dazu wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht und mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden mit ¼ Volumen an Ladepuffer gemischt und in die Probentaschen eingebracht. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurde zusätzlich ein entsprechender Längenstandard (50 bp DNA Ladder, DNA Molecular Weight Marker XIV oder 1 kb Plus DNA Ladder) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der Horizon 10.14 Agarose-Gelelektrophorese-Kammer bei 100 V in 1x TAE-Puffer für 60 min. Durch Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA konnte diese anschließend unter UV-Licht auf dem UV-Transilluminator UVT-20 M sichtbar gemacht werden. Für präparative Zwecke wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits nach Herstellerangaben isoliert.

2.3.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Vor einer Ligation müssen die 5'-Phosphatreste des geschnittenen Vektors entfernt werden, um eine Religation zu verhindern. Dazu wurden 1 µl Alkalische Phosphatase pro µg DNA mit 1/10 Volumen vom Hersteller mitgelieferten 10x Dephosphorylierungspuffer 60 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kits durchgeführt. Die darin enthaltene T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl-Gruppen und 5'-Phosphat-Gruppen in dsDNA, so dass komplementäre überhängende Enden und beliebige glatte Enden miteinander verbunden werden. Vektor-DNA und Insert-DNA wurden üblicherweise in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, und nicht mehr als 200 ng Gesamt-DNA pro Ansatz ligiert. Hierzu wurde die Mischung aus Vektor- und Insert-DNA mit der entsprechenden Menge 5x DNA Dilution Buffer versetzt und die Lösung mit dH₂O (DNase, RNase frei) auf 10 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 10 µl T4 DNA Ligation Buffer und 1 µl T4 DNA Ligase wurde der Ansatz 5 min bei 15-25°C inkubiert und direkt in der Transformation von One Shot TOP10 *E. coli* (siehe 2.2.2.) verwendet.

PCR Produkte wurden in den Vektor pCRII-TOPO kloniert, um ein darauffolgendes Schneiden mit Restriktionsenzymen zu erleichtern. pCRII-TOPO aus dem TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor liegt linearisiert vor und hat an den 3'-Enden an ein überhängendes Thymidin kovalent das Enzym Topoisomerase I gebunden, welches die Ligation mit PCR-Produkten katalysiert, die ein 3'-überhängendes Adenosin besitzen. 2 µl des aufgereinigten PCR-Produkts wurden mit 1 µl Salt Solution, 1 µl pCRII-TOPO und 2 µl dH₂O (DNase, RNase frei) versetzt, 5

min bei RT inkubiert und direkt in der Transformation von One Shot TOP10 *E. coli* (siehe 2.2.2.) verwendet.

2.3.12. Sequenzierung

Zur Analyse von Plasmid-DNA und DNA-Konstrukten wurden je 2 µg DNA in 20 µl dH₂O (DNase, RNase frei) zum AGOWA GmbH Sequenzierservice (Berlin) geschickt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Vector NTI Software.

2.3.13. Klonierung der extrazellulären Domäne von mALK1

Zur Konstruktion von pSec-mALK1.ec wurde RNA aus MS1-Zellen isoliert und die mRNA in cDNA revers transkribiert. Mittels präparativer PCR wurde das Fragment, das für die Aminosäuren 23-119 der extrazellulären Domäne von murinem ALK1 ohne Signalpeptid kodiert, kloniert. Gleichzeitig wurde mit den Primern mALK1-ec_for und mALK1-ec_rev stromaufwärts eine Schnittstelle für *HindIII* und stromabwärts eine für *XhoI* angefügt. Das 319 bp große PCR-Produkt wurde zuerst in den Vektor pCRII-TOPO eingefügt („pCRII-TOPO-mALK1.ec“), um ein darauffolgendes Schneiden mit den Restriktionsenzymen zu erleichtern. Die Sequenz von mALK1.ec wurde mittels Sequenzierung überprüft. Da sie eine Punktmutation aufwies, wurde diese durch PCR-Mutagenese mit den Primern mALK1_for und mALK1_rev, die die korrekte Base A statt G enthielten, korrigiert. Das korrigierte Plasmid pCRII-TOPO-mALK1.ec und der Vektor pSecTag2/Hygro B wurden mit *XhoI* verdaut und die 5'-Überhänge mit Hilfe des Klenow Enzyms zu glatten Enden aufgefüllt. Nach Restriktionsverdau mit *HindIII* wurde das mALK1.ec-Insert wie in 2.3.11. beschrieben in den geschnittenen Vektor pSecTag2/Hygro B ligiert („pSec-mALK1.ec“).

