

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Medikamente

<u>Wirkstoff</u>	<u>Handelsname</u>	<u>Dosierung</u>	<u>Form</u>	<u>Hersteller</u>
Acetylsalicylsäure	Aspirin	500 mg	Tabletten	Bayer
	Aspirin 300N	300 mg	Tabletten	Bayer
	Herz ASS	50 mg	Tabletten	Ratiopharm
Amiodaron	Cordarex	50 mg/ml.	Lösung	Sanofi Winthrop
Atropinsulfat	Atrop. sulf. sol.1%	10 mg/ml	Lösung	WDT
Azaperon	Stresnil	40 mg/ml	Lösung	JANSSEN
Doxapram	Dopram-V	20 mg/ml	Lösung	Albrecht
Embutramid	T 61	200 mg/ml	Lösung	Intervet
Epinephrin	Suprarenin	1,2 mg/ml	Lösung	Hoechst
Etilefrin	Effortil	7,5 mg/ml	Lösung	BOEHRVET
Glyceroltrinitrat	Nitrolingual infus.	1 mg/ml	Lösung	G.Pohl-Boskamp
Heparin-Natrium	Heparin-Natrium	25000 I.E.	Lösung	B.Braun Melsung
Ketamin	Ketanest 10%	115,3 mg/ml	Lösung	PARKE-DAVIS
	Ketanest 5%	57,67 mg/ml	Lösung	PARKE-DAVIS
Lidocain	Xylocain 2%	20 mg/ml	Lösung	AstraZeneca
N,N-Dimeth.-Butyr.	Respirot	0,15 mg/ml	Tropfen	BOEHRVET
Pentetrazol	Coryvet	100 mg/ml	Lösung	ATAROST
Verapamil	Isoptin	2,5 mg/ml	Lösung	Knoll
	Isoptin mite	120 mg	Tabletten	Knoll
Xylazin	Rompun 2%	20 mg/ml	Lösung	Bayer
	Xylazin 2%	23,3 mg/ml	Lösung	SANOFI

4.1.2 Material für Intervention

Angiographie-Set	Coro-Set pvb Medizintechnik GmbH & Co KG, Kirchseeon, Germany
Ballonkatheter	Presario, PTCA ballon catheter, Model 6343, ø 3.5 oder 4.0 mm; Länge: 20mm Medtronic, Minneapolis U.S.A
Braunüle	Vasocan Braunüle, 0.9x22 mm, BRAUN
Druckaufnehmer	Druckmess-Set HKL

	Medex Medical Ltd., Lancashire, GB
Führungsdraht	Wizdom ST, Floppy Guidewire, \varnothing 0,36 mm, Länge: 18cm Cordis Corporation, Miami, U.S.A.
Führungskatheter	Vector Guiding catheter 8F, AR 2.0 with sideholes Vector Guiding catheter 8F, JR 3.5 with sideholes Medtronic, Minneapolis, U.S.A.
Inflator + Y-Stück	20/30 Priority Pack with CoPilot, Accessory Kit Guidant, Advanced cardiovascular systems, Temecula, USA
Kontrastmittel	UltraVist-370, Wirkstoff Iopromid SCHERING, Berlin, Germany
Nadelinjektionskatheter	„NIC-3“ BMT, Oberpfaffenhofen, Germany
Schleuse	Avanti ⁺ Introducer 8F Cordis Corporation, Miami, U.S.A.

4.1.3 Plasmide

VEGF-Plasmid "ph VEGF.165.787" für Gentransfer, konstruiert von David Leung 1989 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Genentech, South San Francisco, CA, USA): zirkulär; Länge: 5701 Basenpaare (bp); Nukleotide 57-629 des humanen VEGF in einem pCIS Expressionsvektor (Gorman et al. 1990) (Enhancer und Promotor vom humanen Cytomegalovirus); Linearisierungsstellen für die Restriktionsenzyme Hind III, Xho I, SacI, EcoRI.

LacZ-Plasmid von Escherichia coli für Gentransfer: entspricht der Publikation von Kalnins et al. (1983), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Seppo Ylä-Herttua, Finnland.

VEGF-Plasmid für die in Situ-Hybridisierung: 930 bp des humanen heparin-bindenden VEGF in einen pBluescript II SK (+/-) Vektor mit Ampicillin-Resistenz (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Genentech, South San Francisco, CA, USA); mRNA-Transkript 801 bp; Linearisierungsstellen für die Restriktionsenzyme Hind III (für Antisense-Sonde) und PST I (für Sense-Sonde).

4.1.4 Schweinefutter

V4133-000 Mpig-H; 4mm, Alleinfutter für Minipigs, Ssniff Spezialdiäten GmbH, 59494 Soest

Inhaltsstoffe: Rohprotein 16 %, Rohfett 3 %, Rohfaser 6 %, Rohasche 6,5 %

Zusatzstoffe: Vit. A: 15.000 I.E./kg, Vit. D3: 1.000 I.E./kg, Vit. E: 100 mg/kg, Cu: 5 mg/kg

4.1.5 Lösungen und Puffer

Agarplatten für Transformation

1,0 g Bacto Tryptone und

0,5 g Bacto Yeast Extract und

1,0 g NaCl in 100 ml dH₂O lösen

1,5 g Select Agar (SIGMA, Select Agar, # A5054) zugeben, autoklavieren

in die noch warme Lösung 100 µl Antibiotikum (Ampicillin 50 mg/ml) geben

ausgießen in Kulturschalen und bei Raumtemperatur stehen lassen bis ausgehärtet

auf dem Deckel stehend bei 4°C aufbewahren

Ammoniumacetat 7,5 M (NH₄-Acetat) pH 7,5, 500 ml

289 g NH₄-Ac (Merck, Ammoniumacetat, 1 kg, 1.01115.1000) in etwas dH₂O lösen

mit Eisessig (konz.Essigsäure) pH 7,5 einstellen und mit dH₂O auf 500 ml auffüllen

Denhardts Lösung 100 x für die *In situ*-Hybridisierung

0,2 g Ficoll (Merck, Ficoll 400, 25g, # 1.00498.0025) und

0,2 g PVP (Merck, Polyvinylpyrrolidone, 100g, # 1.07370.0100) und

0,2 g BSA (Merck, Albumin Fraktion V, 25g, # 1.12018.0025)

in DEPC-H₂O ad 10 ml lösen und in 1 ml - Aliquots bei -20°C lagern

DEPC-H₂O für die *In situ*-Hybridisierung

Steriles Flaschenwasser in gereinigte Flaschen füllen

1 ml DEPC (SIGMA, Diethylpyrocarbonat, 100ml, # D5758) pro Liter Wasser dazugeben,

gut schütteln, mindestens 1 Std. einwirken lassen. Autoklavieren.

Dextransulfat 50 % (DexSO₄) für die *In situ*-Hybridisierung

25 g Dextransulfat (Merck, 10g, # 1.03093.0010) in zunächst 25 ml DEPC-H₂O lösen

im 80°C Wasserbad erhitzen, öfters vortexen und bei 3000 rpm zentrifugieren

erneut 25 ml DEPC-H₂O zugeben und mischen

in 1 ml - Aliquots bei -20°C lagern

Differenzierungs-Lösung für Orcein-Färbung

100 ml 70 % Ethanol plus 1,0 ml HCl.

Frisch herstellen und nach Verwendung werfen. Gesundheitsschädlich!

Dithiothreitol (DTT) 0,1 M für die *In situ*-Hybridisierung

309 mg DTT (BioMol, Dithiothreitol, 5g, # 04010) und

18 ml DEPC-H₂O und

20 µl 0,5 M EDTA

pH 6,0 einstellen

auf 20 ml mit DEPC-H₂O auffüllen und bei -20°C in 0,2 ml - Aliquots lagern

EDTA 0,5 M pH 8,0 für die *In situ*-Hybridisierung

93 g EDTA Na₂2H₂O (SIGMA, Ethylenediaminetetraacetic acid Disodium, 100g, # E5134)

NaOH-Plätzchen zugeben (Merck, Natriumhydroxid Plätzchen zur Analyse, # 1.06498)

rühren bis alles gelöst ist

0,5 ml DEPC zugeben und autoklavieren

Formamid (deionisiert) pH 7,0 für die *In situ*-Hybridisierung

400 ml Formamid (Merck, Formamid reinst, # 1.04008)

20 g Ionenaustauscherharz (BioRad, Analyt. Grade Bed Resin AG501x8(D), # 1426425)

auf Schüttler stellen (mindestens 2 Std schütteln lassen)

pH prüfen, ggf. mit neuem Austauscherharz weiter deionisieren.

mittels Papierfaltenfilter filtrieren

für die Verwendung als Hybridisierungspuffer in 1ml-Aliquots bei -20°C lagern

Rest dunkel in 4°C lagern

Glycin 1 M für die *In situ*-Hybridisierung

37,5 g Glycin in 1x PBS lösen (Merck, Glycin zur Synthese, 250g, # 8.16013)

0,5 ml DEPC zugeben

pH 7,4 mit NaOH einstellen und autoklavieren

HCl 0,2 N (Salzsäure) für die *In situ*-Hybridisierung

100 ml 1 M HCl + 400 ml DEPC-H₂O

Kaliumpermanganat-Lösung für Orcein-Färbung

0,15 g Kaliumpermanganat (MERCK) in 100 ml dH₂O lösen

5,0 ml schweflige Säure (3 %; 1,58 ml 95 % H₂SO₄ + 48,42 ml dH₂O) zugeben

Frisch herstellen und nach Verwendung werfen. Gesundheitsschädlich!

LB-Medium für Transformation

1,0 g Bacto Tryptone (DIFCO Laboratories, Bacto Tryptone, # 211705)

0,5 g Bacto Yeast Extract (DIFCO Laboratories, Bacto Yeast Extract, # 0127-17-9)

1,0 g NaCl (Merck, NaCl, # 1.06404)

in 100 ml dH₂O lösen und autoklavieren

bei 4°C aufbewahren, unmittelbar vor Gebrauch Antibiotikum zusetzen

Natriumacetat 3 M pH 6,0 für die *In situ*-Hybridisierung

123,5 g Natriumacetat in dH₂O lösen (Merck, Natriumacetat z.A., 250g, 1.06268)

mit Eisessig (100% Essigsäure) pH 6,0 einstellen

0,5 ml DEPC zugeben und autoklavieren

Natriumchlorid 5 M für die *In situ*-Hybridisierung

146 g NaCl in dH₂O lösen

0,5 ml DEPC zugeben und autoklavieren

Na₂CO₃ 1 M pH 10,2 für die *In situ*-Hybridisierung

1,06 g Na₂CO₃ (Merck, Natriumcarbonat z.A., # 1.06392)

in 10 ml DEPC-H₂O auflösen, vortexen

pH 10,2 mit Natriumhydrogencarbonat einstellen

aliquotieren zu je 1 ml und bei -20°C lagern

NaHCO₃ 1 M für die *In situ*-Hybridisierung

0,84 g NaHCO₃ (Merck, Natriumhydrogencarbonat z.A., # 1.06329)

in 10 ml DEPC-H₂O auflösen

in 1 ml - Aliquots bei -20°C lagern

Na₂H₂PO₄ 1 M pH 6,8 für die *In situ*-Hybridisierung

1 M Natriumdihydrogenphosphat-Lösung:

69 g NaH₂PO₄ *H₂O (Merck, Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat z.A., # 1.06346.0500)

in 500 ml H₂O lösen

1 M Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung:

89 g Na₂HPO₄ *2H₂O (Merck, Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat z.A., # 1.06580)

in 500 ml H₂O lösen

beide Lösungen etwa im Verhältnis 1:1 mischen, bis pH 6,8 erreicht ist

auf 500 ml 0,5 ml DEPC zugeben und autoklavieren

Orcein-Lösung für Orcein-Färbung

1,0 g Orcein (MERCK) in 100 ml 70 % Ethanol lösen

1,0 ml HCl zugeben (pH zw. 1 und 2)

mind. 48 Stunden vor Anwendung herstellen.

Ein halbes Jahr haltbar. Vor Verwendung filtrieren. Gesundheitsschädlich!

Oxalsäure (5 %) für Orcein-Färbung

5 g Oxalsäure (MERCK) in 100 ml dH₂O lösen.

Ein Jahr haltbar. Gesundheitsschädlich!

PBS (Phosphate Buffered Saline) 10 x Stammlösung für die Immunhistochemie

320 g NaCl und

8 g KCl (Merck, KCl zur Analyse, # 1.04933) und

46 g Na₂HPO₄ (SIGMA, Sodium phosphate dibasic Anhydrous, # S-0876) und

8 g KH₂PO₃ (SIGMA, Potassium phosphate monobasic Anhydrous, # P-5379)

in 800 ml sterilem Flaschenwasser lösen

pH auf 7,4 einstellen mit NaOH (Merck, Natronlauge, # 1.09131)

danach die Lösung auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter bringen

PBS 10 x pH 7,2 für die *In situ*-Hybridisierung, ein Liter

5,2 g NaH₂PO₄*H₂O und

12,46 g Na₂HPO₄*2H₂O und

76 g NaCl und

1,0 ml DEPC

pH 7,2 mit 1 M NaOH einstellen, autoklavieren

Perjodsäure 0,5 % für Orcein-Färbung

0,5 g Periodsäure (MERCK) in 100 ml dH₂O lösen.

Ein Jahr haltbar. Gesundheitsschädlich!

Posthybridisierungs-Mix für die *In situ*-Hybridisierung, ein Liter

500 ml deionisiertes Formamid pH 7,0 und

100 ml 10 x Salze (vorher Denhardt's rein!)

