

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Abzug	Köttermann
Auto-Pipette „Acu Jet“	Brand
Autoklav „2540EL“ & „V150“	Systemec
Brutschrank	Bachofer, Heraeus
Digitalkamera „Disc 75“	Sony
Einbettautomat „Shandon Citadel 1000“	Thermo Electron Cooperation
Eismaschine „AF200“	Scotsman Thermocycler
Elektrophoresekammern	GIBCO
Elektrophoresespannungsquellen	Pharmacia Biotech, Life Tech
Entwicklungsmaschine Curix60	Agfa
Fluoreszenzmikroskop „CTRMIC, DMIRE2“	Leica
Geldokumentationsanlage Gel Imager	INTAS
Heizblock „TCR100“	Roth
Kühlraum	Wiessmann
Kühlschränke	Liebherr, Thalheimer
„Master Cycler Gradient“	Eppendorf
Membranvakuumpumpe „ME2“	Vacuubrand
Mikroskop „Axiovert25“	Zeiss
Mikrotom „HM 325 Cool Cut“	Mikrom
Mikrowelle	Bosch
Plattenphotometer Benchmark Plus	BioRad
Photometer „Genesis6“	Thermo Spectronic
Pipetten	Eppendorf, Labsys, Pipetman
Schüttelinkubator „3033“	GFL
Schwenktisch „Rocky“	Biometra
Sterilbank „Lamin Air“	Holten
Taqman ABI 7000	Applied Biosystems
Tischzentrifugen	Eppendorf
Vortexer „VF2“	Janke & Kunkel
Waage „Scout“	Ohaus
Wasserbad	GFL
Western Blot Apparaturen	Biorad
Zentrifugen	Hettich, VWR, Kendro

2.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad pro analysi.

Ampicillin	Sigma
Agarose	Cambrex
APS	Roth
Blot Quick Blocker/Blocking Reagenz	Chemicon

BSA	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform	Roth
DAPI	Linaris
DEPC-H ₂ O	Sigma
DMEM high glucose	PAA
DMSO	Sigma
DTT	Promega
EDTA	Sigma
Eosin	Roth
Essigsäure	Merck
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Fluor-Shield-Eindeckmedium	Linaris
FKS	PAA
Formaldehyd	Roth
Glucose	Roth
Glycerin	Roth
Ham's F12K	ATCC
Hepes	PAA
HCl	Roth
Isopropanol	Roth
Isofluran	Boehringer
LPA	Sigma
Mayers Haematoxylin Lösung	Sigma
MgCl ₂	Invitrogen
M199-Medium	Sigma
NaAC	Sigma
NaCl	Merck
Nagellack	Ellen Betrix
NaOH	Merck
Nukleotide (dCTP, dUTP, dATP, dGTP)	Promega
PBS	PAA
PCR Rxn Puffer (10x)	Invitrogen
Pikrinsäure	Merck
PonceauS-Solution	Sigma
PSG	PAA
RNAzol/RNABee	Tell Test
RNaseOut	Invitrogen
RotiphoreseGel 30/Acrylamidmix	Roth
Roti-Load1 (4x)	Roth
Roticlear	Roth
5-ROX	Sigma
RPMI	PAA
Sirius Red Lösung	Polysciences Inc.
SDS	Roth
Sudanschwarz	Sigma
SYBR green I nucleic acid gel staining	Sigma
Temed	Roth
TGF-β1	Sigma

TritonX100	Roth
Transkriptionspuffer (5x)	Promega
Trypsin EDTA	PAA
Tween20 (Polysorbat)	Merck
Xylol	Roth

2.1.3 Puffer

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Citratpuffer 10 mM	1,92 g Citrat in 1000 ml H ₂ O gelöst (pH 6)
Coomassie-Brilliant Blue	0,25 g Brilliant Blue in Methanol
Coomassie-Entfärber	45 % Methanol 45 % H ₂ O 10 % Essigsäure
Coating Puffer	0,2 g Na ₂ CO ₃ 0,3 g Na HCO ₃ in 90 ml H ₂ O gelöst H ₂ O ad 100 ml (pH 9,6)
Elektrophoresepuffer 5x	15,1 g TRIS Base 94,0 g Glycin 50 ml 10 % SDS ad 1000 ml H ₂ O (pH 8,3)
Glycin Stripping Puffer	1,876 g Glycin 100 ml 10 % SDS H ₂ O ad 1000 ml (pH 2)
Kollagenase-Dispase-Puffer	20 mg DNase 16 g NaCl 0,74 g KCl 0,2 g Na ₂ HPO ₄ 12 g Hepes 4 g Glukose ad 2000 ml H ₂ O (pH 7,3) sterilfiltriert 5 g BSA 2 mg/ml Kollagenase Typ1 2 mg/ml Dispase Pufferansatz in 25 ml Aliquots bei -20°C lagern. Vor jeder Aufarbeitung bei RT auftauen lassen und frisch mit 120 µl 2,5% Trypsin und 187,5 µl 0,1 M CaCl ₂ versetzen.
OD-Lösung für ELISA	1 Silbertablette (Sigma) 1 Goldtablette (Sigma) In 20 ml H ₂ O (sterilfiltriert) auflösen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
PBS-T (10 mM)	1 PBS –Tablette in 1000 ml H ₂ O gelöst + 0,5 % TWEEN 20.
Protein-Extraktionspuffer (Double Detergent Lysis Puffer)	10 mM Tris, pH 7,5 140 mM NaCl 1 mM EDTA 25 % Glycerol 0,5 % SDS 0,5 % Nonident P-40 Immer frisch ansetzen auf 1ml: 0,1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 100 ng/ml Proteaseinhibitor Cocktail (PIC)
TBS-T (5x)	12,1 g TRIS Base 40 g NaCl ad 1000 ml H ₂ O (pH 7,6) +0,1 % TWEEN 20
TBE-Puffer (10x)	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA bei RT lagern (pH 8,3)

2.1.4 Zellkulturmedien

<i>Vollmedium für:</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Rattenfibroblasten und HT1080	DMEM 10 % FKS 1 % Hepes 1 % PSG
HFL-1 Zellen	Ham's F12K-Medium 10 % FKS
humane Endothelzellen	M199 Medium 20 % FKS 1 % PS (Penicillin Streptomycin) 2 % G (Glutamin)
Kryomedium für HFL-1	Vollmedium plus 10 % FKS

2.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 2.1.5: Übersicht der Oligonukleotidsequenzen. Alle Primerpaare wurden bei Biotex käuflich erworben. Der kleinere Col III-Primer mit 78bp wurde für die semiquantitative Auswertung benutzt, das größere Primerpaar für die real time PCR.

