

3. Methoden

3.1 Isolierung von Primärzellen aus Mauseaorten

Die Präparation glatter Gefäßmuskelzellen erfolgte aus Aorten von 6 Wochen alten, männlichen Mäusen. Die Tiere wurden mit Ether anästhesiert und mittels einer Guillotine dekapiert. Die thorakalen Aorten wurden entnommen, von adhärentem Fett- und Bindegewebe sowie Blutresten befreit und in longitudinaler Richtung aufgeschnitten. Unter dem Mikroskop wurde das adventitielle Gewebe mit zwei feinen Pinzetten entfernt und die Endothelschicht der Gefäßstreifen vorsichtig mit einem schräg aufgesetzten Skalpell abgeschabt. Das Präparat wurde in eine Petrischale überführt und in kleine Stücke zerlegt. Nach Zugabe von Verdauungspuffer wurde das Produkt für 30min bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von Vollmedium gestoppt, die Suspension in ein steriles Falcon-Röhrchen überführt und 5min bei 300g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Vollmedium aufgenommen, die Zellen mit einer Dichte von $3-5 \cdot 10^5 / \text{cm}^2$ ausgesät und bei 37°C unter 5% CO₂ inkubiert. Die weitere Kultivierung erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben. Der Phänotyp der glatten Gefäßmuskelzellen wurde durch eine α -Glattmuskel-Actin Färbung nachgewiesen.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung

Aus der Mauseorta isolierte glatte Gefäßmuskelzellen wurden in Vollmedium in Zellkulturflaschen im Inkubator unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Zweimal wöchentlich wurde verbrauchtes Medium gegen frisches, 37°C warmes Vollmedium ausgetauscht. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70-90% wurden die Zellen passagiert und in neuen Zellkulturflaschen ausgesät bzw. für Versuchsdurchführungen verwendet.

3.2.2 Passagieren von Zellkulturen

Alle verwendeten Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt. Nach Absaugen des verbrauchten Mediums in der Zellkulturflasche wurden die Zellen mit PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung versehen und 3-5min im Brutschrank inkubiert. Durch vorsichtiges Klopfen lösten sich die adhärennten glatten Gefäßmuskelzellen vom Boden

des Gefäßes ab. Die vollständige Ablösung wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert. Trypsin wurde durch Zugabe von Vollmedium inaktiviert, die Zellsuspension in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und 3min bei 300g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in Vollmedium resuspendiert und gegebenenfalls die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde in der Regel zur weiteren Kultivierung 1:5 verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Vollmedium überführt. Bei Erreichen der 9. Passage wurden die Zellen verworfen.

3.2.3 *Bestimmung der Lebendzellzahl*

Aus einem definierten Volumen an Zellsuspension wurde ein Aliquot entnommen, mit dem gleichen Volumen Trypanblaulösung vorsichtig vermischt und 2min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit drang der Farbstoff in abgestorbene, geschädigte Zellen ein und färbte diese blau. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte durch Auszählung der farblosen, intakten Zellen in einer Zählkammer nach Neubauer unter einem Lichtmikroskop bei 20facher Vergrößerung. Die Anzahl der vitalen Zellen pro ml wurde errechnet durch Multiplikation der ausgezählten Zellen mit dem Kammer- und dem Verdünnungsfaktor.

3.2.4 *Langzeitkonservierung und Auftauen von Zellkulturen*

Die zu konservierenden glatten Gefäßmuskelzellen wurden nach Trypsinierung in Vollmedium aufgenommen und 3min bei 300g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in Vollmedium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und Aliquots von $1 \cdot 10^6$ Zellen 3min bei 300g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 2ml Einfriermedium resuspendiert und in sterile Cryo-Röhrchen überführt. Um ein langsames Einfrieren zu gewährleisten, wurden die Zellen über Nacht in einem mit Gefrierlösung (Isopropanol) gefüllten Behälter bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff langzeitkonserviert.

Zur Kultivierung der Zellen erfolgten ein rasches Auftauen der Zellsuspension durch Schütteln im 37°C -Wasserbad und zügige Überführung in eine mit Vollmedium befüllte Zellkulturflasche.

3.2.5 *Ernten von Zellpellets*

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 10cm Zellkulturschalen wie unter 3.2.1 beschrieben kultiviert und bei einer Dichte von 70-90% Konfluenz als Zellpellet geerntet. Hierfür wurden die adhärennten Zellen in PBS gewaschen, auf Eis gestellt und nach Zugabe von 1000 μl eisgekühltem PBS zügig mit einem Gummischaber vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Die Zell-

suspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, für 3min bei 300g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C konserviert.

3.3 Proliferationsassay

Kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben passagiert und mit einer Dichte von 1000 Zellen pro 100µl Vollmedium in der Vertiefung einer 96-well-Zellkulturplatte ausgesät. Für jeden Messtag wurde eine entsprechende Platte angesetzt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens wurde der ATPLite® 1000 Assay Kit (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA) verwendet.

Das Prinzip der Methode beruht auf einer indirekten ATP-Messung, einem Marker für Zellviabilität. Durch Zugabe von Luciferin und Luciferase wird aus den lysierten Zellen freigesetztes ATP umgesetzt. Die emittierende Lichtintensität verhält sich proportional zur ATP-Konzentration.