1,6 g DTT zugeben

restliches Volumen mit dH₂O auffüllen

PFA/PBS 4% pH 7,0 (Paraformaldehyd), 500ml

20 g Paraformaldehyd (Merck, Paraformaldehyd, 1 kg, 8.18715.1000)
in 80°C-warmem 1 x PBS (aus 10 x PBS) lösen
auf Heizplatte bei 70°C etwa 20 Min rühren (autoklav. Rührfisch!!!) bis Lösung klar
Flasche dabei mit Alufolie umwickeln
nach Abkühlen pH 7,0 mit 1 M NaOH (oder HCl) einstellen
vor Gebrauch filtrieren (Papierfaltenfilter 185 mm, S&S, steril)
max. 2 Tage bei 4°C aufbewahren

Gesättigte Pikrinsäurelösung pH 2,0, 1,2%, 500 ml

6 g Pikrinsäure (giftige Kristalle!!!; MERCK, Pikrinsäure z.A., 500 g, # 1.00623.0500)
in 500 ml dH₂O lösen (rühren)

Pronase

500 mg Protease (Sigma, Protease 4,9 U/mg, 1 g, P-5147) in 12,5 ml DEPC-H₂O lösen
4 Std bei 37°C vorverdauen (im Wasserbad)
aliquotieren zu je 625 µl (ein Aliquot reicht für 50 ml Verdauung für Paraffinschnitte)
bei -20°C lagern

Saline 10 x 1,5 M Stammlösung für die Immunhistochemie

87,66 g NaCl in 1000 ml sterilem Flaschenwasser lösen

Salze 10 x für die *In situ*-Hybridisierung, 500 ml

300 ml 5 M NaCl und
50 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 und
50 ml 1 M Na_xH_xPO₄ pH 6,8 und
50 ml 0,5M EDTA pH 8,0 und
45 ml DEPC-H₂O
unmittelbar vor Gebrauch 5 ml 100x Denhardt´s-Lösung zugeben

Sirius Rot Lösung, 500 ml

0,5 g Sirius Red (Polysciences inc., C.I.35700 # 09400)
in 500 ml frischer Pikrinsäurelösung lösen (lange rühren)
wenn Sirius Red gelöst ist, ein paar Kristalle Pikrinsäure zugeben, die sich nicht lösen
sollen (Zeichen für Sättigung der Lösung).
Maximal eine Woche lagern bei RT

SSC (Standard Saline Citrate) 20 x, ein Liter

175 g NaCl und

88 g Trinatriumcitrat-Dihydrat (Merck, Trinatriumcitrat Dihydrat, 1 kg, 1.06432.1000)

in 1000 ml dH₂O lösen

pH 7,0 einstellen

TES 10 x Waschlösung pH 7,5, 2,5 Liter

250 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 und

50 ml 0,5 M EDTA und

722,5 g NaCl

mit dH₂O auf 2500 ml auffüllen

Triethanolamin 0,1 M pH 8,0, 500 ml

6,65 ml Triethanolamin (Sigma, Triethanolamin, 500 ml, T1377) und

450 ml DEPC-H₂O

pH 8,0 mit 1 N HCl/NaOH einstellen

mit DEPC-H₂O Volumen auffüllen

unmittelbar vor Gebrauch aus 4°C dazugeben:

1,25 ml Essigsäureanhydrid (Merck, Essigsäureanhydrid Reag., 50ml, 1.59001.0050)

Tris 10 x 0,5 M pH 7,6 Stammlösung für die Immunhistochemie

60,55 g Tris Base (SIGMA, Trizma Base, # T-1503)

in 700 ml sterilem Flaschenwasser (B.Braun, Aqua B.Braun, # 2121P15J) lösen

mit 1 N HCl (Merck, Salzsäure, # 1.09057) auf pH 7,6 – 7,7 einstellen

danach die Lösung auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter bringen

Tris 1 M (verschiedene pH-Werte) für die *In situ*-Hybridisierung

15,8 g Tris-HCl (Sigma, Trizma Hydrochloride, 500g, T-5941) in 100 ml DEPC-H₂O auflösen

12,1 g Tris-Base (Sigma, Trizma Base, 500g, T-6066) in 100 ml DEPC-H₂O auflösen

beide Lösungen miteinander mischen bis gewünschter pH erreicht ist

Yeast t-RNA für die *In situ*-Hybridisierung

25 mg y-tRNA (Gibco BRL, yeast t-RNA, 50 mg, # 15401-029)

in 500 µl DEPC-H₂O lösen

in 10 und 50 µl - Aliquots bei -20°C lagern

4.1.6 Geräte

Airflow Controller AFC-1000	Thurm
Autoklav 3870 ELV	tuttnauer
C-Bogen Diagnost OP-C6	Philips
Centrifuge Avanti J-25	Beckman
Certomat H Heißluft-Ofen	B-Braun
Certomat R Schüttler	B-Braun
Compact-Desinfektor G7783CD	Miele
Defibrillator	HEILIGE
Digital-pH/mV-Meter GPHR 1400	Greisinger Electronic
Eismaschine	Ziegra
EKG-Gerät Horizon 2000, Model 260	Mennen Medical Inc.
Elektrophorese-Kammer	OWL
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gene Amp PCR System 9700	PE Applied Biosystems
Hofer HE33 Submarine Unit	Pharmacia Biotech
Homogenisiergerät Ultra Turrax T25	Janke & Kunkel
Kamera, Bildschirm, Drucker	Polaroid
Kühlschrank 4°C	Bosch
Magnetrührer mit Heizung Ikamag RH	Janke & Kunkel
Magnetrührer mit Heizung RCT basic	Janke & Kunkel
Mikrowelle Micromat Duo	AEG
Ofen	WTB Binder
PC	NTAS
Photometer Gene Quant	Pharmacia
Power-Supply Power Pac 300	BIORAD
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Trio Thermoblock	Biometra
Ultraflow Freezer -85°C	Nuaire
UV/Weißlicht-Leuchttisch NU-72	Konrad Benda
Videorekorder U-Matic, VO-5800PS	Sony
Vortex	cenco instruments
Vortex MS1 Minishaker	Janke & Kunkel
Waage SB A 53	Scaltec
Wasserbad	Memmert
Wasserbad Thermomix BU	B-Braun

4.2 Methoden

4.2.1 Tierexperiment

4.2.1.1 Vorbereitung und Narkoseeinleitung

22 Hausschweine (Hybride der Rassen Deutsches Landschwein und Pietrain) wurden eine Woche vor Intervention in den Ställen der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der FU Berlin (FEM) eingestellt. Sie wurden einzeln auf Stroh gehalten, hatten freien Zugang zu Trinkwasser, wurden morgens und nachmittags mit handelsüblichem, pelletiertem Futter für Minipigs gefüttert und erfuhren ein automatisiertes Lichtprogramm mit 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit. Die hier beschriebenen Versuche waren vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (G 0145/99).

Am Tag vor der Intervention wurde den Tieren 80 mg Verapamilhydrochlorid und 350 mg Acetylsalicylsäure über das Futter verabreicht. In den darauffolgenden Tagen erhielten die Tiere täglich 350 mg Acetylsalicylsäure bis zum Tage der Sektion.

Am Tag der Intervention unterblieb die morgendliche Fütterung. Vor Einleitung der Narkose wurden die Tiere adspektorisch auf ihre Narkosefähigkeit hin untersucht. Dabei wurde geachtet auf eventuelle Hautrötung oder Blässe (Kreislaufprobleme), Atmung und Nasenausfluss (Atemwegsinfektion), Haltung und Verhalten der Tiere. Für die Dosierung der Narkosemittel wurde das Körpergewicht der Tiere geschätzt.

Je Tier wurden in einer Mischspritze 750 – 850 mg Ketamin (10 %), 460 – 520 mg Xylazin, 120 mg Azaperon und 5 mg Atropin aufgezogen und mittels einer auf eine Perfusorleitung aufgesetzten Kanüle in die Nackenmuskulatur verabreicht. Die Tiere schliefen exzitationslos ein und konnten nach 15 Minuten aus dem Stall in den OP-Vorbereitungsraum verbracht werden.

Hier wurden Herz und Lunge auskultiert, der Puls an der A. saphena medialis palpirt, die kapillare Rückfüllungszeit am Zahnfleisch bestimmt, die Maulhöhle auf eventuelle Strohreste untersucht und die Narkosetiefe anhand der ausgefallenen Reflexe und der Bulbusstellung abgeschätzt. Die Schweine wurden gewogen, in der Leiste mit Seifenlösung gewaschen, an der Halsunterseite und der rechten Brustwand zur Befestigung der EKG-Klebelektroden rasiert und mit einer Braunüle in der V. auricularis lateralis versehen.

Die Tiere wurden auf dem mit einem Luftkissen gepolsterten Operationstisch in Rückenlage ausgebunden und an einen EKG-Monitor und eine Dauertropfinfusion mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) angeschlossen (Tropfgeschwindigkeit: ca. 8 ml pro Minute). Die Leistengegend wurde mit einer jodhaltigen Lösung desinfiziert und steril abgedeckt.

Die Narkose wurde aufrecht erhalten durch wiederholte intravenöse Gaben von 200 mg Ketamin (5 %) und 14 mg Xylazin im Abstand von 20 Minuten. Während der gesamten Narkosedauer atmeten die Tiere spontan.

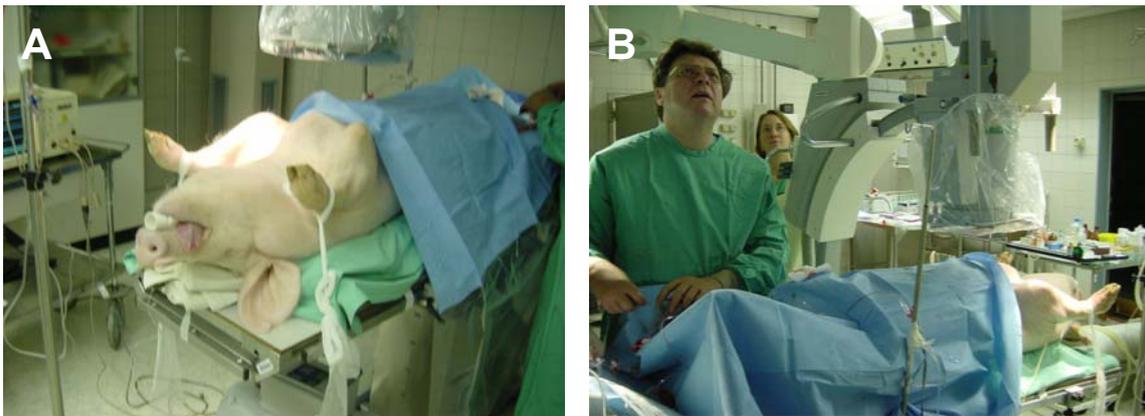


Abb. 4: Intervention. A) Schwein in Narkose; B) Versuchsaufbau unter Durchleuchtung

4.2.1.2 Koronare Ballon-Angioplastie und Gentransfer

Die linke oder rechte Arteria femoralis wurde mit einer Punktionsnadel in der Leiste punktiert und ein flexibler Draht ins Gefäß verbracht. Die Punktionsnadel wurde entfernt und die Einstichstelle durch einen kleinen Hautschnitt erweitert, so dass eine zuvor mit NaCl gespülte 8 French Schleuse in die Arterie vorgeschoben werden konnte. Nach Entfernung des Drahts und des Mandrins wurde die sichere arterielle Lage der Schleuse durch Öffnen des Hahns überprüft, bevor die Tiere 5000 I.E. Heparin intravenös erhielten. Unter Durchleuchtungskontrolle wurde zunächst ein langer Draht (Bestandteil des Angiographie-Sets) zur Aorta ascendens vorgeschoben, um dem gekrümmten Führungskatheter als Leitschiene zu dienen. Als Führungskatheter für die rechte Koronarie wurde ein Judkins rechts 3.5 mit Seitenlöchern verwendet, für die linke Koronarie ein Amplatz rechts 2.0 mit Seitenlöchern. Der Draht wurde entfernt, sobald der Führungskatheter kurz oberhalb der Koronarostien positioniert war. Nachdem das Ostium der Koronararterie intubiert war, konnten Verlauf und Ausmaße des

Gefäßes mittels Kontrastmittel-Angiographie dargestellt und zur Dokumentation auf Video aufgezeichnet werden. Der Führungskatheter wurde über die Hahnenbank des Angiographie-Sets an einen Druckaufnehmer angeschlossen, der seitlich am Operationstisch auf Herzhöhe angebracht war (siehe hierzu Abb. 4). Der Druckaufnehmer war mit dem Monitor verbunden, um so eine arterielle Blutdruckmessung über die Spitze des Führungskatheters durchzuführen.

Ein Führungsdraht mit flexibler Spitze wurde durch den Führungskatheter tief in die Koronararterie vorgeschoben, um dem nun folgenden Ballonkatheter als Leitschiene zu dienen. Die Größe des Ballonkatheters (ausgehend von einem Inflationsdruck von 8 atm) richtete sich dabei nach der angiographisch festgestellten Größe der Arterie. Ziel war dabei, das Gefäß auf das 1,3 bis 1,5-fache seiner ursprünglichen Größe zu dilatieren, um sicher zu stellen, dass die verursachte Verletzung der Gefäßwand ausreichte, um eine adäquate Gewebsreaktion zu provozieren. Um eventuell auftretende Gefäßspasmen zu unterbinden, wurde vor Dilatation über den Führungskatheter ein Bolus Glyceroltrinitrat-Lösung (1 mg auf 5 ml NaCl) in das Zielgefäß appliziert. Der 20 mm lange Ballonkatheter wurde in Position gebracht und unter einem Druck von 8 atm mit Kontrastmittel gefüllt. Die Lage des Ballons wurde auf Video aufgezeichnet, um später bei der Präparation der Gefäße das sichere Auffinden der Läsion zu gewährleisten. Während der Dilatation wurde die korrekte Lage und vollständige Entfaltung des Ballons angiographisch überprüft. Nach 30 Sekunden wurde der Ballon deflatiert. Von dem Zeitpunkt, ab dem sich der Ballon vollständig entleert hatte, bis zum erneuten Druckaufbau, wurde eine Pause von mindestens einer Minute eingehalten. Insgesamt wurden drei 30-sekündige Dilatationen je behandeltem Gefäß durchgeführt. Bei jedem Tier wurde die rechte Koronararterie (RCA) und eine der beiden linken Koronararterien dieser Ballonkatheter-Behandlung unterzogen. Nach erfolgter Dilatation wurden Ballonkatheter und Führungsdraht entfernt und eine weitere Kontrastmitteldarstellung durchgeführt, um Dissektionen zu erkennen bzw. auszuschließen.

An den beiden dilatierten Gefäßabschnitten wurde anschließend der Gentransfer mittels Nadelinjektionskatheter durchgeführt. Ein Gefäß erhielt dabei das Verum VEGF, das jeweils andere Gefäß das Kontrollgen LacZ. Die jeweils unbehandelt gebliebene linke Koronararterie, also entweder der R. interventrikularis anterior (RIVA) oder der R. circumflexus (RCX), dienten später als unverletzte Kontroll-Gefäße. Zunächst wurde der Nadelinjektionskatheter an der

Dilatationsstelle in Stellung gebracht, und dann konnten per Knopfdruck die drei Kanülen des Injektionskatheters ausgefahren und in die Arterienwand vorgeschoben werden (zuvor wurde durch Injektion von Kontrastmittel angiographisch die effiziente Übertragung durch den Nadelinjektionskatheter nachgewiesen).

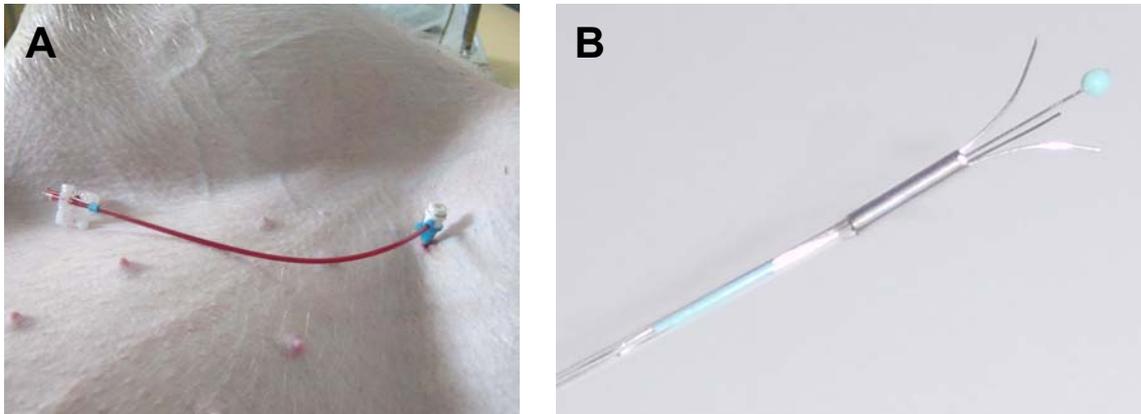


Abb. 5: Zugang & Katheter. A) Arterielle Schleuse in der Arteria femoralis; B) Spitze des Nadelinjektionskatheters mit den drei Kanülen im ausgefahrenen Zustand.

