

3. Material und Methoden

3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Im Rahmen der ambulanten Schwangerschaftsvorsorgeuntersuchungen wurde die Schwangerschaft einer jeden Frau in die Gruppe „unauffällige Schwangerschaft“ bzw. „Risikoschwangerschaft“ eingestuft. Dies geschah nach den aktuellen Mutterschaftsrichtlinien (Holzgreve und Louwen, 1994). Frauen, bei denen sowohl anamnestisch als auch durch Befunderhebung keine Risikofaktoren oder pathologischen Befunde im Verlauf der Schwangerschaft erkennbar waren, sind als unauffällig eingestuft worden. Ausschlaggebend für die Kennzeichnung als Risikoschwangerschaft im Sinne einer schwangerschaftsinduzierten Hypertonie war die mehrfache Feststellung einer Blutdruckerhöhung von >140 mmHg systolisch und >90 mmHg diastolisch (nach National Institute of Health, USA 1997). Für die Diagnose einer Präeklampsie musste zusätzlich der Nachweis einer Proteinurie von mindestens 0,3 g/l im 24h-Sammelurin erfüllt sein (Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, NIH USA, 2000). Da das Auftreten peripherer Ödeme kein obligater Bestandteil des Krankheitsbildes ist, bildete es kein Ausschlusskriterium. Patientinnen mit prä-existenter Hypertonie wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Tab.1: Charakteristika der Schwangeren

	Normotensive Schwangerschaften	Präeklampsie
Gesamtzahl der Proben	166	33
präpartal	92	28
postpartal	74	5
Gestationsalter der Proben (Wochen)	33,91 ± 7,29	34,46 ± 4,16
Minimum	6	23
Maximum	43	41
Alter der Mutter (Jahre)	29,76 ± 6,24	31,12 ± 6,13
Gesamtzahl der Schwangerschaften	1,8 ± 1,28	1,7 ± 1,11
Blutdruck (mmHg)		
systolisch	113,16 ± 9,1	158,24 ± 9,06
diastolisch	66,07 ± 7,43	98,03 ± 6,86
Proteinurie (g/L)	keine	0,41 ± 0,096
Ödeme (aufgetreten bei)	0	24
keine	166	9
leicht		9
mittel		12
schwer		3

3.2 Probengewinnung

Zur Untersuchung der FLT-1-Expression der neutrophilen Granulozyten sowie für Zellisolierung und -kultur wurden den Patientinnen der Poli- und Frauenklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin 6ml venösen Blutes entnommen, das durch Zusatz von EDTA antikoaguliert wurde. Die Lagerung und der Transport der Proben erfolgte bei 4°C, die Verarbeitung innerhalb von 4 Stunden nach Entnahme.

Die gesamten Blutproben wurden nach den Standardrichtlinien der Ethikkommission des Universitätsklinikums Benjamin Franklin behandelt.

3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der quantitativen Analyse von Zellsuspensionen. Passieren die Zellen im Flüssigkeitsstrom den Lichtstrahl des Lasers, reflektieren sie bzw. emittieren die gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper Licht, das, mit Hilfe zahlreicher Filter und Spiegel auf bestimmte Wellenlängen reduziert, die Detektoren erreicht (Abb.7).

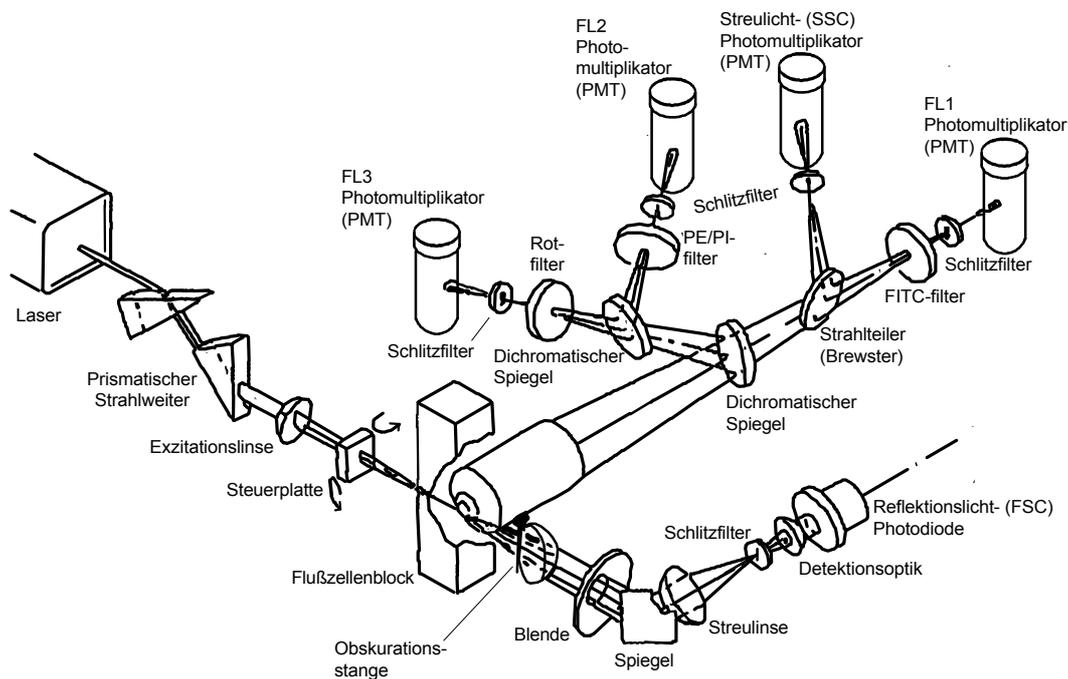


Abb.7: Das optische System eines Durchflusszytometers.
(aus: Einführung in die Durchflusszytometrie, Becton-Dickinson)

Das optische System eines Durchflusszytometers ist in der Lage, fünf Parameter der zu analysierenden Zellen zu erfassen. Zu den sog. intrinsischen Merkmalen gehören das Reflexionslicht (engl.: forward angle light scatter = FSC), dessen Quantität proportional zur

Zellgröße ist, und das Streulicht (engl.: *side scatter* = SSC), das Auskunft über die Granularität geben kann. Darüber hinaus ist es möglich, durch die Konjugation von Antikörpern mit bestimmten Fluorchromen, extrinsische Eigenschaften der Zellen zu beschreiben, denn die emittierte Lichtmenge ist proportional zur Zahl der markierten Epitope. Das bedeutet, die Lichtemission wird um so höher, je dichter die entsprechenden Antigene exprimiert werden. Da die Farbstoffe über unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren verfügen (Abb.8, Tab.2), bietet sich die Möglichkeit, verschiedene Epitope einer Zelle gleichzeitig zu markieren. Diese Daten in Verbindung mit den Informationen des FSC und SSC erlauben nicht nur eine exakte Charakterisierung der untersuchten Zellpopulation, sondern auch eine Quantifizierung des Fluoreszenzsignals, das gleichbedeutend mit der Dichte der untersuchten Epitope ist.