Für die Lumineszenzmessung wurden den kultivierten Zellen pro Vertiefung 50µL Säugetier-Zellysepuffer zugefügt und 5min bei 700rpm und Raumtemperatur auf dem Thermomixer geschüttelt. Die Zellsuspensionen wurden nach dem gleichen Auftragungsmuster in eine weiße 96-well-Mikrotiterplatte überführt. 50µl Luciferin/Luciferase-Substratlösung wurden pro Vertiefung zugegeben und abermals 5min bei 700rpm und Raumtemperatur geschüttelt. Zur Inaktivierung der Fluoreszenz wurde die Platte für 10min im Dunkeln stehen gelassen. Die Lumineszenzmessung erfolgte bei 120 bzw. 160facher Verstärkung mit Hilfe des Spektrometers Spectrafluor Plus (Tecan, MTX Lab Systems, Inc., Vienna, Virginia, USA). Die Auswertung wurde mit der zugehörigen Software Magellan 3.0 durchgeführt.

3.4 Durchflusszytometrische Analyse

Kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben passagiert und mit einer Dichte von $3 \cdot 10^5$ Zellen pro 6cm-Zellkulturschale ausgesät. Nach Anhaftung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 24 Stunden ohne Zusatz von FCS und Mitogenen synchronisiert. Anschließend wurde das Medium gegen Vollmedium ausgetauscht und die Zellen

24 Stunden unter Zusatz von 100 μ M BrdU inkubiert. Zur Aufbereitung für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen in PBS gewaschen, trypsiniert, mit 5% FCS/PBS versehen und 10min bei 300g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4% PFA/PBS resuspendiert, 10min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend 10min bei 300g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden in Aceton/Methanol (50%/50% v/v) aufgenommen und unter gelegentlichem Vortexen 30min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 5% FCS/PBS wurde das Pellet in DNase-Lösung resuspendiert. Ein FITC-markierter Anti-BrdU-Antikörper wurde hinzugegeben und die Suspension 30min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden 5min bei 300g und 4°C zentrifugiert und in 5%FCS/PBS gewaschen. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde das Pellet in FACS-Puffer resuspendiert, in einem BD FACScan Zytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) vermessen und mit der zugehörigen Software BD CellQuest Pro ausgewertet. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf dem Einbau von BrdU als falsches Nucleotid in die DNA während der Synthese-Phase des Zellzyklus. BrdU stellt somit einen S-Phase-Marker dar. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wird die Fluoreszenz von Fluorescein des FITS-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörpers bei einer definierten Zellzahl gemessen. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Anzahl der Fluorochrommoleküle und somit zu BrdU.

3.5 RNA-Analyse mittels Real-time PCR

3.5.1 RNA-Isolierung

Bei -80°C konservierte und wie unter 3.2.5 beschrieben präparierte Zellpellets bestehend aus glatten Gefäßmuskelzellen wurden auf Eis angetaut und mit 1000 μ l Trizol versetzt, durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig resuspendiert und 5min bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform wurde geschüttelt, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15min bei 8000g zentrifugiert. 500 μ l der oberen wässrigen Phase wurden abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die anderen Phasen wurden verworfen, wobei die untere phenolische Phase Proteine und kleinere DNA-Stücke und die Interphase größere DNA-Fragmente enthielt. Der RNA-Lösung wurden 500 μ l RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol zugefügt und gemischt. Nach Zugabe von 70% (v/v) Ethanol wurde die Lösung homogenisiert. Dreimal hintereinander wurden jeweils 700 μ l Probenlösung auf RNeasy Säulen gegeben und jeweils 1min bei 300g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen

und die Säulen mit 350µl RW1-Puffer gewaschen. Der DNA-Verdau erfolgte für 30min bei Raumtemperatur durch Zugabe von 10µl DNase I (1000Einheiten/ml) und 70µl RDD-Puffer. Anschließend wurde die Säule mit RW1-Puffer sowie mit Ethanol enthaltendem RPE-Puffer gewaschen und 2min bei maximaler Geschwindigkeit trocken zentrifugiert. Die RNA wurde mit 30µl RNase freiem Wasser eluiert.

3.5.2 Bestimmung des RNA-Gehaltes

Die Quantifizierung der RNA erfolgte bei einer Absorption von 260nm mit einem ND-1000 Spektro-Photometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). Zur Überprüfung der Reinheit wurden sowohl das A_{260}/A_{230} -Verhältnis (RNA/organische Verbindungen) als auch das A_{260}/A_{280} -Verhältnis (RNA/Proteine) gemessen. Alle Verhältnisse lagen über 2,0 bzw. über 1,9. Somit konnten Verunreinigungen durch organische Verbindungen bzw. Proteine vernachlässigt werden. Bei Bedarf wurde die RNA bei -80°C gelagert.

3.5.3 cDNA-Synthese

Der Nachweis von gewünschten Genabschnitten mittels der PCR-Methode erfolgte durch Amplifizierung von DNA-Segmenten. Hierfür wurde die gewonnene RNA in die komplementäre cDNA umgewandelt. Die Reaktion wurde mit Zufallsprimern bestehend aus hexamerischen Sequenzen jeder Möglichkeit durchgeführt.

RNA-Lösung, berechnet auf 2µg RNA, wurde mit 1µl (3µg/µl) Random Primer in Fluka-Wasser zu 25µl aufgefüllt, 10min bei 65°C inkubiert und anschließend 5min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 8µl 5x Erststrang-Puffer, 2µl 0,1M DTT, 2µl der 10mM Nukleotid-Mischung und 1µl Reverser Transkriptase (200 Einheiten/µl) wurde 60min bei 42°C inkubiert und das Enzym anschließend für 10min bei 70°C inaktiviert. Nicht verwendete cDNA wurde bei -80°C gelagert.