<i>Zielgen</i>	<i>Primersequenz</i>	<i>Fragmentlänge</i>
hTGF-β	F 5' - CAC ACT GCA AGT GGA CAT CAA CG – 3' R 5' - TCT CCG TGG AGC TGA AGC AAT AGT – 3'	181 bp
hCTGF	F 5' - GGC TTA CCG ACT GGA AGA CA – 3' R 5' - GTT GTA ATG GCA GGC ACA GG – 3'	444 bp
hCol I	F 5' - CGT TGG ACC TCC TGG TAA TC – 3' R 5' - CCT TGT TAC CGC TCT CTC CT – 3'	202 bp
hCol III	F 5' - GGA CAC AGA GGC TTC GAT GG – 3' R 5' - CCT CGA GCA CCG TCA TTA CC – 3'	190 bp
hFN	F 5' - GCA ACG ATC AGG ACA CAA GG – 3' R 5' - CTG CAC GAA CAT CGG TGA AG – 3'	182 bp
hEDG-1	F 5' - CGG ACA AGG AGA GCA TT – 3' R 5' - CCA GAC AAG AGC AGG TTA GC – 3'	201 bp
hEDG-2	F 5' - CAA TAC TCG GAG ACT GAC TG – 3' R 5' - ACC ACA ATG ACC ACC ACT AC – 3'	197 bp
hGAPDH	F 5' - GCA GGA GGC ATT GCT GAT – 3' R 5' - CAC CAT CTT CCA GGA GCG AG – 3'	234 bp
rTGF-β	F 5' - AAG AAG TCA CCC GCG TGC TA – 3' R 5' - TGT GTG ATG TCT TTG GTT TTG TC – 3'	69 bp
rCTGF	F 5' - TAT GAT GCG AGC CAA CTG – 3' R 5' - CTG ACC ATG CAG AGA CGA – 3'	140 bp
rCol I	F 5' - TGA CCT TGA GGT GGA CAC TA – 3' R 5' - CAG TCA GAG TGG CAC ATC TT – 3'	125 bp
rCol III	F 5' - GAA AAA ACC CTG CTC GGA ATT – 3' R 5' - GGA TCA ACC CAG TAT TCT CCA CTC T – 3'	78 bp
rCol III	F 5' – CTC AAG AGC AGC GGA GAA TAC – 3' R 5' – ATC TGT CCA CCA GTG CTT – 3'	140 bp
rFN	F 5' - CAT GGC TTT AGG CGA ACC A – 3' R 5' - CAT CTA CAT TCG GCA GGT ATG G – 3'	81 bp
rMMP-9	F 5' – TCG ACT CCA GTA GAC AAT CC – 3' R 5' – GAC AAC TTC CAA TAC CGA CC – 3'	103 bp
rMMP-2	F 5' – TAC GAT GAT GAC CGG AAG TG – 3' R 5' – GGA AGT TCT TGG TGT AGG TG – 3'	153 bp
rTIMP-2	F 5' – TGC AATGCA GAC GTA GTG – 3' R 5' – TGT CCT TGT CAG GTC CTT – 3'	141 bp
rEDG-1	F 5' - TCC ATC GTC ATC CTC TAC TG – 3' R 5' - GAT CAC TGT CTT CAG CAA GG – 3'	131 bp
rEDG-2	F 5' - TGG TGG TGG TGA TTG TAG TC – 3' R 5' - TAG TCC TCT GGC GAA CAT AG – 3'	218 bp
rβ-Actin	F 5' – CCG TGA AAA GAT GAC CCA GAT C – 3' R 5' – TGG TAC GAC CAG AGG CAT ACA G – 3'	101 bp
rGAPDH	F 5' - CAT GCC ATC ACT GCC ACT CA – 3' R 5' - GCG GCA TGT CAG ATC CAC AA – 3'	209 bp
18-S	F 5' - CCG CAG CTA GGA ATA ATG GAA TA – 3' R 5' - TCT AGC GGC GCA ATA CGA AT – 3'	107bp

2.1.6 Antikörper, Enzyme & Sonstiges

Anti-EDG-2-Ak (CT, rabbit)	Calbiochem
Anti-EDG-1-AK (CT, rabbit)	exalpa
Anti-ED-1-AK	Dako
Anti-Fn-Ak	Dako
Anti-GAPDH-Ak	Chemikon
Anti-Rat Ki-67 Antigen	Dako
Anti-Vim-Ak (mouse)	Oncogene
Anti-vWF-Ak (rabbit)	Dako
Albumin Standard	Perbio/ PIERCE
AP-konjugierter Ak (goat anti-rabbit)	Dako
Background Reducing Anitbody Reagent	Dako
BCA Protein Assay	Perbio/ PIERCE
BioMax Light Film für WB	Kodak
CY3 Fluoreszenzmarker	Danova
Dispase	Roche
DNase	Roche
DNA Marker100 bp	Invitrogen, Fermentas
ECL WB Detection Reagenz	Amersham Biosciences
Farbstoff "fast red"	Dako
Fibronectin Antigen (rat)	Sigma
FITC Fluoreszenzmarker	Dianova, Jackson Immuno
Kollagenase Typ1	Cell Systems
PAS-Färbekit	Merck
PCNA	Dako
Permanent Mounting Medium	Vecta Mount
Pox-conjugated AffiniPure GoatAnti Rabbit	Jackson Immuno Research
Prestained Protein Ladder (10-180 kDa)	Fermentas
Reverse Transkriptase „Superscript“	Invitrogen
TGF-β Kit DY240	R&D Systems
Taq-Polymerase	Invitrogen, Rapidenzyme
XTT Cell Proliferation Kit II	Roche

2.1.7 Software

ABI 7000 Software	Applied Biosystems
Acrobat Reader	Adobe
AlphaEaseFC	Adobe
BCA-Microplate Manager	BioRad
Endnote	Thomson ICI Research
INTAS-Software für Gel Imager	INTAS
Office 2000 (Word, Excel, Power Point)	Microsoft
Photoshop 7.0	Adobe
SPSS for Windows 11.5.1	SPSS Inc.