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Zellaufschluss

Ganzzelllysate wurden mit Duschl-Lysepuffer oder RIPA-Lysepuffer hergestellt, denen Proteaseinhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail Tablets Complete und Orthovanadat) frisch zugesetzt wurden. Zellen in Flaschen wurden mittels Trypsin abgelöst, zentrifugiert und das Zellpellet anschließend durch Zugabe des Lysepuffers (1 ml Lysepuffer pro 10⁷ Zellen) lysiert. Zellen in Schalen wurden mit PBS (mit Mg²⁺/Ca²⁺) gewaschen und durch Zugabe von Lysepuffer direkt auf dem Schalenboden lysiert (0,5 ml Lysepuffer pro 10cm-Zellkulturschale). Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden Zelltrümmer bei 13000 rpm und 4°C 10 min abzentrifugiert.

Um cytoplasmatische und nukleären Proteine getrennt voneinander zu isolieren, wurden die NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents verwendet. Puffer CER I und NER

wurden vor Verwendung frisch mit Protease-Inhibitor versetzt. Zu 5×10^6 Zellen wurden erst 500 μl CER I hinzugefügt, und nach intensivem Vortexen 27,5 μl CER II, wodurch die Zellmembran, aber nicht die Kernmembran, aufgeschlossen wurde. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand, der die cytoplasmatische Proteinfraction enthält, in ein frisches Tube auf Eis überführt. Das Pellet wurde in 250 μl NER resuspendiert, und durch 40-minütiges Schütteln bei 4°C die nukleären Proteine in den Überstand extrahiert.

Membranproteine wurden mit Hilfe des Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Kits getrennt von cytoplasmatischen isoliert. Diese Trennung wurde erreicht, indem mit einem hydrophoben Detergens die Membranproteine aus dem Lysat herausgelöst wurden. 5×10^6 Zellen wurden erst in 150 μl Reagent A lysiert, und dann nach Zugabe einer Mischung aus 333 μl Reagent B und 167 μl Reagent C 30 min bei 4°C geschüttelt, um die Membranproteine zu extrahieren. Im Anschluss an eine Zentrifugation wurde der Überstand zur Separation der Membranproteinfraction 10 min bei 37°C inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation konnte die obere hydrophile Phase mit den cytoplasmatischen Proteinen von der unteren hydrophoben Phase abgenommen werden.

Die Protein-Isolation aus Tumorproben bei gleichzeitiger RNA-Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des PARIS-Kits (siehe 2.3.3.). In 2 ml Cell Disruption Buffer wurden die Tumore mit Hilfe des Homogenisiergeräts Polytron PT 1200 homogenisiert, die Hälfte des Homogenats zur vollständigen Lyse 5-10 min auf Eis gestellt und anschließend Zelltrümmer abzentrifugiert.

Im Anschluss an alle Lysemethoden wurde mittels Bradford die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.4.2.), und das Lysat direkt weiterverwendet (siehe 2.4.3. und 2.4.4.) oder bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurde 1 μl Benzonase pro 400 μl Zelllysat zugefügt und 30 min bei 37°C inkubiert, um vor dem Auftragen auf eine SDS-Gel (siehe 2.4.4.) störende DNA abzubauen.

2.4.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsspektrums von Coomassie Blau von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung des Farbstoffs an Proteine. Zur Proteinquantifizierung wurden 200 μl Bio-Rad Protein Assay Reagenz zu 2-5 μl Lysat oder 20 μl Elutionsfraktionen in 798 μl , 795 μl bzw. 780 μl dH_2O zugefügt, und nach 5 min die Absorption bei 595 nm gegen einen Leerwert (die entsprechende Menge Lysepuffer/Elutionspuffer in dH_2O mit Bio-Rad Reagenz) gemessen. Durch Aufstellen einer Eichreihe mit verschiedenen BSA-Konzentrationen konnte die Proteinkonzentration mit folgender Formel errechnet werden:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{595} / 0,0522 - 0,0313 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.4.3. Ni-NTA-und α -c-myc-Fällung

Proteine mit einem 6xHIS-tag oder einem *c-myc*-tag (Proteine in den Vektoren pcDNA3.1/*myc*-HIS A und pSecTag2/Hygro B) wurden durch eine Fällung mit Ni-NTA-Agarose bzw. α -c-myc-Agarose-beads aufkonzentriert. Dazu wurden 20 μ l Ni-NTA-Agarose, Protease Inhibitor Cocktail ohne EDTA und 1mM Pefabloc SC-Protease Inhibitor zu 1 ml Überstand oder Zelllysats transfizierter Zellen, die HIS-Proteine exprimieren, hinzugefügt und über Nacht bei 4°C rotiert.