3.5.4 Primerdesign

Primer bestehen aus kurzen Oligonukleotidsequenzen, die an den komplementären DNA-Strang des gesuchten Gens hybridisieren. Mit Hilfe eines Primerpaares werden gewünschte Genabschnitte amplifiziert. Primer sollten aus nicht mehr als 18-30 Basen bestehen. Um eine geeignete Schmelztemperatur von $55-80^{\circ}\text{C}$ und eine spezifische Anlagerung zu erreichen, sollten die Primer einen 40-70%igen Anteil an Guanidin und Cytosin vorweisen.

Zur Ermittlung exonüberspannter Primer und gegebenenfalls Taqman-Sonden wurde das Software Programm Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet.

Um die Bindung an ungewünschte Genabschnitte auszuschließen, wurde die Spezifität der Primer mit Hilfe des NIH Genomic BLAST-Programms überprüft. Alle Primer und Taqman-Sonden wurden von der Firma Biotex, Berlin erworben. Es wurden 50-100µM Primerlösungen angesetzt.

3.5.5 *Real-time PCR*

Die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion bietet den Vorteil einer umgehenden quantitativen Darstellung der DNA-Vervielfältigung. Die Quantifizierung erfolgt über die Fluoreszenzmessung eines interkalierenden Farbstoffs (z.B. SYBR Green). Die Auswertung orientiert sich an der Zyklenzahl der Amplifizierung. Zum Ausgleich der Ungenauigkeit der eingesetzten cDNA-Menge wird die Zyklenzahl der Zielgen-DNA gegen die Amplifizierungsrate eines „Housekeeping“ Gens normalisiert. Hierbei setzt man voraus, dass das Haushaltsgen in unterschiedlichen Ansätzen in gleichen Mengen exprimiert wird. Die Auswertbarkeit der Ergebnisse wird durch den Kurvenverlauf eines internen Standards bestätigt.

Reaktionsansätze bestehend aus 12,5µl SYBR Green PCR Mastermix, je 0,75µl Vorwärts-, bzw. Rückwärtsprimer, 10µl Fluka-Wasser und 1µl cDNA-Probe wurden pro Vertiefung auf eine 96-well-MicroAmp-Platte gegeben. Für eine Standardreihe wurde die Probe ein-, zwei-, vier- bzw. achtfach verdünnt. Der Nachweis jeder Probe erfolgte in Dreifachansätzen. Die Mikrotiterplatte wurde mit geeigneten Kappen verschlossen. Zur Entfernung von Luftblasen wurde die Platte 5min bei 1000g zentrifugiert. Die Real-time PCR erfolgte mit einem ABI 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mit eingebautem Thermocycler, Laser- und Detektionssystem und der zugehörigen Sequence Detection System Software Version 1.7.

3.5.6 *Taqman-Analyse*

Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Modifizierung der Real-time PCR. Hierbei wird dem Versuchsansatz zusätzlich zu den beiden Primern ein weiteres synthetisches Oligonukleotid hinzugefügt. Diese Taqman-Sonde hybridisiert innerhalb der gesuchten Nukleotidsequenz des Zielgens, besitzt jedoch auf Grund einer Modifizierung am 3'-Ende keine Primerfunktion. An den beiden Enden der Sonde sind Fluorochrome konjugiert, die bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden. Hierbei entspricht die Emissionswellenlänge des Reportermoleküls der Anregungswellenlänge des Quencher-Farbstoffs. Solange sich die beiden Moleküle in unmittelbarer Nähe befinden, wird das durch den Reporter emittierte Licht durch den Quencher ausgelöscht. Bei Amplifizierung des DNA-Strangs mit der hybridisierten Sonde

werden durch die DNA-Polymerase die Farbstoffe aus ihrer Bindung gelöst, wodurch auf Grund der entstehenden Entfernung der beiden Fluorochrome eine Anregung des Quenchers nicht mehr möglich ist. Das emittierte Licht des Reporters liefert somit eine direkte Aussage über die vervielfältigte DNA-Menge.