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturschalen mit 10cm Durchmesser	TPP
Sammelröhrchen	TPP
Zellschaber	TPP
8-Kammer-Objektträger	Falcon
Deckgläser 24x50mm	Roth
96-well-Platte mitt Flachboden	Corning Incorporated
96-well-Platte "Micro Amp Optical"	Applied Biosystems

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Im Rahmen der Optimierungsprozesse wurden neben den HFL-1 Zellen, humane Fibroblasten der Lunge (von ATCC käuflich erworben) und HT1080 vor allem aus Rattenmyokard isolierte Fibroblasten verwendet, wie dann auch später für die Stimulationsreihen (siehe 3.2.2 und 3.2.3). Die verschiedenen Zellarten wurden in ihrem entsprechenden Vollmedium (siehe 2.1.4) bei einer Atmosphäre von 5% CO₂ in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C vermehrt. Das Kulturmedium wurde alle 3 Tage gewechselt, bis die Zellen Konfluenz erreichten. Dann wurden die Zellen in PBS gewaschen, durch Zugabe von 1%iger Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, in vierfachem Mediumüberschuss gesammelt, 5min bei Raumtemperatur mit 250 g zentrifugiert und die pelletierten Zellen wieder ausgesät. Die Rattenfibroblasten wurden 1:4 gesplittet, bis in die zweite Passage subkultiviert und in der zweiten Passage für den Stimulationsversuch verwendet. Dann erfolgte bei Erreichen der Konfluenz nach 24h Serumentzug, d.h. Zellmedium ohne FKS (fetales Kälberserum), die Stimulation mit LPA in verschiedenen Konzentrationen durch Gabe des Stimulans in die Zellkulturschale. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte dann die RNA-Isolation (siehe 2.2.4) und nach entsprechender Zeit die Proteingewinnung (siehe 2.2.10). Die HFL-Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -120°C in ihrem Kryomedium aufbewahrt.

Als Positivkontrolle für den anti-von-Willebrandt-Faktor-Antikörper im Rahmen der Fibroblastencharakterisierung wurden humane Endothelzellen (V236) aus einer Beinvene verwendet. Diese wurden freundlicherweise aus der Arbeitsgruppe von Prof. Theuring, CCR Charité, zur Verfügung gestellt und mit einem entsprechenden Vollmedium ebenfalls unter Standardbedingungen kultiviert.

2.2.2 Tiere und -haltung

Für die Untersuchungen zu LPA und myokardialen Fibroseprozessen wurden männliche Wistar Ratten bei der Firma Harlan Winkelmann erworben und zu den üblichen tiermedizinischen Standards im Tierstall des „Centre for Cardiovascular Research“ (CCR) gehalten. Folgende Tierversuchsnummer wurde verwendet: O 0042/03.

Das durchschnittliche Alter der verwendeten männlichen Tiere betrug zehn Wochen, der Quotient aus Herzgewicht zu Körpergewicht war bei allen Tieren in etwa gleich, ein negatives Indiz für Fibrose oder Hypertrophieprozesse (siehe Tabelle 2.2.2.).

Tabelle 2.2.2: Tierhaltung. Dargestellt sind das Alter der verwendeten männlichen Wistar Ratten in Wochen sowie der Quotient aus Herzgewicht (HW) und Körpergewicht (BW). Die Daten der weiblichen Tiere sind nicht gezeigt aber vergleichbar.

<i>Nr.</i>	<i>Alter in Wochen</i>	<i>HW/BW *1000</i>
1	10	5,26
2	10	4,53
3	10	4,83
4	10	5,03
5	9	5,05
6	9	4,85
7	11	5,35
8	11	4,79
9	10	5,60
10	10	4,22
11	10	5,28
12	10	4,46
13	10	3,66
14	10	4,36
15	10	3,64
Mittelwert	10	4,73

Die Ratten für die Untersuchungen zur EDG-1 Expression und Lokalisation im Rahmen der anti-THY-1-induzierten chronisch progredienten Glomerulosklerose stammten aus Versuchen der Arbeitsgruppe von Prof. Peters, Nephrologie Charité, und wurden ebenfalls im Tierstall des CCR in metabolischen Käfigen gehalten (Tierversuchsantrag Reg. 0009/05). Die Betreuung dieses Tiermodells sowie alle Operationen und Organentnahmen im Alter von 20 Wochen wurden durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Peters vorgenommen [57, 65, 66].

2.2.3 Fibroblasten-Isolation aus Rattenmyokard

Nach der Betäubung der Ratten mit Isofluran erfolgte die sofortige Entnahme der Herzen. Hierfür wurde die Bauchhöhle eröffnet und der Zugang zum Thorax durch das Zwerchfell

ermöglicht. Nun wurde das Herz in ein mit 10 ml DMEM gefüllten Falcon-Röhrchen bis zur anschließenden Weiterverarbeitung überführt.

Das Herz wurde mehrfach in PBS gespült und danach in einer mit PBS gefüllten Petrischale mit einem sterilen Skalpell in 1-2 mm große Stücke geschnitten. Die Myokardstücke wurden in einem Falconröhrchen gesammelt und mit PBS-Spülung von verbliebenen Erythrozyten befreit. Dann sedimentierten die Stückchen, der Überstand wurde dekantiert und mit 5 ml des frisch angesetzten Kollagenase-Dispase-Puffers versetzt. Es folgte eine 15 minütige Inkubation bei 37°C im Wasserbad. Nach anschließendem Schütteln sedimentierte die Suspension bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde in ein neues Falcon mit FKS überführt und auf Eis gelagert. Der Rest wurde erneut mit Kollagenase-Dispase-Puffer versetzen, inkubiert und geschüttelt. Nach erneutem Sedimentieren wurde der Überstand ebenfalls in das mit FKS gefüllte Falcon-Röhrchen überführt. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt, bis möglichst alle Myokardstücke verdaut waren.

