

2. Material und Methoden

2.1 Wachstumsassay für glatte Gefäßmuskelzellen

Die Wachstumsuntersuchungen wurden an isolierten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) von normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten (WKY, 3 - 6 Monate alt) durchgeführt.

2.1.1 Isolierung und Kultivierung von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Rattenaorta

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden nach der Explantmethode von Ross und Mitarbeitern gewonnen [79].

Nach intraperitonealer Betäubung mit Urethan (1.4 g pro kg Körpergewicht) wurden die Ratten dekapitiert. Der Brustkorb wurde eröffnet und die thorakale Aorta mit Hilfe eines sterilen Präparierbestecks freigelegt. Die Aorta wurde unter keimarmen Bedingungen entnommen und in steriles DMEM (Dulbeccos' Modified Eagles' Medium, Invitrogen, Karlsruhe) überführt. Anschließend wurde die Aorta von Binde- und Fettgewebe durch Abstreifen mit einer kräftigen Pinzette entfernt und mit PBS-Puffer (pH 7.4, Calcium- und Magnesiumfrei, Invitrogen, Karlsruhe) gespült. Das Gefäß wurde longitudinal aufgeschnitten und die Intima mit einem Skalpell vorsichtig abgeschabt. Die verbliebene Media wurde in kleine Gewebestücke mit einer Kantenlänge von 2-3mm zerschnitten und auf den Boden einer 25 cm² Kulturflasche übertragen. Die flach ausgebreiteten Aortenstücke wurden nach kurzer Antrocknung mit DMEM inklusive fötalem Kälberserum (FCS, 10%) und 1% Streptomycin/Penicillin überschichtet und im Zellkulturschrank in feuchter Atmosphäre bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% Raumluft inkubiert.

Nach 5-14 Tagen wuchsen die Gefäßmuskelzellen aus der Peripherie der Explantate aus.

Die Gewebstücke wurden dann aus der Kulturflasche entfernt. Das Kulturmedium wurde alle 2 -3 Tage gewechselt.

Wenn die Primärzellen konfluent gewachsen waren, wurden die Zellen durch Trypsinierung mit einer calcium- und magnesiumfreien 0.05% Trypsin/0.02% EDTA-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) abgelöst und in einer Zellzahl von 2.5×10^4 /ml in 75 cm² großen Kulturflaschen subkultiviert. Die bei der Trypsinierung gewonnenen Zellen wurden mit Hilfe eines Zellzählers (CASY 1TT, Schärfe, Reutlingen) gezählt und dabei die Viabilität überprüft. Bei einer Viabilität von 95% wurden die Zellen subkultiviert.

2.1.2 Charakterisierung von glatten Gefäßmuskelzellen

Die Zellen der Primärkultur wurden morphologisch im Lichtmikroskop charakterisiert. Die Immunphänotypisierung erfolgte mit Hilfe von Antikörpern gegen glattmuskuläres alpha-Aktin. Zur Darstellung der alpha-aktinhaltigen Zellen wurde die Technik der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Es wurden dazu monoklonale Antikörper (Progen, Heidelberg, Deutschland) aus der Maus gegen glattmuskuläres alpha-Aktin (ASM1) eingesetzt. Der prozentuale Anteil der alpha-Aktin-negativen Zellen wurde durch den Vergleich der fluoreszierenden mit den nicht fluoreszierenden und nur im Durchlicht sichtbaren Zellen ermittelt.

Es wurden nur solche Primärkulturen subkultiviert, in denen der alpha-Aktin positive Anteil in der ersten Passage größer als 95% war.

Die Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen „Von Willebrandt Faktor“ (vWF, Roche Bioscience, Mannheim, Deutschland) zum Nachweis von Endothelzellen war negativ.

Die in den Experimenten verwendeten Zellen waren somit frei von Kontamination mit Endothelzellen.

Für die Immunfärbung wurden die Zellen auf sterilen Objektträgern (Chamber Slides, Nunc, Wiesbaden) in vier voneinander getrennten Inkubationskammern kultiviert.

Wenn die Zellen einen konfluenten, einlagigen Zellverband gebildet hatten, wurden sie zunächst mindestens 30 Minuten in einer Lösung aus 96% Alkohol mit 3% Essigsäure und 1% Aqua dest. fixiert.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült und dann wurde der primäre Antikörper „ASM1“ und vWF in einer Konzentration von 1µg/ml in zwei der Kammern für 2 Stunden zugefügt.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch zweistündige Inkubation in einem PBS-Puffer mit 0.2% Rinderserumalbumin (BSA, Serva, Heidelberg, Deutschland) abgesättigt.

Kammer 3 diente als Kontrolle zur Erfassung der Autofluoreszenz der Zellen und Kammer 4, um die unspezifischen Reaktionen des fluoreszeinkonjugierten anti - Maus Antikörpers (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit zellulären Strukturen zu überprüfen.