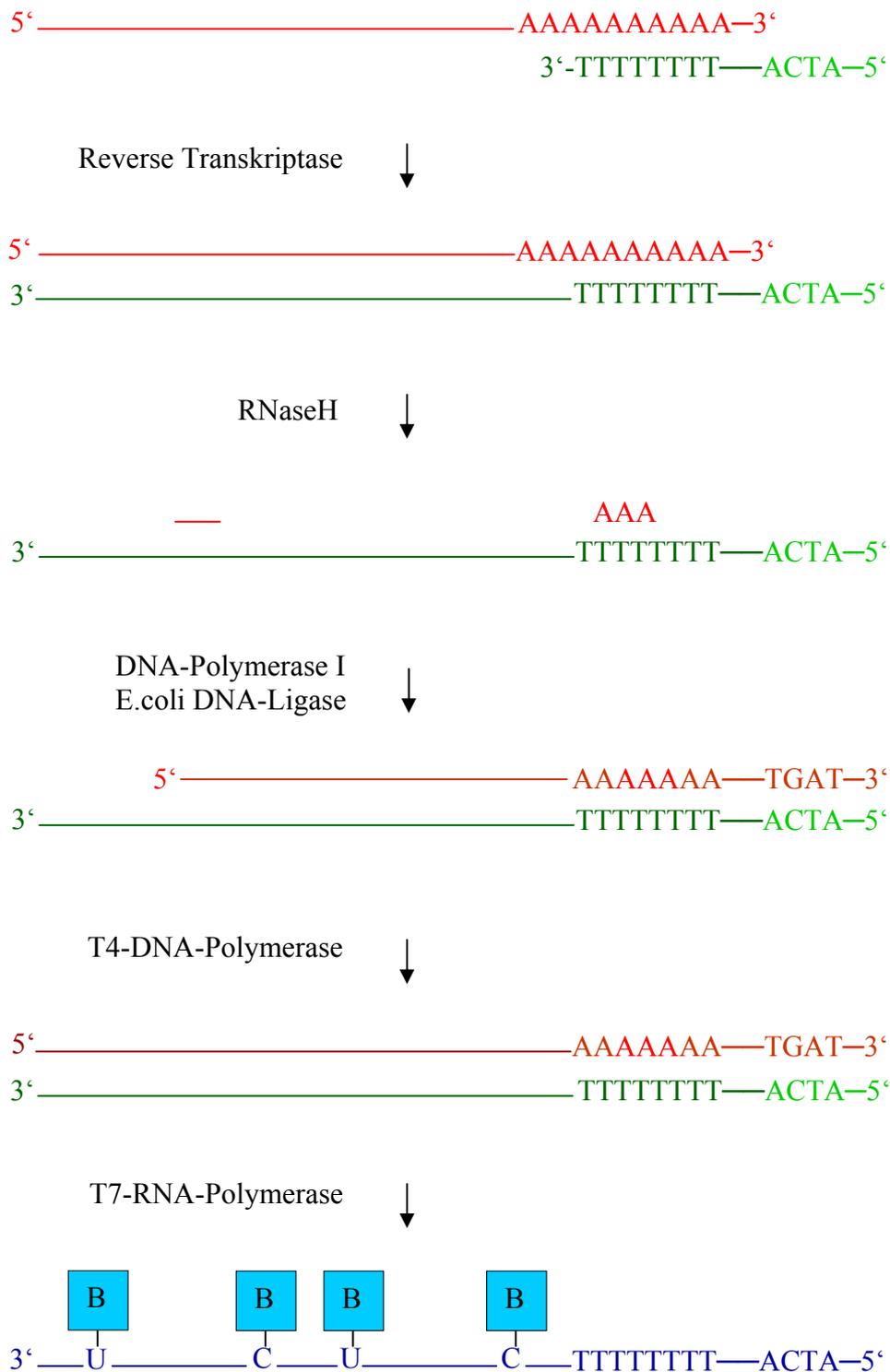
Es wurden pro Reaktionsansatz 1 µl cDNA-Probe mit 12,5 µl PCR Mastermix, 1,0 µl Taqman-Sonde, je 0,75 µl Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer und 9,0 µl RNase-freiem Wasser vermischt und eine Verdünnungsreihe erstellt. Die Untersuchung erfolgte im dreifachen Ansatz. Die Proben wurden auf eine 96-well-MicroAmp-Platte gegeben, abgedeckt und durch Zentrifugieren von Luftblasen befreit. Die Messung und Auswertung erfolgte im Applied Biosystems 7700 Sequence Detector und der zugehörigen Software.

3.6 RNA-Analyse mittels Affymetrix-Chip

Das Prinzip der Genchip-Analyse beruht auf dem Nachweis exprimierter mRNA von über 39000 verschiedenen Genen. Vergleichsanalysen bieten die Möglichkeit umfassende Unterschiede im Expressionsmuster verschiedener Proben zu ermitteln.

Bei Mikrochips der Firma Affymetrix binden Biotin-marierte antisense RNA-Fragmente an 25-mer Oligonukleotide, die mit Hilfe der photolithographischen Festplattensynthese auf den Glaträger des Biochips aufgebracht wurden. Eine Färbung der RNA erfolgt über die Bindung des Farbstoffs Streptavidin-Phycoerythrin an Biotin. Die Signalstärke der Fluoreszenzintensität wird zur Berechnung des mRNA-Expressionsgehaltes herangezogen.

Die Synthese der markierten antisense RNA erfolgt in mehreren Schritten. Bei der Erststrangsynthese wird von isolierter RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase ein komplementärer DNA-Strang gebildet. Die selektive mRNA-Umschreibung wird durch die Oligo-dT-Nukleotidsequenz des T7-Oligo-dT-Primers gewährleistet. RNase H greift am RNA-DNA-Hybridmolekül an und baut den RNA-Strang größtenteils ab. Die dadurch entstehenden restlichen RNA-Fragmente dienen als Primer für die DNA-Polymerase I. Diese verlängert den zweiten DNA-Strang und die neuen Sequenzen werden durch die E.coli DNA-Ligase verknüpft. Die T4-DNA-Polymerase vollendet die Zweitstrangsynthese durch Auffüllung der 5'-Enden des DNA-Doppelstrangs. Die Amplifizierung der RNA erfolgt mit Hilfe der DNA-abhängigen T7-RNA-Polymerase, die den korrespondierenden RNA-Phagen-Promotor im T7-Oligo-dT-Primer erkennt und in 5'-Richtung antisense RNA transkribiert (Abb.3.1).



Legende:

stellvertretender Ausschnitt des T7-Phagen Promotors

— ACTA —

stellvertretender Ausschnitt des T7-Oligo-dT-Primers

3' — TTTTTTTT — ACTA — 5'

mRNA

5' — AAAAAAAAAA — 3'