Die Probe wurde anschließend zweimal mit PBS mit Protease Inhibitor Cocktail ohne EDTA gewaschen und zur Analyse auf SDS-Gelen eingesetzt. Die Ni-NTA-Agarose-Präzipitate wurden in 10 μ l 4x SDS Probenpuffer 5 min bei 95°C aufgeköcht, kurz zentrifugiert und die Überstände auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe 2.4.4.).

2.4.4. SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mit der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.4.2.) wurde jeweils die gleiche Menge an Protein pro Probe in 30 μ l dH₂O mit 10 μ l reduzierendem 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben 5 min auf 95°C erhitzt und auf ein NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (1,5mm x 10 well) aufgetragen. Zur Identifizierung von Proteinen wurden 10 μ l des Precision Plus Protein Standard All Blue oder der BenchMark Pre-Stained Protein Ladder in die erste Tasche auf dem Gel pipettiert. Die SDS-PAGE wurde in einer Novex Mini-Cell PAGE)-Kammer mit 1x NuPAGE MOPS SDS Running Buffer durchgeführt. Das Einlaufen der Proben erfolgt bei 80 V für 15 min, danach wurde die Spannung für weitere 45 min auf 200 V erhöht. Nach Auftrennung der Proteinproben wurden die Gele entweder gefärbt (siehe 2.4.5.) getrocknet oder im Western Blot (siehe 2.4.6.) eingesetzt.

2.4.5. Färben von Proteingelen

Zum Nachweis von Proteinmengen wurden sie SDS-Gele mit Hilfe der Simply Blue SafeStain Färbelösung gefärbt. Dazu wurde das Gel nach der Gelelektrophorese 3x 5 min in dH₂O gewaschen, 1 Std. unter Schütteln in der Färbelösung inkubiert und mind. 1 Std. mit Leitungswasser gewaschen.

2.4.6. Western Blot

Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde nach dem Semi-Dry-Verfahren (Kyhse-Andersen 1984) durchgeführt. Dazu wurde ein sogenannter Sandwich aus einem Filterpapier, der Nitrozellulosemembran, dem SDS-Gel und einem weiteren Filterpapier, alles getränkt in Western Blot Transferpuffer, gebaut und der

Transfer bei 65 mA pro Blot für 2 h im Fastblot Semi-Dry Blotter durchgeführt. Zur Bestätigung des Transfers wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt, und danach mit 0,5 M Tris-HCl (pH 7,4) wieder entfärbt. Zur Immunodetektion wurde die Membran für 1 Std. mit 1x Roti-Block unter Schütteln geblockt, um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu besetzen. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper in 1x Roti-Block erfolgte für 3 h bei RT oder über Nacht bei +4°C. Nichtgebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für je 5 min mit PBST entfernt. Die Inkubation mit dem HR-gekoppelten Sekundärantikörper wurde in 3% Topblock in PBST für 1 Std. durchgeführt. Die verwendeten Antikörper und deren jeweilige Verdünnungen sind der Tabelle 2.1.6. zu entnehmen. Nach erneutem Waschen wurde der Blot mit 1:1 verdünnten ECL (Enhanced chemiluminescence) Western Blotting Detection Reagents entwickelt. Bei schwachem Signal wurden ECL Plus Western Blotting Detection Reagents verwendet, dazu wurden Lösungen A und B im Verhältnis 40:1 gemischt und der Blot 5 min mit der Lösung inkubiert. Bei der Umsetzung des Substrats Luminol in den ECL Reagenzien durch die Meerrettichperoxidase (HRP) am Sekundärantikörper entsteht Licht. Die Detektion der Lichtquanten erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms, der anschließend in der Entwicklermaschine Curix 60 entwickelt wurde. Um einen Western-Blot ein weiteres Mal mit einem anderen Antikörper behandeln zu können, mussten die bereits gebundenen Antikörper von dem Blot entfernt werden. Dazu wurde die Membran mit 1x Re-Blot Plus Strong Solution für 15 min bei RT gestrippt. Nach intensivem Waschen mit PBS wurde der Blot erneut wie oben beschrieben geblockt und mit Antikörpern behandelt.

