

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Alle im folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten oder sterilfiltrierten Lösungen (Porendurchmesser der Filter 0,2 µm). Zum Ausschluss einer etwaigen Mykoplasmen-Kontamination wurden die Zellkulturen zur mikrobiologischen Untersuchung ins Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen (Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin) eingesandt. Alle mit humanem oder transfiziertem Zellmaterial in Kontakt getretenen Materialien oder Geräte wurden anschließend mit 90%igem Alkohol desinfiziert oder durch Autoklavieren sterilisiert.

Die Zellen wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37°C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

Die regelmäßige phasenkontrastmikroskopische Untersuchung der Zellkulturen erfolgte am Invert-Mikroskop mit 50-, 100-, 200- und 320-facher Vergrößerung und die Photodokumentation mittels einer PC-gesteuerten Videokamera (Inteq 000610) mit angeschlossener Bildverarbeitungssoftware (Axiovision).

4.1.1 Verwendete Zellen

4.1.1.1 Murine mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Myokard (MHEC5)

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um mikrovaskuläre Endothelzellen, die aus dem Herzmuskel zwei Wochen alter Mäuse isoliert, identifiziert und etabliert wurden (Plendl et al., 1993). Die Identifizierung der Endothelzellen erfolgte anhand der *in vitro*-Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL), der Lokalisation des von Willebrand Faktors (vWF) und der Expression des Angiotensin-converting-enzyme (α -ACE). MHEC5 war einer von verschiedenen Klonen, die von der elterlichen Zelllinie bei Passage 25 mittels „*limiting dilution cloning*“ gewonnen wurden. Plendl et al. (1995) beschrieben ab Passage 42 ein verändertes Wachstumsverhalten dieser Zellen, eine spontane Transformation mit Übergang

von endothelialer zu epitheloider Morphologie und Induktion von malignen Hämangioendotheliomen nach Implantation der Zellen in geeignete Empfängertiere. Die murinen Endothelzellen wurden in den Passagen 37 bis 46 verwendet.

4.1.1.2 Humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus der neonatalen Vorhaut (HDMEC)

Die humanen Endothelzellen wurden als gepoolte Zellkultur aus Zellen verschiedener Spender in der Passage 4 käuflich über die Fa. Cambrex Bio Science Verviers erworben. Die Identifizierung der Endothelzellen erfolgte anhand der *in vitro*-Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL), der Expression des von Willebrand Faktors (vWF) sowie der fehlenden Expression von α -Smooth Muscle Actin. Ein *in vitro*-Modell der Angiogenese dieser Zellen wurde von der Fa. Cambrex Bio Science Verviers nicht etabliert. Die humanen Endothelzellen wurden in den Passagen 4 bis 10 verwendet.

4.1.2 Kultivierung der Endothelzellen

4.1.2.1 Kulturschalen

Je nach Zielsetzung wurden sterile Zellkulturschalen unterschiedlicher Größe verwendet (zur Übersicht siehe Tab. 3).

Kulturschalen	Größe	Verwendungszweck
6-Loch-Kulturschalen	<ul style="list-style-type: none"> • 34,6 mm Durchmesser • 17,5 mm Höhe 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Vermehrung der murinen und humanen EZ ➤ Induktion der angiogenen Kaskade humaner EZ
24-Loch-Kulturschalen	<ul style="list-style-type: none"> • 15,5 mm Durchmesser • 17,3 mm Höhe 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Kultivierung muriner und humaner EZ ➤ Induktion der angiogenen Kaskade ➤ Transfektionsversuche
p35-Kulturschalen	<ul style="list-style-type: none"> • 35 mm Durchmesser • 10 mm Höhe 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Vermehrung der humanen EZ
p60-Kulturschalen	<ul style="list-style-type: none"> • 60 mm Durchmesser • 15 mm Höhe 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Vermehrung der humanen EZ
p100-Kulturschalen	<ul style="list-style-type: none"> • 100 mm Durchmesser • 20 mm Höhe 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Kultivierung der S180-Zellen zur Herstellung des konditionierten Mediums

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Kulturschalen mit Größe und Verwendungszweck

Für die immunhistochemische und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung wurden die Zellen auf sterilen Glasplättchen in 24-Loch-Platten gezüchtet.