Der Überstand wurde bei 250 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit PBS gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert, das PBS verworfen und das Pellet in 10-20 ml Vollmedium aufgenommen. Die Zellen wurden auf Zellkulturschalen ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ für 1h im Brutschrank inkubiert, so dass die Fibroblasten adherieren konnten. Nach einer Stunde wurden alle anderen Zellen mit PBS abgewaschen und auf die adherierten Rattenfibroblasten 10 ml Vollmedium gegeben. Die weitere Kultivierung erfolgte im Brutschrank. In den ersten drei Tagen wurde täglich mit PBS gewaschen und frisches Vollmedium hinzu gegeben. Der Erfolg der Isolation war danach lichtmikroskopisch gut zu beurteilen, bzw. in der Immunfluoreszenz mit zellspezifischen Antikörpern (siehe dort).

2.2.4 RNA-Isolation

Zur Gewinnung der RNA aus den myokardialen Rafibs wurde auf die Zellkulturschalen je 1 ml RNAzol gegeben und die Zellen abgeschabt. Das Lysat wurde in je ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und 0,2 ml Chloroform hinzugefügt. Daraufhin wurden die Proben für 2 min gevortext und wieder 5 min auf Eis inkubiert. Es folgten 10 min Zentrifugation bei 19.000 g. Die obere klare wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Um die RNA zu fällen, wurde zu der wässrigen Phase das gleiche Volumen an Isopropanol hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben über Nacht bei -20°C gefällt.

Am nächsten Tag wurden die Proben bei 4°C für 30 min mit 19.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das RNA-Pellet zweimal mit 80% Ethanol gewaschen und 5

min bei 4°C und 5.471 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend nochmals dekantiert und das Pellet luftgetrocknet. Je nach Größe wurde das Pellet in 25-50 µl H₂O-DEPC aufgenommen. Der Nukleotidgehalt wurde im Photometer mit einer optischen Dichtemessung (OD) bei 260 nm bestimmt. Als Nullwert diente das H₂O-DEPC, welches zum Lösen der RNA verwendet wurde.

2.2.5 DNase-Verdau

An die Isolation der RNA mit RNazol schloss sich ein DNase-Verdau an, um die in den Proben eventuell noch vorhandenen DNA-Mengen zu inaktivieren. Der folgende Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert:

15 µg RNA vor DNase-Verdau
3,0 µl DNase (2U/µg RNA)
7,5 µl MnCl₂
1,0 µl RNase Out
ad 60 µl H₂O-DEPC

Im Anschluss an den DNase-Verdau wurde jede Probe wieder mit RNazol aufgearbeitet (siehe 2.2.4) und die RNA-Menge photometrisch bestimmt. Durch den DNase-Verdau und die zweite RNazol-Aufarbeitung mussten RNA-Mengenverluste von bis zu 30% einkalkuliert werden. Durch die erneute Behandlung mit RNazol wurde die DNase denaturiert und die Mn-Ionen von der RNA separiert. Nach der zweiten RNazol-Aufarbeitung wurde ein Teil der Proben zur Kontrolle des DNase Verdau mit dem PCR-Verfahren (s.u.) und rGAPDH-Primern amplifiziert und auf einem Agarose Gel aufgetragen. Als Positivkontrolle dienten dabei DNA-Proben aus Rattenherzen.

2.2.6 Reverse Transkription

Mit Hilfe der reversen Transkription werden RNA-Proben in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, um sie anschließend mit Hilfe der PCR-Verfahren auswerten zu können.

Die cDNA-Synthese für Rattenfibroblasten und HFL-1 Zellen erfolgte durch das Enzym Superscript II Reverse Transkriptase, welches u.a. die Aktivität einer RNA-abhängigen DNA Polymerase aufweist. Eventuell vorhandene RNasen wurden durch Zusatz des RNase-Inhibitors „RNase-Out“ inaktiviert. Als Negativkontrolle wurde für jeden Ansatz eine Probe mit H₂O pipettiert. Im Ansatz wurden die RNA-Proben auf 125 ng/µl verdünnt und 4 µl aus diesem

Ansatz mit DEPC-H₂O auf 10 µl aufgefüllt, mit 2 µl Random Hexameren (300 ng/µl) gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 70°C für 10 min erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA zu lösen, und bis zur Zugabe des Mastermixes auf Eis gekühlt.

Der Mastermix enthielt:

- 4,0 µl Puffer (5-fach konzentriert)
- 1,0 µl dNTP (0,5 mM)
- 1,0 µl RNase-Inhibitor (2 U/µl)
- 2,0 µl DTT (10 mM)
- 1,0 µl Superscript-II

Der Ansatz wurde mit 9 µl des Mastermix gemischt, kurz zentrifugiert, zuerst 10 min bei RT, dann für eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Zum Stoppen der cDNA-Synthese wurde das Enzym 5 min bei 95°C inaktiviert und der Mix kurz auf Eis abgekühlt. Für die sich anschließende PCR wurde die cDNA durch Zugabe von 79 µl DEPC-H₂O auf 5 ng/µl verdünnt und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

2.2.7 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifizierung eines spezifischen DNA-Bereichs mit Hilfe der hitzebeständigen Taq-Polymerase, die von Saiki et al. erstmals zur routinemäßigen Anwendung gebracht wurde [67]. Sie dient der Herstellung von Kopien bestimmter Nukleotidsequenzen mit folgendem PCR-Programm:

<i>Zyklus</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>	
1	5 min	95 °C	Denaturierung der Doppelstränge
2	35 sec	95°C	Denaturierung der Doppelstränge
3	35 sec	primerspezifisch	„Annealing“
4	35 sec	72 °C	Verlängerungsphase
5	5 min	72 °C	Verlängerungsphase

Ein solches Programm läuft in variierbaren Zykluszahlen von Schritt zwei bis vier ab.

Die unter 2.1.5 genannten Oligonukleotide wurden zunächst für die PCR optimiert: Hierfür wurde mittels eines Temperaturgradienten im Thermocycler die optimale „Annealing-Temperatur“ ermittelt. Danach wurde mit Hilfe eines Plateauversuchs die optimale Zykluszahl des frühen Anstiegs, der so genannten Log-Phase, ermittelt.