2.4.7. Proteinaufreinigung

Jeweils 5×10^7 Zellen des Klons CHO-hALK1.ec 1-3 wurden in 3 Rollerflaschen in je 150 ml Vollmedium mit 0,8 mg/ml Hygromycin 2 Tage anwachsen lassen. Dann wurden die Zellen 2x für ca. eine Woche in je 150 ml serumfreiem Medium HyQ PF CHO mit 0,8 mg/ml Hygromycin kultiviert, bis nur noch 70% lebende Zellen im Überstand vorhanden waren. Die gesamten Überstände wurden gepoolt, mit 18 Protease Inhibitor Cocktail Tablets Complete (EDTA-free) versetzt und bei -80°C gelagert. Vor der Proteinaufreinigung wurde der Überstand bei 20.000 rpm (47.800 g) im SS-34-Rotor 20 min in der Ultrazentrifuge RC 5B Plus zentrifugiert und anschließend durch ein 0,2 µm Filter Unit filtriert, um Zellreste und Schwebstoffe zu entfernen. Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Die Puffer wurden mit Hilfe des ProBond Purification Systems nach Angaben des Herstellers angesetzt, ebenfalls durch ein 0,2 µm Filter Unit filtriert und entgast. 18 ml Ni-NTA-Agarose wurden abzentrifugiert, mit Native Binding Buffer (20 mM N-Phosphat, 500 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen und mit dem Überstand über Nacht bei 4°C gerührt. Mit dieser Suspension wurde eine 10 ml Säule luftblasenfrei befüllt und der Durchlauf gesammelt. Die Säule wurde in das FPLC-System eingespannt und mit 100 ml Native Wash

Buffer (20 mM Na-Phosphat, 500 mM NaCl, pH 6) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min gewaschen. Auch die Waschfraktion wurde aufgefangen. Anschließend wurde mit dem Native Wash Buffer und steigenden Imidazol-Konzentrationen bei 1 ml/min eluiert, erst mit 20 ml von 0 auf 100 mM Imidazol, dann mit weiteren 40 ml von 100 auf 500 mM Imidazol. Dabei wurden im Fraktionssammler 1ml-Fraktionen gesammelt und gleichzeitig deren Proteinkonzentration durch UV-Absorption bei 280 nm gemessen. Im Anschluss wurden Überstand, Durchlauf, Waschfraktion und die Elutionsfraktionen nach TCA-Fällung (siehe 2.4.8.) auf einem SDS-Gel aufgetrennt und gefärbt (siehe 2.4.5.), um die Qualität der Aufreinigung zu überprüfen. Außerdem wurde die hALK1.ec-Expression von Durchlauf, Waschfraktion und den Elutionsfraktionen analysiert, indem je 30 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen und auf einem Western Blot mit α -myc detektiert wurden (siehe 2.4.4. und 2.4.6.). Die hALK1.ec-haltigen Fraktionen (11-17) wurden gepoolt und in einem Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Device (10 kDa NMWL) 10 min bei 4000 g zentrifugiert. Durch zweimaliges Auffüllen auf 15 ml mit PBS und anschließendes Zentrifugieren wurde das Imidazol entfernt und das Eluat auf ca. 1 ml reduziert.

2.4.8. TCA-Fällung

Zu je 500µl Überstand, Durchlauf und Waschfraktion aus der Proteinaufreinigung (siehe 2.4.7.) wurden 140 µl TCA-Lösung (50%) gegeben, um eine Endkonzentration von 11% TCA zu erreichen. Von den Elutionsfraktionen wurden jeweils 100 µl mit 28 µl TCA-Lösung (50%) gefällt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Proben 30 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 2x mit 1 ml Aceton gewaschen und 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit 10 µl 4x SDS Probenpuffer 5 min bei 95°C aufgeköcht und auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe 2.4.4.).