Vor Aussaat der Zellen wurden die Kulturschalen bzw. Glasplättchen je nach Versuchsaufbau gelatinisiert. Hierfür wurde die Kulturschalenoberfläche mit 100 µl 1,5%iger Gelatine (in PBS, 0,01 M, pH 7.4) pro cm² bedeckt und für 10-15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die restliche flüssige Gelatine abgesaugt, die Kulturschalenoberfläche einmal mit 150 µl PBS pro cm² gewaschen und durch Zugabe einiger Tropfen Kulturmedium vor dem Austrocknen geschützt.

Die Endothelzellen wurden in einer Konzentration von 2-4x10⁴ Zellen pro cm² ausgesät. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Alle Medien und Lösungen, soweit nach Herstellerangabe möglich, wurden vor Verwendung auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt.

Je nach Verwendungszweck der Endothelzellen wurden diese nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers subkultiviert bzw. zur Beobachtung der angiogenen Kaskade in Kultur belassen. Anhand mikroskopischer Untersuchungen wurde die angiogene Kaskade *in vitro* in 5 Stadien eingeteilt (siehe Kapitel 5.1).

4.1.2.2 Kulturmedien

Für die Anzucht **muriner Endothelzellen (MHEC5)** sowie für die Herstellung von S180-Tumor-konditioniertem Medium wurde das Erhaltungsmedium DMEM⁺ verwendet (Zusammensetzung s. Kap. 3.10). Die Angiogenese der murinen Endothelzellen wurde durch ein Selektivmedium (P0) induziert (Zusammensetzung s. Kap. 3.10), welches als pro-angiogene Zusätze ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement), S180-konditioniertes Medium sowie Heparin enthielt. ECGS wird aus bovinem Nervengewebe gewonnen und enthält laut Hersteller den Endothelial Cell Growth Factor (ECGF)- α und - β sowie den Fibroblast Growth Factor (FGF), der ebenfalls von Maciag et al. (1979) charakterisiert wurde. S180-konditioniertes Medium wurde von Zellen eines murinen Fibrosarkoms gewonnen. Die Zellen produzieren spezielle Faktoren, die das Wachstum von Endothelzellen fördern (Folkman et al., 1979). Rosenthal et al. (1990) wiesen in diesem Medium den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) nach. Die Kultivierung der Tumorzellen erfolgte in DMEM⁺ bis zu einem Farbumschlag des enthaltenen Indikators von rot nach gelb. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde steril filtriert und in Aliquoten bei -20°C gelagert.

Für die Anzucht **humaner Endothelzellen (HDMEC)** wurde ein Wachstumsmedium (EGM-2 MV) verwendet, das entsprechend dem Herstellerprotokoll angesetzt wurde (s. Kap. 3.10). Versuchsweise wurden die humanen Endothelzellen im Erhaltungsmedium DMEM⁺ sowie im

Basalmedium EBM-2, supplementiert mit 5% FBS, 0,1% Vitamin C und 0,1% Gentamicin/Amphotericin kultiviert.

4.1.3 Subkultivierung

Eine Subkultivierung der Zellen erfolgte nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers, sofern die Zellkultur nicht zur Beobachtung der angiogenen Kaskade belassen wurde. Das Splitten der Zellen variierte je nach Zellspezies von 1:3 (HDMEC) bis 1:5 (MHEC5).

4.1.3.1 Subkultivierung muriner Endothelzellen

Zur Subkultivierung der murinen Endothelzellen wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit 100 µl PBS pro cm² gewaschen, um abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und Reste verbrauchten Mediums zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit einigen Tropfen Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt und für max. 3 min bei 37°C inkubiert. Durch leichtes Klopfen an der Kulturschale („shake off“) konnten die Zellen vom Kulturschalenboden gelöst werden. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe von einigen Tropfen Kulturmedium gestoppt, die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in neue Kulturschalen ausgesät bzw. für die Zellzählung verwendet.