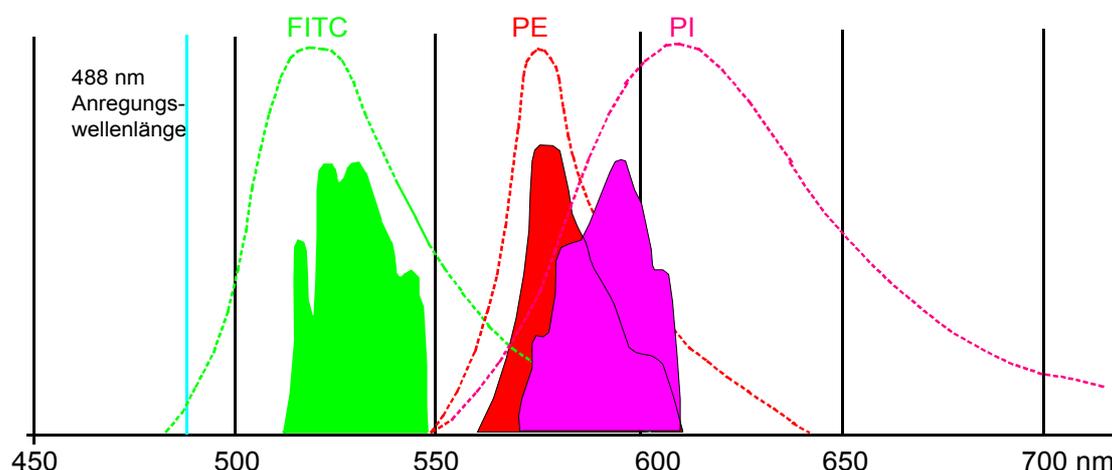


Abb.8: Darstellung der Emissionsspektren der am häufigsten verwendeten Fluorochrome

Die Wellenlängen des von ihnen emittierten Lichts unterscheiden sich so, dass für das Durchflusszytometer die Auftrennung der Signale möglich ist. Somit können in einer Analyse bis zu drei verschiedene Zellepitope markiert werden (Einführung in die Durchflusszytometrie, Becton-Dickinson).

Tab.2: Farbstoffe mit Anwendung in der Durchflusszytometrie

Farbstoff	Abkürzung	Anregungsmaximum	Emissionsmaximum
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	488 nm	530 nm
Propidiumiodid	PI	488 nm	620 nm
Phycoerithrin	PE	492 nm	580 nm

3.3.1 Charakterisierung der Population neutrophiler Granulozyten im Vollblut durch extrazelluläre Mehrfach-Markierung

Das Prinzip der mehrfachen Markierung von Zellen zur präzisen Darstellung in der FACS-Analyse war auch bei der Charakterisierung der Neutrophilen-Population im Vollblutbild der Patientenproben von Bedeutung. Durch Wahl geeigneter Oberflächenepitope, CD11B (α M-Integrin, MAC-1) und CD16 (FC Rezeptor IIIb), die in dieser Kombination als Neutrophilenspezifisch angesehen werden können (Clark et al, 1998), gelang die Differenzierung zu den übrigen Leukozyten, Voraussetzung für die spätere Einordnung der FLT-1-Signale, die zu einem Teil auch auf Monozyten als Träger des VEGF-Rezeptors (Shen et al, Blood, 1996) entfallen.

Die Markierung der Granulozyten vollzog sich nach folgendem Protokoll:

50 μ l EDTA-Vollblut wurden mit jeweils 10 μ l CD 11B- (PE-markiert, Becton-Dickinson, Einsatz gemäß Herstellerangaben) und CD16- (PC5-markiert, Immunotech, Einsatz gemäß Herstellerangaben) Antikörper versetzt und 15 min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten durch Zusatz von 500 μ l Lysierungslösung der Probe entzogen. Die Einwirkzeit betrug sieben Minuten bei Raumtemperatur. Beendet wurde die Lysierung mit 100 μ l Fixierung pro Ansatz. Der nachfolgende Waschschrift erfolgte durch Zufügen von 3ml Cell-Wash-Puffer und Zentrifugation bei 2000 U/min bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation wurde die flüssige Phase durch Absaugen vorsichtig entfernt, der Zelleniederschlag resuspendiert. Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer Typ FACScan (Becton-Dickinson), die Bearbeitung der Daten zur Quantifizierung der Signalintensität mit Hilfe der Software „Win List“ (Verity Software House).

3.3.2 Markierung des VEGF-Rezeptors FLT-1

Für die Markierung des VEGF-Rezeptors FLT-1 stehen Antikörper verschiedener Firmen zur Auswahl, die sich in bestimmten für die Versuchsplanung durchaus bedeutsamen Gesichtspunkten unterscheiden.

Zunächst waren die Möglichkeiten der externen und internen Markierung der Rezeptordomänen abzuwägen. Die Verwendung eines extern bindenden Antikörpers besitzt den Vorteil, hierbei in Kombination mit CD11B und CD16 eine exakte Charakterisierung der neutrophilen Granulozyten durch Oberflächenmarkierung vornehmen zu können, ohne durch Permeabilisierung, wie es die Einschleusung eines Antikörpers gegen die intern gelegene Domäne erfordert, die Zellen für weitere Versuchsschritte, wie RNA-Extraktion oder Kultivierung unbrauchbar zu machen.

Ausserdem gelänge mit dem Durchflusszytometer Typ FACStar (Becton Dickinson), das neben der Analytiksoftware auch über die Funktion der Zellsortierung verfügt, in einem Arbeitsgang die Expressionsanalyse und die Isolierung der Zellen, unter Umgehung längerer Zentrifugationszeiten, die sich bei anderen Auftrennungsverfahren kaum vermeiden lassen und die u.U. die Ausbeute an vitalen Granulozyten im Isolat deutlich herabsetzen können.

Somit gaben wir einem gegen die externe Domäne gerichteten monoklonalen anti-FLT-1-Antikörper (mouse-anti-human, Konzentration: 3mg/ml, sigma) den Vorzug.

Unser Versuch, diesen Antikörper selbst mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) zu versehen, um eine direkte FACS-Analyse zu ermöglichen, misslang. Daher kam ein fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörpers (goat-anti-mouse, sigma) nach folgendem Protokoll zum Einsatz:

50µl EDTA-Vollblut wurden mit 500µl Lysierungslösung von den Erythrozyten befreit, anschließend mit 20µl des anti-FLT-1-extern Antikörpers (Einsatz 1:500 der Stammlösung) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgtem Waschen wurden 20µl des Sekundärantikörpers (Einsatz 1:500 der Stammlösung) hinzugefügt und nochmals 30 min inkubiert. Um eventuelle unspezifische Bindungen des zweiten Antikörpers zu erkennen, wurde für jede Probe eine Kontrolle gefertigt, die nur den *Goat-anti-mouse*-Antikörper erhielt.

Nach abschließendem Waschschrift erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer. Es zeigte sich, dass Proben und Kontrollen Markierungen annähernd gleicher Signalintensität aufwiesen. Der Sekundärantikörper hatte demnach auch nicht spezifisch an die neutrophilen Granulozyten gebunden, so dass eine Differenzierung in FLT-1- und sekundäres Signal nicht möglich war.

Um diese falsch positiven Markierungen zu unterdrücken, wurde vor Zusatz des zweiten Antikörpers humanes Serum zur Absättigung der F_c -Rezeptoren auf den Granulozyten, die für die unspezifischen Bindungen verantwortlich gemacht werden können, verwendet (Tab.3).

Tab.3: Einsatz der Antikörper und der Blockierung in den einzelnen Messreihen

	Anti-FLT-1	Serum	Sekundärer Antikörper
Reihe A	+	–	+
Reihe B	+	+	+
Reihe C	–	–	+
Reihe D	–	+	+

Die Messreihen B und D (s. Tab.3) wurden vor Zusatz des sekundären Antikörpers mit 100µl humanen Serums versetzt, es folgte zehnmünütige Inkubation im Kühlschrank.

Auch unter diesem Blockierungsversuch blieben die Signale unverändert. Der daraufhin vorgenommene Wechsel des Sekundärantikörpers von *Goat-anti-mouse* zu *Rabbit-anti-mouse* war ebenfalls ohne Erfolg. Deshalb verblieb nur die Verpflichtung eines anderen Herstellers bezüglich des primären Antikörpers. Dieser extern bindende anti-FLT-1 (Schering, entwickelt von Meinrad et al) ließ wiederum keine direkte Fluoreszenzkoppelung zu und eröffnete bei Einsatz der sekundären Antikörper die bekannten Probleme, was den Schluss zulässt, dass Oberflächenmarkierungen von Granulozyten in der Durchflusszytometrie aufgrund der hohen Dichte von F_c-Rezeptoren, die diese Zellen präsentieren, nur mit direkt fluoreszierenden Antikörpern durchführbar sind.