Abb. 3.1: Darstellung der Synthese von Biotin-markierten antisense RNA

3.6.1 RNA-Isolierung

Bei -80°C konservierte und wie unter 3.2.5 beschrieben präparierte Zellpellets bestehend aus glatten Gefäßmuskelzellen wurden auf Eis angetaut und in $350\mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol enthaltenden RLT-Puffer resuspendiert und lysiert. Um die RNA-Ausbeute zu erhöhen und ein Verstopfen der RNeasy Mini-Spinsäulen zu verhindern, wurde die Suspension 2min bei maximaler Drehzahl in einer QIAshredder Spinsäulen homogenisiert. Das Lysat wurde mit dem gleichen Volumenanteil 70% (v/v) Ethanol gemischt, auf eine RNeasy Spinsäule gegeben und 15s bei $8000g$ zentrifugiert. Hierbei wurden RNA-Fragmente, die länger als 200 Nukleotide waren, an die Säulenmatrix gebunden. Übrige Substanzen wurden mit RW1-Puffer aus der Säule gewaschen. Zur vollständigen Entfernung der genomischen DNA wurde DNase I-Lösung mit RDD-Puffer versetzt und auf die Säule gegeben. Die DNA wurde 30min bei Raumtemperatur verdaut. Es folgten drei Waschschritte mit RW1- bzw. zweimal mit RPE-Puffer. Zur Trocknung wurde die Säule anschließend bei voller Geschwindigkeit 2min zentrifugiert. Die Eluierung der RNA erfolgte mit $30\mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser. Die RNA-Menge wurde wie unter 3.5.2 beschrieben quantifiziert. Nicht verwendete Proben wurden bei -80°C konserviert.

3.6.2 Erststrangsynthese

Für die Erststrangsynthese wurden Ausgangsmengen von $9\text{-}18\mu\text{g}$ RNA pro Probe verwendet. Jeder Probe wurden $2\mu\text{l}$ $50\mu\text{M}$ T7-Oligo-dT-Primer zugesetzt und das Volumen mit DEPC-Wasser auf $14\mu\text{l}$ ergänzt. Die Lösungen wurden 10min bei 70°C inkubiert. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert und 5min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von $4\mu\text{l}$ Erststrangpuffer, $2\mu\text{l}$ $0,1\text{M}$ DTT, $2\mu\text{l}$ 10mM Nukleotidmischung, $2\mu\text{l}$ RNase-Inhibitor ($20\text{-}40\text{U}/\mu\text{l}$) und $2\mu\text{l}$ Reverse Transkriptase ($200\text{U}/\mu\text{l}$) wurde kurz gemischt und 90min bei 42°C inkubiert. In dieser Zeit vervollständigte die Reverse Transkriptase den komplementären DNA-Strang. Anschließend wurde das Enzym für 10min bei 70°C inaktiviert.

3.6.3 Test-Taqman

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe der Taqman-Methode bestätigt. Nachgewiesen wurde das Haushaltsgen Maus-GAPDH. Die Durchführung erfolgte wie unter 3.5.6 beschrieben im doppelten Ansatz.

3.6.4 *Zweitstrangsynthese*

23,5µl cDNA-Probe der Erststrangsynthese wurden mit einer Mischung aus 91µl RNase-freiem Wasser, 30µl 5x Zweitstrangpuffer, 3µl dNTPs (10µM), 1µl E.coli DNA-Ligase (10U/µl), 4µl DNA-Polymerase I (9U/µl) und 1µl RNase H (1,5U/µl) versehen, vorsichtig vermengt und kurz abzentrifugiert. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei 16°C. Dem Versuchsansatz wurden 2µl T4-DNA-Polymerase (7,9U/µl) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte 5min bei 16°C, hierbei vervollständigte die T4-DNA-Polymerase die 5'-Enden des Zweitstrangs. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10µl 0,5mM EDTA-Lösung gestoppt.

3.6.5 *DNA-Aufreinigung*

Die Aufreinigung der gewonnenen doppelsträngigen DNA erfolgte durch Zugabe der gleichen Volumenmenge eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1 (v/v/v)). Durch ausgiebiges Vortexen wurde die Probe emulgiert und in ein abzentrifugiertes Phase-Lock-Gel-Gefäß überführt. Es wurde 2min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert und die obere wässrige, Nukleinsäuren enthaltende Phase abgenommen.

Zur Extraktion der DNA wurde die Lösung mit dem halben Volumen 7,5M Ammoniumacetat-Lösung versetzt und als Fällungshilfe 2µl lineares Acrylamid zugefügt. Für die DNA-Fällung wurde das 2,5fache Volumen an eisgekühltem, absolutem Ethanol zugegeben, geschüttelt und bei -20°C über Nacht inkubiert. Es wurde 20min bei 4°C und maximaler Drehzahl zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit eisgekühltem 70%(v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und bei 37°C getrocknet.

3.6.6 *T7-Reaktion, Amplifikation*

Es wurde für jede Probe eine Mischung aus 2µl 10x Reaktionspuffer, 2µl T7-RNA-Polymerase-Mischung, je 3,5 µl 10mM Bio-11-CTP bzw. Bio-16-UTP je 2µl 75mM ATP bzw. GTP und je 1,5µl 75mM CTP, bzw. UTP auf Eis vorbereitet. Das DNA-Pellet wurde in 5µl DEPC-Wasser resuspendiert und mit der vorgefertigten Mischung vermengt. Der Reaktionsansatz wurde 5 Stunden bei 37°C inkubiert und zwischenzeitlich vorsichtig geschüttelt. Die Amplifikation erfolgte durch mehrfache Transkription der Biotin-markierten antisense aRNA.