4.1.3.2 Subkultivierung humaner Endothelzellen

Zur Subkultivierung der humanen Endothelzellen wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen nach einmaligem Spülen mit 100 µl HBSS (HEPES Buffered Saline Solution) pro cm² mittels 80 µl Trypsin/EDTA-Lösung (0,025% Trypsin/0,01% EDTA) pro cm² von der Kulturschale abgelöst. Nach Neutralisation der Enzymwirkung mit 160 µl TNS-Lösung (Trypsin-Neutralizing Solution) pro cm² und anschließendem einmaligen Spülen der Kulturschalenoberfläche mit 100 µl HBSS pro cm² wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt, bei 200 x g abzentrifugiert, im Kulturmedium resuspendiert und erneut ausplattiert.

4.1.4 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie zum Passagieren (s. Kap. 4.1.3) vom Boden der Kulturschale abgelöst. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 200 x g wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit Medium zur Kryokonservierung resuspendiert und in 1 ml Aliquoten in Kryoröhrchen überführt (2-3x10⁵ Zellen pro Kryoröhrchen). Die Kryoröhrchen wurden zunächst in einer dickwandigen Styroporbox auf -80°C heruntergekühlt, um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden. Nach 24-48 Stunden

wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff (-196°C) umgelagert. Die Protokollierung erfolgte mittels der Anwendungssoftware WinFreeze.

4.1.5 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff direkt in ein Wasserbad gegeben und bei 37°C vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml warmes Kulturmedium langsam aufgenommen und 5 min bei 200 x g sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet mit dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und in Kulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit frischem Nährmedium versorgt.

4.1.6 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen wie bei der Subkultivierung (s. Kap. 4.1.3) von der Kulturschale abgelöst, in Kulturmedium bzw. TNS gewaschen und bei 200 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und 1 Tropfen dieser Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Für jede Bestimmung wurden die Zellzahlen von jeweils 16 Kleinquadraten summiert, um die Zellzahl über einem Großquadrat zu erhalten. Alle Zellzahlbestimmungen wurden als Duplikate angelegt und die Mittelwerte (Mw) errechnet. Aus der Zellzahl und dem Verdünnungsverhältnis wurde dann die Zellzahl pro ml Suspension wie folgt ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mw der Zellzahl aus 2 Großquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante} (10^4)$$

4.2 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Endothelzellen *in vitro*

Für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung wurden die Endothelzellen auf Glasplättchen in 24-Loch-Platten angezüchtet. Die Volumina von Puffer, Lösungen und Reagenzien orientierten sich stets an einer ausreichenden Bedeckung der Proben.

Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (0,01 M, pH 7.4) und anschließend mit 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7.2) gespült. Die Fixierung erfolgte bei 4°C in Karnovsky-Lösung (2% Paraformaldehyd und 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer). Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 0,1 M Cacodylat-Puffer erfolgte die Kontrastierung unter Lichtabschluss für 2 Stunden bei 4°C mit 1% Osmiumtetroxid und 1,5% Kaliumferrocyanid (in 0,1 M Cacodylat-Puffer). Anschließend wurden die Zellen dreimal für ca.

10 Minuten in 0,1 M Cacodylat-Puffer gespült. Im nächsten Schritt mussten die Zellen vom Glasplättchen in der Vertiefung abgelöst werden. Sofern die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von Einzelzellen (z.B. während der Transfektion) im Vordergrund stand, konnten diese unter mikroskopischer Kontrolle mittels Zellschaber vom Glasplättchen abgeschabt und durch Spülen mit 0,1 M Cacodylat-Puffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 200 x g wurde das Zellpellet dann mit 1,5%igem Agar (in Aqua dest.) für 30 min bei 4°C überschichtet und im Anschluss vorsichtig mit einer Kanüle aus dem Reaktionsgefäß herausgelöst. Sollte der Zellrasen zusammenhängend untersucht werden (z.B. während der angiogenen Kaskade), erfolgte die Beschichtung mit 1,5%igem Agar in der Vertiefung selbst für 30 min bei 4°C. Anschließend wurde der Agar mit anhaftendem Zellrasen vorsichtig mittels Glasspatel aus der Vertiefung herausgelöst.