2.5. Zellbiologische Methoden

2.5.1. Zellkultur

Alle Zelllinien und Primärzellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 90% relativer Feuchtigkeit im Brutschrank gehalten. Die Passagierung erfolgte alle 3–4 Tage, wenn die Zellen eine Konfluenz von 70–90% erreicht hatten, mittels Trypsinierung. Dazu wurden die Zellen mit PBS (ohne Mg²⁺/Ca²⁺) gewaschen, 3-5 min mit 1x Trypsin/EDTA-Lsg. bedeckt und anschließend das Trypsin durch Medienzugabe inaktiviert. Bei HUVEC und HPAEC wurden zur Trypsinierung die vom Anbieter mitgelieferten Lösungen HepesBSS, Trypsin/EDTA Solution und Trypsin neutralizing solution verwendet. Nach Zentrifugation und Vereinzlung wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:20 wieder in Zellkulturflaschen ausgesät. Zellkulturflaschen, -schalen und -platten wurden für die Kultur von primären Endothelzellen vorher für 5 min mit 3%

Collagen G in PBS (mit Mg^{2+}/Ca^{2+}) beschichtet. Die Zellzahlbestimmung erfolgte im CASY Zellzähler nach Anleitung des Herstellers.

Transfizierte Zellen erhielten Vollmedium mit dem jeweiligen Selektions-Antibiotikum. Zu dem Medium für PAEC-ALK1, PAEC-ALK1-Q/D und PAEC-ALK1-K/R wurden 0,8 mg/mL G418 (Neomycin-Analogon Geneticin) hinzugefügt, da der Vektor pcDNA3.1/*myc*-HIS A ein Neomycin-Resistenzgen trägt. Das Medium für CHO-hALK1.ec, A375-hALK1.ec, A375-mALK1.ec und A375-pSec wurde mit 0,8 mg/mL Hygromycin ergänzt, da der Vektor pSecTag2/Hygro B für eine Hygromycin-Resistenz kodiert.

Zellen wurden in Medium mit 20% FCS und 10% DMSO erst bei $-80^{\circ}C$ langsam eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Für HUVEC und HPAEC wurde hierzu das vom Anbieter mitgelieferte Cryo-SFM verwendet.

2.5.2. Proliferationsassay

MVECs wurden in 200 μ l Vollmedium mit einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen/well in collagenbeschichteten 48-well-Platten ausgesät. PAECs oder A375 wurden in 400 μ l Magermedium mit 0,5% FCS oder in Vollmedium mit einer Dichte von 1000 Zellen/well in 48-well-Platten ausgesät. Nach ca. 4 Std. wurde das Vollmedium der MVECs durch Magermedium ersetzt, und am nächsten Tag (Tag 1) wurden 40 ng/ml VEGF, 2 ng/ml bFGF, 200 ng/ml ALK1/Fc, Zellüberstände oder andere Zusätze zugegeben. An Tag 4 wurde die Zellzahl mittels Alamar Blue Assay bestimmt. Dazu wurde 1/20 des Volumens im Well Alamar Blue zugegeben und nach 2 Std. die Fluoreszenzemission bei 590 nm nach Anregung bei 530 nm im Microplate Fluorescence Reader Flx800 gemessen.

HUVECs und HPAECs wurden 2 Tage vor dem Proliferationsassay auf Endothelial Cell Growth Medium 1 gesetzt. 96-well-Zellkulturplatten wurden mit 3 % Collagen beschichtet und pro well 2000 Zellen in 100 μ l Vollmedium ausgesät. An Tag 1 wurden Zytokine oder andere Zusätze zugegeben. An Tag 4 wurde die Zellzahl mittels CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay bestimmt, indem 10 ml CellTiter-Glo Buffer mit einer Flasche CellTiter-Glo Substrate gemischt wurden, und je 100 μ l in jedes well pipettiert wurden. Nach 2-minütigem Schütteln wurde der Inhalt der wells in weiße 96er-Platten OptiPlate-96 überführt und 10 min zur Stabilisierung des Signals stehen gelassen. Im LumiCount wurde anschließend die Lumineszenz gemessen.