Das Plasmid-Liposomen-Gemisch wurde über eine am Katheterende aufgesteckte Spritze in die Adventitia bzw. in die Gefäßumgebung injiziert, wobei die im Kathetersystem verbliebenen Reste des Gemischs durch eine Nachinjektion mit einer zuvor bestimmten Menge physiologischer Kochsalzlösung ausgespült wurden. Es wurde darauf geachtet, dass möglichst gleich häufig linke wie rechte Koronararterien das VEGF-Plasmid bzw. das Kontrollgen LacZ erhielten.

Die Zufälligkeit der Zuordnung wurde dadurch gegeben, dass die Zuordnung zur „linken“ oder „rechten“ Gruppe schon bei Erstellung des Behandlungsplans festgelegt wurde und somit schon vor der angiographischen Größenschätzung der Gefäße feststand, und die Reihenfolge, in der die Tiere zur Intervention kamen, durch die von den Tierpflegern bei der Stallbelegung gewählte Aufstellung vorgegeben war.

MATERIAL UND METHODEN

Tier	Datum Intervention	Geschlecht	Gewicht kg	Punktion	VEGF- Gentransfer	LacZ- Gentransfer	Komplikationen	Datum Sektion	Zeitgruppe
------	--------------------	------------	------------	----------	----------------------	----------------------	----------------	---------------	------------

A1	11.01.00	♂ kastr	27,0	Art. fem. re	RCX Kath.: AR 2.0 Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCA Kath.: JR 3.5 Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	12.01.00	1 Tag
A2	18.01.00	♂ kastr	27,0	Art. fem. re	RCX Kath.: AR 2.0 Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCA Kath.: JR 3.5 Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	19.01.00	1 Tag
A3	15.02.00	♂ kastr	26,2	Art. fem. re	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	16.02.00	1 Tag
A4	14.03.00	♂ kastr	25,1	Art. fem. li	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	15.03.00	1 Tag
A5	14.03.00	♂ kastr	30,0	Art. fem. re	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	15.03.00	1 Tag

C1	08.02.00	♂ kastr	26,0	Art. fem. re	RCX Kath.: AR 2.0 Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCA Kath.: JR 3.5 Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	15.02.00	7 Tage
C2	08.02.00	♂ kastr	26,0	Art. fem. re	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	15.02.00	7 Tage
C3	29.02.00	♂ kastr	26,5	Art. fem. re	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	07.03.00	7 Tage
C4	29.02.00	♂ kastr	31,0	Art. fem. li	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	07.03.00	7 Tage
C5	08.03.00	♂ kastr	27,0	Art. fem. re	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	15.03.00	7 Tage

MATERIAL UND METHODEN

D1	09.02.00	♂ kastr	25,5	Art. fem. re	RIVA Kath.: AR 2.0 Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCA Kath.: JR 3.5 Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	23.02.00	14 Tage
D2	09.02.00	♂ kastr	24,5	Art. fem. re	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	23.02.00	14 Tage
D3	16.02.00	♂ kastr	29,0	Art. fem. re	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	01.03.00	14 Tage
D4	16.02.00	♀	27,0	Art. fem. re	RIVA Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	Exitus 22.02.	-	-
D4 neu	08.03.00	♂ kastr	30,0	Art. fem. li	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	15.03.00	14 Tage
D5	16.02.00	♀	24,0	Art. fem. li	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	07.03.00	14 Tage

E1	01.02.00	♂ kastr	33,0	Art. fem. re	RIVA Kath.: AR 2.0 Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCA Kath.: JR 3.5 Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	29.02.00	28 Tage
E2	01.02.00	♂ kastr	23,0	Art. fem. re	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	29.02.00	28 Tage
E3	04.02.00	♂ kastr	28,7	Art. fem. re	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	01.03.00	28 Tage
E4	04.02.00	♂ kastr	25,0	Art. fem. re	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	Exitus 04.02.	-	-
E4 neu	24.02.00	♀	31,5	Art. fem. li	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	21.03.00	28 Tage
E5	04.02.00	♂ kastr	27,0	Art. fem. re	RCX Kath.: AR 2.0 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	RCA Kath.: JR 3.5 SH Ballon: 20mm, Ø 4mm	-	21.03.00	28 Tage

Tab. 1: Behandlungsplan und -protokoll

Nach Beendigung der Intervention und Entfernung der Katheter wurde die arterielle Schleuse entfernt und die Blutung in die Leiste durch 20 minütigen, kräftigen Druck auf die Einstichstelle unterbunden. Nach Ablauf der 20 Minuten wurden die Tiere weitere 10 Min auf dem Operationstisch beobachtet, um Nachblutungen rechtzeitig zu erkennen und eingreifen zu können. Dann wurden die Tiere zum Aufwachen in ihren Stall zurückgebracht und in Seitenlage und tiefer gelagertem Kopf auf Stroh gebettet. Alle 15 Minuten wurde die punktierte Leiste auf Blutungen untersucht, so lange, bis die Tiere diese Untersuchung aufgrund des zurückkehrenden Bewusstseins nicht mehr ohne Abwehrbewegungen zuließen.

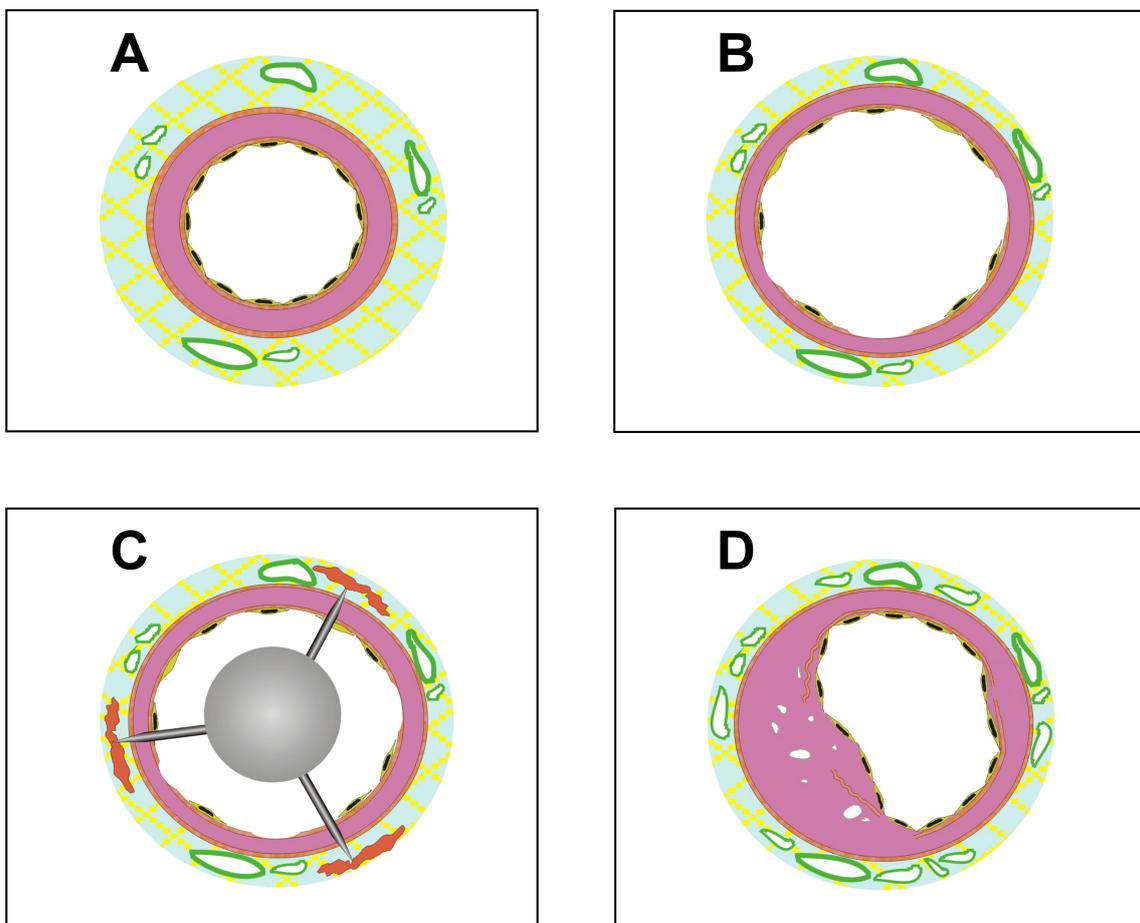


Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. A) Gesunde Koronar-Arterie mit typischer Schichtung von innen nach außen: Tunica Intima (Endothel), Lamina elastica interna, Tunica Media, Lamina elastica externa, Adventitia mit vereinzelt Vasa vasorum. B) Koronar-Arterie nach Ballondilatation: stellenweise Denudation des Endothels, Lamina elastica interna partiell rupturiert, Media teilweise ebenfalls beschädigt, Gefäßdurchmesser deutlich erhöht. C) Nadel-injektionskatheter NIC-3 in Position: Injektion des Plasmid-Liposomen-Gemischs in die Adventitia des dilatierten Gefäßabschnitts. D) Reaktion der Gefäßwand auf die Verletzung mittels Ballonkatheter: Wiederherstellung der Endothelzellschicht, Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen in Intima und Media (I+M), Mikrogefäß-Bildung in I+M, Verdichtung der Adventitia, Zunahme der Vasa vasorum-Anzahl in der Adventitia.

4.2.1.3 Sektion und Perfusionsfixation

Die Tiere wurden je nach Dauer der Nachbeobachtungszeitraums in vier Gruppen zu je fünf Schweinen eingeteilt: Gruppe A wurde einen Tag nach Intervention der Sektion zugeführt, Gruppe C nach sieben Tagen, Gruppe D nach 14 und Gruppe E nach 28 Tagen.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, erlebten zwei Tiere nicht den planmäßigen Zeitpunkt der Sektion. Sie verstarben unmittelbar im Anschluss an die Intervention aufgrund eines Herzstillstands nach Kammerflimmern, das auch durch den Einsatz eines Defibrillators und diverser Notfallmedikamente nicht terminiert werden konnte. Diese Tiere wurden ersetzt, um die statistische Aussagekraft der Daten zu gewährleisten.

Am Tag der geplanten Sektion wurden die Tiere nüchtern gelassen und wie oben beschrieben in Narkose gelegt. Die hierfür benötigte Ketamin- und Xylazin-Dosis wurde körperrgewichtsadaptiert verabreicht (höchste Dosierung: 1000 mg Ketamin (10 %) und 620 mg Xylazin).

Über eine in die Ohrvene gelegte Braunüle erhielten die Tiere eine frisch angesetzte Bromo-Deoxyuridin-Infusionslösung (1 g Bromo-Deoxyuridin pro 20 Kilogramm Körpergewicht, gelöst in 200 ml 37°C-warmer Kochsalzlösung). Die Tiere wurden nach abgeschlossener Infusion noch eine Stunde in Narkose gehalten, um den proliferierenden Zellen Gelegenheit zum Einbau der markierten Base zu geben. Nach Ablauf dieser Stunde erhielten die Tiere eine Injektion von 5000 I.E. Heparin und wurden fünf Minuten später durch eine schnelle intravenöse Injektion von 10 – 14 ml T61 euthanasiert.

An einem Tier je Zeitgruppe (Tiere A1, C2, D1, E3) wurde vor Euthanasie eine erneute Koronarangiographie durchgeführt, um exemplarisch eine angiographische Verlaufskontrolle durchzuführen und eine eventuelle endotheliale Dysfunktion (intrakoronare Spasmen), verursacht durch die Verletzungen der Gefäßwand durch Ballon- und Nadelinjektionskatheter, *in vivo* zu detektieren.

Nach Feststellung des Todes wurde der Thorax eröffnet und das Sternum nach kranial verlagert. Der Herzbeutel wurde eröffnet und bis über die Herzohren freipräpariert. Die V. cava caudalis wurde durchtrennt und das anhängende Lungengewebe so abgetrennt, dass die Hinterwand des Herzens freigelegt war. Dann wurden die Aorta und alle kranialen Gefäße

durchtrennt, so dass das Herz als Ganzes entnommen werden konnte.

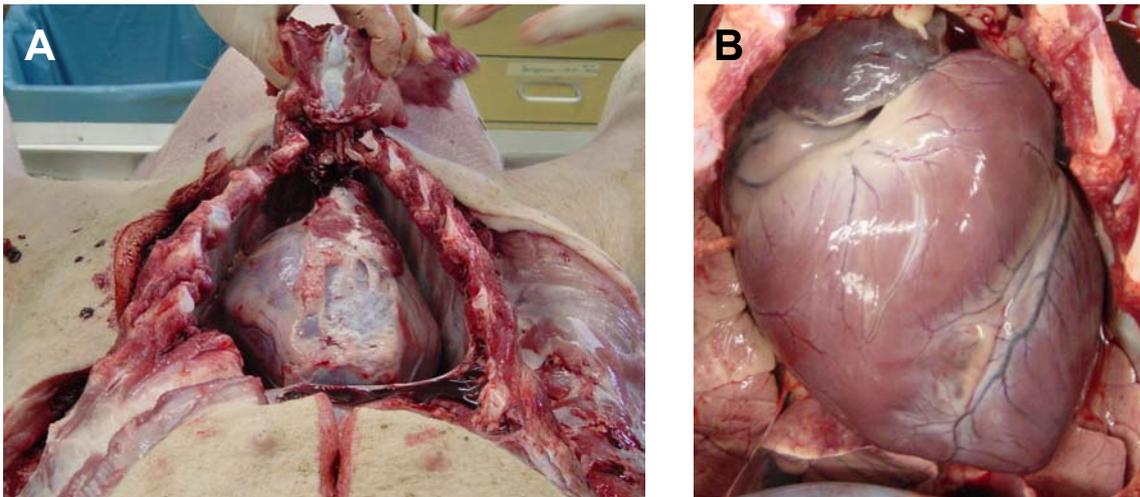


Abb. 7: Sektion. A) Öffnen des Thorax durch Entfernung des Brustbeins. B) Öffnen des Herzbeutels zur Darstellung der Gefäße und besseren Übersichtlichkeit bei der Präparation des Herzens.

Das Herz wurde über eine an der Aorta ascendens befestigte Arterienklemme unter einem Abzug aufgehängt, der Schlauch einer zyklischen Pumpe in die Aorta vorgeschoben und mit dem Ende auf Höhe der Koronarostien fixiert. Es erfolgte eine zehnmünütige Perfusion mit Ringer-Lactat-Lösung. Die durch die Abtrennung von Lunge und Gefäßen entstandenen Öffnungen in den Vorhöfen wurden dabei mit Arterienklemmen verschlossen. Ein in den Pumpkreislauf zwischengeschalteter Druckaufnehmer ermöglichte die Kontrolle des Perfusionsdrucks, der zwischen 80 und 120 mmHg (physiologischer Blutdruck) lag und durch das Entfernen oder Umpositionieren von Arterienklemmen beeinflusst werden konnte.