Die Proben wurden nun in kleinere Stücke geteilt und in 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen. Es folgte die Entwässerung und Epon-Einbettung. Hierfür wurden die Proben über eine aufsteigende Ethanolreihe von 50%, 70%, 80%, 90% (je 15 min) sowie 100% (zweimal 15 min) in reines Propylenoxid für 15 min, anschließend in Propylen-Epon-Gemisch (1:1) für mindestens zwei Stunden sowie zuletzt in reines Epon für vier Stunden überführt. Anschließend wurden die Proben in eine Beemkapsel eingebettet und bei 60°C für 24-48 Stunden polymerisiert.

Mit einem Ultramikrotom wurden aus den auspolymerisierten Epon-Blöckchen 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, diese nach Richardson (Richardson et al., 1960, s. Kap. 3.10) gefärbt und lichtmikroskopisch, auch zur Vororientierung für das Anfertigen von Ultradünnschnitten, beurteilt. Von geeigneten Proben wurden schließlich Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt und auf Kupfergrids aufgefangen. Die anschließende Kontrastierung der Proben erfolgte mit Uranylacetat (Ultrastain I) und Bleicitrat (Ultrastain II) für jeweils 10 min.

Die Auswertung erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop. Zur Photodokumentation wurden Kodak Electron Microscope Filme verwendet.

4.3 Immunhistochemische Untersuchung humaner Endothelzellen *in vitro* zum Nachweis von Kollagen IV

Für die immunhistochemische Untersuchung humaner Endothelzellen während der angiogenen Kaskade *in vitro* wurden diese auf Glasplättchen in 24-Loch-Platten angezüchtet. Die Untersuchungen erfolgten stets im Doppelansatz. Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu sichern, wurden zwei negative Kontrollen im Einfachansatz in jedem Versuch mitgeführt. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich jeweils auf eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte.

Die Zellen wurden zweimal mit 300 µl PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 200 µl eiskaltem Methanol-Aceton (1:1) für 5 min bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 300 µl PBS. Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Zellen 20 min bei Raumtemperatur mit 150 µl Proteinblocker inkubiert. Nach Entfernen des Proteinblockers wurden die Zellen mit 150 µl von einem aus der Ziege gewonnenen polyklonalen Primärantikörper gegen humanes und bovines Kollagen IV in einer Verdünnung mit PBS von 1:20 ca. 20-22 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Die Kontrollansätze wurden mit einem aus der Ziege gewonnenen Normalserum (Verdünnung mit PBS 1:40) bzw. mit PBS-Puffer überschichtet. Am nächsten Tag wurden die Zellen zur Entfernung nicht-gebundenen Primärantikörpers zweimal mit 300 µl PBS gewaschen und bei Raumtemperatur und in Dunkelheit für 30 min mit 150 µl von dem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper Kaninchen anti-Ziege IgG in einer Verdünnung mit PBS von 1:20 inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 300 µl PBS zur Entfernung des überschüssigen Sekundärantikörpers wurden die Glasplättchen mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einen mit einem Tropfen Fluorostab präparierten Objektträger gebracht. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit 100- und 400-facher Vergrößerung und die Photodokumentation mittels einer PC-gesteuerten Videokamera (C3 CCD DXC) und dem Bildanalysesystem Lucia M.

4.4 Histologische Untersuchung humaner Endothelzellen *in vitro* mittels May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Eine histologische Untersuchung humaner Endothelzellen *in vitro* erfolgte stets im Anschluss an die immunhistochemische Untersuchung. Hierfür wurden die Glasplättchen wieder von den Objektträgern abgezogen und mit PBS gespült. Durch Zugabe von Methylalkohol-Aceton (1:1) für 5 min wurden die Proben bei Raumtemperatur fixiert, mit PBS gespült und an der Luft getrocknet.

Die luftgetrockneten Glasplättchen wurden für 3 min mit ca. 20-30 Tropfen May-Grünwald-Färbelösung überschichtet und anschließend die gleiche Menge Aqua dest. für 1 min hinzugefügt. Nach Abgießen der verdünnten Färbelösung wurden die Proben mit verdünnter Giemsa-Lösung (3% in Aqua dest.) für 15-20 min überschichtet, anschließend mit Aqua dest. abgespült und an der Luft getrocknet.