Der an IgG-alpha-Ketten bindende sekundäre Antikörper wurde zu den Kammern 1, 2 und 4 in einer Konzentration von 2µg/ml für 2 Stunden hinzugegeben. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Färbung in einer 3%igen Paraformaldehydlösung fixiert. Die Präparate wurden in einem „Fluovert“ Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet (Abbildung 2).

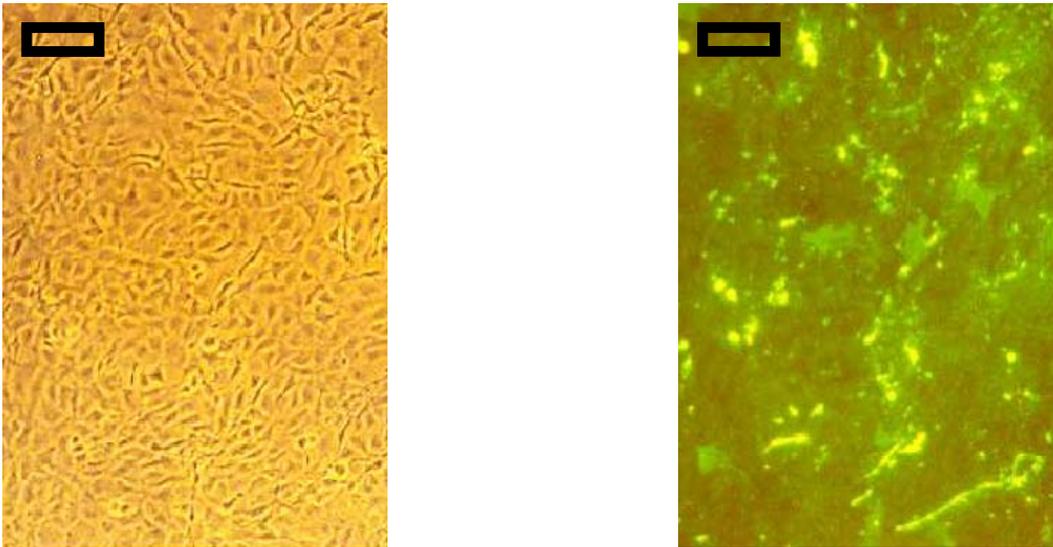


Abbildung 2: linkes Bild - lichtmikroskopisches Bild der pflastersteinartig angeordneten VSMC (Primärkultur) bei 20facher Vergrößerung; rechtes Bild - fluoreszenzmikroskopisches Bild der mit ASM1 angefärbten VSMC (grüne Fluoreszenz) bei 20facher Vergrößerung. Im linken oberen Bild zeigt sich ein geöffneter Balken. Die Länge des Balkens entspricht $10\mu\text{M}$).

2.1.3 Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen

VSMC wurden in 96-Lochschalen (Falcon Labware, Cockeysville, USA) mit einer Dichte von 5×10^4 -Zellen ausgesät. Die Zellen wurden für 24h in DMEM und 10%-FCS bis zur Subkonfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 72h in DMEM und 0.5%-FCS ruhig gestellt. Die ruhig gestellten Zellen wurden dann mit den Agonisten (XpnX, X=A/G und $n=5/6$) und den Kontrollen (PDGF, ATP und GTP) für 48h mit verschiedenen Dosierungen inkubiert. Nach 42h wurde $[^3\text{H}]$ -Thymidin ($2\mu\text{Ci/ml}$) hinzugegeben.

Nach 48h wurden die Zellen dreimal mit DMEM gewaschen und danach wie oben bereits angegeben trypsinisiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem automatischen Zellernter geerntet und auf Filterpapier aufgebracht. Anschließend wurde die inkorporierte Radioaktivität der geernteten Zellen in einem Szintillationszähler (Beckmann, München, Deutschland) gemessen.

2.1.4 RNA-Extraktion aus glatten Gefäßmuskelzellen

2.1.4.1 RNA-Extraktion

Die RNA wurde aus glatten Gefäßmuskelzellen mit Hilfe einer modifizierten Guanidiniumthiozyanat-Phenol-Chloroform Einschritt Extraktion gewonnen, wobei die Substanz Trizol® (Invitrogen, Karlsruhe) verwandt wurde.

200mg Nierengewebe oder Kontrollgewebe wurden in 4ml Trizol® homogenisiert (1ml Trizol® pro 50mg Gewebe), und es wurden 800µl Chloroform (200µl pro 1ml Trizol®) hinzugegeben.

Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 15 Sekunden geschüttelt und die Probe für 15min bei 11800g (4°C) zentrifugiert (Zentrifuge Z323K, Hermle, Gosheim). Nach Zentrifugation entstand in dem Reaktionsgefäß eine obere wässrige Phase (RNA), die abpipetiert und in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt wurde. Der Rest wurde verworfen.

Zu der wässrigen Phase wurden 2ml Isopropanol hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde vorsichtig geschüttelt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde bei 12000g erneut für 10min (4°C) zentrifugiert. Auf dem Boden des Reaktionsgefäßes bildete sich ein Pellet,

bestehend aus RNA. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet zweimalig mit 70%igem Ethanol gewaschen.

Anschließend wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 50µl sterilem RNase-freiem H₂O resuspendiert.

Das RNA-Extrakt konnte nun bis zur weiteren Verwendung bei -20°C oder tiefer bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

2.1.4.2 Vermessung der RNA

Zur Vermessung der RNA wurden 2µl des RNA-Extraktes mit 78µl sterilem Wasser versetzt. Die RNA-Menge wurde mit Hilfe eines Photometers (GeneQuant II DNA/DNA Calculator, Pharmacia) bestimmt, indem die Absorption der Probe bei 260nm (A_{260}) bestimmt wurde. Die RNA-Konzentration berechnete sich dann nach folgender Formel:

$$\text{RNA-Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 1.6$$

Die Reinheit der RNA wurde mit Hilfe des Quotienten von A_{280} und A_{260} bestimmt. Für die RNA lag der Quotient zwischen 1.6 und 1.8.

Die Qualität der RNA wurde mit Hilfe eines 1.5%igen Agarose-Gels kontrolliert.

Dabei wurden 2µl der extrahierten RNA auf ein 1.5%iges Ethidiumbromid-haltiges Agarose-Gel aufgetragen und für 45min bei 100V elektrophoretisch aufgetrennt und die erhaltenen Banden mit Hilfe eines UV-Schirms dargestellt und photographiert.

2.1.4.3 Reverse Transkription

Jeweils 2µg der erhaltenen RNA wurde mit 2.5µl Random Hexamers (200 pmol) versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 15µl aufgefüllt. Diese Probe wurde nun auf 72°C für 5min zwecks Zerstörung von Sekundärstrukturen erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Eis gelegt, um die erneute Entstehung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Zu der Probe wurde ein Reaktionsgemisch von 35 µl bestehend aus 5-fach Mulv-RT-Puffer (Promega, Mannheim), 1.5µl dNTP (jeweils 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Promega, Mannheim), 0.5µL RNasin (25 units/µl; Promega, Mannheim), 1µl Mu-MLV reverse Transkriptase (20 units/µl) und RNase- und DNase-freies H₂O hinzugeben. Die Probe wurde nun bei 37°C für 60 min inkubiert und anschließend kurz für 5 min auf 95°C erhitzt.

Die erhaltene cDNA konnte bis zur weiteren Verwendung bei +4°C gelagert werden.

2.1.5 Polymerasekettenreaktion

Um die Expression der Purinrezeptoren nachzuweisen, wurden spezifische Oligonukleotide (Tabelle 1) mit Hilfe des Programms Primer Express® (Version 1.0.6; Perkin Elmer, Boston) hergestellt, die die Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisierte. Diese Primer wurden dann für die PCR verwandt. Der Primer für β-actin wurde einer Arbeit von Raff (1997) entnommen [80].

Subtyp	Primersequenz 5'-3'	Fragment- länge
P2Y1	F 5'- CTGGCCGACTTTTTGTATGTG-3' R 5'-CCTGATAGGTGGCATAAACCC-3'	640 bp
P2Y2	F 5'-CAGTGCTCTGCAAGCTGG-3' R 5'-TGCCCTGCCAGGAAGTAG-3'	631 bp
P2Y4	F5'-TGGGATGCAACAGCCAC-3' R5'-GGTACGGAGGGAACGG-3'	540 bp
P2Y6	F5'-CTATAACTACGCCAGAGGGGA-3' R5'-GCCAAGTAGGCTGTCTTGGT-3'	543 bp
β-actin	F 5'-TACAACCTCCTTGCAGCTCC-3' R 5'GGATCTTCATGAGGTAGTCTGTC-3'	630 bp

F = Forward, R = Reverse

Tabelle 1: Verwandte Oligonukleotide zur Expressions-
untersuchung der Purinrezeptoren in der Rattenniere

Als Ausgangsmaterial für die PCR diente das Material (cDNA) der reversen Transkription.

1µl des RT-Produktes wurde mit 49µl eines Gemisches bestehend aus 0.75 Units einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe), 2µl dNTP (bestehend aus jeweils 2.5mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP; Promega, Mannheim), 2µl MgCl₂ (25mM; Promega, Mannheim), 10fach PCR-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe), steriles DNase-freies H₂O und 2µl des spezifischen Primerpaares (jeweils 10µM), zusammengesetzt aus Vorwärts-(F) bzw. Rückwärts(R)-Oligonukleotid, versetzt.