Abb. 8: Fixation. Einstündige Formalin-Perfusion des Herzens mittels zyklischer Pumpe

Nach der Spülung mit Ringer-Lactat folgte, wie zuvor beschrieben, eine einstündige Perfusionsfixation mit gekühltem, zehnpotentigem, neutral gepuffertem Formalin, und dann eine Immersionsfixation für 24 Stunden bei 4°C.

4.2.1.4 Präparation und Weiterverarbeitung

Vor der Präparation wurden die Herzen für eine halbe Stunde gewässert, um die gesundheitsschädlichen Formalindämpfe zu verringern. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Charité - Campus Benjamin Franklin wurden die Koronarien mitsamt der sie umgebenden Adventitia und angrenzenden Myokardgewebes aus den Herzen herauspräpariert. Unter Zuhilfenahme der Videoaufzeichnungen und der makroskopisch sichtbaren Veränderungen an den Koronararterien wurde die dilatierte Stelle aufgesucht, um den dilatierten Gefäßabschnitt (formalinbedingt geschrumpft auf ca. 90 % des ursprünglichen Ausmaßes) mit proximalem und distalem Referenzsegment separieren zu können. Auf diese Art entstanden je nach Gefäßlänge zwischen drei und fünf Gefäßabschnitte, ein bis zwei Abschnitte, die proximal der Dilatationsstelle lagen, die Dilatationsstelle selbst, und ein bis zwei Abschnitte, die distal der Dilatationsstelle lokalisiert waren. Jeder Abschnitt wurde wiederum in 0,4 bis 0,5 cm lange Stücke zerteilt und in Kunststoffkapseln aufbewahrt zur weiteren Fixierung, Entwässerung und anschließenden Paraffinröschung.

Am nächsten Tag konnten die Gefäßstücke in Paraffin eingebettet und mit der Anfertigung von Querschnitten begonnen werden. Von jedem Paraffinblock wurden mindestens 15 serielle, durchnummerierte Gewebeschnitte angefertigt (eingestellte Schnittdicke 5 µm) und auf beschichtete Objektträger (Superfrost plus) aufgezogen. Schnitt Nummer eins und zwei eines jeden Blocks wurden im Institut für Pathologie nach den dortigen Standardmethoden mit Hämatoxylin-Eosin bzw. Elastica van Gieson gefärbt, die Schnitte 3 – 15 wurden mindestens zwei Wochen bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie mittels Immunhistochemie, Histochemie oder *in situ*-Hybridisierung untersucht wurden.

4.2.2 Digitale Bildanalyse

4.2.2.1 Auswahl der Querschnitte und Bestimmung des „Injury Score“

Da die Reaktion einer Arterie auf eine Intervention entscheidend vom Schweregrad der Gefäßwandverletzung abhängt, wurde als Maß für die Gefäßverletzung für jeden Masterquerschnitt ein „Injury Score“ bestimmt, um die Vergleichbarkeit der Gefäße zu gewährleisten.

Hierzu wurde von jedem Gefäß (ohne Kenntnis von dessen Ursprung/Behandlungsgruppe) die Stelle bzw. der Elastica van Gieson-gefärbte Querschnitt ausgesucht, der die schwersten Verletzungen der elastischen Laminae und die meiste Neointima-Bildung aufwies (sogenannter „Masterquerschnitt“) und nach einem modifizierten Schema (Rosenthal et al. 2001) Punkte für den Schweregrad der Verletzung vergeben:

Punkte	Veränderungen
0.0	keine Veränderung/Gefäßwandschädigung
0.5	leichte Neointimabildung bei intakter LEI, Media und LEE
1.0	Neointimabildung bei rupturierter LEI; Media unbeteiligt; LEE intakt
1.5	Neointimabildung, rupturierte LEI, Media-Beteiligung; LEE intakt
2.0	starke Neointimabildung, rupturierte LEI, starke Media-Beteiligung; LEE intakt
2.5	starke Neointimabildung, rupturierte LEI, starke Media-Beteiligung; LEE leicht angegriffen
3.0	starke Neointimabildung, rupturierte LEI, starke Media-Beteiligung; LEE stark angegriffen

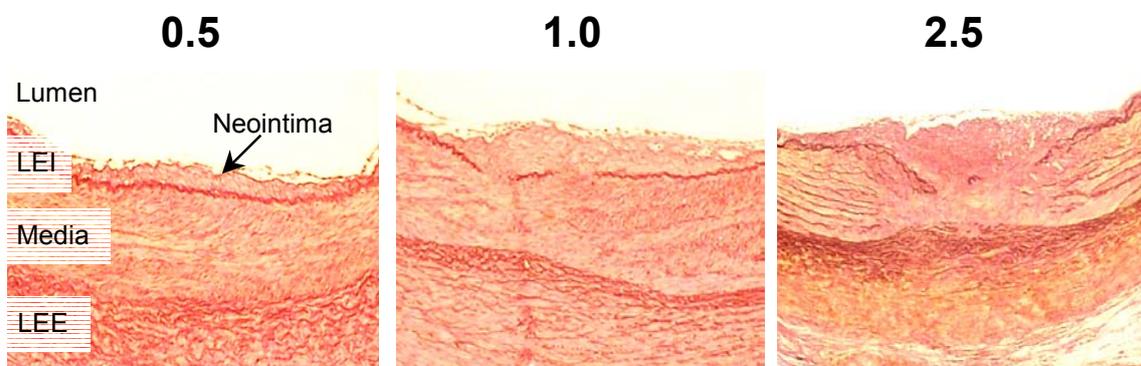


Abb. 9: Injury Score. Ausschnitte aus Masterquerschnitten als Beispiele für die Vergabe der Injury Scores

4.2.2.2 Morphometrie an Elastica van Gieson-gefärbten Schnitten

Zur Bestimmung der Lumenfläche, LEE-Fläche und Gesamtarterienfläche wurden die Elastica van Gieson-gefärbten Masterquerschnitte zunächst unter einem Mikroskop (DMRD, Leica GmbH, Bensheim, Deutschland) betrachtet und das Bild von einer auf dem Mikroskop installierten Videokamera (Sony 3CCDTM, Sony Inc., Tokyo, Japan) aufgenommen. Das Signal wurde auf einen Computer übertragen und digitalisiert (Grafikkarte Matrox Comet 24-bit color). Mit Hilfe der Software LUCIA G (Version 3.52ab, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) wurde das Bild auf dem Monitor fixiert und vermessen. Dazu wurden die zu messenden Flächen zunächst umfahren und dann unter Einbeziehung der Vergrößerungen (Objektiv, Leica Videokameraadapter mit 0.35-facher Vergrößerung) berechnet und in mm^2 ausgedrückt. Zur Bestimmung der LEE-Fläche diente dabei die dunkel gefärbte LEE, und zur Bestimmung der Gesamtarterienfläche wurde die Grenze zwischen dichter und lockerer Adventitia umfahren. Die Daten wurden in eine Excel-Tabellenkalkulation exportiert. Unterbrechungen der LEI (Pfeile) machten eine getrennte Bestimmung von Neointima- und Media-Fläche unmöglich, daher wurde eine kombinierte Intima+Media (I+M)-Fläche bestimmt. Diese Fläche und die Adventitiafläche wurden rechnerisch ermittelt: LEE-Fläche minus Lumenfläche ergab I+M-Fläche, und Gesamtarterienfläche minus LEE-Fläche ergab die Adventitiafläche.

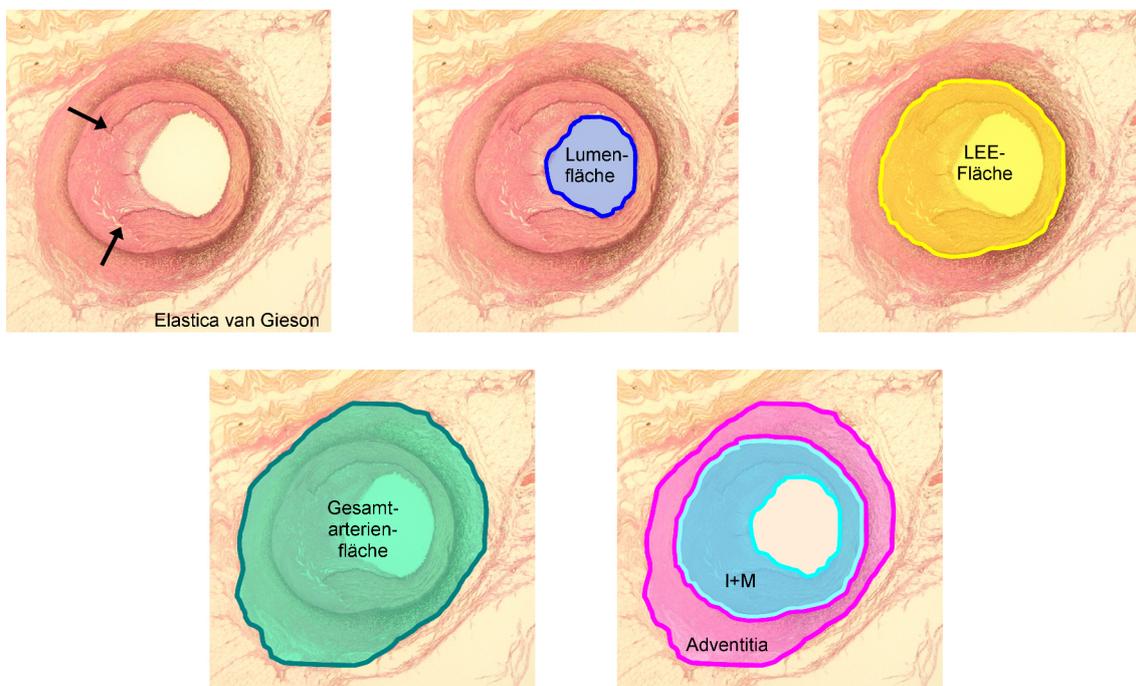


Abb. 10: Morphometrie. Flächenmessung und Bestimmung von I+M- bzw. Adventitiafläche an routinemäßig Elastica van Gieson-gefärbten Schnitten.

4.2.2.3 Messungen an (immun)histochemisch-gefärbten Schnitten

4.2.2.3.1 Endothelzellen

Immunhistochemisch gefärbte Endothelzellen (Färbeprotokoll für von Willebrand-Faktor siehe 3.2.3.1) wurden auf den Masterquerschnitten manuell gezählt: ein stark vergrößerter Abschnitt (40x Vergrößerung) wurde auf dem Monitor festgestellt und die Endothelzellen in diesem Bild in Intima+Media bzw. in der Adventitia gezählt; dann wurde wieder auf das Live-Bild umgeschaltet (um den unmittelbar benachbarten Abschnitt im Mikroskop einzustellen) und in gleicher Weise damit verfahren; nach Auswertung aller Bilder wurden die Einzelergebnisse addiert und in eine Excel-Tabelle übertragen. Wann immer es Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Grenzverlaufs von I+M und Adventitia (also der LEE bzw. der dichten Adventitia) gab, wurde der gleiche Querschnitt der Elastica van Gieson-gefärbten Reihe zum Vergleich herangezogen.

4.2.2.3.2 Proliferierende Endothelzellen

Proliferierende Zellen wurden mittels 5-Bromo-2'-deoxyuridine-Färbung angefärbt (Protokoll siehe 3.2.3.3) und die proliferierenden Endothelzellen in Intima+Media bzw. Adventitia der Masterquerschnitte manuell gezählt (wie unter 3.2.2.3.1 beschrieben). Ob es sich bei einer positiven Zelle um eine Endothelzelle handelte, wurde durch Endothelzellefärbung auf seriellen, benachbarten Schnitten und nach morphologischen Kriterien entschieden. Die Ergebnisse wurden in die Excel-Tabellen übertragen, und anschließend konnte der Proliferationsindex (Prozent der proliferierenden Endothelzellen bezogen auf die Gesamtendothelzellzahl)

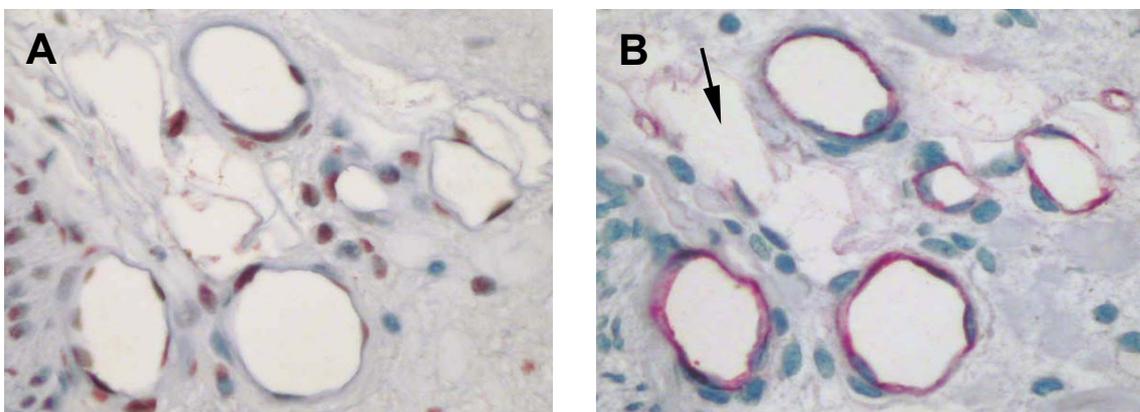


Abb. 11: Proliferation von Endothelzellen. A) BrDU-Färbung; B) Der vWF-gefärbte Nachbarschnitt diente der Erkennung von Endothelzellen/Gefäßen bzw. dem Ausschluss präparationsbedingter „Pseudogefäße/Gewebslücken“ (Pfeil).

berechnet werden.

4.2.2.3.3 Mikrogefäße

Die Mikrogefäßanalyse in Intima+Media und Adventitia eines jeden Masterquerschnitts wurden an Endothelzell-gefärbten Schnitten durchgeführt. Auch hier wurden mehrere Einzelbilder (20x Vergrößerung) ausgewertet und zu einem Gesamtergebnis addiert. Je Bild wurden alle Mikrogefäße einzeln umfahren und die Fläche computerassistent markiert (wie bei der Lumenflächenbestimmung beschrieben, mit mehrmaliger Anwendung pro Bild). Das Programm errechnete die Zahl der Mikrogefäße, Gesamtfläche und Gesamtumfang aller Mikrogefäße (in mm² bzw. mm). Diese Daten wurden ebenfalls in Excel-Tabellen exportiert. Anschließend wurde der durchschnittliche Umfang eines Mikrogefäßes (MVS_I = microvascular size index) und der von Mikrogefäßen "bedeckte" Anteil der in Intima+Media- bzw. Adventitiafläche (Dichte in %) berechnet.