Ein Ansatz für die PCR setzte sich dabei wie folgt zusammen:

5 µl Primermix (1,6 pmol je Primer)
2,5 µl Puffer (10x)
0,75 µl MgCl₂ (50 mM)
4,0 µl dNTP's (1,25 mmol/µl)
0,2 µl Taq-Polymerase (1 U/25 µl Ansatz)
10 µl Template (5 ng/µl)
ad 25 µl H₂O

2.2.7.1 Semiquantitative PCR

Mit Hilfe der semiquantitativen PCR kann man die Transkriptionshäufigkeit eines Gens, d.h. die Genaktivität unter verschiedenen Bedingungen und deren Regulation ermitteln. Hierzu wurden die Zielgene Fibronectin, CTGF, TGF-β, Col I und Col III in Proben aus mit LPA stimulierten Zellen mittels des unter 2.2.7 genannten PCR-Programms und ihren genspezifischen Charakteristika amplifiziert. Parallel zu den zu untersuchenden Zielgenen wurde ein so genanntes Referenzgen zu seinen genspezifischen Bedingungen amplifiziert. Von diesem Gen musste bekannt sein, dass es unter denselben Stimulationsbedingungen nicht reguliert wurde. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt, die Banden sichtbar gemacht und mit dem Alpha Ease Programm ausgewertet. Dabei wurden die entsprechenden Proben der Zielgene auf die des Referenzgens bezogen, d.h. der Quotient der beiden gebildet und im Vergleich zu den unstimulierten Zellen bewertet.

2.2.7.2 Real time PCR

Die real time PCR ist ebenfalls eine Methode zur Bestimmung der Transkriptionshäufigkeit bestimmter Gene. Ihr Vorteil liegt in der Tatsache, dass die Daten während des PCR-Prozesses kontinuierlich gewonnen werden und so nach jedem Amplifizierungszyklus die Menge an DNA bestimmt werden kann - im Gegensatz zur Standard PCR, wo nach einer vorher bestimmten Anzahl von Zyklen die Endpunktmenge an DNA bestimmt wird. Für die Quantifizierung kann mit spezifischen Fluoreszenz-markierten-Sonden oder mit einfachen, interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR-Green gearbeitet werden. Gemessen wird die Zunahme der Fluoreszenz bei einer bestimmten Wellenlänge nach jedem Amplifikationszyklus. Die Zyklenanzahl, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert

übersteigt, ergibt den so genannten Ct-Wert („threshold cycle“). Für die Quantifizierung der Menge an DNA-Kopien in der Probe wird aus dem Ct-Wert der Probe und dem Ct-Wert eines Referenzgens ein Quotient gebildet.

Die ersten Zyklen der PCR-Reaktion führen zu keiner nennenswerten Änderung des Fluoreszenz-Signals und stellen somit die „Baseline“ dar. Nachdem ein Schwellenwert an Zyklen überschritten ist, durchläuft die PCR-Reaktion die exponentielle Phase, in der eine exakte Verdopplung des DNA-Produkts hochspezifisch mit einer ungefähr 100%igen Effizienz stattfindet. In dieser Phase wird der Ct-Wert bestimmt. In der sich anschließenden linearen Phase ist ein Großteil der Reaktionskomponenten bereits verbraucht, die Reaktion verlangsamt sich und erste Produkte degradieren. Zum Ende der Reaktion stellt sich ein Plateau ein, d.h. die Reaktion ist gestoppt, keine weiteren Kopien werden hergestellt und die PCR-Produkte degradieren (siehe Abb.2.2.7.2a).

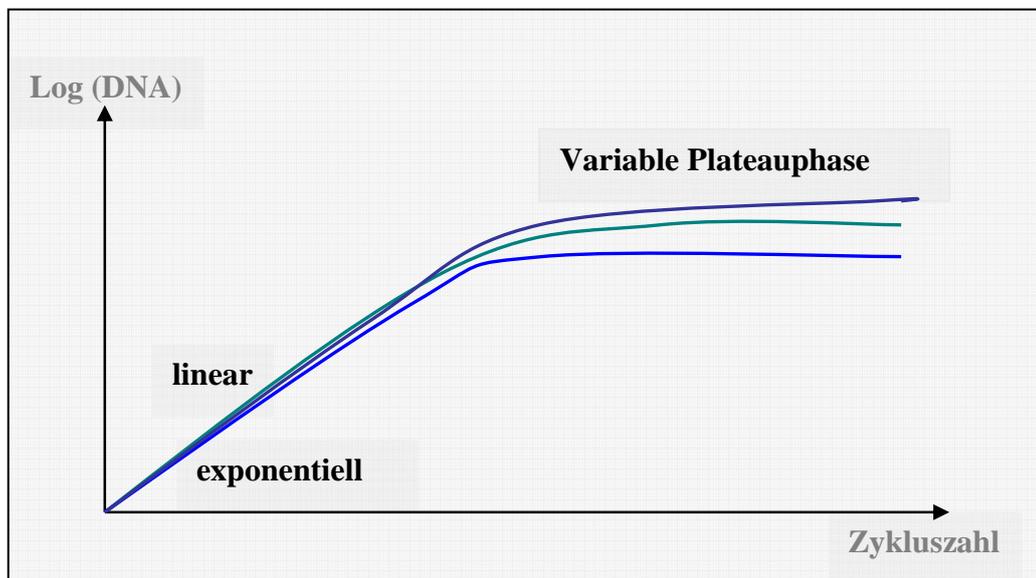


Abb. 2.2.7.2a: Phasenschema einer PCR-Amplifikation in Anlehnung an das Abi-User-Manual.

Der SYBR-Green Farbstoff ist ein hochspezifischer Marker für doppelsträngige DNA und detektiert demnach jede Form von doppelsträngiger DNA. Daher ist eine gut optimierte PCR-Reaktion essentiell für genaue Ergebnisse, andernfalls kann es durch unspezifische Bindungen zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Wichtig ist auch die Länge des Amplikons.