3.6.7 *Aufreinigung mit RNeasy-Säulen*

Die Probenansätze wurden mit DEPC-Wasser zu 100µl ergänzt und mit 350µl RLT-Puffer gemischt. Nach Vermengung mit absolutem Ethanol wurde der Ansatz auf eine RNeasy-Säule

gegeben und 1min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit RPE-Puffer gewaschen und anschließend trocken zentrifugiert. Die an der Säulenmatrix haftende RNA wurde mit 100µl DEPC-Wasser eluiert und mit dem halben Volumen an 7,5M Ammoniumacetatlösung und 1µl linearem Acrylamid gemischt. Nach Vermengung mit dem 2,5fachen Volumen an eiskaltem, absolutem Ethanol wurde die Nukleinsäure über Nacht bei -20°C gefällt. Die Probe wurde 30min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und das Pellet mit eiskaltem 70%(v/v) Ethanol gewaschen und 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde 30min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 20µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die Biotin-markierte aRNA wurde wie unter 3.5.2 beschrieben quantifiziert und auf eine Endkonzentration von 15µg/32µl verdünnt.

3.6.8 *Affymetrix-Chip-Analyse*

Die Biochip-Analyse erfolgte mit dem GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Dieser Chip repräsentiert 45 101 Probensätze. Das Design des Genechip®Arrays besteht aus 11 bis 20 Probenpaaren für jedes nachzuweisende Gen. Jedes Probenpaar setzt sich zusammen aus einer dem Gen entsprechenden Oligonukleotidsequenz, mit der die Proben-RNA perfekt hybridisiert (perfect match, PM). Die andere Oligonukleotidsequenz unterscheidet sich in einer Base, wodurch eine Fehlpaarung mit der Probe erzielt wird (mismatch, MM).

Die synthetisierte Biotin-markierte aRNA wurde nach dem Standard-Affymetrixprotokoll fragmentiert, auf den Chip gegeben und 16 Stunden bei 45°C hybridisiert. Anschließend wurden die Arrays gewaschen und mit Streptavidin-Phycoerythrin in der Affymetrix Fluidics Station 450 gefärbt. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Affymetrix GeneChip Scanners 300 7G. Die Bilddateien wurden mit der Software GCOS 1.4 analysiert. Zur Korrektur von Hintergrundsignalen wurde der quantitative Expressionsgehalt jedes Gens aus der Differenz berechnet, die sich aus den Signalintensitäten der perfekten Paarung und der Fehlpaarung ergaben. Die Werte wurden über einen Scaling Faktor normalisiert. Gene mit $P_{\text{value}} < 0,0025$ und einem mindestens zweifachen Signalunterschied wurden als unterschiedlich exprimiert betrachtet, wenn mindestens eine Signalstärke >200 war. aRNA-Fragmentierung, Hybridisierung, Färbung, sowie die Biochip-Analyse wurden in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Norbert Hübner (MDC, Berlin) ausgeführt.

3.7 Proteinanalyse

3.7.1 Präparation von Zellextrakten

In 6cm-Zellkulturschalen kultivierte, 70-90% konfluente glatte Gefäßmuskelzellen wurden in PBS gewaschen, mit 100µl RIPA-Lysepuffer versetzt und auf Eis gestellt. Die adhärenen Zellen wurden zügig mit einem Gummischaber abgekratzt und die Suspension in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 10min auf Eis lysiert und anschließend 10min bei 14000g und 4°C zentrifugiert. Das Proteinlysate wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Bedarf entweder konserviert oder analysiert. Zur Konservierung wurde die Proteinlösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt.

3.7.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinproben wurden bei Vergleichsanalysen mit äquivalenten Konzentrationen eingesetzt. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mittels der Methode nach Bradford.

Das Prinzip dieser Analyse beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue-G250 an vorhandene Proteine, wodurch der Farbstoff vom kationischen in den anionischen Zustand überführt wird. Die Absorption der anionischen Form wird bei 595nm gemessen. Die Absorptionsänderung ist über einen weiten Bereich proportional zur Proteinkonzentration. Dieser Bereich wird durch eine mit BSA in PBS erstellte Eichgerade definiert.

Mit Hilfe eines Vorversuchs wurde der Verdünnungsgrad für die Konzentrationsmessung im linearen Bereich bestimmt. Aliquote der Proteinproben wurden mit dem ermittelten Faktor in PBS verdünnt und 50µl in einer durchsichtigen 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt. 200µl einer frisch angesetzten Bradfordlösung wurden hinzugefügt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte mit Hilfe des Spektrometers Spectrafluor Plus (Tecan, MTX Lab Systems, Inc., Vienna, Virginia, USA) und die Auswertung mit der zugehörigen Software Magellan 3.0.

3.7.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinlysate wurden nach der Proteinbestimmung mit PBS verdünnt, um vergleichbare Proben mit äquivalenter Proteinkonzentration zu erhalten. Die definierten Proben wurden mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 6:1 vermischt. Die Proteine wurden 5min bei 95°C im Thermoblock denaturiert, 5min auf Eis gekühlt und kurz abzentrifugiert. Polyacrylamidgele, bestehend aus 10 bzw. 12%igen Trenngelen wurden in einer Gelgießvorrichtung gegossen, mit Sammelgel überschichtet und in einer Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wur-

de mit 1x Laufpuffer befüllt und die Taschen der Gele von Acrylamidresten befreit. Die Proteinproben bzw. ein Proteinmarker wurden in die Taschen überführt. Mit Hilfe eines Spannungsgebers wurde ein elektrisches Feld erzeugt und die konstant negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe wanderten zum Pluspol. Um eine gleichmäßige Auftrennung zu erhalten wurden die Proteine im Sammelgel bei 60 Volt zu einer Lauffront konzentriert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte im Trenngel bei 120 Volt. Zur Charakterisierung des gesuchten Proteins wurde die elektrophoretische Mobilität, basierend auf dem Molekulargewicht des Proteins, mit einem Standardprotein des Markers verglichen.

3.7.4 *Western-Blot-Analyse*

Bei der Western-Blot-Analyse werden die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Hintergrund des Transfers besteht darin, dass die Membran eine gut handhabbare, feste Vorlage darstellt, welche die Diffusion der Proteine unterbindet.