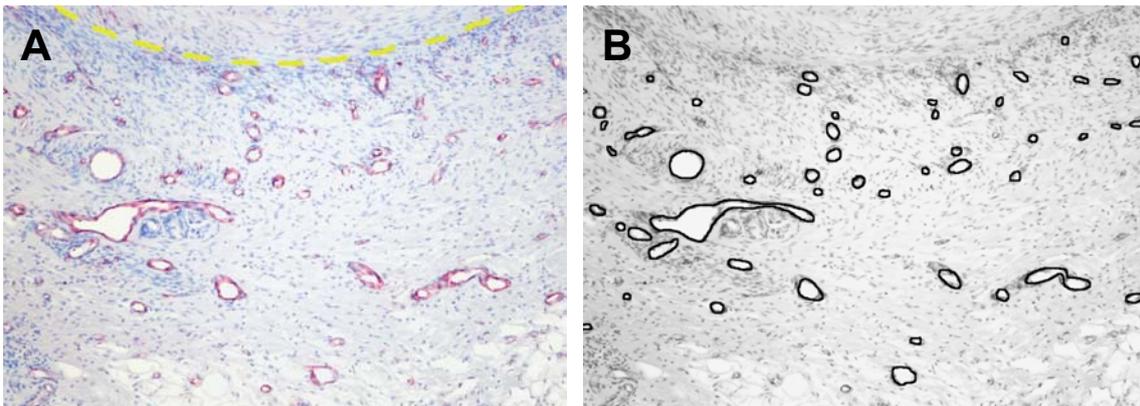


Abb. 12: Mikrogefäße. A) Ausschnitt aus der Adventitia eines vWF-gefärbten Schnitts, die gelbe gestrichelte Linie markiert die Lamina elastica externa. B) die computerunterstützte Mikrogefäßauswertung ist hier mit schwarzer Umrandung simuliert.

4.2.2.3.4 Kollagen, Elastin, α -Aktin

Für die Bestimmung dieser Parameter mussten zunächst histochemisch bzw. immunhistochemisch gefärbte Schnitte angefertigt werden (Färbeprotokolle siehe unter 3.2.3.4 und 3.2.4.1+2). Für jede der jeweiligen spezifischen Färbungen wurden Makros programmiert, die die spezifische Färbung von der unspezifischen Färbung und vom Hintergrundweiß unterscheiden konnten. Die auszumessende Fläche (Intima+Media- bzw. Adventitiafläche) wurde in oben beschriebener Weise eingegrenzt, und dann der Anteil der positiv gefärbten

Fläche an der eingegrenzten Fläche bestimmt (Bestimmung der „area fraction“ in %) (Noutsias et al. 2001). Dabei wurden Flächen, die nicht mit Gewebe bedeckt waren (weiß) von der Bezugsfläche abgezogen. Für die Bestimmung von Kollagen wurde unter polarisiertem Licht gearbeitet, um die grün-rot-gelb-leuchtenden Fibrillen sichtbar zu machen (Hintergrund hier dunkelblau).

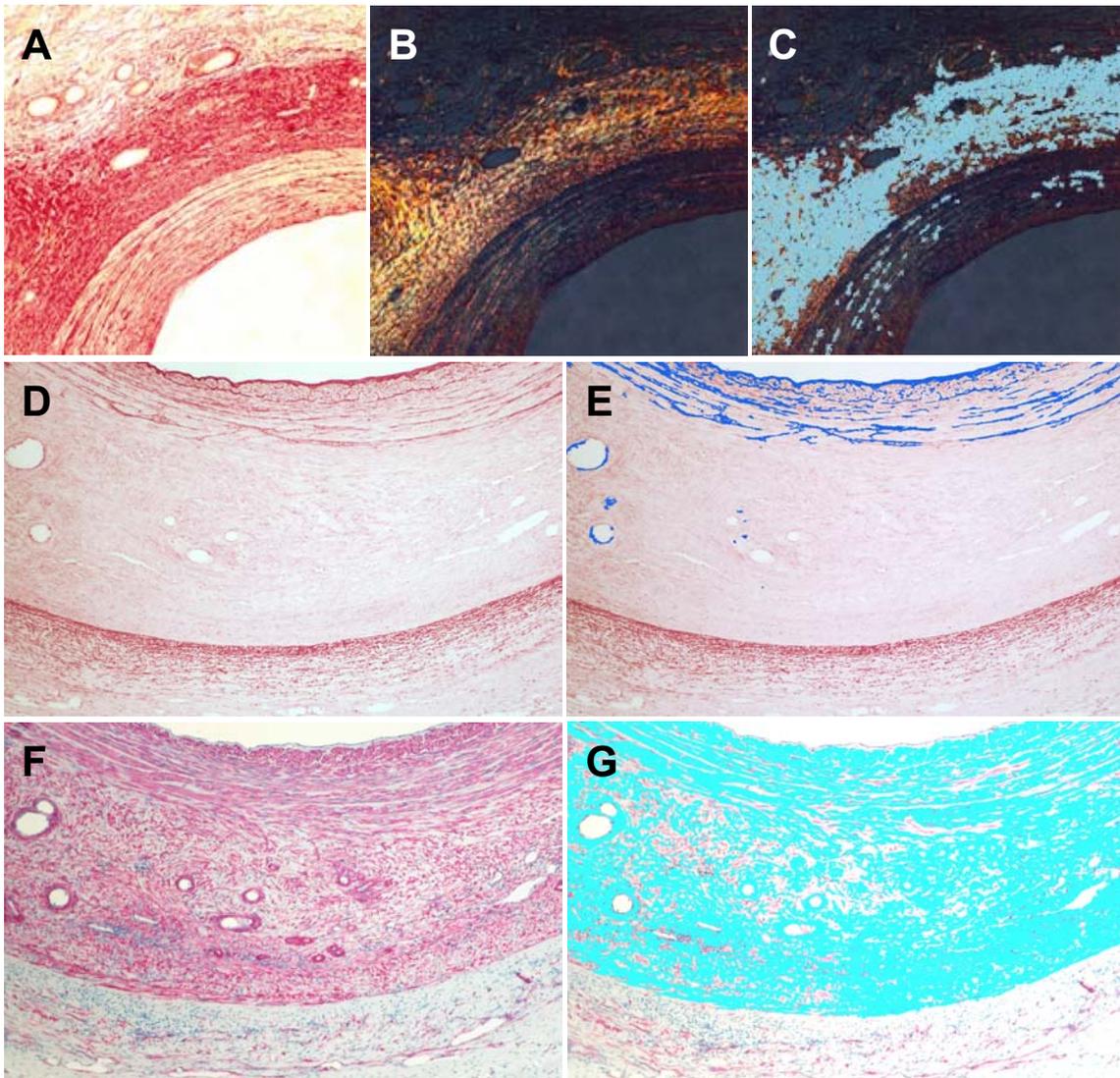


Abb. 13: Kollagen, Elastin, α -Aktin. Ausschnitt aus einem Sirius Rot-gefärbten Masterquerschnitt für die Kollagenmessung, A) unter dem Lichtmikroskop, und B) unter polarisiertem Licht. C) In hellblau die Flächenerkennung durch das Makro. D) Ausschnitt aus einem Orcein-gefärbten Masterquerschnitt für Elastinmessung. E) In blau die Flächenerkennung in der Intima+Media durch das Makro. F) α -Aktin-Färbung für glatte Muskelzellen und Myofibroblasten. G) In hellblau die Flächenerkennung in der Intima+Media durch das Makro.

4.2.2.3.5 Makrophagen, T-Lymphozyten

Die Zellen wurden immunhistochemisch markiert (Färbeprotokolle siehe unter 3.2.3.5). Auch hier wurde ein Makro programmiert, das die spezifische Färbung von der Gegenfärbung und vom Hintergrundweiß unterscheiden konnte. Dieses Makro musste jedoch zusätzlich Punkte anhand ihrer Größe diskriminieren: kleine Punkte wurden ignoriert, mittelgroße Punkte wurden als Zelle gezählt, und große Punkte wurden automatisch in die entsprechende Anzahl an Zellen zerlegt und die entsprechende Zellzahl bestimmt (Noutsias et al. 2002). Dieses System wurde an 10 Querschnitten überprüft, die zunächst manuell ausgezählt und dann mit der oben beschriebenen Methode bestimmt wurden. Die Fehlerquote lag bei 3,54 % und war daher vernachlässigbar. Auf diese Weise wurde der Gehalt an Makrophagen bzw. T-Lymphozyten in Intima+Media und Adventitia bestimmt.

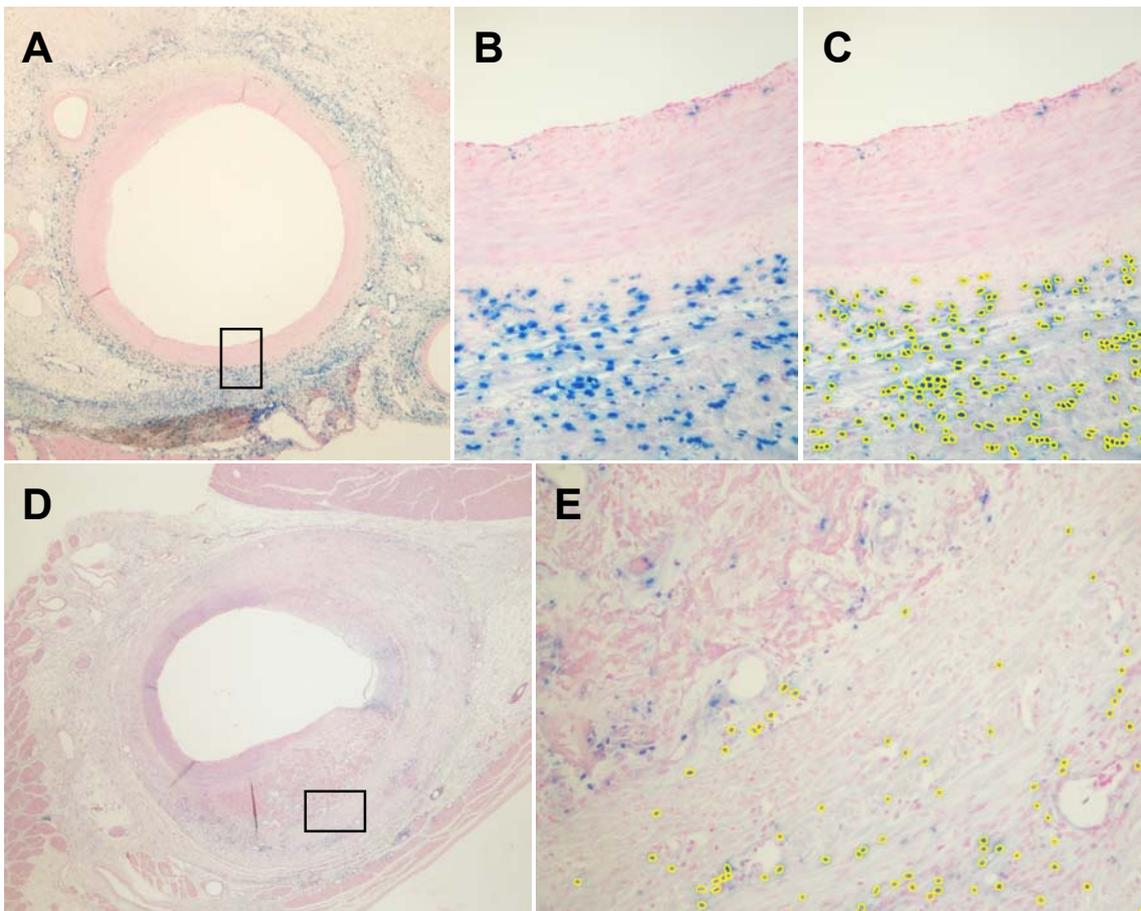


Abb. 14: Makrophagen und T-Lymphozyten. A) Makrophagenfärbung einer VEGF-transfizierten Koronarie ein Tag nach Intervention und B) Ausschnitt daraus. C) Darstellung der computerunterstützten Zellerkennung in der Adventitia. D) T-Lymphozyten-Färbung einer VEGF-transfizierten Koronarie 14 Tage nach Intervention. E) Ausschnitt daraus und Darstellung der computerunterstützten Zellerkennung in der Adventitia.

4.2.3 Immunhistochemie

4.2.3.1 Von Willebrand-Faktor für Endothelzellen

- Entparaffinierung der Präparate mit Rotihistol (Roth, Rotihistol, # 6640.1) über Nacht
- die Objektträger am nächsten Tag dann jeweils für 5 Min in absolutem, 96%, 90%, 80% und 70% Ethanol (J.T.Baker, Ethanol Absolute, # 8006) rehydrieren
- Schnitte für 10 Min in steriles Flaschenwasser (B.Braun, Aqua B.Braun, # 2121P15J) stellen
- 200 ml steriles Flaschenwasser im Wasserbad auf 38°C erwärmen
- 500 mg Pepsin (SIGMA, Pepsin, # P-7000) abwiegen und in 4 ml des bereits erwärmten Wassers lösen
- 1 ml 2N HCl (Merck, 2N Salzsäure, # 1.09063) hinzufügen und die Lösung vor dem Einstellen der Präparate kurz mit einem leeren Objektträger durchmischen
- Schnitte für 15 Min bei 38°C in dem Pepsin-HCl-Gemisch belassen
- Objektträger für 2 x 5 Min in sterilem Flaschenwasser wässern
- TBS-Puffer herstellen: 500 ml 10x Tris, 500 ml 10x Saline, 4 Liter steriles Flaschenwasser
- Objektträger für 10 min in TBS-Puffer stellen
- „TBSA“ herstellen: 100 mg BSA (Merck, Albumin Fraktion V, # 1.12018.0025) in 100 ml TBS-Puffer lösen
- Schweineserum (DAKO, Schweinenormalserum, # X0901) im Verhältnis 1:10 mit TBSA verdünnen
- Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- die Schnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift (Beckman Coulter, PAP Pen, # IM1056) umranden
- Blockierungsschritt: verdünntes Schweineserum auf die Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei 37°C 15 Min inkubieren
- Primärantikörper (DAKO, polyklonal Kaninchen Anti-Von Willebrand-Faktor, # A0082) im Verhältnis 1:250 mit TBSA verdünnen
- Schweineserum abschütteln
- Primärantikörper auf die Präparate auftragen (auf die Negativkontrolle nur TBSA) und in einer feuchten Kammer bei 37°C 45 Min inkubieren
- Sekundärantikörper (DAKO, Schwein Anti-Kaninchen, biotinyliert, # E0353) im Verhältnis 1:400 mit TBSA verdünnen
- Primärantikörper ablaufen lassen und die Objektträger 2 x 2 Min in TBS-Puffer spülen
- Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- Sekundärantikörper auf die Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei 37°C 45 Min inkubieren
- ABC-Reagenz (DAKO, Strept AB Komplex Streptavidin-Biotin, # K0391) herstellen (30 Min vor Gebrauch): 10 µl Streptavidin + 10 µl biotinylierte Alkalische Phosphatase pro 2000 µl TBSA
- Sekundärantikörper ablaufen lassen und die Objektträger 2 x 2 Min in TBS-Puffer spülen
- Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln

- ABC-Reagenz auf die Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei 37°C 30 Min inkubieren
- Fast Red-Reagenz herstellen: eine Fast Red-Tablette in 2 ml Fast Red-Substratpuffer (DAKO, Fast Red Substrat System ICC, # K0699) lösen durch schütteln und vortexen, dann Lösung in eine Tropfflasche mit Filtertip überführen
- ABC-Reagenz ablaufen lassen und die Objektträger 2 x 2 Min in TBS-Puffer spülen
- Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- Fast Red-Reagenz auf die Präparate auftropfen und bei Raumtemperatur 12 Min inkubieren
- Fast Red-Reagenz ablaufen lassen und die Objektträger 2x 2 Min in sterilem Flaschenwasser spülen
- Präparate für 60 Sek mit frisch filtriertem Hämatoxylin (Merck, Hämatoxylin III nach Gill modifizierte Lösung, # 1.05174) färben
- Präparate in warmem Leitungswasser bläuen
- Objektträger mit auf 37°C erwärmter Glyceringelatine (Merck, Kaisers Glyceringelatine, # 1.09242) eindecken

4.2.3.2 Vascular Endothelial Growth Factor

- Entparaffinierung, Rehydrierung, Wässern der Präparate (siehe oben)
- Objektträger für 10 min in TBS-Puffer stellen
- 4 Tropfen Avidin bzw. Biotin (Vector, Avidin-Biotin Blocking Kit, # SP-2001) in jeweils 1 ml TBS-Puffer geben und durch Schwenken mischen
- Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- die Schnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift umranden
- Blockierungsschritt I: verdünntes Avidin auf die Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei 37°C 30 Min inkubieren
- Avidin abschütteln
- Blockierungsschritt II: verdünntes Biotin auf die Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei 37°C 30 Min inkubieren
- Primärantikörper (Genentech, mouse monoclonal mAb Anti-VEGF, # A4.6.1) im Verhältnis 1:50 mit TBSA verdünnen; für die Negativkontrolle Maus IgG (DAKO, Maus IgG Negativkontrolle, # X 0931– 01) im Verhältnis 1:50 ebenfalls mit TBSA verdünnen
- Biotin abschütteln
- Primärantikörper bzw. Maus-IgG auf die Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei 37°C 60 Min inkubieren
- Primärantikörper ablaufen lassen und die Objektträger 2x 2 Min in TBS-Puffer spülen
- Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- Sekundärantikörper „2 Link Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins“ (DAKO, Universal DAKO APAAP KIT, # K0670) auf die Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur 30 Min inkubieren
- Sekundärantikörper ablaufen lassen und die Objektträger 2x 2 Min in TBS-Puffer spülen
- Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- Tertiärantikörper „3 APAAP“ (DAKO, Universal DAKO APAAP KIT, # K0670) auf die

- Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur 30 Min inkubieren
- Tertiärantikörper ablaufen lassen und die Objektträger 2x 2 Min in TBS-Puffer spülen
 - Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
 - erneut Sekundärantikörper „2 Link Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins“ auf die Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur 10 Min inkubieren
 - Sekundärantikörper ablaufen lassen und die Objektträger 2x 2 Min in TBS-Puffer spülen
 - Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
 - Tertiärantikörper „3 APAAP“ auf die Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur 10 Min inkubieren
 - Färbung mit Fast Red und Hämatoxylin, eindecken mit Glycingelatine (siehe oben)

4.2.3.3 5-Bromo-2'-deoxyuridine für proliferierende Zellen

- Entparaffinierung, Rehydrierung, Wässern der Präparate (siehe oben)
- Blockierungsschritt: Präparate für 5 Min in 3% H₂O₂ (Otto Fischer, Wasserstoffperoxid-Lösung 3%) stellen
- 0,1% Trypsinlösung vorbereiten: 5 mg Trypsin (SIGMA, Trypsin, # T-0134) abwiegen, 5 ml PBS-Puffer abmessen und ins 37°C-Wasserbad stellen
- 2,5 ml 1 N Salzsäure mit 2,5 ml 2 N Salzsäure (Merck, 2 N Salzsäure, # 1.09063.1) mischen und ebenfalls ins 37°C-Wasserbad stellen
- Objektträger für 2x 5 Min in PBS-Puffer stellen
- Objektträger aus dem PBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- Objektträger mit auf 37°C vorgewärmter, 1,5 N Salzsäure überschichten und 15 Min bei 37°C inkubieren
- 0,1 M Borax pH 8,5 herstellen: 7,63 g Borax (SIGMA, Borax Decahydrate, # B-3545) in 200 ml sterilem Flaschenwasser lösen
- Objektträger für 5 Min in sterilem Flaschenwasser wässern
- Präparate für 5 Min in Borax-Lösung stellen
- Objektträger für 5 Min in PBS-Puffer stellen
- 0,1% Trypsinlösung herstellen: abgewogenes Trypsin in warmem PBS lösen
- Objektträger aus dem PBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- Objektträger mit auf 37°C vorgewärmter, 0,1% Trypsinlösung überschichten und für 7,5 Min bei 37°C inkubieren
- Objektträger 5 Min in PBS-Puffer spülen
- „PBSA“ herstellen: 1 g BSA (Merck, Albumin Fraktion V, # 1,12018.0025) in 100 ml PBS lösen
- Primärantikörper (Amersham, Mouse monoclonal Anti-BrdU with Nuclease, # RPN202) im Verhältnis 1:25 mit PBSA verdünnen
- Objektträger aus dem PBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- Primärantikörper auf die Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei 37°C 2 Std inkubieren

- Primärantikörper ablaufen lassen und die Objektträger 2x 2 Min in PBS-Puffer spülen
- Objektträger aus dem PBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- Sekundärantikörper (Vector, Elite Kit R.T.U. biotinylated universal Anti-Rabbit/Mouse-IgG, # BA-1400) auf die Präparate auftragen und 30 Min bei Raumtemperatur inkubieren
- Sekundärantikörper ablaufen lassen und die Objektträger 2x 2 Min in PBS-Puffer spülen
- Objektträger aus dem PBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- ABC-Reagenz (Vector, Elite Kit R.T.U., # PK-7100) auf die Präparate auftragen und 30 Min bei Raumtemperatur inkubieren
- ABC-Reagenz ablaufen lassen und Objektträger für 5 Min in 0,05 M Tris (20 ml 10x Tris auf 180 ml dH₂O) stellen
- Objektträger aus dem 0,05 M Tris herausnehmen und abschütteln
- ACE-Lösung (DAKO, AEC High Sensitivity Substrate Chromogen, # K3461) auf die Präparate auftropfen und bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss 15 Min einwirken lassen
- ACE-Lösung ablaufen lassen und die Objektträger 2x 2 Min in sterilem Flaschenwasser spülen
- Färbung mit Hämatoxylin, eindecken mit Glycergelatine (siehe oben)

4.2.3.4 α -Aktin für glatte Muskelzellen und adventitielle Myofibroblasten

- Entparaffinierung, Rehydrierung, Wässern der Präparate (siehe oben)
- Objektträger für 10 min in TBS-Puffer stellen
- Kaninchenserum (DAKO, Kaninchennormalserum, # X0902) im Verhältnis 1:10 mit TBSA verdünnen
- Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- die Schnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift umranden
- Blockierungsschritt: verdünntes Kaninchenserum auf die Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei 37°C 15 Min inkubieren
- Primärantikörper (DAKO, monoklonal Maus Anti-human Aktin (smooth muscle), # M0851) im Verhältnis 1:200 mit TBSA verdünnen
- Kaninchenserum abschütteln
- Primärantikörper auf die Präparate auftragen (auf die Negativkontrolle nur TBSA) und in einer feuchten Kammer bei 37°C 45 Min inkubieren
- Sekundärantikörper (DAKO, Kaninchen Anti-Maus, biotinyliert, # E0354) im Verhältnis 1:400 mit TBSA verdünnen

...fortfahren wie bei 3.2.3.1 von Willebrand-Faktor

4.2.3.5 Makrophagen und T-Lymphozyten

- Entparaffinierung, Rehydrierung, Wässern der Präparate (siehe oben)
- Objektträger für 10 min in TBS-Puffer stellen
- Proteinase K (Roche, # 745723, 50 mg) vorbereiten: 0,2 mg in 1,0 ml 37°C-warmem 10 mM Tris-HCl (pH 7,4-8) lösen

- Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- Proteinase K auftragen und 5 Min bei 37°C inkubieren
- Proteinase K ablaufen lassen und Objektträger für 10 min in TBS-Puffer stellen
- Kaninchenserum im Verhältnis 1:10 mit DAKO Antibody Diluent (# S2022) verdünnen
- Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- die Schnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift umranden
- Blockierungsschritt: verdünntes Kaninchenserum auf die Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei 37°C 30 Min inkubieren
- Primärantikörper anti-CDx (CD = cluster of differentiation): Serotec, mouse anti human CD68 [macrophages/monocytes, Clon 387], # MCA 874G bzw. DAKO, mouse anti human CD3, # M7254
- jeweils im Verhältnis 1:25 mit DAKO Antibody Diluent verdünnen; für die Negativkontrolle Maus IgG im Verhältnis 1:25 ebenfalls mit DAKO Antibody Diluent verdünnen
- Kaninchenserum abschütteln
- Primärantikörper bzw. Maus-IgG auf die Präparate auftragen und in einer feuchten Kammer bei 37°C 120 Min bzw. 60 Min inkubieren
- Primärantikörper ablaufen lassen und die Objektträger 2x 2 Min in TBS-Puffer spülen
- Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- Sekundärantikörper „2 Link Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins“ und Tertiärantikörper „3 APAAP“ jeweils erst 30 Min inkubieren, dann nochmal 10 Min (siehe oben)
- Tertiärantikörper ablaufen lassen und die Objektträger 2x 2 Min in TBS-Puffer spülen
- Vector Blau ansetzen (Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit III, Vector, # SK 5300): 2 Tropfen von Reagenzlösung 1 zu 5 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,2) geben und mischen; dann 2 Tropfen von Reagenzlösung 2 zugeben und mischen; dann 2 Tropfen von Reagenzlösung 3 zugeben und mischen
- Objektträger aus dem TBS-Puffer herausnehmen und abschütteln
- Vector Blau auftragen und 20 Min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- Vector Blau-Lösung ablaufen lassen und die Objektträger 2x 2 Min in sterilem Flaschenwasser spülen
- Präparate für 3 Min mit Nuclear Fast Red (DAKO, # S1963) färben
- Präparate 2x 2 Min in sterilem Flaschenwasser spülen
- Objektträger 2x für je 1 Min in 95 % Ethanol stellen, dann 2x für je 1 Min in 100 % Ethanol stellen
- Objektträger für 2x 2 Min in RotiClear (Roth, # A538.1) stellen
- Eindecken mit VectaMount (Vector, # H-5000)

4.2.4 Histochemie

4.2.4.1 Sirius Rot-Färbung für Kollagen

- Schnitte gut entparaffinieren (Paraffin bricht Licht)

- absteigende Alkoholreihe (je 3 Min)
- 15 Min dH₂O
- Objektträger für 60 Min bei RT in Küvette mit Sirius Red Lösung stellen
- überschüssigen Farbstoff lösen in 0,01 N HCl für 2 Min
- aufsteigende Alkoholreihe (ab 90%)
- 5 Min in Xylol
- eindecken mit Corbit-Balsam

4.2.4.2 Orcein-Färbung für Elastin

- Schnitte entparaffinieren, absteigende Alkoholreihe (je 2 Min), 10 Min dH₂O
- Küvette mit Kaliumpermanganat-Lösung für 10 Min bei RT
- Waschen in Leitungswasser
- Schütteln in Oxalsäure bis Lösung farblos
- Waschen in Leitungswasser, Abspülen mit dH₂O
- Perjodsäure für 5 Min bei RT
- Waschen in Leitungswasser, Abspülen mit dH₂O
- Orcein-Lösung in der Mikrowelle erhitzen (30-45 Sek), Schnitte für 30 Min reinstellen
- Schnitte unter dem Mikroskop anschauen, ob sie dunkel genug sind (wenn nicht: weitere 10 Min in Orcein-Lösung stellen)
- Abspülen mit 70 % Ethanol
- Schnitte unter dem Mikroskop anschauen, ob Gewebe schon ausreichend differenziert ist (wenn nicht: mit Differenzierungs-Lösung behandeln)
- aufsteigende Alkoholreihe, Xylol
- eindecken mit Corbit-Balsam

4.2.5 RT-PCR

4.2.5.1 RNA-Isolierung

RNA-Extraktion aus Paraffinblöcken mit Qiagen RNeasy-Mini-Kit (# 74104)

- Microtom-Tisch mit RNase-Zap (Ambion, RNase-Zap, # 9780) behandeln, ausgebackene Microtom-Klinge einlegen, Handschuhe tragen: 12 (je 4 µm dicke) Schnitte vom Paraffinblock abschneiden und in steriles 2 ml-Eppendorf-Gefäß stecken
- 1200 µl Xylol dazu und kräftig schütteln
- 5 Min zentrifugieren (Eppendorf-Tischzentrifuge, 14.000 rpm)
- Xylol abpipettieren
- 1200 µl 100% Ethanol (für die Mikrobiologie) dazu, vortexen
- 5 Min zentrifugieren (14.000)
- Ethanol abpipettieren (nichts vom Pellet abziehen)

- 1200 µl 100% Ethanol dazu, vortexen
- 5 Min zentrifugieren (14.000)
- Ethanol abpipettieren (nichts vom Pellet abziehen)
- Eppendorf-Gefäß mit offenem Deckel 10-15 Min bei 37°C inkubieren bis Ethanol verdunstet ist
- Pellet in 350 µl Qiagen-Buffer „RLT“ lösen; vor Gebrauch des Puffers je ml Puffer 10 µl Mercaptoethanol (BioRad, 2-Mercaptoethanol, # 161-0710) zugeben
- 45 Sek homogenisieren (Homogenisier-Gerät vor Beginn mit RNase-Zap, RNase-freiem Wasser und Ethanol reinigen; zwischen den Proben mit Ethanol säubern)
- 590 µl RNase-freies H₂O zugeben
- 10 µl Proteinase (Qiagen, Proteinase K, # 19131) dazu und durch pipettieren mischen
- 10 Min bei 55°C inkubieren
- 3 Min (12.000 rpm) zentrifugieren
- Überstand (ca. 900 µl) in RNase-freies Eppendorf-Gefäß (nicht aus Kit) überführen (möglichst nichts vom Pellet dabei mitnehmen)
- 0,5 x Volumen (also ca. 450 µl) 100% Ethanol dazu geben und durch pipettieren mischen
- 700 µl davon auf Mini-Säule geben und Säule mit zugehörigem 2 ml Collection Tube 15 Sek zentrifugieren (10.000 rpm)
- Eluat wegschütten (Sondermüll!) und Rest von der Probe auf Säule pipettieren
- 15 Sek zentrifugieren (10.000 rpm) und Eluat verwerfen
- 350 µl Buffer „RW1“ auf die Säule pipettieren und 15 Sek zentrifugieren (10.000 rpm)
- Eluat verwerfen
- 10 µl DNase (Qiagen, RNase-free DNase-Set, # 79254: wird lyophilisiert geliefert, muss in 550 µl des mitgelieferten Wassers gelöst werden und kann dann bei -20°C aufbewahrt werden. In 4°C nur 6 Wochen haltbar) und 70 µl Buffer „RDD“ (mit dabei bei DNase) vorsichtig mischen, auf Säule auftragen (direkt auf die Membran, nicht auf den inneren Ring!) und 15 Min bei Raumtemperatur stehen lassen
- 350 µl Buffer „RW1“ auf die Säule pipettieren und 15 Sek zentrifugieren (10.000 rpm)
- Collection Tube samt Eluat verwerfen
- Säule in frisches 2 ml Collection Tube stecken und 500 µl Buffer „RPE“ (bei Lieferung muss Ethanol dazu gegeben werden) dazu geben und 15 Sek zentrifugieren (10.000 rpm). Eluat wegschütten
- 500 µl Buffer „RPE“ dazu und 2 Min zentrifugieren (10.000 rpm). Collection Tube samt Eluat wegwerfen
- Säule in mitgeliefertes 1,5ml- Eppendorf-Gefäß stecken und RNA mit 15 µl RNase-free Water (mitgeliefert) herauspülen durch 1 minüt. Zentrifugieren (10.000)