Zur Vervielfältigung der DNA wurde ein PCR-Cycler der Firma Techne benutzt. (Cambridge, UK).

Das Reaktionsgemisch wurde zunächst für 3 min auf 95°C erhitzt. Danach wurde in 30 Zyklen eine Temperatur von 55°C

für 60 Sekunden (Bindung des Primers an die zu amplifizierende DNA), 72°C für 60 Sekunden (Extension der zu amplifizierenden DNA) und 95°C für 30 Sekunden (Denaturierung der DNA-Stücke) erzeugt.

Nach Abschluss der Zyklen wurde die Probe auf 4°C abgekühlt.

2.1.5.1 Gelelektrophorese der PCR-Fragmente und Sequenzierung

10µl der erhaltenen PCR-Lösung wurden nun auf ein 1.5%iges ethidiumbromidhaltiges Agarose-Gel aufgetragen und für 60 min bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Fragmentlängenkontrolle wurde eine 100 bp-Leiter (New England Biolabs, Frankfurt/M.) ebenfalls aufgetragen. Anschließend wurden die erhaltenen Banden mit Hilfe eines UV-Schirms dargestellt, photographiert und ausgewertet.

Um die Spezifität der in der PCR erhaltenen Banden zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte sequenziert. Hierbei wurde ein kommerzielles Angebot genutzt.

Ein Aliquot der erhaltenen PCR-Produkte und ein Aliquot der korrespondierenden Primerpaare wurde der Firma Invitrogen (Karlsruhe) zur Sequenzierung zur Verfügung gestellt.

Die Firma stellte die Sequenziererergebnisse elektronisch (per E-mail) zur Verfügung. Die Sequenziererergebnisse wurden mit Hilfe des Programms BLAST ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) ausgewertet.

2.2 Materialien

Alle Materialien und Substanzen, die in den Versuchen verwendet wurden, werden nachfolgend in alphabetischer Reihenfolge genannt :

Agarose-Gel 1.5%, Fa. Life Technologies, D
BSA = Rinderserumalbumin, Fa. Serva, Heidelberg, D
DMEM = Dulbecco`s modified Eagles Medium, Fa. Invitrogen,
Karlsruhe, D
DNA-Polymerase, Fa. Invitrogen, Karlsruhe, D
dNTP, Fa. Promega, Mannheim, D
FCS = Fötales Kälberserum, Fa. Biochrom, Berlin, D
Fluoreszeinkonjugierte Anti-Maus-Antikörper, Fa. Sigma,
Geisenhofen, D
Fluovert Fluoreszenzmikroskop Fa. Leitz, Wetzlar, D
Kulturflaschen Nunclon™Surface, Fa. Nunc International, USA
Monoklonale Antikörper, Fa. Progen, Heidelberg, D
Mulv-RT-Puffer, Fa. Promega, Mannheim, D
PBS- Puffer, Fa. Invitrogen, Karlsruhe, D
PCR-Cycler, Fa. Techne, Cambridge, UK
PCR-Puffer, Fa. Invitrogen, Karlsruhe, D
Photometer Gene Quant 11, Pharmacia
Programm Primer Express® Version 1.0.6., Fa. Perkins Elmer,
Boston, USA
RNasin, Fa. Promega, Mannheim, D
Sterile Objektträger= Chamber slides, Fa. Nunc, Wiesbaden, D
Streptomycin/ Penicillin-Gemisch, Fa. Sigma, Geisenhofen, D
Szintillationszähler, Fa. Beckmann, München, D
Trizol®, Fa. Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypsin-EDTA-Lösung, Fa. Invitrogen, Karlsruhe, D
Von Willebrandt-Faktor vWF, Fa. Roche Bioscience, Mannheim, D
Zellkulturschrank „Function Line“ Fa. Heraeus, D
Zellzähler Casy1TT, Schärfe Systems, Reutlingen, D
Zentrifuge Z323K, Fa. Hermle, Gosheim, D
96-Lochschalen, Falcon Labware, Cockeysville, USA
100 bp Leiter, Fa. New England Biolabs, Frankfurt/M., D

Sequenzierung der PCR-Produkte durch die Fa. Invitrogen,
Karlsruhe, D

2.3 Statistik

Das Wachstum der glatten Gefäßmuskelzellen wird als prozentualer Anteile im Vergleich zu unstimulierten glatten Gefäßmuskelzellen angegeben.

Alle Ergebnisse werden als Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung angegeben.

Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt.

Vergleiche zwischen den Dosiswirkungskurven wurden mit Hilfe eines Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt.

Ein $P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Alle P Werte sind zweiseitig.