Ausgehend von diesen Ergebnissen griffen wir deshalb auf einen intern bindenden anti-FLT-1-Antikörper (Santa Cruz) zurück, bei dem die Konjugation mit Fluorchromen problemlos gelang .

3.3.3 Konjugation des anti-FLT-1 intern- Antikörpers mit Fluoresceinisothiocyanat

Da das Ausmaß der Fluorchrom-Konjugation von der eingesetzten Antikörpermenge abhängig ist, muss eine definierte Konzentration des gelösten Antikörpers vorliegen. Das Optimum für die Konjugation nach dem verwendeten Protokoll beträgt 2mg/ml.

Natriumazid (NaN₃) muss vollständig aus der Lösung entfernt werden, da es selbst mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) reagieren und so die Markierung beeinträchtigen kann. Zu diesem Zweck wurde der Antikörper über eine Austauschsäule (Kwik Sep dextran desalting column, Pierce) mit Hilfe eines speziellen Puffers (Reaction Buffer, J.T. Baker) dialysiert. Nach dem Zusatz des Puffers wurde die Antikörperkonzentration mittels Spektrophotometer bestimmt. Hierbei ergibt sich für Immunglobuline der Klasse G (IgG) pro mg/ml eine Absorption von 1,4 bei einer Wellenlänge von 280nm.

Vor der folgenden Konjugation wurden 10 mg FITC (molecular probes) in anhydriertem Dimethylsulfoxid (DMSO, Aldrich) gelöst. Von dieser Stammlösung wurden 60µg pro mg Antikörper eingesetzt und sofort vermischt. Das Reaktionsgefäß (Tube, Falcon) ließ man dann unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur für eine Stunde rotieren. Anschließend wurde das nicht gebundene FITC wiederum durch Dialyse aus der Lösung entfernt, der nun Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper in Lagerungspuffer (Storage Buffer, Sigma) aufgenommen und stand in einer Konzentration von 0,5 µg/ml für die Analysen zur Verfügung.

3.3.4 Intrazelluläre Markierung des FLT-1

Die bereits mit CD11b und CD 16 markierte, lysierte und gewaschene Probe wurde mit 500µl Permeabilisierungslösung behandelt (zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit) und anschließend erneut gewaschen (3ml Cell-Wash, 10 min Zentrifugation bei 2000 U/min). Danach erfolgte der Zusatz des Antikörpers (20µl), und 100µl Permeabilisierungslösung, um eine ausreichende Penetration des Antikörpers ins Zellinnere zu gewährleisten. Die Inkubation dauerte 30 min und vollzog sich wiederum bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Nach abschließendem Waschschrift und Resuspension wurde die Probe in 300µl Cell-Wash aufgenommen und am FACScan (Becton Dickinson) analysiert.

3.3.5 Optimierung der eingesetzten Antikörpermenge für die FLT-1-Markierung

Um sicherzustellen, dass die verwendete Antikörpermenge nicht nur ausreichende Signalintensität erreicht, sondern im Sättigungsbereich liegt, haben wir diese in einer Messreihe variiert (Einsatz von 5 bis 35µl der Antikörperlösung) und die Veränderung des Signals dokumentiert.

Es zeigte sich, dass bei Einsatz von 20µl des Antikörpers eine stationäre Signalintensität resultiert, d.h. eine weitere Steigerung der anti-FLT-1-Menge führte zu keiner Zunahme des Fluoreszenzsignals in der FACS-Messung (Abb.9).

Basierend auf diesen Ergebnissen haben wir für unsere Untersuchungen der FLT-1-Expression die Antikörpermenge auf 20µl festgelegt.

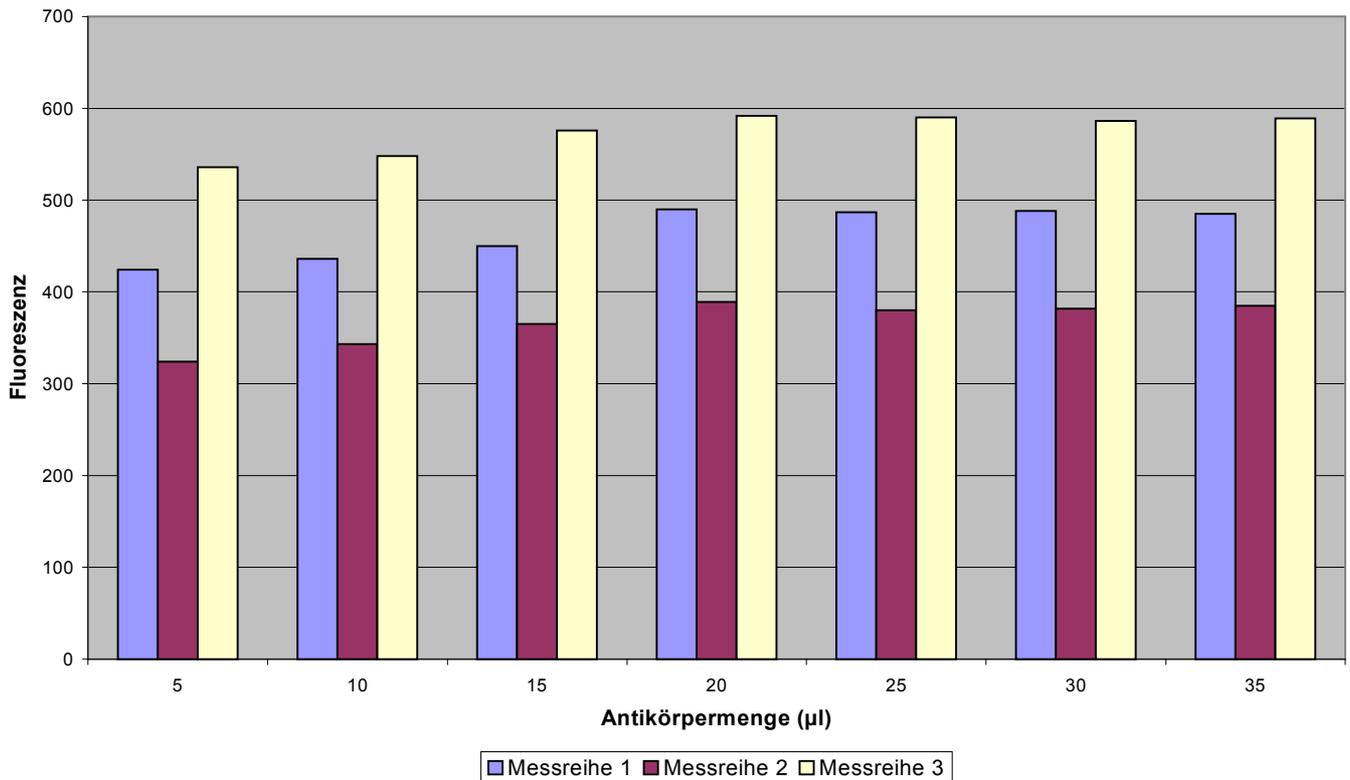


Abb.9: Veränderung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörpermenge.

Darstellung der FACS-Ergebnisse der einzelnen Messreihen als Säulendiagramm. Jede Messreihe (1-3) repräsentiert eine Probandin, deren Vollblut mit verschiedenen Mengen des anti-FLT-1-Antikörpers versetzt wurde. Eine stationäre Phase der Signalintensität (y-Achse) wird bei 20µl Antikörperzusatz erreicht. Eine weitere Steigerung der Antikörpermenge hatte keine signifikante Zunahme des Fluoreszenzsignals zur Folge.