4.2.5.2 Reverse Transkription

- 11 µl des Eluats mit 0,5 µl Random Primers (Invitrogen, Random Primers, # 48190-011) versetzen und 10 Min bei 70°C inkubieren, danach sofort auf Eis.
- Rest des Eluats bei -80°C aufbewahren (für spätere Überprüfung, ob DNase-Verdau geklappt hat: ohne RT in PCR einsetzen. Menge: im Verhältnis zur cDNA hiervon nur die Hälfte einsetzen in die PCR)

- 97 µl serumfreies RPMI-Medium mit 3 µl FuGENE Transfection Reagent (Roche, Mannheim) versetzen und 5 Min bei RT stehen lassen
- dann 2 µg VEGF-Plasmid dazugeben, den Ansatz vorsichtig mischen und weitere 30 Min bei RT stehen lassen
- ein Well (einer 6er-Well Plate) mit ca. 60% HaCat-Bewuchsrate zunächst mit 200 µl RPMI-Medium beschicken und dann die 100 µl des Ansatzes dazugeben
- zu Kontrollzwecken parallel dazu die gleiche Anzahl HaCat-Zellen nur mit Medium und FuGENE, jedoch ohne das VEGF-Plasmid behandeln
- nach 24 Std im Brutschrank (37°C, pH 7,4, 5% CO₂) das Plasmid abziehen, die Zellen mit PBS waschen, und dann für weitere 24 Std mit RPMI + 10 % Fetalem Kälberserum in den Brutschrank stellen

RNA-Isolierung aus HaCat mittels RNAClean LS (Hybaid, RNAClean LS, # RC-200LS)

- das Medium abziehen und pro Well 250 µl PBS vorlegen
- je Well 750 µl RNAClean-LS zugeben, die Zellen mit einem sterilen Zellschaber vom Boden abkratzen und das Zell-Lysat durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisieren
- das Zell-Lysat in ein Eppendorf-Gefäß überführen, 200 µl Chloroform zugeben, gut mischen und für 5 Min auf Eis stellen
- 15 Min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugieren (Eppendorf Tischzentrifuge)
- wässrige, klare Oberphase in frisches Eppendorf-Gefäß überführen und gleiche Menge an Isopropanol zugeben
- 30 Min bei -20°C präzipitieren lassen
- 15 Min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugieren (Eppendorf Tischzentrifuge)
- Überstand verwerfen und Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol waschen
- 8 Min bei 4°C und 10500 rpm zentrifugieren (Eppendorf Tischzentrifuge)
- Überstand verwerfen und Pellet ca. 10 Min bei 37°C trocknen lassen
- Pellet für 5 Min bei 56°C in 80 µl DEPC-H₂O lösen

DNase Behandlung

- 80 µl der jeweiligen Probe, 16 µl 10x DNase I Puffer, 8 µl Dnase I RNase-free (Roche, # 776785), 56 µl RNase-free H₂O
- 30 Min bei 37 °C inkubieren
- abstoppen mit 16 µl 10 x Terminations-Mix (0,1M EDTA, pH 8,0, 1 mg/ml Glycogen)

Aufreinigen

- jeweils 750 µl RNAClean-LS zugeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisieren
- 200 µl Chloroform zugeben, gut mischen und für 5 Min auf Eis stellen
- 15 Min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugieren (Eppendorf Tischzentrifuge)
- wässrige, klare Oberphase in frisches Eppendorf-Gefäß überführen und gleiche Menge an Isopropanol zugeben
- 30 Min bei -20°C präzipitieren lassen

- 15 Min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugieren (Eppendorf Tischzentrifuge)
- Überstand verwerfen und Pellet mit 1 ml 70% Ethanol waschen
- 8 Min bei 4°C und 10500 rpm zentrifugieren (Eppendorf Tischzentrifuge)
- Überstand verwerfen und Pellet ca. 10 Min bei 37°C trocknen lassen
- Pellet für 5 Min bei 56°C in 20 µl DEPC-H₂O lösen

Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung

Probe	Absorption	errechnete Konzentration
ohne Plasmid	0,248	0,54 µg/µl
	0,246	
2 µg Plasmid	0,249	0,54 µg/µl
	0,245	

Reverse Transkription

- 5 µl der Probe (ca. 2,5 µg) mit 6 µl Wasser und 0,5 µl Random Primers versetzen
- 10 Min bei 70°C inkubieren, danach sofort auf Eis
- 4 µl First Strand Buffer, 2 µl DTT, 1 µl dNTP, 0,5 µl Superscript zugeben
- RT-Programm: 25°C...10 Min 42°C...50 Min 70°C...15 Min 4°C...

PCR-Ansatz

fortlaufende Proben-Nummer	339	340	341	342	343	344
	HaCat ohne Plasmid	HaCat+ 2µg Plasmid	HaCat ohne Plasmid: RNA (ohne RT)	HaCat+ 2µg Plasmid: RNA (ohne RT)	Negativ-Kontrolle	Plasmid als Positiv-Kontrolle
10x Taq Puffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
10 mM dNTP	1,25 µl	1,25 µl	1,25 µl	1,25 µl	1,25 µl	1,25 µl
Primer 1	2,5 µl VEGFsense	2,5 µl VEGFsense	2,5 µl VEGFsense	2,5 µl VEGFsense	2,5 µl VEGFsense	2,5 µl VEGFsense
Primer 2	2,5 µl VEGFanti	2,5 µl VEGFanti	2,5 µl VEGFanti	2,5 µl VEGFanti	2,5 µl VEGFanti	2,5 µl VEGFanti
Taq Polymerase	0,625 µl	0,625 µl	0,625 µl	0,625 µl	0,625 µl	0,625 µl
Menge RT-cDNA	5 µl	5 µl	2,5 µl RNA	2,5 µl RNA	-- µl	2,5 µl

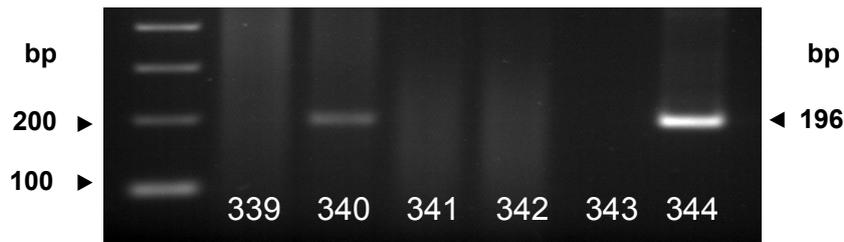


Abb. 16: Primertest an HaCat-Zellen. Gelelektrophorese der PCR-Produkte auf einem 2 %-igen Agarose-Gel mit Ethidiumbromid; links eine 100 bp-DNA-Leiter zur Orientierung, daneben die Banden der entsprechenden Proben. Die Proben Nr. 340 und 344 zeigen die erwartete Bande bei 196 bp.

Menge H ₂ O	33,125 µl	33,125 µl	35,625 µl	35,625 µl	38,125 µl	35,6251 µl
gesamt	50 µl					
Erwartung	-- bp	196 bp	--- bp	--- bp	-- bp	196 bp

4.2.6 *In Situ*-Hybridisierung mit VEGF-Sonde

4.2.6.1 Transformation

- Chemisch kompetente Zellen (E.coli von Promega # JM 109) auf Eis auftauen lassen
- 1 µg des VEGF-tragenden Plasmids (pBluescript II SK, high copy, Ampicillin-Resistenz mit 2958 bp Vektorklänge und 930 bp Insertlänge) in autoklaviertes Eppendorf-Gefäß geben
- 20 µl der Zellen dazugeben und vorsichtig umrühren
- 10 Min auf Eis stehen lassen
- Gefäß für 45 Sekunden auf 42°C erwärmen, danach sofort wieder auf Eis
- 500 µl LB-Medium dazugeben und 1 Std. bei 37°C und 225 rpm schütteln lassen
- 100 µl davon mit Glasspatel auf temperierter Agarplatte ausstreichen
- Agarplatte über Nacht bei 37°C inkubieren
- 2 ml LB-Medium vorlegen in 15ml-Falcon und 2 µl Ampicillin (50 mg/ml) zugeben
- mit Pipettenspitze eine Kolonie von der Platte abnehmen und Spitze in das Medium fallen lassen
- Falcon mit leicht aufgesetztem Deckel 4,5 Std bei 37°C und 225 rpm schütteln lassen
- die bebrüteten 2 ml Bakteriensuspension in 100 ml frisches, autoklaviertes LB-Medium (mit 100 µl Ampicillin 50 mg/ml versetzt) überführen
- über Nacht bei 37°C und 225 rpm schütteln lassen

4.2.6.2 Plasmid-Präparation

- 102 ml Bakteriensuspension auf zwei Zentrifugenröhrchen (Sorvall: Bottle PC 50 ml,

- QTY 25, # 03480) verteilen und in Beckman-Zentrifuge zentrifugieren bei 6000 g, 15 Min, 4°C
- Überstand abgießen. Eines der Pellets in 10 ml Buffer P1 (mit RNase versetzt, aus Qiagen QIAfilter Plasmid Maxi Kit, # 12263) lösen, wenn vollständig gelöst mit dieser Flüssigkeit das zweite Pellet vollständig lösen. Vortexen und pipettieren erlaubt
 - 10 ml Buffer P2 dazu, durch Invertieren mischen und 5 Min (nicht länger) bei RT stehen lassen. Vortexen jetzt nicht mehr erlaubt! Lösung sollte viskös erscheinen
 - 10 ml gekühlten Buffer P3 dazu, sofort durch Invertieren mischen und 15 – 20 Min auf Eis inkubieren
 - 30 Min bei 20.000 g und 4°C zentrifugieren. Vorher kurz mischen.
 - Überstand (klar) sofort abpipettieren und in frisches Zentrifugenröhrchen überführen. 15 Min bei 20.000 g und 4°C zentrifugieren. Währenddessen die Säulen auspacken und in 100 ml-Erlenmeyerkolben hängen, mit 10 ml Buffer QBT füllen und durchlaufen lassen
 - Überstand sofort abnehmen und auf die vorbereitete Säule geben und durchlaufen lassen
 - 30 ml Buffer QC darauf geben und komplett durchlaufen lassen
 - 30 ml Buffer QC darauf geben und komplett durchlaufen lassen
 - DNA mit 15 ml Buffer QF eluieren, dabei frisches Zentrifugenröhrchen verwenden
 - 0,7 x Volumen (also ca. 10,5 ml) Isopropanol dazugeben, mischen und sofort 60 Min bei 15.000 g und 4°C zentrifugieren; Überstand vorsichtig abschütten
 - 5 ml 70% Ethanol dazugeben und 10 Min bei 15.000 g zentrifugieren
 - Überstand abschütten und Pellet 5 – 10 Min lufttrocknen lassen
 - Pellet in angemessener Menge (ca. 400 µl) sterilem Flaschenwasser lösen
 - Konzentration bestimmen
 - Aliquots herstellen und bei –20°C einfrieren

4.2.6.3 Linearisieren des Plasmids

- RNase-freie Eppendorf-Gefäße beschriften mit Plasmid-Name, „sense“ oder „antisense“
- 20 µl des VEGF-tragenden Plasmids (Konz.: 1,985 µg/µl) hineingeben
- 20 µl DEPC-H₂O jeweils dazu
- 5 µl vom jeweiligen 10x Puffer dazu
- 5 µl vom jeweiligen Restriktionsenzym dazu
(PST I von Stratagene # 500860 10,000 U/500 µl für Sense-Sonde,
Hind III von BioLabs , 104S 10,000 U/500 µl für Antisense-Sonde)
- vorsichtig mischen, zentrifugieren bei 13000 rpm
- 4 Std. bei 37°C inkubieren

Extraktion:

- Gesamtvolumen verdoppeln mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol, pH 8 (Gibco BRL, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1, 100 ml, # 15593-031
- vortexen und zentrifugieren (4°C, 13000 rpm, 5 Min)
- obere, wässrige Phase abpipettieren und in frisches, beschriftetes Eppi überführen

- Volumen verdoppeln mit Ph:Chl:IAA, vortexen, zentrifugieren, obere Phase in frisches, beschriftetes Eppi überführen

Präzipitation:

- ein Zehntel des Gesamtvolumens an 3 M Natrium-Acetat (pH 6) dazu geben
- das Doppelte des Gesamtvolumens an abs. Ethanol dazu geben
- bei -80°C für 30 Min präzipitieren lassen
- zentrifugieren (4°C, 13000 rpm, 15 Min)
- Überstand verwerfen
- 700 µl 70%-Ethanol (aus -20°C) vorsichtig zum Pellet dazu geben
- zentrifugieren (4°C, 13000 rpm, 5 Min)
- Überstand verwerfen
- Pellet trocknen lassen
- Pellet in 10 µl DECP-H₂O lösen, Konzentration bestimmen
- auf Endkonzentration von 1µg/µl verdünnen.
- 2 µl für Gel abnehmen, Rest bei -20°C lagern

4.2.6.4 Transkription mit [S35]-UTP

- alpha-S35-UTP (Hartmann, Braunschweig, # KS-210-9,25, -20°C) aus Securitainer entnehmen, Plexiglasdeckel aufschrauben und unter Abzug hinter Plexiglaswand bei RT auftauen lassen
- pro Sonde 10 µl (3,7 MBq) in RNase-freies Eppendorfgefäß (Eppendorf Biopur Safe lock, 1,5 ml einzeln verpackt, # 0030121.589) pipettieren
- Eppendorfgefäße beschriften (VEGF Sense T7 bzw. VEGF Antisense T3)
- jeweils dazu pipettieren (Mischen durch pipettieren):
 - 4 µl 5x Transkriptionspuffer (je nachdem: für T3 oder T7)
 - 1 µl 100 mM DTT (bei Polymerase dabei)
 - 1 µl RNasin (Promega, RNasin Plazenta, 2500u, # N2111)
 - 2 µl 10mM 3xNTP-Gemisch (Roche, Set of dNTPs, # 1.969064)
(Je 3µl 100mM ATP, GTP, CTP plus 21µl DECP-H₂O)
 - 2 µl linearisiertes Plasmid
 - 8 µl DEPC-H₂O
 - 2 µl RNA Polymerase (Gibco BRL, T3 Polymerase, # 18036-012; T7 Polymerase, # 18033-019)
- 60 Min ins 37°C Wasserbad
- erneut 1 µl der jeweiligen RNA Polymerase zugeben
- weitere 30 Min bei 37°C
- dazu geben:
 - 10 µl Yeast tRNA (Invitrogen, Yeast tRNA, # 15401-029; Konz.: 50 mg/ml)