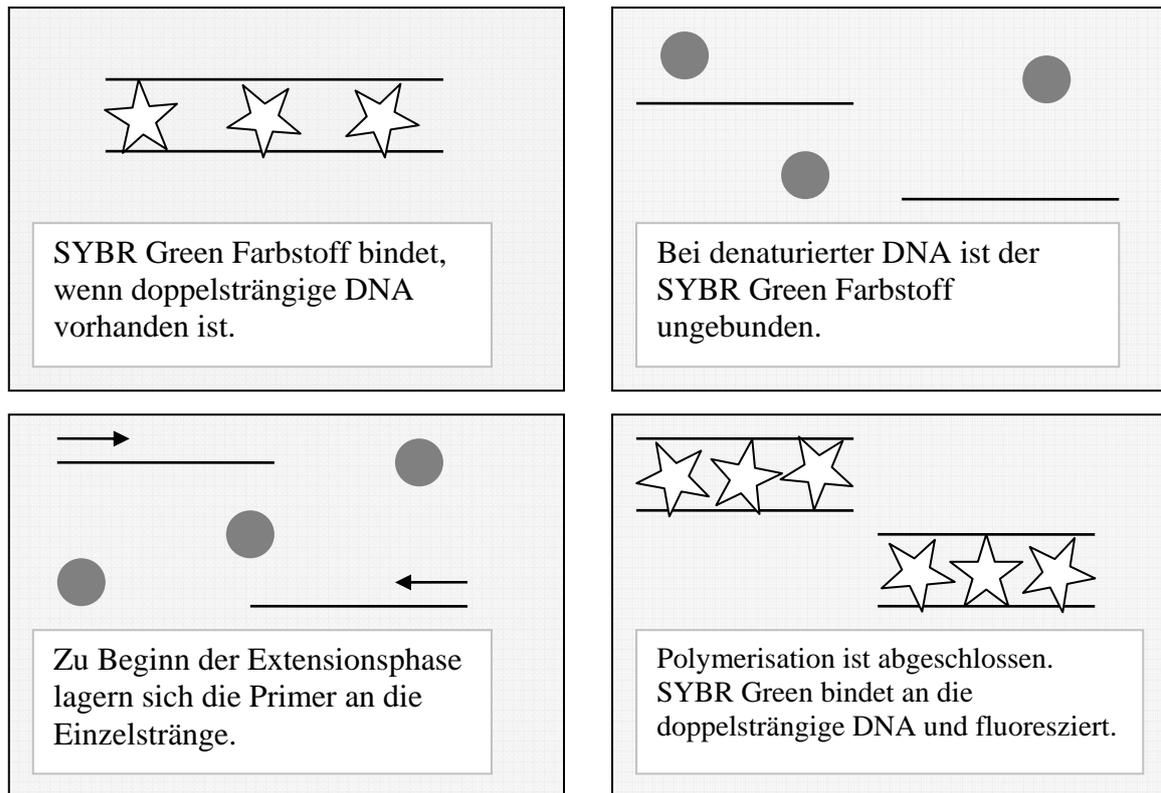


Abb. 2.2.7.2b: Schematische Anlagerung von SYBR-Green während einer rT-PCR in vier Schritten. Abbildung in Anlehnung an das Abi Users Manual Syber Green Dye.

Die real-time PCR verbindet somit die Vorteile einer permanenten und spezifischen Bestimmung der Amplikon-Menge in der exponentiellen Wachstumsphase mit Hilfe einer direkt proportionalen Messung eines Fluoreszenzsignals, außerdem kann auf Post-PCR-Prozesse wie Agarose-Gele weitgehend verzichtet werden (siehe Abb. 2.2.7.2b).

Durchführung

Die cDNA-Proben aus verschiedenen Experimenten wurden jeweils auf 2 ng/μl verdünnt und nach folgendem Master-Mix-Ansatz für die real-time PCR auf Eis in 96er Well-Platten pipettiert:

Tabelle 2.2.7.2a links: Zusammensetzung des Master Mix für die real time PCR; Ansatz für ein Well (= Vertiefung/Loch) in einer 96er Platte

Tabelle 2.2.7.2b rechts: Zusammensetzung des SYBR-Mix als wichtigstem Bestandteil des rT-PCR-Master-Mix. Der SYBR-Mix kann bei 4°C einen Monat gelagert werden.

<i>Master-Mix (1x)</i>		<i>SYBR-Mix</i>	
SYBR-Mix	12,5 µl	10x PCR Puffer	100 mM Tris HCl
Primer-Mix	1 µl (3 µl)		15 mM MgCl ₂
Taq	0,0625 µl (5 U/µl)		500 mM KCl (pH=8,3)
Template	5 µl	MgCl ₂	50 mM
Aqua dest.	6,4375 µl (4,4375 µl)	dNTP's	2 mM each
		SYBR green I	In 20% DMSO in H ₂ O auf 10xSYBR verdünnt.
		NP40/Tween	0,5% NP40(v/v) 0,5% Tween20 (v/v)
		ROX	Ein Kristall Rox 635,8 g/mol in ca. 50 ml H ₂ O lösen, bis Farbe wie ein „dunkler pink Panther“; Lagerung bei -20°C

Für den Primermix wurden die genspezifischen Forward und Reverse Primer auf eine Endkonzentration von 5 pmol each mit Aqua dest. verdünnt. Nur der Fibronectin Primer benötigte 2,5 pmol each. Für die meisten Zielgene wurde jeweils 1,0µl Primermix eingesetzt (siehe unten).

Die Ansätze wurden bei 4°C kurz zentrifugiert und im Anschluss die PCR-Reaktion im ABI-7000 gestartet. Es wurde je nach Annealing-Temperatur des Zielgens mit zwei verschiedenen PCR-Programmen gearbeitet:

Tabelle 2.2.7.2c: Programme für rT-PCR

<i>Zeit und Schritt</i>	<i>2-Schritt</i>	<i>3-Schritt</i>
Denaturieren	5 min 95°C	5 min 95°C
	15 sec 95°C	15 sec 95°C
Annealing	1 min 60°C	1 min X°C
Verlängerungsphase		30 sec 72°C

Je nach Zielgen variierten die Primermix-Menge, die Annealing-Temperatur und die Zykluszahl (siehe Tabelle 2.2.7.2d):

Tabelle 2.2.7.2d: Zielgen-Charakteristika für rT-PCR. Pro Zielgen sind Art des PCR-Programms, Annealing-Temperatur (Temp.), Zusammensetzung des Primermix und die verwendete Gesamtzykluszahl dargestellt.