3.3.6 Nachweis der Spezifität der Antikörperbindung an die FLT-1-Domäne

Da es sich bei dem von uns verwendeten Antikörper um ein Produkt polyklonalen Ursprungs handelt, musste die Spezifität seiner Bindung überprüft werden. Zu diesem Zweck kam ein Verdrängungspeptid zum Einsatz, dessen Sequenz der Domäne des VEGF-Rezeptors entspricht, gegen die der F_{ab} -Teil des anti-FLT-1-Antikörpers gerichtet ist (Abb.10).

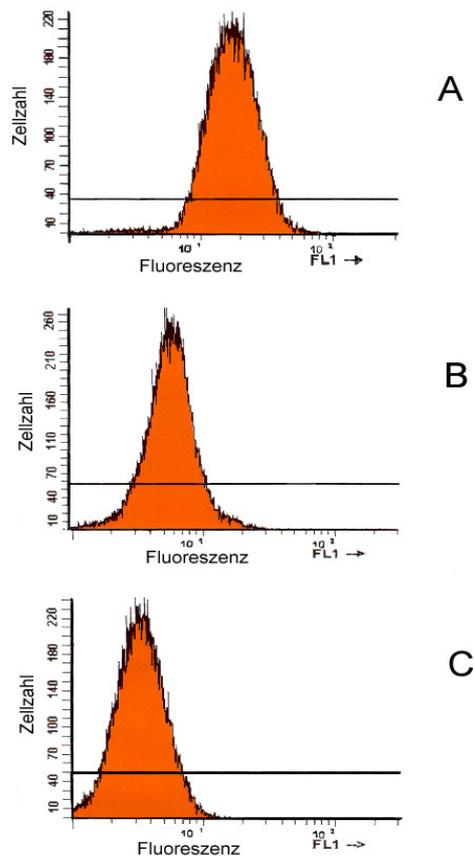


Abb.10: Unterdrückung des FLT-1-Signals durch Verwendung eines Blockierungspeptids.

A= native FLT-1-Fluoreszenz, **B**= Zusatz von 1,2 µg Blockierungspeptid; **C**= Zusatz von 1,6 µg Blockierungspeptid
 Zur Darstellung der FLT-1-Markierung wurde ein Histogramm gewählt, das die Fluoreszenz (x-Achse) gegen die gezählten Zellen (y-Achse) aufträgt (**A**). Nach Zusatz des Blockierungspeptids, das mit dem anti-FLT-1-Antikörper vorinkubiert wurde, ist eine Verminderung des Fluoreszenzsignals erkennbar. Die auf der x-Achse abzulesenden Signalwerte zeigen ein niedrigeres Niveau (**B**). Diese Tendenz wird bei Erhöhung der eingesetzten Menge an Blockierungspeptid (**C**) noch deutlicher, das FLT-1-Signal ist nahezu vollständig supprimiert (x-Werte $< 10^1$ sind in der Durchflusszytometrie als negativ bewerten).

Zur Darstellung der spezifischen Verdrängung wurden aufsteigende Peptidkonzentrationen der Antikörperlösung in den Verhältnissen 4:1, 2:1, 1:1 zugesetzt. und anschließend für 30 min im Eisbad inkubiert. 20µl der jeweiligen Lösung wurden nach bekanntem Protokoll den Proben hinzugefügt und das resultierende Fluoreszenzsignal am FACScan gemessen.

Für diese Messungen standen drei Patientenproben in dreifacher Auslegung der Ansätze zur Verfügung.

Das erhaltene Signal zeigte mit zunehmender Konzentration des Blockierungspeptids deutliche Intensitätsminderung und ließ sich bei äquivalenter Menge von Antikörper und Peptid nahezu vollständig unterdrücken. Dies lässt darauf schließen, dass die Markierung der neutrophilen

Granulozyten mit dem anti-FLT-1-Antikörper spezifisch für die interne Domäne des VEGF-Rezeptors ist, unspezifische Bindungen oder *Crosslinking* treten offenbar nicht auf.

3.4 Zellisolierung

Für die Isolierung mononukleärer Zellen stehen mehrere Verfahren zur Verfügung, deren gemeinsames Prinzip die Auftrennung des Vollblutes über eine geschichtete Flüssigkeitssäule aus Komponenten unterschiedlicher Dichte darstellt. Zum Aufbau dieses Dichtegradienten kommen verschiedene Substanzen in Betracht, so dass einige auf ihre Verwendbarkeit für meine Versuchsplanung geprüft wurden. Entscheidend waren neben dem Zeitaufwand der Methode, der im Hinblick auf anschließende Verfahren wie Kultivierung oder RNA-Extraktion so gering wie möglich sein sollte, um Devitalisierung oder Degradation der Zellen zu vermeiden, auch die Reinheit des Isolats, die erreichbare Ausbeute und die Vitalität der Zellen.

Für die Bestimmung der gewählten Gütekriterien standen folgende Methoden zur Verfügung:

- Die Reinheit der isolierten Zellpopulation wurde anhand einer FACS-Analyse im Vergleich zum zuvor erstellten Vollblutbild (FSC, SSC) ermittelt.
- Durch Zellzählung am Sysmex (F820)-Cellcounter wurde die Ausbeute dokumentiert.
- Für die Vitalitätsprüfung wurde eine Propidiumiodid-Färbung durchgeführt.
Dazu wurden 20µl der Substanz mit 500µl Zellsuspension versetzt, fünf Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert, anschließend gewaschen (Zusatz von 3ml Cell-Wash, 10min Zentrifugation bei 1000U/min) und am FACSscan analysiert.

Propidiumiodid ist ein Farbstoff, der Nukleinsäuren anfärbt. Bei Kontakt mit Zellen ist also die Läsion der Zytomembran Voraussetzung für ein Farbsignal.

3.4.1 Isolierung über Hypaque-Ficoll-Gradienten (Ferrante et al, 1980)

5ml Hypaque (Sigma, Dichte 1,119) werden zunächst mit 5ml Ficoll (Seromed, Dichte 1,077) und dann mit 5ml EDTA-Vollblut überschichtet. Anschließend wird 20min bei 2000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der erfolgten Auftrennung werden Serum und die obere Zellschicht, die die Lymphozyten enthält, abgesaugt und die Schicht der Granulozyten abpipettiert. Um Flüssigkeitsverluste der Zellen, die durch die Hygroskopie der Trennflüssigkeiten bedingt sind, auszugleichen, muss ein Waschschriff folgen. Die Zellsuspension wird im Verhältnis 1:1 mit PBS-Puffer aufgefüllt und 10min bei 2000 U/min und 4°C zentrifugiert.

3.4.2 Isolierung über Ficoll-Percoll-Gradienten (Lichtenberger et al, 1999)

Zunächst muss hierbei das Vollblut 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt werden, bevor es der Trennsäule, bestehend aus 5ml Percoll (67 %) und 5ml Ficoll (57 %), zugesetzt wird. Es wird dann 60min bei 400 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen von Serum und Lymphozytenschicht, die sich bei diesem Verfahren mit ausreichendem Abstand abzeichnet, entnimmt man die Schicht der Granulozyten (Abb.11) und wäscht dreimal mit PBS-Puffer, jeweils mit zehninütiger Zentrifugation bei 300g.

3.4.3 Isolierung über Polymorph-Prep

Nach Überschichtung von 5ml Polymorph-Prep (Nycomed) mit 5ml EDTA-Vollblut wird 30min bei 2600 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Entnahme der Granulozyten gelingt nach Verwerfen von Serum und Lymphozyten problemlos (Abb.11). Die Aufreinigung erfolgt mit Hilfe 0,45 % NaCl und 10minütiger Zentrifugation bei 2000 U/min. Bei Verunreinigung des Isolats durch Erythrozyten wird mit EL-Buffer (Quiagen) lysiert. Dazu wird der Puffer im Verhältnis 2:1 zur eingesetzten Vollblutmenge verwendet, die Lösung 10min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert und abschließend nochmals gewaschen.