Die Auswertung erfolgte am Mikroskop Optiphot 2 mit 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung und die Photodokumentation mittels einer PC-gesteuerten Videokamera (C3 CCD DXC) und dem Bildanalysesystem Lucia M.

4.5 Transiente Transfektion mikrovaskulärer Endothelzellen

Zur Charakterisierung verschiedener Plasmidkonstrukte auf Effizienz in den etablierten Zellkulturmodellen wurden murine und humane Endothelzellen in verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade *in vitro* transfiziert.

4.5.1 Verwendete Plasmidkonstrukte

Als Ausgangsvektor für alle Plasmidkonstrukte diente der Vektor pJWM115, ein modifizierter pCMV β Vektor der Fa. Clontech (Heidelberg). Der pCMV β Vektor weist Gene für den CMV-Promotor, das Reportergen β -Galactosidase sowie für die Ampicillinresistenz auf. Durch Austausch des β -Galactosidase-Gens gegen das Luciferase-Gen aus dem Vektor pGL3 der Fa. Promega (Mannheim) wurde der Vektor pJWM115 hergestellt.

Um die Expressionsstärke verschiedener Promotoren zu testen, wurde der CMV-Promotor des Vektors pJWM115 ausgetauscht gegen:

- ein langes Fragment des humanen Ets-1-Promotors (Nucleotid 87-1943; Jorcyk et al., 1991)
- ein kurzes Fragment des humanen Ets-1-Promotors (Nucleotid 948-1943; Jorcyk et al., 1991) sowie
- den murinen E-Selektin-Promotor (Collins et al., 1991).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Plasmide untersucht, in die neben dem E-Selektin-Promotor (kurz E-sel-Promotor) zusätzliche regulatorische Sequenzen kloniert wurden (muriner 5x β bs-Enhancer, muriner Flk-1-Enhancer, humanes HLA-Intron).

Als Reportergen wurde das Enzym Firefly Luciferase aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis* gewählt, da sich dieses Nachweisverfahren durch das Fehlen eines eukaryontischen Äquivalentes sowie durch seine sehr hohe Sensitivität auszeichnet (De Wet et al., 1987). Die Stärke der Expression des Reportergens sollte zu einer Aussage über die Aktivität verschiedener Promotoren sowie über die Promotoraktivitätssteigerung durch Enhancer-/Intron-Sequenzen in der jeweiligen Zelllinie führen.

In der Tab. 4 sind die verwendeten Plasmidkonstrukte in einer Übersicht zusammengestellt.

<i>Vektor</i>	<i>Reportergen</i>	<i>Promotor</i>	<i>Zusätzliche regulatorische Gensequenz</i>
pJWM115	Luciferase	CMV	keine
pCK5	Luciferase	Ets-1I (6,592 Kb)	keine
pPS12	Luciferase	Ets-1k (5,737 Kb)	keine
pPS6	Luciferase	E-sel	keine
pPO18	Luciferase	E-sel	5xeps-Enhancer
pPO14	Luciferase	E-sel	Flk-1-Enhancer
pPO12	Luciferase	E-sel	HLA-Intron

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Plasmidkonstrukte

4.5.2 Transfektionsreagenz

Zur Transfektion der Endothelzellen mit Plasmid-DNA wurde das polykationische *SuperFect Transfection Reagent* verwendet. Das Reagenz basiert auf aktivierten Dendrimer-Molekülen, stark verzweigten sphärischen Makromolekülen. Die Komplexbildung erfolgt durch Bindung der negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Moleküls an die positiv geladenen Aminogruppen der Dendrimere. Die gebildeten kompakten Komplexe besitzen eine positive Nettoladung.