Sowohl Nitrocellulosemembran als auch Blotpapier wurden für 10min vor Verwendung in Transferpuffer gelegt. Anschließend wurde ein luftblasenfreier Blotstapel zusammengesetzt, bei dem das Gel senkrecht zur Laufrichtung auf die Membran aufgelegt wurde und die äußeren Lagen aus Blotpapier bestanden. Der Stapel wurde zwischen die Graphitplattenelektroden der Blotapparatur eingelegt, so dass die im Gel enthaltenen Proteine in Richtung der Anode auf die Membran übertragen werden konnten. Der Transfer erfolgte für 1 Stunde bei 110mA pro Gel. Zur Kontrolle der Übertragung wurde die Membran für kurze Zeit in eine Ponceau-Färbelösung gelegt. Ponceau-Rot färbt Proteine unspezifisch an. Die Färbelösung wurde anschließend durch Waschen der Membran in 1x TBST entfernt.

3.7.5 *Chemilumineszenz-Verfahren*

Um unspezifisches Anlagern der Antikörper an die Transfermembran zu verhindern, wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken in 1% Pepton/1x TBST geblockt. Der spezifische erste Antikörper wurde im Verhältnis 1:500 in 1% Pepton/1xTBST verdünnt und auf die Membran gegeben. Für die immunologische Reaktion wurde die Membran in der Antikörperlösung über Nacht bei 4°C geschwenkt. Der HRP-gekoppelte zweite Antikörper wurde im Verhältnis 1:5000 in 1% Pepton/1x TBST verdünnt. Die Membran wurde dreimal in 1x TBST gewaschen, mit der Antikörper-Lösung versetzt und für die Antikörper-Antikörper-Reaktion bei Raumtemperatur eine Stunde geschwenkt. Anschließend wurde die Membran dreimal mit 1x TBST gewaschen und nach Zugabe der Detektionslösung für

1min inkubiert. Hierbei katalysierte die Meerrettichperoxidase die Chemilumineszenzreaktion. Die Membran wurde luftblasenfrei in eine Expositionskassette überführt. In der Dunkelkammer wurde ein Autoradiographiefilm in die Kassette eingelegt. Die Expositionsdauer orientierte sich an der Intensität der Banden auf dem entwickelten Foto. Die Filmentwicklung erfolgte mit einem automatischen Entwicklungsgerät.

3.7.6 *Strippen von Membranen*

Beim Strippen von Membranen werden die gebundenen Antikörper von der Membran entfernt, so dass die Analyse eines weiteren Proteins möglich wird.

Die Stripping-Lösung wurde frisch angesetzt, auf die Membran gegeben und 30min bei 55°C unter Schütteln im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit 1x TBST gewaschen und 1 Stunde in 1% Pepton/1x TBST geblockt.

3.7.7 *Quantitative Auswertung der Proteinexpression*

Die Western Blot-Filme wurden densitometrisch mit dem Software-Programm NIH Scion Image 1.63 analysiert. Nach Abzug des Hintergrundes wurden drei Werte arithmetisch gemittelt, normalisiert und der Standardfehler des Mittelwerts berechnet. Die quantitative Auswertung erfolgte nach mehrmaliger Versuchswiederholung.

3.8 **Immunfluoreszenz**

3.8.1 *Fixierung und Permeabilisierung*

3,5cm-Zellkulturschalen mit eingelegten sterilen Deckgläschen wurden vorbereitet und glatte Gefäßmuskelzellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben passagiert. Pro Zellkulturschale wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei einer Dichte von 50-70% wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10min in frisch angefertigter 4%iger PFA/PBS bei Raumtemperatur fixiert und abermals in PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte in eiskaltem 80%igen (v/v) Methanol bei -20°C. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und bei Bedarf bei -20°C aufbewahrt.

3.8.2 *Färbung und mikroskopische Analyse*

Das Deckgläschen mit den fixierten und permeabilisierten Zellen wurde für mehrfache Untersuchungen vorsichtig in kleinere Teile gesplittert. Die für die Untersuchung verwendeten Splitter wurden über Nacht bei 4°C in 2% BSA/PBS geblockt und anschließend dreimal in PBS gewaschen. Die Zellen wurden eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem 1:40 in 1% BSA/PBS verdünnten α -Glattmuskel-Actin-Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde der in 1% BSA/PBS 1:200 verdünnte, mit dem Fluorochrom Alexa Fluor 488 konjugierte sekundäre Anti-Maus-Antikörper hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen in Aqua Poly/Mount-Lösung eingebettet. Die Fluoreszenzmessung und Auswertung der Proben erfolgte an einem konfokalen Laserscan-Mikroskop. Als Mikroskop wurde ein Invertmikroskop (Diphot 300, Nikon, Japan) verwendet, an das ein MRC 1024 Laserscan-System (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) mit Argon-Krypton-Laserquelle angeschlossen war. Zur Beobachtung wurde ein 60 \times Ölimmersionsobjektiv eingesetzt. Die Bildaufnahme erfolgte mit Hilfe der Software Lasersharp 4.2 (Bio-Rad).

3.8.3 *Quantitative Auswertung*

Die quantitative Auswertung erfolgte durch eine Intensitätsmessung an Hand der schwarz-weiß Abbildungen der glatten Gefäßmuskelzellen mit Hilfe des Programms Adobe-Photoshop 7.0. Die Intensität der weißen Bereiche entspricht der Fluoreszenzstärke von Alexa Fluor und ist somit proportional zum α -Glattmuskel-Actin-Gehalt der vermessenen Zelle. Für die statistische Auswertung wurden 50 Zellen pro Zellart vermessen.