2.5.3. Stabile Transfektionen

Es wurden 10^6 CHOs oder A375-Zellen in Vollmedium auf 10cm-Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag bei 40-60%iger Konfluenz transfiziert. Dazu wurden 10 μ g Plasmid-DNA (pSec-hALK1.ec, pSec-mALK1.ec oder pSecTag2/Hygro B) in 500 μ l OptiMem und 100 μ l Lipofectin in 500 μ l OptiMem verdünnt. Nach 45 min wurden die beiden Lösungen gemischt und der Ansatz 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden 2x mit PBS (mit Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen,

bevor der Transfektions-Ansatz mit 4 ml OptiMem auf die Zellen gegeben wurden. Die Transfektion erfolgte für 6 Std. im CO₂-Inkubator. Anschließend wurde das Transfektions-Medium durch Vollmedium ersetzt, und weitere 72 Std. später 0,8 mg/mL Hygromycin zur Selektion transfizierter Zellen zugegeben. Nachdem die Zellen ca. 50% konfluent waren, wurden sie in sog. limiting dilutions auf 96-well-Zellkulturplatten ausgesät, jeweils eine Platte mit 0,5; 1 und 2 Zellen pro well. Wenn sich Einzelkolonien gebildet hatten, wurden sie erst auf eine 24- und dann auf eine 6-well-Platte übertragen. Um die Integration des Plasmids in die genomische DNA zu überprüfen, wurde Gesamt-DNA aus den Zellen isoliert und nach PCR auf einem Agarose-Gel analysiert (siehe 2.3.6., 2.3.7.1. und 2.3.11.). Die Expression von ALK1.ec im Überstand wurde nach Ni-NTA-Fällung auf Western Blots kontrolliert (siehe 2.4.3., 2.4.4. und 2.4.6.).

2.5.4. Transiente Transfektionen

Einen Tag vor der Transfektion wurden 2×10^6 HepG2 Zellen in Magermedium mit 5% FCS auf einer 10cm-Zellkulturschale ausgesät. Zur Transfektion wurden 10-100 ng des Plasmids pcDNA3.1-ALK1 pro 7000 Zellen vorgelegt. Pro µg DNA wurden 2 µl Fugene 6 Transfection Reagent mit 15 µl OptiMem gemischt und auf die DNA-Verdünnungen pipettiert. Nach einer Inkubation von 15-45 min wurde diese Mischung auf die Zellen gegeben und die Schale kurz geschwenkt. Die Zellen wurden 6 Std. im Inkubator für die Zellkultur kultiviert, bevor das Medium durch Magermedium mit 0,2% FCS ersetzt wurde. 24 Std. später wurden die Zellen wie in 2.4.1. beschrieben mit Duschl-Puffer lysiert. Zur Optimierung und Kontrolle der Transfektion wurden HepG2 mit dem Plasmid pEGFP transfiziert, und die Expression von grün fluoreszierendem EGFP unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft.

2.5.5. Luziferase-Reportergen-Assay

In einem Luziferase-Reportergen-Assay muss der zu untersuchende Promotor dem Reportergen (Luziferase) vorangestellt sein, so dass bei Aktivierung des Promotors die Transkription der Luziferase induziert wird (Abb. 2.1). Wird Luziferase exprimiert, setzt sie das Substrat D-Luziferin in Oxyluciferin und Licht um, wodurch sich die vorhandene Menge an Luziferase und damit der Grad der Promotor-Aktivierung quantifizieren lässt. Um die Aktivierung des Id1- und des Endoglin-Promotors durch verschiedene Zytokine und Rezeptoren zu messen, wurden die Promotoren in das Reportergen-Plasmid pGL3-Basic bzw. pXP2 kloniert.