4.5.3 Kultivierung der Zellen für die Transfektion

Zur Transfektion der Endothelzellen im Stadium der Proliferation wurden die Zellen 20 bis 24 Stunden vor der Transfektion mit einer Aussaatdichte von $0,5-2,25 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 (murine Endothelzellen) bzw. $1,7-2,1 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 (humane Endothelzellen) in 24-Loch-Platten ausgesät, in 500 μl Erhaltungs- (DMEM⁺) bzw. Wachstumsmedium (EGM-2 MV) pro Kulturschale kultiviert und am folgenden Tag bei 30-40% Konfluenz transfiziert. Der Zeitraum zwischen Aussaat und Transfektion wurde in Vorversuchen durch Zellzählung und mikroskopische Kontrolle ermittelt.

Zur Transfektion muriner und humaner Endothelzellen im fortgeschrittenen Stadium der angiogenen Kaskade wurden diese im Selektivmedium (P0) bzw. Wachstumsmedium (EGM-2 MV) bis zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen kultiviert und anschließend transfiziert.

4.5.4 Durchführung der Transfektion

Alle Transfektionen wurden in 24-Loch-Kulturschalen durchgeführt. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich jeweils auf eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte. Die Zeitangaben für

die Kultivierung nach der Transfektion beziehen sich auf die Auswertung transienter Expression. Die Transfektionen erfolgten stets im Vierfachansatz.

Zur Herstellung des Transfektionsansatzes wurden 0,25-4 µg Plasmid-DNA mit serum- und antibiotikafreiem Kulturmedium zu einem Volumen von 100 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß versetzt und kurz mit einem Vortex-Rührer gemischt. Nach Zugabe von 0,25-4 µl *Superfect*-Reagenz wurde der Ansatz noch einmal für 10 sec mit einem Vortex-Rührer gemischt und 10 min zur Komplexbildung bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubation wurde das Kulturmedium der Zellen nach Waschen mit 300 µl PBS durch 400 µl Kulturmedium ohne Serum- und Antibiotika-Zusatz ersetzt. Anschließend wurden 100 µl Transfektionsansatz gleichmäßig auf die Zellen getropft und für 1-5 Stunden bei 37°C inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen unter dem Invert-Mikroskop beobachtet. Nach Absaugen des Transfektionsmixes erhielten die Zellen frisches Medium mit Serum- und Antibiotikazusatz und wurden bis zur Lyse weitere 24 bzw. 30 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen erneut unter dem Invert-Mikroskop beobachtet.

Ziel der mikroskopischen Beobachtungen war es, eventuelle morphologische Veränderungen an den Zellen während und nach der Transfektion festzustellen.

4.5.5 Nachweis der Expression und Bestimmung der Transfektionseffizienz

4.5.5.1 Lyse der transfizierten Zellen

Die adhärennten Endothelzellen wurden in der 24-Loch-Kulturschale lysiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 300 µl PBS pro Vertiefung gewaschen. Nach vollständigem Absaugen des Puffers wurden pro Vertiefung 100 µl *Cell Culture Lysis Reagent* (25 mM Tris-phosphat, 2 mM DTT, 2 mM 1,2-diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure, 10% Glycerin, 1% Triton[®] X-100) des *Luciferase-Assay System* zum Lysieren der Zellen verwendet. Nach 20 min Inkubation bei 37°C wurde das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 10.000 x g für 2 min zentrifugiert (Tischzentrifuge), um Zelltrümmer abzutrennen. 50 µl des klaren Lysisüberstandes wurden zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität in ein Polystyrol-Messröhrchen überführt und bis zur Messung auf Eis gelagert. 10 µl des Überstandes wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei -80°C gelagert.

4.5.5.2 Luciferase-Assay

Die Lumineszenzmessung erfolgte im Luminometer mit angeschlossener FB12 Sirius Software. Für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden 50 µl Zellextrakt in ein Messröhrchen gegeben und in der Messkammer des Luminometers platziert. Um temperaturbedingte Schwankungen der Enzymaktivität zu vermeiden, wurde das Lysat vor der Messung an Raumtemperatur adaptiert. Als Leerwert wurde der zur Lyse der transfizierten Zellen verwendete Puffer eingesetzt.

Die Chemilumineszenz wurde durch automatische Injektion von 100 µl Luciferin-Reaktionsgemisch des *Luciferase-Assay System* pro Probe für 10 sec gemessen und der Messwert in RLU/s (Relative Light Units pro Sekunde) ausgegeben. Der gemessene RLU-Wert des Leerwertes wurde automatisch von den Messwerten der Proben abgezogen.