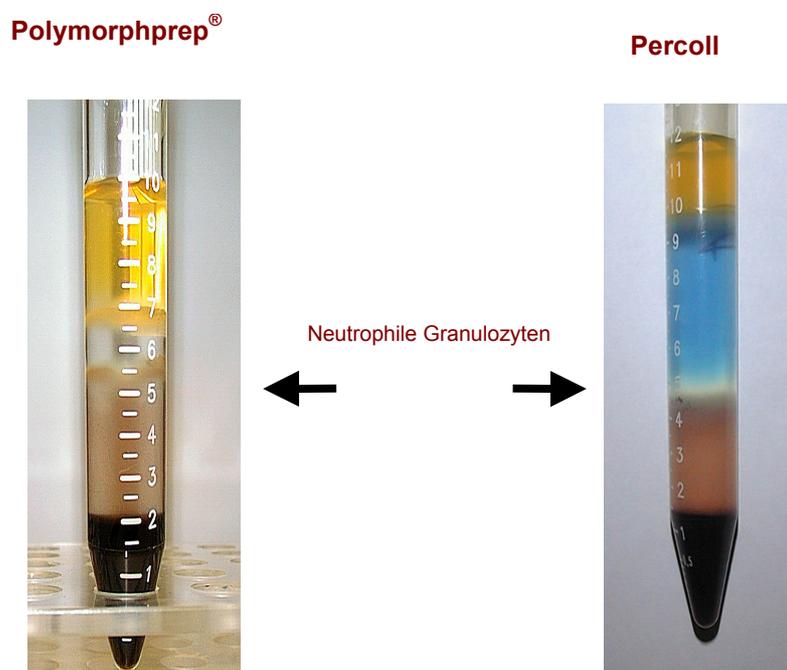


Abb.11: Isolationsergebnisse bei Verwendung von Polymorphprep® und einem Ficoll-Percoll-Gradienten.

Bei beiden Verfahren ist die Auftrennung der Leukozyten in Lymphozyten (obere Schicht) und neutrophile Granulozyten mit ausreichendem Abstand der einzelnen Zellschichten gelungen, so dass die Entnahme ohne Kontamination möglich ist.

3.4.4 Vergleich der Verfahren

Bei der Methode nach Ferrante et al (3.4.1) entsteht bei der Auftrennung nur ein geringer Sicherheitsabstand zwischen den einzelnen Zellschichten, so dass eine Verunreinigung des Isolats durch lymphozytäre Beimischung kaum zu vermeiden ist.

Die Verwendung des Ficoll-Percoll-Gradienten (3.4.2) ist ein sehr zeitaufwendiges Verfahren und aufgrund der wiederholten Waschschriffe durch relativ hohen Zellverlust belastet. Auch bezüglich der Zellvitalität sind die ausgedehnten Zentrifugationszeiten problematisch, da sie die Sensibilität der Granulozyten gegenüber äußeren Kräften nicht angemessen berücksichtigen.

Die Isolierung mit Hilfe von PolymorphPrep (3.4.3) zeigte sich bei allen überprüften Parametern als den anderen Verfahren überlegen und wurde deshalb für die weitere Versuchsplanung etabliert.

3.5 Zellkultur

Für die Stimulationsexperimente und Migrationsassays wurden die isolierten Zellen in Kulturmedium aufgenommen. Dazu wurde RPMI- Medium 1640 mit den Zusätzen von 7% fetalen Kälberserums, 1% L-Glutamin (2mM) und 1% Penicillin/Streptomycin gewählt.

Da fetales Kälberserum selbst Wachstumsfaktoren enthält, die durchaus zu unspezifischen Effekten auf die kultivierten Zellen führen können, war es erforderlich, seine Konzentration so gering wie möglich zu halten, wobei die Vitalität der Zellen, die Verringerung der verwendeten Serummenge schließlich limitierte.

So unternahmen wir Kultivierungsversuche mit Medien, deren Anteil an fetalem Kälberserum wir sukzessiv von 10% auf 5% senkten. Vitalitätsprüfungen der neutrophilen Granulozyten erfolgten jeweils nach 12, 24 und 48h durch Zusatz von Propidiumiodid zur entnommenen Suspensionsprobe von 500µl. Die FACS-Analyse (Abb.12) gab Aufschluss über das Verhältnis der vitalen zu den avitalen Zellen.

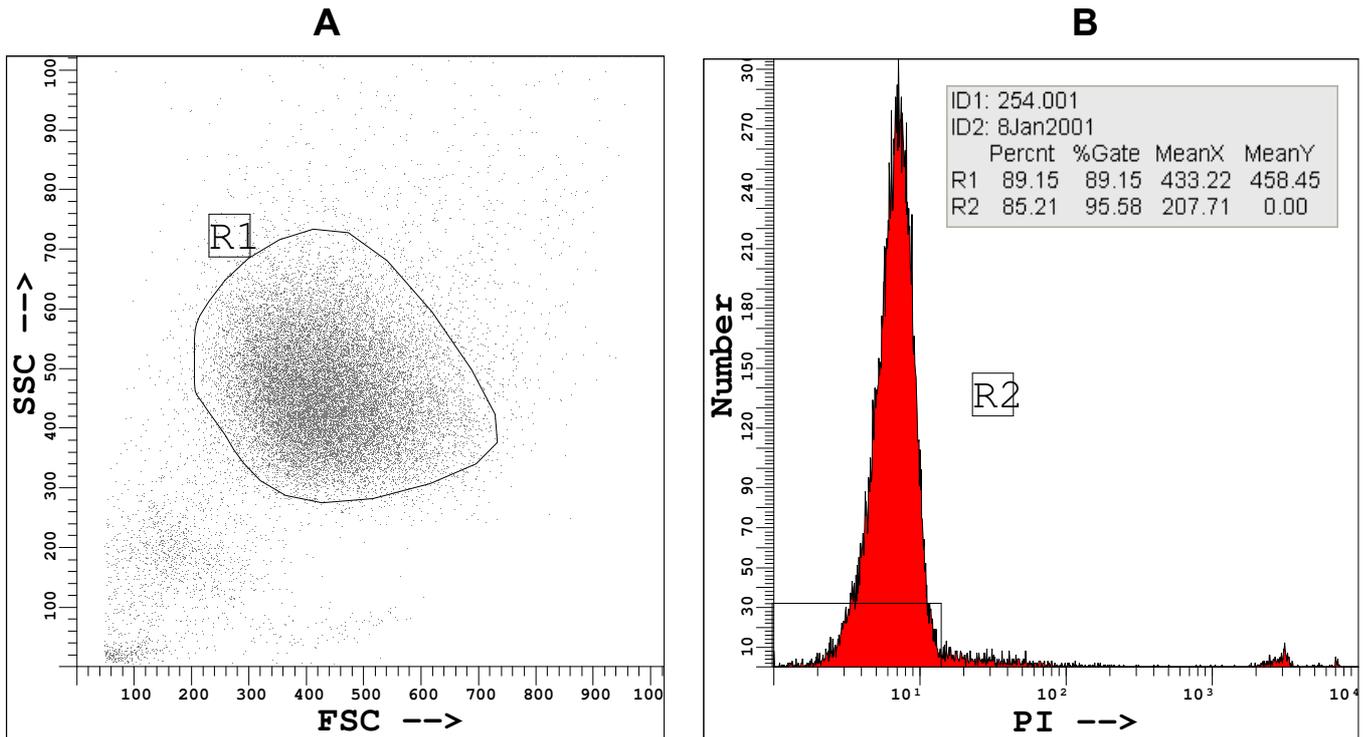


Abb.12: Vitalitätsprüfung kultivierter neutrophiler Granulozyten.

A: Darstellung der Zellen ohne Fluorochrome im FSC/SSC- Modus.