<i>Zielgen</i>	<i>Programm & Temp.</i>	<i>Primermix 1:1 F/R</i>	<i>Zykluszahl</i>
r18-S	2 Schritt 60°C	1 µl ; 5 pmol each	30 Zyklen
rCTGF	3 Schritt 55°C	1 µl; 5 pmol each	35 Zyklen
rCol I	3 Schritt 55°C	1 µl; 5 pmol each	35 Zyklen
rCol III	3 Schritt 56°C	1 µl; 5 pmol each	40 Zyklen
rTGF-β	2 Schritt 60°C	1 µl; 5 pmol each	35 Zyklen
rFibronectin	2 Schritt 60°C	1 µl; 2,5 pmol each	35 Zyklen
rMMP-9	3 Schritt 65°C	1 µl; 5 pmol each	40 Zyklen
rMMP-2	2 Schritt 60°C	3 µl; 5 pmol each	35 Zyklen
rTIMP-2	2 Schritt 60°C	3 µl; 5 pmol each	35 Zyklen

Im Anschluss an den Lauf wurde eine Dissoziationskurve ermittelt. Hierfür wurden die Amplifikate schrittweise von 60°C auf 95°C erhitzt, die beiden Doppelstränge dissoziierten und der Fluoreszenzfarbstoff wurde freigegeben. Der messbare Anstieg des Fluoreszenzsignals bei einer bestimmten Schmelztemperatur eines Amplifikats war für jedes Zielgen unterschiedlich und diente der Überprüfung der Spezifität der PCR-Reaktion. Außerdem wurden die Amplifikate exemplarisch auf ein Agarose Gel aufgetragen, um eine abschließende Fragmentlängenüberprüfung durchzuführen (siehe auch 3.2.6).

Auswertung

Für die Auswertung der PCR-Läufe wurde auf die Auto-Ct und Auto-Baseline Funktion der ABI 7000-Software zurückgegriffen. Durch Abgleich der Ct-Werte mit einem Standard Ct-Wert ermittelte das Programm die Menge an DNA des jeweiligen Zielgens. Die Mittelwerte eines jeden Doppelansatzes wurden mit Hilfe der Excel-Office-Software auf die entsprechende Mittelwertprobe des Referenzgens 18-S-RNA bezogen. Durch Vergleich der Quotienten der einzelnen Proben der verschiedenen Gruppen konnten stimulierte mit nicht-stimulierten Proben verglichen werden.

2.2.8 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese diente der Identifizierung und Trennung von DNA-Fragmenten bzw. Gesamt-RNA und beruht auf der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Als Referenz für das Molekulargewicht diente ein DNA-Längenstandard (100 bp Marker, MW), der zusammen mit den Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelen mit 2 % Agarose, die durch Kochen in 1xTBE-Puffer gelöst wurden. Nach Abkühlung auf ca. 40°C wurden 4,0 µl Ethidiumbromid dem 100 ml Agarose-TBE-gemisch zugesetzt, das mit den DNA-Doppelsträngen interkaliert, die dadurch im UV-Licht bei 300 nm fluoreszierten (siehe Abb. 2.2.8).

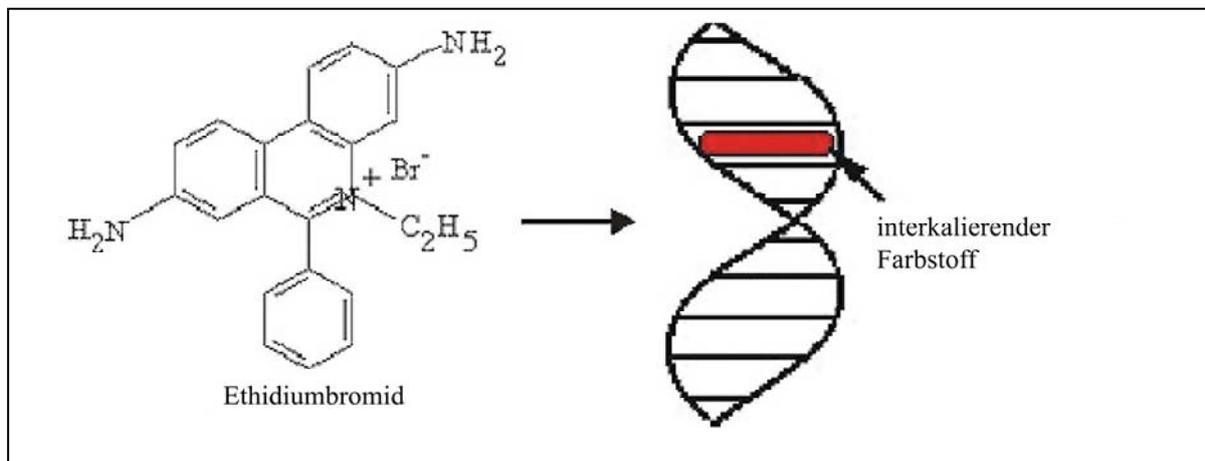


Abb. 2.2.8: Schema für Ethidiumbromideinlagerung in DNA-Doppelstränge. Links Strukturformel von Ethidiumbromid. Rechts Ethidiumbromid als interkalierender Farbstoff.

Je 10 µl der Amplifikate wurden mit 2 µl Bromphenolblau -Puffer gemischt und in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur unter einer konstanten Spannung von 2-9 V/cm. Die Gele wurden unter UV-Licht bei ungefähr 300 nm analysiert und zur Dokumentation durch einen Farbfilter mit einer Kamera fotografiert.

2.2.9 XTT-Proliferations-Assay

Für die Bestimmung der Proliferation von Rattenfibroblasten wurde der „Cell Proliferation Kit II“ verwendet. Die Reaktion beruhte auf der metabolischen Umwandlung des Tetrazoliumsalzes XTT (Natrium-3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxy-6-nitro)-benzen Schwefelsäurehydrat) in Formazan [71] (siehe Abb.2.2.9). Lebende, stoffwechselaktive Fibroblasten spalten durch mitochondriale Dehydrogenasen das gelbe Tetrazoliumsalz XTT, und es entsteht der orange Farbstoff Formazan. Dieses Reaktionsprodukt ist wasserlöslich und kann

mit Hilfe des ELISA-Platten-Lesegeräts bei einer Wellenlänge von 450-500 nm direkt spektrophotometrisch quantifiziert werden.

Die Fibroblasten wurden in verschiedenen Zellzahlen in 100 µl Medium pro Well für den Assay in einer 96-Loch-Platte ausgesät und verschiedenen Stimuli ausgesetzt. Nach 48 Stunden wurden pro Well 50 µl XTT-Färbereagenz („XTT labeling reagent“) mit 1 µl Elektronen-Kopplungsreagenz (1,25 mM N-methyl-dibenzopyrazinmethylsulfat, PMS) gemischt. Zu jedem „well“ (Loch) wurden je 50 µl XTT-Farbreagenzmischung gegeben und bis zu 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. In unterschiedlichen zeitlichen Abständen erfolgte dann eine Messung im ELISA Platten-Reader bei 480 nm und einer Referenzwellenlänge 650 nm.