4.5.5.3 Proteinbestimmung nach Pierce (Bicinchoninic Acid, BCA)

Der Proteingehalt in den Zelllysaten wurde mittels BCA Protein Assay im Anschluss an die Luciferase-Messung bestimmt, um Unterschiede in der Zelldichte pro Kulturschale auszugleichen.

Der BCA-Assay kombiniert die Biuret-Reaktion, die Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{1+} -Ionen durch Protein unter alkalischem pH, mit der Fähigkeit von Bicinchonininsäure, mit Cu^{1+} -Ionen einen stabilen Farbkomplex zu bilden, der kolorimetrisch bei 562 nm (seinem Absorptionsmaximum) detektiert werden kann (Smith et al., 1985).

Der Proteinassay wurde in 96-Loch-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Messung erfolgte bei 565 nm gegen den zur Lyse der transfizierten Zellen verwendeten Puffer als Leerwert. Als Standard diente bovines Serumalbumin (BSA, Stammlösung 2 mg/ml), angesetzt im Lysepuffer in Konzentrationen von 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1,0 mg/ml. Alle Proben, der Leerwert sowie der mitgeführte Albuminstandard wurden 1:1,5 mit Aqua dest. verdünnt. Die optimale Verdünnung der Ansätze für den BCA Protein Assay zur Vermeidung von Wechselwirkungen zwischen Dithiothreitol (DTT, Bestandteil des Lysepuffers) und der BCA-Arbeitslösung wurde in Vorversuchen ermittelt. Eingesetzt wurden jeweils 10 µl pro Loch der Mikrotiterplatte. Der Leerwert und der Albuminstandard wurden im Doppelansatz gemessen.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl BCA-Arbeitslösung pro Vertiefung, bestehend aus 50 Teilen Reagenz A (Puffer) und 3 Teilen Reagenz B (Kupfersulfatlösung), gestartet. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C und anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 565 nm im Mikroplattenphotometer gemessen. Die entsprechenden Proteinkonzentrationen wurden anhand der aus dem BSA-Standard abgeleiteten

Eichgeraden ermittelt. Die Auswertung erfolgte mittels der KCjunior Software. Der Proteingehalt wurde in mg Protein pro ml Lösung angegeben.

4.5.5.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Das Verhältnis der Lichtemission (RLU/s) zum Gesamtproteingehalt der Zellen (mg Protein/ml) wurde berechnet und als Transfektionseffizienz ausgegeben (RLU/mg Protein). Dabei wurde die lichtmikroskopische Kontrolle der Zellen während und nach der Transfektion berücksichtigt und damit potentielle morphologische Schädigungen der Zellen infolge der Transfektion beurteilt und abgeschätzt.

4.5.6 Kontrollen zu den Transfektionsversuchen

Bei jedem Transfektionsversuch wurden folgende Kontrollen im Doppelansatz mitgeführt:

Kontrolle 1 (K1): Inkubation der Zellen in nackter, nicht-komplexierter DNA

Kontrolle 2 (K2): Inkubation der Zellen in serumfreiem Medium, also ohne DNA und Transfektionsreagenz

Kontrolle 3 (K3): Inkubation der Zellen in dem Transfektionsreagenz, also ohne DNA

Die Kontrollen sollten sicherstellen, dass die resultierende Enzymaktivität nicht auf die Aufnahme nackter Plasmid-DNA oder auf endogene Enzymaktivität zurückzuführen ist bzw. nicht auf einer Induktion durch das Transfektionsreagenz basiert.

4.5.7 Statistik

Aufgrund von großen Schwankungen der Daten und der daraus resultierenden schiefen Verteilung erschien eine Mittelwertberechnung der RLU-Werte nicht sinnvoll. Aus diesem Grund wurden aus den Daten die Mediane berechnet. Da die Kontrollen nur im Doppelansatz mitgeführt wurden und folglich der Median dem arithmetischen Mittel entspricht, wurden die Mittelwerte berechnet und angegeben.