- 1 µl RNAsin
- 1 µl DNase I (Promega, RQ1 RNase-free DNase 1U/µl, 1000u, # M610A)
- 8 Min bei 37°C inkubieren
- dazu geben:
 - 10 µl 3M Natrium-Acetat, pH 6,0
 - 74 µl DEPC-H₂O

Extraktion:

- 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol pH 8 zugeben
- vortexen, zentrifugieren (13000 rpm, RT, 5 Min)
- Oberphase abpipettieren und in frisches, mit Sondename und „Hot“ beschriftetes Gefäß überführen

Präzipitation:

- 1/10 des Oberphasen-Volumens an 3M Natrium-Acetat zugeben
- das zweifache Oberphasen-Volumen an abs. Ethanol zugeben
- vortexen, 45 Min bei -80°C fällen
- zentrifugieren (4°C, 30 Min, 13000 rpm)
- Überstand verwerfen
- Pellet trocknen lassen (unter Abzug ca. 10 Min)
- 60 µl 0,01M DTT dazu und gut auf- und abpipettieren bis Pellet aufgelöst
- 1 µl abnehmen für Szintillationmessung, Rest in -80°C lagern

4.2.6.5 Szintillationsmessung mit Beckman Coulter-Counter

- Jedes Messröhrchen (Super Polyethylene Vial 20 ml *with separately packed screw caps for liquid scintillation counting*, Packard Bioscience B.V., Niederlande) mit 2 ml Szintillationscocktail füllen
- den abgenommenen Mikroliter Sonde samt Pipettenspitze in die Flüssigkeit geben
- Anordnung der Röhrchen in den Racks:
 1. Rack: leeres Röhrchen an vorletzter Stelle zeigt dem Gerät, dass es sich um 35S handelt. Übrige Plätze frei lassen
 2. Rack: Platz 1 Leerwert (nur Szintillations-Cocktail). Auf den folgenden Plätzen die heißen Proben
 3. Rack: alles frei; zeigt dem Gerät, dass Messung beendet
- Racks hinten rechts in den Counter stellen, START/ENTER drücken, Drucker einschalten
- Messung wiederholen
- Ergebnisse (Mittelwerte aus 4 Messwerten)
 - VEGF-Antisense: 785.745,97 cpm
 - VEGF-Sense: 899.959,75 cpm

4.2.6.6 Prähybridisierung Paraffinschnitte

Deckgläschen silikonisieren

Deckgläschen in vertikale Küvetten fächerförmig einsortieren; 0,2 N HCL darüber geben, 20 Min einwirken lassen, abschütten; abs. Ethanol darüber geben, abschütten, 15 Min trocknen lassen; 6h bei 250°C im Ofen backen, abkühlen lassen; Silikonlösung (Serva, Silicone solution, 250ml, # 35130.03) unter dem Abzug in die Küvette gießen, kurz schwenken und wieder in die Flasche zurückgießen; Küvette mit Alufolie abdecken; Silikonbeschichtung einbrennen: 2h bei 100-115°C.

Vorbereitung der Paraffinschnitte (auf Superfrost Plus Objektträgern aufgezogen)

- Rotihistol-Bad über Nacht
- 20 Min frisches Roti-Histol bei RT
- 30 Min Aceton (Merck, Aceton reinst, # 1.00013)
- 10 Min 50:50 Aceton/1 x PBS
- 10 Min 1 x PBS
- 20 Min 0,2M HCl
- 30 Sec 1 x PBS
- 2 Min 1 x PBS
- 10 Min 100 mg Pronase in 200 ml 1x PBS pH 7,2 bei RT
- 30 Sec 0,1 M Glycin / 1x PBS
- 30 Sec 1x PBS
- 30 Sec 1x PBS
- 20 Min bei 4°C Nachfixieren mit frischem 4% Paraformaldehyd/PBS pH 7,0
- 3 Min 1x PBS

Acetylierung:

- 10 Min 0,1M frisches Triethanolamin pH 8,
unmittelbar vor Gebrauch 0,25 % (v:v) Essigsäureanhydrid aus 4°C zugeben; *Küvette sofort schütteln, so dass Bläschen entstehen; auf Schüttler stellen*
- 5 Min 1x PBS

Dehydrierung:

- 2 Min 30 % Ethanol (mit DEPC-H₂O ansetzen)
- 2 Min 70 % Ethanol (mit DEPC-H₂O ansetzen)
- 2 Min 90 % Ethanol (mit DEPC-H₂O ansetzen)
- 2 Min abs. Ethanol
- Objektträger in Hybridisierungskammern legen (auf 3 Lagen Zellstoff) und ca. eine Stunde bei geöffnetem Deckel trocknen lassen.

4.2.6.7 Hybridisierung

Je Objektträger werden 25 µl einer Mischung aus „Hybridisierungsmix“ mit „Sondenmix“ im Verhältnis 4:1 (v:v) benötigt, also für jeden Objektträger 20 µl HybMix und 5 µl Sondenmix.

Benötigte Sondenmenge X in µl:

$$X = \frac{400.000 \text{ cpm (= Soll-Wert) } \cdot \text{Anzahl Objektträger}}{\text{Szintillations-Wert}}$$

Hybridisierungsmix

	für 1 OT	für 10 OTs	für 15 OTs	für 20 OTs	für 30 OTs
Formamid deion.	10 µl	100 µl	150 µl	200 µl	300 µl
10x Salze <i>vorher Denhardt's rein!</i>	2,5 µl	25 µl	37,5 µl	50 µl + 0,5 µl	75 µl
0,1 M DTT	2 µl	20 µl	30 µl	40 µl	60 µl
Yeast-tRNA	0,5 µl	5 µl	7,5 µl	10 µl	15 µl
50 % DexSO4	5 µl	50 µl	75 µl	100 µl	150 µl
	20 µl	200 µl	300 µl	400 µl	600 µl

Sondenmix

	für 1 OT	für 10 OTs	für 15 OTs	für 20 OTs	für 30 OTs
Formamid deion.	2,5 µl	25 µl	37,5 µl	50 µl	75 µl
0,1 M DTT	0,5 µl	5 µl	7,5 µl	10 µl	15 µl
X + Y * <small>*X = Menge an Sonde in µl Y = DEPC-H₂O</small>	2 µl	20 µl	30 µl	40 µl	60 µl
	5 µl	50 µl	75 µl	100 µl	150 µl

- HybMix herstellen, gut mischen durch auf- und abpipettieren, auf beschriftete Eppendorf-Gefäße verteilen und bis zum Gebrauch in 50°C-H₂O-Bad stellen.
- Zellstoff in Hybridisierungskammern verteilen und jede Kammer mit einer Mischung aus 25 ml Formamid (direkt aus der Flasche) und 25 ml DEPC-H₂O tränken
- Objektträger nach Sonden sortiert in die Kammern legen
- Sondenmix herstellen
- Sondenmix für 30 Sec in 80°C-Wasserbad tauchen
- Sondenmix in Hybmix pipettieren, gut mischen durch auf- und abpipettieren
- 25 µl Mix auf jeden Objektträger pipettieren
- Deckgläschen (gebacken und silikonisiert) auflegen und mit Pinzette andrücken

- Hybridisierungskammern luftdicht verschließen und bei 50°C über Nacht inkubieren

4.2.6.8 Waschen nach Hybridisierung

- Posthybridisierungs-Mix (PHM) herstellen und in Glasküvetten verteilen
- Küvetten samt Inhalt im 52°C-Wasserbad mit Schütteleinrichtung vorwärmen
- Objektträger von den Kammern in die Küvetten einsortieren
- 15 Min im Schüttelbad bei 52°C waschen
- PHM in frische Küvetten füllen und Objektträger umsortieren. Dabei die Deckgläser durch leichtes Rütteln der Küvetten zum Abgleiten bringen, ggf. nachhelfen.
- Deckgläser und Waschlösung in radioaktiven Müll
- 4 Std bei 52°C schüttelnd waschen; währenddessen TES-Puffer herstellen und auf 37°C vorwärmen
- PHM wegschütten (in Radioaktiv-Müll) und Küvetten mit warmem TES füllen
- 15 Min in 37°C-Wasserbad in TES schütteln (TES auch in radioaktiven Müll)
- 15 Min in 37°C-Wasserbad in frischem TES schütteln (TES auch in radioaktiven Müll)
- währenddessen RNase bei 4°C auftauen (Calbiochem, RNase A, # 556746: *wird in 12,3 ml DEPC- H₂O gelöst (entspricht 10 mg/ml), dann 2 Min gekocht und aliquotiert und bei -20°C gelagert*)
- RNase in TES lösen (Endkonzentration 20 µg/ml, also 200 µl RNase/100 ml TES)
- 30 Min in 37°C-Wasserbad in TES mit RNase schütteln
- 15 Min in 37°C-Wasserbad in TES schütteln
- 15 Min in 37°C-Wasserbad in TES schütteln
- 20 Min bei RT in 2 x SSC-Puffer schütteln (20 ml 20 x SSC pro 180 ml Wasser)
- 20 Min bei RT in 0,1 x SSC schütteln (1 ml 20 x SSC pro 199 ml Wasser)
- 20 Sec in 30 % Ethanol / 0,3 M NH₄-Acetat (*4 ml 7,5M NH₄-Acetat pro 196 ml Wasser*)
- 20 Sec in 70 % Ethanol / 0,3 M NH₄-Acetat geben
- 20 Sec in 90 % Ethanol / 0,3 M NH₄-Acetat geben
- 10 Sec in abs. Ethanol geben
- Objektträger über Nacht staubfrei lufttrocknen lassen

4.2.6.9 Autoradiographie

- Objektträger nach Sonden und Entwicklungs-Chargen sortieren und mit in die Dunkelkammer nehmen
- Kartellboxen mit CaCl₂-Päckchen (Merck, Calciumchlorid gekörnt, 11.02391) versehen
- Fotoemulsion Kodak NTB-2 (Integra Biosciences, Kodak autoradiography emulsion type NTB2, 118ml, # 1654433) im 43°C-Wasserbad erwärmen
- leere, saubere Objektträger-Versanddose mit Öffnung oben als „Dippküvette“ im 43°C-Wasserbad befestigen
- Gestelle zum Trocknen der Objektträger aufstellen
- Tür abschließen, Licht aus, 10 Min an Dunkelheit gewöhnen (absolute Dunkelheit! auch

kein Rotlicht!), währenddessen die Emulsion ab und zu ganz sachte schwenken

- Dose mit Emulsion herausnehmen, aufschrauben und mit einer sterilen Spritze 25 ml langsam aufziehen, um sie dann in die leere, saubere Dippküvette zu geben
- 15 Min warten, damit Emulsion in der Küvette vollends auf Temperatur kommt
- leeren Objektträger dippen und damit die Dunkelkammer verlassen (um Gleichmäßigkeit und Blasenfreiheit daran zu überprüfen)
- alle Objektträger langsam dippen, kurz in der Emulsion belassen, langsam wieder herausziehen und die Rückseite am Deckel der Dippküvette abstreifen
- Objektträger zum Trocknen aufstellen (eine Std)
- nach 20 Objektträgern ca. 5 ml Emulsion in die Dippküvette nachfüllen
- Objektträger in Kartellboxen einsortieren, dabei Filmschicht nicht berühren
- jede Box zweimal mit fester Alufolie umwickeln, Licht an
- Boxen beschriften mit Sondenname und Datum
- Boxen und Karton mit Emulsion in 4°C stellen für die nächsten Wochen (*Kühlschrank sollte frei von Radioisotopen und Aldehyden sein*)

4.2.6.10 Entwicklung und Färbung

- D-19 Entwickler (Eastman Kodak, Kodak Developer D-19, # 1464593) filtrieren und 1:1 mit sterilem Flaschenwasser verdünnen (*Entwickler kommt als Pulver; Pulver muss in 3,8 Litern 52°C-warmem dH₂O gelöst werden und dann in einer dunklen Flasche aufbewahrt werden*)
- Küvetten füllen: eine mit verdünntem Entwickler, zwei mit sterilem Flaschenwasser, eine mit Fixierer (Kodak Polychrome graphics, Kodak RA 3000, # 3458775)
- Küvetten für 2 Std in den Kühlschrank stellen (*um optimale Temp. von 15°C zu erreichen*)
- Plastikbecher mit 2 Litern kaltem Leitungswasser füllen
- Kartellboxen aus 4°C herausnehmen, um an RT zu adaptieren
- Licht aus (in völliger Dunkelheit arbeiten, kein Rotlicht!)
- Objektträger aus Kartellboxen in Glasküvetteneinsätze umsortieren
- 4 Min entwickeln in D-19/dH₂O, ab und zu rütteln, abtropfen auf Papier
- 10 Sek in dH₂O tauchen
- 5 Min in Fixierer
- 5 Min in dH₂O tauchen
- in Leitungswasser
- Licht darf wieder angeschaltet werden
- Präparate 30 Min unter fließendem Leitungswasser (kalt) spülen

Färbung:

- Präparate 5 Min in frisch filtriertem Hämalaun (Merck, Mayer's Hämalaun, # 1.09249) färben
- kurz in sauren Alkohol tauchen (*10 ml 12 N HCl plus 990 ml 70% Ethanol*)
- Präparate 2 Min in „Scott's Blue“ stellen (*1,75 g NaHCO₃ + 10 g MgSO₄ pro 500 ml H₂O*)

- 5 Min waschen mit kaltem Leitungswasser
- 30 Sek 70% Ethanol
- zweimal 30 Sek 95% Ethanol
- zweimal 1 Min abs. Ethanol
- dreimal 5 Min Xylol
- Präparate mit Vectamount eindecken
- Präparate trocknen lassen
- eventuelle Rückstände der Fotoemulsion entfernen
- Rückseite der Objektträger mit 70% Ethanol reinigen

4.2.7 Statistik

Zur Berechnung der Signifikanzen wurden zunächst alle drei Datengruppen (Kontroll-, LacZ-, VEGF-Gruppe) mit ANOVA verglichen. Ergab sich dabei ein signifikanter Wert, wurden die Datengruppen paarweise verglichen mit einem student's unpaired t-test. Der Welch's alternate t-test wurde angewendet, wenn sich die Standardabweichungen der zu vergleichenden Datengruppen signifikant unterschieden.

Als statistisch signifikant wurden P-Werte $< 0,05$ angenommen.