Die in der Region 1 (R1) markierten Zellen entsprechen nach den Merkmalen Zellgröße und -granularität dem Bild vitaler Granulozyten. Ihr Anteil an der Gesamtzellzahl beträgt 89,15%.

B: Die Verwendung des Farbstoffes Propidiumjodid (PI) erlaubt noch genauere Aussagen über die Zellvitalität.

PI ist ein DNA-markierender Farbstoff. Sein Signal ist also Indiz für Läsionen der Zellmembran. Das Histogramm (**B**) lässt keine PI-Markierung der Zellen erkennen. Die x-Werte der Fluoreszenz liegen bei $< 10^1$ und sind daher als negativ zu bewerten. Die analysierten Zellen sind vital.

Ein Anteil von 7% fetalen Kälberserums erwies sich als die Konzentration, bei der die Granulozyten auch nach 48h Kultivierung noch überwiegend als vital eingestuft werden konnten. Daraufhin wurde die Zusammensetzung des für die weiteren Experimente einzusetzenden Mediums auf die o.g. Rezeptur festgelegt.

3.5.1 Stimulation der kultivierten neutrophilen Granulozyten durch Zusatz von VEGF

Der Einfluss der VEGF-Konzentration auf die Expression seiner Rezeptoren im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus war für Endothelzellen bereits beschrieben (Barleon et al, 1997). Da auch bei den neutrophilen Granulozyten die Möglichkeit einer direkten Rückkoppelung zwischen VEGF-Konzentration und FLT-1-Expression in Betracht kam, unternahmen wir Stimulationsversuche.

Aus dem Vollblut normo- und hypertensiver Schwangerer wurden Granulozyten über Polymorph-Prep isoliert. Eine Zellzählung erfolgte mit Hilfe des Sysmex-Counter. Von jeder Probe wurden

$1,5 \times 10^6$ Zellen in RPMI 1640-Medium aufgenommen und für 24h einer VEGF-Konzentration (VEGF-165, seromed) von 5ng/ml (= 0,3nM) ausgesetzt. Die Inkubation erfolgte im Begasungsbrutschrank (Heracell, Heraeus Sepatech) bei 37°C und 5% CO₂. Die Rezeptorexpression wurde vor und nach der Stimulation nach bekanntem Protokoll in der Durchflusszytometrie ermittelt.

3.5.2 Migrationsassay

Der Aufbau des Migrationsassays ist nach Literaturangaben (Falk et al, 1980; modifiziert nach Barleon et al,1996, sowie Waltenberger et al, 2000) entwickelt worden.

Verwendung fanden hierbei Multidish-6 Well-Platten (NUNC), die den unteren Teil der Migrationskammer bildeten. In jedes Schälchen wurden 2ml RPMI 1640- Medium vorgelegt. Ein Zellkultureinsatz (Cell Culture Insert, NUNC) komplettierte die Kammer als oberer Anteil, der für die Aufnahme des Zellisolats konzipiert wurde. Dieser Einsatz besaß als Bodenabschluss eine Polycarbonat-Membran mit einem Durchmesser von 25mm und einer Porengröße von 3,0µm, die eine Penetration der Granulozyten in die Kulturschale gestattete (Abb.13).

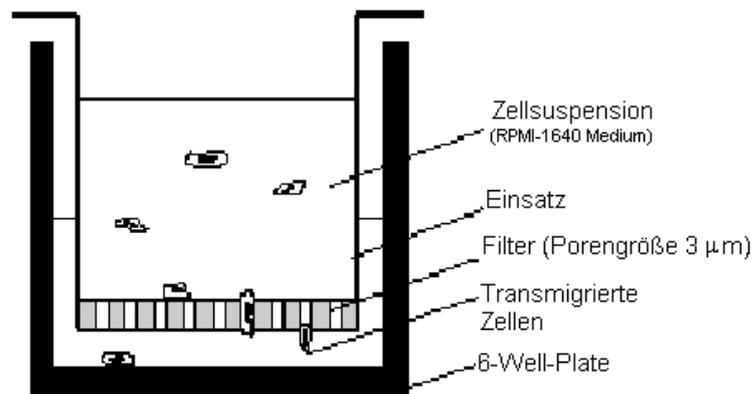


Abb.13: Schematische Darstellung einer Migrationskammer.

Die isolierten Zellen wurden in RPMI 1640-Medium resuspendiert. Die Zellzahl der Suspension wurde wiederum mittels Sysmex-Cellcounter bestimmt. Anschließend wurden pro Ansatz $1,5 \times 10^6$ Zellen, aufgenommen in 1,5 ml Medium, unter Laminar-Flow-Bedingungen (Bioflow –Clean Air,

Biohazard) in den oberen Kammerteil eingebracht und nach Hinzufügen der Zusätze (siehe unten) für 24h bei 37°C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank (Typ Heracell, Heraeus Sepatech GmbH) inkubiert. Mit dieser Versuchsanordnung sollte die Migration der Zellen in Abhängigkeit einer gegebenen VEGF-Konzentration untersucht werden. Hierfür war zunächst die Ermittlung eines Ausgangswertes erforderlich, der sich aus der Migration als Eigenbewegung der Zellen ohne Zusatz chemotaktisch wirksamer Substanzen ergibt. Dabei wurde der unteren Kammer ein dem VEGF-Zusatz äquivalentes Volumen Aqua bidest. zugefügt. Das Verhältnis der migrierten Granulozyten zur Gesamtzellzahl sollte dann im weiteren Aufschluss geben, ob unter Zusatz von VEGF eine Steigerung der Zellwanderung eintritt.

Bei der Wahl geeigneter VEGF-Konzentrationen orientierten wir uns an Arbeitsgruppen, die bei ähnlichem Versuchsplan die induzierte Migration von Monozyten beschrieben und dabei *VEGF-165* 0,3nM eingesetzt hatten (Barleon et al, 1996).

Um im gleichen Versuchsansatz neben den möglichen Effekten der Chemotaxis auf die Migration der neutrophilen Granulozyten eventuell auch eine Dosis-Wirkungsbeziehung erkennen zu können, verwendeten wir zusätzlich die Konzentrationen 0,15nM und 0,6nM.

Um festzustellen, ob mögliche Unterschiede der Migrationsantwort tatsächlich VEGF-spezifisch sind, also z.B. durch veränderte FLT-1-Expression zu erklären sind, wählten wir als Kontrolle eine chemotaktisch hochpotente Substanz, die ihre Wirkung unabhängig von VEGF-Rezeptoren vermittelt. Wir verwendeten fMLP, formylMetLeuPhe (nach Mitola et al, 1997), das in einer Konzentration von 10ng/ml eingesetzt wurde.

Für jede Probe wurden die verschiedenen Ansätze (Aqua bidest., VEGF-165 0,15 / 0,3 / 0,6 nM, fMLP) dreifach ausgelegt. Die Auswertung des Migrationsassays erfolgte nach 24-stündiger Inkubation. Die Einsätze aus den Kulturplatten wurden entfernt und verworfen, während die Lösung der unteren Kammer vorsichtig resuspendiert und dann zur Messung in FACS-Röhrchen aufgenommen wurde. Die Auszählung der migrierten Zellen erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers, das im FACSmate-Modus auch über eine Zellzähler-Funktion verfügt.

3.6 Molekularbiologische Untersuchungen

3.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde aus den isolierten Granulozyten mit dem TRIZOL-Reagent (Gibco BRL) gemäß den Herstelleranweisungen extrahiert, wobei die Einwirkzeit zur Förderung der RNA-Freisetzung durch zwölfstündige Lagerung bei 4°C verlängert wurde.