3.9 **Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität**

Der Nachweis der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte leicht abgewandelt nach der Methode von Dimri und Mitarbeitern (Dimri et al., 1995). Das Prinzip des Nachweises beruht auf der Umsetzung von X-Gal durch Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase bei pH 6, wodurch im zweiten Schritt durch Reaktion mit Luftsauerstoff ein tiefblauer Indigofarbstoff entsteht.

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben passagiert und mit einer Dichte von 1000 Zellen pro 100 μ l Vollmedium je Kamin auf einen sterilen Objektträger ausgesät. Die Zellen wurden wie unter 3.2.1 beschrieben kultiviert und bei einer Dichte von 50-70%

Konfluenz fixiert. Hierfür wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und 10min bei Raumtemperatur mit Fixierlösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die frisch angesetzte Färbelösung hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 3 Tage bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und die Kamme sowie die Gummidichtungen vom Objektträger entfernt. Zur späteren Charakterisierung der Zellkerne wurden die Zellen in DAPI-Mounting-Medium eingebettet und der Objektträger mit einem Deckglas versehen. Die Präparate wurden bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Analyse und Bilddarstellung erfolgten mit einem Axioplan-2 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) und der zugehörigen Axio Version 3.0 Software unter Einstrahlung von sichtbarem Licht bei 100facher Vergrößerung.

3.10 Telomerase-Aktivitätsmessung

Die Telomerase-Aktivität wurde mit Hilfe des Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS}-Assays durchgeführt. Das Enzym Telomerase kompensiert Telomerverkürzungen, indem es fehlende, sich wiederholende Nucleotidsequenzen ergänzt.

Kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit PBS gewaschen, nach Zugabe von Lyse-Reagenz abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und 30min auf Eis lysiert. Es wurde 20min bei 13000g und 4°C zentrifugiert und der Proteingehalt des Lysats wie unter 3.7.2 beschrieben bestimmt. Die Proben wurden geteilt und je ein Teil wurde bei 85°C für 10min denaturiert. Probenaliquote mit einem Gehalt von je 3µg Proteinen wurden mit nukleasefreiem Wasser auf 20µl aufgefüllt. Jede Probe wurde mit 25µl Reaktionsmischung, bestehend aus 2x konzentrierter Lösung, biotinyliertem Telomerase-Substrat P1-TS, optimiertem Anker-Primer P2, Nukleotiden und Taq DNA-Polymerase, ergänzt. Um auszuschließen, dass ein in den Zellen exprimierter Taq DNA-Polymerase-Inhibitor enthalten ist, wurde allen Proben 5µl interner Standard zugefügt. Im GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wurde eine PCR-Reaktion nach folgendem Protokoll durchgeführt: 30min bei 25°C für die Primerelongation, 30 Zyklen mit je 30s Denaturierung bei 94°C, 30s bei einer Schmelztemperatur von 50°C und 90s Polymerisation bei 72°C und einer Reaktionsbeendigung von 10min bei 72°C. Zu je zweimal 2,5µl Probe und einmal 2,5 µl hitzeinaktivierter Probe wurden 10µl Denaturierungspuffer gegeben und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Einer Probe und der Negativkontrolle wurden 100µl Hybridisierungspuffer T zugesetzt, die andere Probe wurde mit 100µl Hybridisierungspuffer IS versehen. Es wurde vorsichtig ge-

mischt. Bei diesem Schritt hybridisierte Digitoxigenin-markiertes Reagenz an die Amplifikationsprodukte. 100µl jeder Probe wurden auf die Straptavidin-beschichtete Mikroplatte übertragen, mit Folie abgedeckt und bei 37°C und 300rpm 2 Stunden geschüttelt. Hierbei wurden die Amplifikationsprodukte durch Bindung von Biotin an Streptavidin immobilisiert. Der Hybridisierungspuffer wurde entfernt und die Platten dreimal mit 1x Waschpuffer vorsichtig gewaschen. Nach Zugabe von HRP-gekoppelter Dixitoxigenin-Antikörper wurde die Platte abermals abgedeckt und 30min bei Raumtemperatur und 300rpm geschüttelt. Die Lösung wurde vollständig entfernt und die Platte fünfmal mit 1x Waschpuffer gewaschen. Es wurden je 100µl TBM-Substratlösung zugefügt, die Platte abgedeckt und 20min bei Raumtemperatur und 300rpm geschüttelt. Zu jeder Probe wurden 100µl Stopp-Reagenz zugefügt, um die Farbentwicklung anzuhalten. Die Absorption der Proben wurde bei 450nm und einer Referenzwellenlänge von 655nm im ELISA Mikroplatten-Lesegerät (Modell 680, Biorad, München) gemessen. Die Auswertung erfolgte im ersten Schritt durch Subtraktion der Absorptionswerte der Referenzwellenlänge von den Werten bei der Absorption bei 450nm. Im zweiten Schritt wurde die Absorption der jeweiligen hitzeschockinaktivierten Negativkontrolle abgezogen.

3.11 Statistische Analyse

Alle Experimente wurden in dreifachen Ansätzen durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt. Für die quantitative Analyse der Western-Blot-Ergebnisse wurden die Daten normalisiert, wobei eine definierte Probe auf 100% gesetzt wurde. Die Daten werden präsentiert als Mittelwert +/- SEM. Statistisch signifikante Unterschiede wurden dem Student's t-test folgend ausgewertet und mehrmals wiederholt. Ein Wert von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die Daten wurden unter Verwendung des Statistik-Programms SSPS 12.0 analysiert.