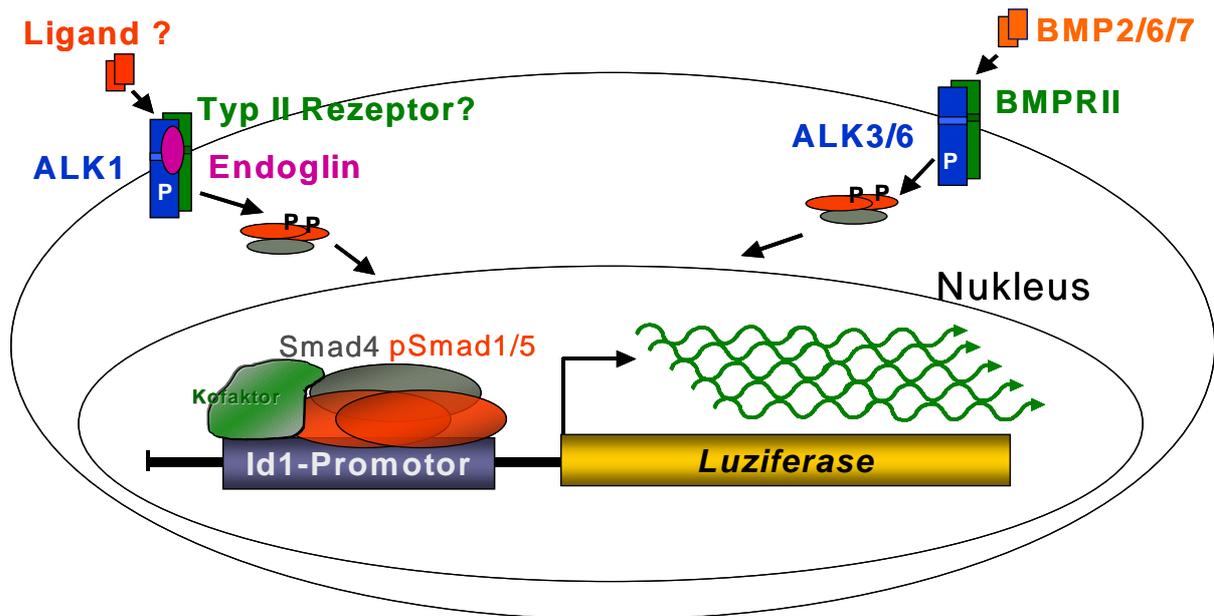


Abb. 2.1: Prinzip des Luciferase-Reporterassays anhand des Id1-Promotors.

Für die Durchführung des Luciferase-Reporterassays wurden HepG2 Zellen einen Tag vor der Transfektion mit einer Dichte von 7000 Zellen pro well in je 100 µl Magermedium mit 5% FCS auf weißen 96er-Zellkulturplatten CulturePlate-96 ausgesät. Die Zellen wurden mit pGL3-Basic-Id1_Prom transfiziert, und entweder mit Expressionsvektoren für bestimmte Rezeptoren oder Transkriptionsfaktoren cotransfiziert oder anschließend mit Zytokinen stimuliert. Zur Überprüfung des Assays diente ein Transfektionsansatz mit dem Plasmid pGL3-Control, das das Luciferase-Reportergen unter Kontrolle des SV40 Promoter enthält. In der Regel wurden pro well bzw. pro 7000 Zellen 100 ng Reporter-Plasmid, 10-110 ng eines oder zwei weiterer Plasmide und 10-110 ng des entsprechenden Leervektors eingesetzt, so dass alle Ansätze mit der gleichen Menge DNA transfiziert wurden. Pro µg DNA wurden 2 µl Fugene 6 Transfection Reagent in 15 µl OptiMem gegeben, und die Mischung auf die DNA-Verdünnungen pipettiert. Nach einer Inkubation von 15-45 min wurde dieser Fugene:DNA Komplex auf die Zellen pipettiert und die Zellkulturplatten 60 min geschüttelt. 6 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen in Magermedium mit 0,2% FCS ausgehungert und die jeweiligen Zusätze (z.B. TGF-β, BMP, ALK1/Fc) zugegeben. Die Zellyse und die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte 24 Std. später durch Zugabe von 100µl Steadylite HTS Substrat pro well. Nach 5 min Schütteln bei RT wurde die Luciferase-Aktivität im VICTOR Light 1420 Luminescence Counter gemessen.

2.6. *In vivo* Methoden

2.6.1. Nacktmaus-Xenografts

Von den Tumorzelllinien A375, A375-hALK1-ec, A375-mALK1-ec und A375-pSec wurden je 10^6 Zellen in 100 μ l PBS s.c. in die rechte Flanke von 8 *nu/nu* Mäusen injiziert. Das Gewicht der Mäuse und das Tumorwachstum wurde erst alle 3-5 Tage, dann alle 1-2 Tage überprüft. Die Tumorfläche errechnet sich aus dem Produkt des längsten und des darauf senkrecht stehenden Durchmessers des Tumors, die mit einer Schiebelehre gemessen wurden. Nach Abschluss des Experiments wurden die Tumore entfernt und ihr Gewicht bestimmt. Sie wurden entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in RNAlater über Nacht bei +4°C inkubiert oder zur Anfertigung von Gefrierschnitten in TissueTek auf einem Korkplättchen in einer Lösung aus Pentan und Trockeneis tiefgefroren. Die Lagerung der Tumore erfolgte bei -80°C.