Die RNA-Integrität wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese in einem Ethidiumbromid-gefärbten 2% igen Agarosegel kontrolliert. Konzentration bzw. Reinheit wurden durch Spektrophotometrie (UV-VIS 1202; Shimadzu) bei einer Wellenlänge von $A_{260\text{nm}}$ bestimmt. Anschließend wurde der Quotient aus den beiden Absorptionsmaxima von $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ errechnet.

3.6.2 Synthese von cDNA durch Reverse Transkription

Die Untersuchung der mRNA-Expression des VEGF-Rezeptors FLT-1 wurde mit Hilfe der Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Hierzu wurden komplementäre DNA-Kopien (engl.: complementary DNA= cDNA) aus der isolierten Gesamt-RNA der Granulozyten hergestellt. Diese Reaktion wird von dem Retroviren-Enzym *Reverse Transkriptase* katalysiert, das auf einer RNA-Matrize eine DNA-Kette synthetisiert. Dazu wurde 1µg Gesamt-RNA in einer Lösung (20µl), bestehend aus

- 4µl 5fach Reverse-Transkriptase-Puffer
- 1µl (2,5 pM) Random Hexamer Oligonukleotide
- 1µl (40mM) Desoxynukleotidtriphosphat (dNTPs)
- 8µl Diethylpyrocarbonat-behandeltes (DEPC) Aqua bidest.
- 0,5µl (2,5 mM) Dithiothreitol
- 0,5µl (4 U) RNasin
- 1µl (200 U) MMLV-Reverse Transkriptase (Moloney murine leukaemia virus)

bei 21°C für 10min, gefolgt von 37°C für 1h und 94°C für 5min in einem PCR-Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) inkubiert. Zur Kontrolle der DNA-Kontamination bzw. falsch positiver Banden bei der RT-PCR wurden (-)RT-Ansätze erstellt, indem hier DEPC-behandeltes Aqua bidest. anstelle der MMLV-Reversen Transkriptase eingesetzt wurde.

3.6.3 Reverse Transkriptase- Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zum Nachweis der mRNA-Expression des VEGF-Rezeptors FLT-1 sowie seiner löslichen Variante sFLT wurde die RT-PCR-Analyse zunächst optimiert. Um in der Gelelektrophorese der PCR-Produkte ein deutliches Signal zu erreichen, wurde die eingesetzte RT-Menge variiert. Aus diesen Optimierungsschritten folgte, dass für eine Reaktion 10µl des RT-Ansatzes (entsprechend einer RNA-Menge von 0,5µg) für die Untersuchung von FLT-1 und sFLT verwendet wurden. Für die Bestimmung der mRNA-Expression wurden cDNA-spezifische Oligonukleotide („Primer“) eingesetzt, um die Amplifikation von in Spuren vorhandener genomischer DNA zu verhindern.

Als endogener Standard für alle untersuchten cDNA-Proben wurde die Amplifikation von β -Actin

genutzt, für deren Ansatz 2 µl des RT-Produktes (entsprechend einer RNA-Menge von 0,25 µg) verwendet wurden.

Alle PCR-Reaktionsansätze enthielten in einem Volumen von 50 µl neben 10 µl bzw. 2 µl des entsprechenden RT-Ansatzes:

- 5 µl 10fach PCR-Puffer
- 0,5 µl (0,4 mM) dNTPs
- 2 µl (2 mM) MgCl₂
- 0,5 µl (2,5 U) *Thermus aquaticus* (Taq)-Polymerase
- 36 µl DEPC-behandeltes Aqua bidest.
- je 0,5 µl (0,2 µM) cDNA-spezifische Primer

Der generelle Amplifikationszyklus umfasste einen einleitenden Denaturierungsschritt bei 94°C für 3 min, 28-34 Zyklen (log linear Phase) mit jeweils 1 min bei Schmelztemperatur von 60°C, 30 sek Extension bei 72°C und 30 sek Denaturierung bei 94°C sowie einen abschließenden Syntheseschritt von 6 min bei 72°C.

Die Zyklenzahl wurde für die einzelnen Transkripte optimiert und betrug für FLT-1 bzw. für sFLT 34, für β-Actin 28.

Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese (Elektrophorese Power Supply ST606T) im Ethidiumbromid-gefärbten, 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden nach Anregung im UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (Geldokumentationssystem mit Diana Software, Firma Raytest). Als molekularer Massenstandard wurden 100 bp-DNA-Größenmarker verwendet. Kontrollreaktionen zur Aufdeckung von DNA-Kontamination oder falsch positiven Banden wurden durchgeführt, indem (-)RT-Ansätze bzw. DEPC-behandeltes Aqua bidest. bei der RT-PCR eingesetzt wurden.

3.6.4 Primerdesign und -synthese

Zur Auswahl der Nukleotidsequenz der einzelnen Primer wurde eine detaillierte Datenbankrecherche nach den publizierten genomischen DNA-, mRNA- bzw. cDNA-Sequenzen in der *Genbank*-Gendatenbank auf dem Server des *National Centers for Biotechnology* (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden danach in das Programm "Primer" des Softwarepakets des *Europäischen Molekularbiologischen Laboratoriums* (EMBL) eingelesen.

Zur Berechnung der idealen Nukleotidsequenz der Primerpaare wurden folgende Optionen verändert:

- 1) mindestens 43% GC-Basenpaarung pro Primer
- 2) Schmelztemperatur mindestens 58°C und maximal 62°C
- 3) Primerlänge mindestens 18 und höchstens 22 Basen
- 4) Amplifikatgröße 400-900 Basenpaare

Die anderen verbindlichen Vorgaben des Softwarepakets zur Spezifität des Primer wurden akzeptiert. Die vorgeschlagenen Sequenzen wurden automatisch berechnet und mittels der Software "Blast" des NCBI auf Spezifität, Kreuzreaktivität und Identität geprüft. Ausgeschlossen wurden die angebotenen Nukleotidsequenzen, bei denen die beiden Primer zusammen andere Gene als die erwarteten cDNAs erkannten. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die Primerpaare mindestens ein Intron überspannen und sogenannte Pseudogene nicht amplifizierten. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma GibcoBRL.

Im Folgenden sind die Primersequenzen der einzelnen Transkripte (5' → 3' sense, 3' → 5' antisense) angegeben:

- β -actin 5'-CCT CGC CTT TGC CGA TCC- 3'(25-42)
 3'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC- 5'(650-628)

Genbanknummer: X63432

Länge des Amplifikats: 626 bp

- FLT-1 5'-TTG GGA CTG TGG GAA GAA AC- 3' (1622–1641)
 3'-TTC AAT AAA CAG CGT GCT GC- 5' (2157–2138)

Genbanknummer: AF0636571

Länge des Amplifikats: 535 bp

- sFLT 5'-TCA GCG CAT GGC AAT AAT AG- 3' (1767–1786)
 3'-GTG GTA CAA TAA TTC CTT GTG GC- 5' (2291-2270)

Genbanknummer: U01134

Länge des Amplifikats: 524 bp

Die beiden VEGF- Rezeptoren, fms-like tyrosine kinase receptor (FLT-) 1 und seine lösliche Variante sFLT, sind Produkte des gleichen Gens und entstehen durch alternatives Splicing der mRNA (Kendall und Thomas, 1993).

In der RT-PCR-Analyse werden beide Formen spezifisch erkannt, da die verwendeten Primerpaare so gewählt sind, dass jeweils ein Oligonukleotid dem die Homologie beider Rezeptoren repräsentierenden DNA-Abschnitt entstammt, dies entspricht für FLT-1 den Basen 1-1969, für sFLT-1 250-2218, während der andere Primer eine FLT-1-, bzw, sFLT-spezifische Sequenz darstellt (Abb.14).

So zeigen sich in der RT-PCR-Analyse zwei Transkriptionsprodukte mit einer Größe von 535 bp für den Membran-durchspannenden FLT-1 und von 524 bp für den löslichen Rezeptortyp.