2.7. Immunologische Methoden

2.7.1. Anfertigung von Gefrierschnitten

Zum Schneiden der Tumore wurden diese im Cryostat Jung Frigocut 2800E auf -20°C gebracht. Es wurden 7 μ m Schnitte angefertigt und diese direkt auf Objektträger transferiert. Nach 10minütigem Trocknen wurden die Kryoschnitte bei -80 °C gelagert.

2.7.2. Immunhistochemie

Die Kryoschnitte wurden nach dem Auftauen mit einem Fettstift umrandet und anschließend in Formaldehydlösung für 5 min fixiert und permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden unspezifischen Bindestellen auf den Schnitten mit 2 % BSA in PBS für 1 Std. geblockt. Auf die Inkubation mit dem Erstantikörper in 1 % BSA in PBS für 1 Std. folgten drei Waschschrte mit PBS. Daran schloss sich eine einstündige Inkubation mit einem AP- oder Biotin-gekoppeltem Zweitantikörper in 1 % BSA in PBS und erneutes Waschen an. War der Zweitantikörper Biotin-gekoppelt, wurden die Schnitte anschließend 30 min mit Streptavidin-AP aus dem Vectastain ABC-AP Kit inkubiert und drei Mal mit PBS gewaschen. Die verwendeten Antikörper und deren jeweilige Verdünnungen sind der Tabelle 2.1.6. zu entnehmen. Die Detektion erfolgte mit den SigmaFast Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablets, von denen je eine in 1 ml dH₂O gelöst wurde und die Lösung durch einen 45 μ m Membranfilter filtriert wurde. Die Schnitte wurden 20 min mit dem Subtrat behandelt, welches ein rotes Präzipitat bildete, und anschließend mit Leitungswasser gewaschen. Eine einminütige Inkubation mit Hämatoxylin QS diente zur Gegenfärbung der Kerne. Nach erneutem Waschen mit Leitungswasser wurden die Schnitte mit einem Tropfen Aquatex Eindeckmittel und einem Deckglas eingedeckelt. Die Betrachtung der Schnitte erfolgte mit Hilfe des Mikroskops Axioskop 40.

2.8. Affymetrix Chip Analyse

Mit Hilfe der Affymetrix Analyse wurde der Einfluss von TGF- β 1 und ALK1/Fc auf die Genexpression von MVECs untersucht. Dazu wurden MVECs (Passage 9) mit einer Dichte von $6,5 \times 10^5$ Zellen/Schale in 6 cm-Zellkulturschalen in je 2,5 ml MVEC-Vollmedium ausgesät, und nach drei Tagen wurde das Vollmedium durch Magermedium ersetzt. An Tag 4 wurden die Zellen 2, 6 bzw. 24 Std. mit 55 ng/ml TGF- β 1 oder 100 ng/ml hALK1/Fc behandelt. Die RNA wurde wie in 2.3.3. beschrieben mit Hilfe des RNeasy Mini Kits isoliert und nach dem von Affymetrix vorgegebenen Protokoll prozessiert. Es folgte eine Messung der RNA-Qualität (siehe 2.3.4.) und eine reverse Transkription in einzelsträngige cDNA (siehe 2.3.5.). Die cDNA wurde zu doppelsträngiger cDNA ergänzt, welche anschließend als Vorlage für eine *in vitro* Transkription mit dem Labeling Kit zur Synthese biotin-markierter cRNA diente. Nach Fragmentierung der cRNA wurden die Fragmente auf dem Affymetrix-Chip HG-U133-Plus-2.0 sequenzspezifisch mit den dort aufgebrauchten DNA-Oligonukleotiden hybridisiert. Die Detektion erfolgte durch Bindung eines Phycoerythrin gekoppelten Streptavidin-Antikörper-Komplexes, dessen Fluoreszenzsignal mit Hilfe des GeneArray Scanner 3000 gemessen wurde. Die Menge an emittiertem Licht ist der Menge an gebundenen cRNA-Fragmenten proportional. Die Array-Datenanalyse wurde mit Hilfe der Genedata Expressionist Analyst Pro Software durchgeführt.