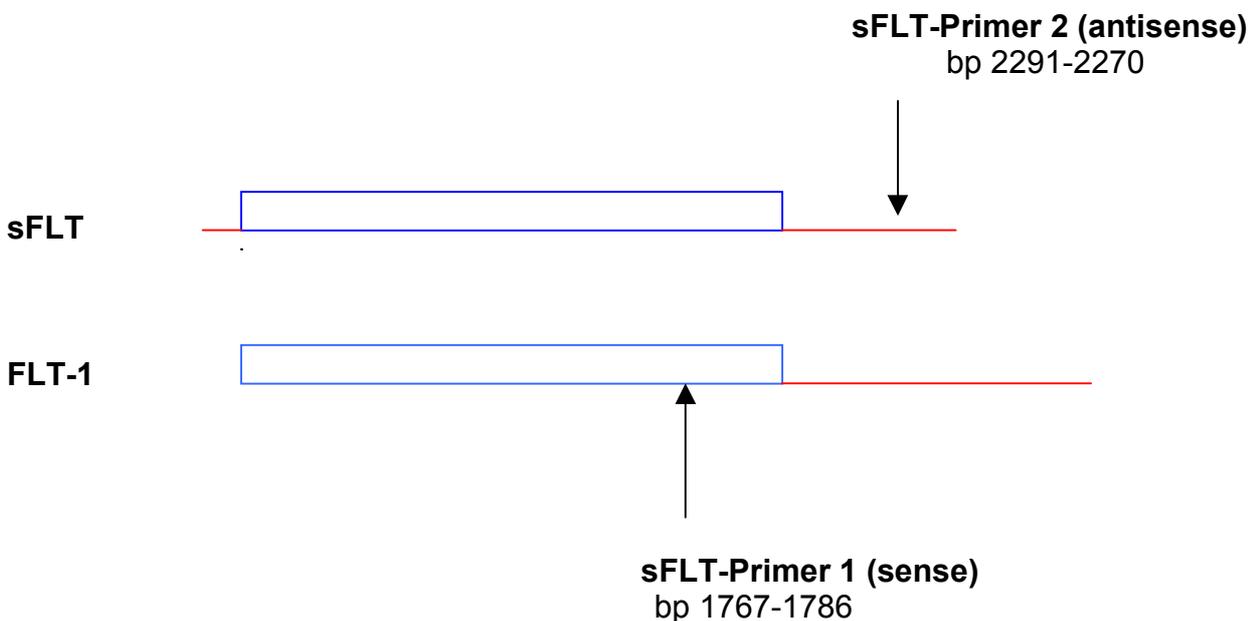


Abb.14: FLT-1- und sFLT-1- Sequenzalignment und Primerdesign.

Dargestellt sind sowohl die homologen DNA-Abschnitte beider Rezeptortypen (blau markiert) als auch die sFLT-, bzw. FLT-1-spezifischen Sequenzen (rot markiert). Anhand der Pfeile wird ersichtlich, aus welchen Bereichen die Sequenzen des sFLT-Primer gewählt wurden. Ein Oligonukleotid (1) entstammt einem übereinstimmenden DNA-Abschnitt, während das andere (2) eine sFLT-spezifische Domäne repräsentiert.

3.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Messdaten hinsichtlich der in der Durchflusszytometrie ermittelten Expressionsveränderungen und des unterschiedlichen Migrationsverhalten der neutrophilen Granulozyten der einzelnen Kollektive wurde mit dem Programm *Sigma-Stat* (Jandel Incomp.) durchgeführt.

Als Testverfahren kamen der t-Test und der Mann-Whitney Rank Sum Test zum Einsatz. Als statistisch signifikant galt die Differenz der Messreihen bei $p < 0,001$. Für die Auswertung der Migrationsassays wurde zusätzlich der Kruskal-Wallis-Test benutzt, hierbei galt $p < 0,002$ als signifikant.

3.8 Materialliste und Bezugsquellen

Antikörper:

• CD 11b (PE-markiert, monoklonal, mouse-anti-human)	Becton-Dickinson, Deutschland
• CD 16 (PC5-markiert, monoklonal, mouse-anti-human)	Immunotech, Deutschland
• Sekundärantikörper (goat-anti-mouse)	Sigma, Deutschland
• Sekundärantikörper (rabbit-anti-mouse)	Sigma, Deutschland
• Anti-FLT-1-Antikörper extern (monoklonal, mouse-anti-human)	Schering, Deutschland
• Anti-FLT-1-Antikörper intern (polyklonal, mouse-anti-human)	Santa Cruz, USA
Blocking peptide (anti-FLT-1-) (Lot Nr. J289)	Santa Cruz, USA
Cell Culture Insert	NUNC, Deutschland
Desoxynukleotidtriphosphat	Boehringer, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deutschland

Dithiothreitol	GibcoBRL, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deutschland
Fetales Rinderserum	Biochrom, Deutschland
FITC	molecular probes, USA
100 bp-DNA-Größenmarker	GibcoBRL, Deutschland
Hypaque Ficoll	Sigma, Deutschland
Kwik Sep dextran desalting column	Pierce, Irland
L-Glutamin	Biochrom, Deutschland
MgCl ₂	GibcoBRL, Deutschland
MMLV-Reverse Transkriptase	GibcoBRL, Deutschland
Multidish-Platten	NUNC, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Deutschland
Percoll	Sigma, Deutschland
Polymorph Prep	Nycomed, Deutschland
Random Hexamer Oligonukleotide	Boehringer, Deutschland
RNasin	Promega, Serva, Deutschland
RPMI 1640- Medium	Seromed, Deutschland
Taq DNA Ploymerase	GibcoBRL, Deutschland
TRIZOL-Reagent	GibcoBRL, Deutschland
VEGF 165	Seromed, Deutschland

3.9 Häufig verwendete Lösungen, Puffer und Medien

3.9.1 Lösungen

FACS-Lysierungslösung (10fach Stammlösung)	Becton-Dickinson, Deutschland
FACS-Permeabilisierungslösung (10fach Stammlösung)	Becton-Dickinson, Deutschland
Fixierungslösung (8% Formaldehyd)	Immunotech, Deutschland
0,1M Dithiothreitol	GibcoBRL, Deutschland
50mM MgCl ₂ -Stammlösung	GibcoBRL, Deutschland
1% Ethidiumbromid-Stammlösung: 0,01g Ethidiumbromid ad 10ml Aqua bidest.	

3.9.2 Puffer

PBS-Dulbecco's (PBS, pH 7,6) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} 10mM Na-Phosphat (pH 7,5) (= 14,6g Na_2HPO_4 / L + 2,6g NaH_2PO_4 / L) 130mM NaCl	Dulbecco, Deutschland
10fach PCR-Puffer	GibcoBRL, Deutschland
5fach 1 st RT-Puffer	GibcoBRL, Deutschland
Erythrocyte Lysis (EL) Buffer	Qiagen, Deutschland
Cell-Wash-Buffer	Becton-Dickinson, Deutschland
1x TAE-Puffer (pH 8,0) 40mM Tris-acetat 1mM EDTA (Ethyldiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	
Reaction Buffer 500nM Carbonat, pH 9,5 (= 17g Na_2CO_3 / L + 28g NaHCO_3 / L)	J.T. Baker, Deutschland
Storage Buffer 10mM Tris, 150mM NaCl, pH 8,2 (= 1,42g / L Trisma + 8,77g / L NaCl) 3-4 Tropfen pHix (5mg/ml Pentachlorophenol in 95 % Ethanol)	Sigma, Deutschland

3.9.3 Medien

Zellkulturmedium:
RPMI 1640 –Medium ohne L-Glutamin
7% FCS
1% L-Glutamin 200mM
1% Penicillin/Streptomycin
2,0g/l NaHCO_3

3.9.4 Gele

2% Agarosegel:
50ml 1x TAE-Puffer (pH 8,0)
1g Agarosepulver