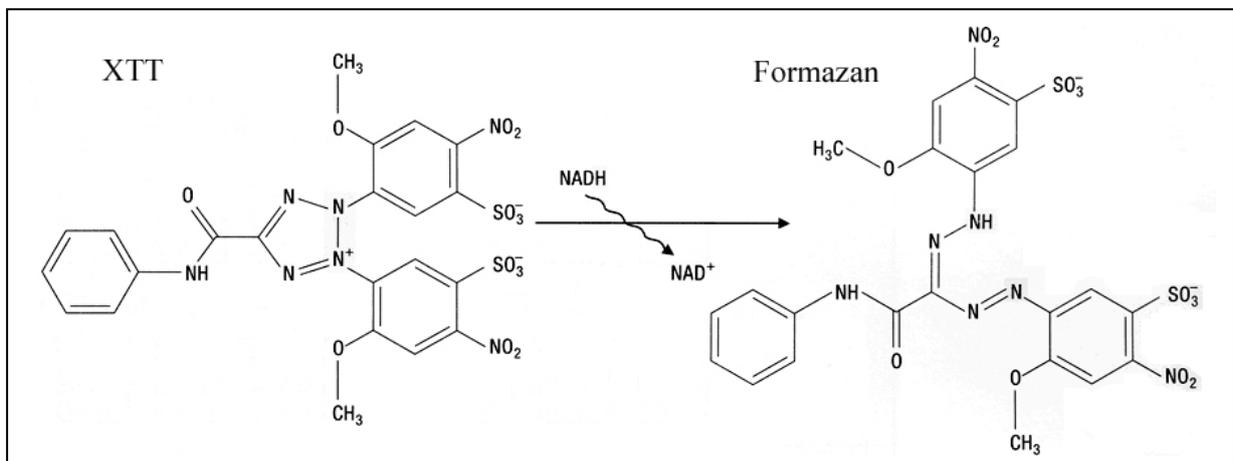


Abb. 2.2.9: Molekulare Struktur von XTT und seinem Reaktionsprodukt Formazan

2.2.10 Proteinbestimmung

2.2.10.1 Proteingewinnung aus Zellkulturschalen

Die zu ca. 90% konfluenten Zellkulturschalen wurden mit PBS gewaschen und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in 1 ml PBS gesammelt und das Lysat in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 250 g. Der Überstand wurde dekantiert und mit einem der Pelletgröße entsprechenden Volumen Proteinextraktions-Puffer gut homogenisiert.

Die Proben wurden kurz gevortext und 20 min auf Eis lysieren gelassen. Die lysierten Proben wurden wieder kurz gevortext und bei 19.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde eine evtl. bestehende Fettschicht abgenommen und der wässrigen Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Hiervon wurden 20 µl überführt und der Rest bei -80°C gelagert.

2.2.10.2 Proteinmessung

Die Messung von Proteinen mit Hilfe des BCA-Proteinmessverfahrens beruht darauf, dass Proteine mit Cu^{2+} in alkalischer Lösung einen Komplex bilden, die so genannte Biuret-Reaktion. Die Cu^{2+} dieses Komplexes werden zu Cu^{1+} reduziert, die mit Bicinchinon-Säure einen violetten Farbkomplex bilden. Die Absorption dieses Farbkomplexes wird bei 550 nm photometrisch gemessen. Als Proteinstandard dient bovines Serumalbumin. Der Proteingehalt der zu bestimmenden Probe ergibt sich aus dem Vergleich der Extinktion der Probe mit der aus den Standardwerten ermittelten Eichgeraden.

Die Proteinmessung erfolgte auf einer 96-Loch-Platte mit Flachboden im ELISA-(„enzyme linked immunosorbent assay“-)Platten-Lesegerät. Pro Ansatz wurden insgesamt 20 μl Probe plus 300 μl Farbstoffgemisch eingesetzt. Das Farbstoffgemisch bestand aus einem Verhältnis der BCA Protein Assay Reagenzien A zu B wie 50:1. Der Lysispuffer wurde als Negativkontrolle verwendet. Zusätzlich wurde ein Proteinstandard in verschiedenen Konzentrationen pipettiert.

Die Platte wurde zugedeckt für 30 min bei 37°C im Hybridisierungsöfen gelagert. Anschließend erfolgte die Proteinmessung im ELISA-Platten-Lesegerät bei 550 nm.

2.2.10.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine immunologische Methode zur Detektion von Proteinen [68]. Sie gliedert sich in folgende Abschnitte:

1. Gelelektrophorese
2. Blotting-Vorgang
3. Antikörperbindung
4. Detektion

Tris - Glycin SDS - Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)

Die Gelelektrophorese diente der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dafür wurde zwischen zwei Glasplatten ein Polyacrylamidgel gegossen, dessen Zusammensetzung danach variierte, in welcher Größenordnung sich das gesuchte Protein befand. Das Gel setzte sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen. Für zwei so genannte Minigele (10x10cm, BioRAD) benötigt man nach dem Protokoll von Lämmli folgende Reagenzien (siehe Tabelle 2.2.10.3a):

Tabelle 2.2.10.3a: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen für Western Blot

<i>Reagenz</i>	<i>Zusammensetzung des Trenngels (10%) für 10 ml</i>	<i>Zusammensetzung des Sammelgels (5%) für 5 ml</i>
H ₂ O (Millipore)	4,0 ml	3,4 ml
30% Acrylamidmix	3,3 ml	0,83 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2,5 ml	-
1.0M Tris (pH 6.8)	-	0,63 ml
10% SDS	0,1 ml	0,05 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	0,004 ml	0,005 ml
Pyronin Y (Farbstoff)		0,005 ml

Das noch flüssige Gel wurde zwischen zwei Glasscheiben gegossen. Dann wurde es zum Schutz vor Austrocknen mit H₂O bedeckt. Nach ungefähr 45 min war es auspolymerisiert. Das H₂O wurde abgegossen und zusätzlich mit Filterpapier abgesaugt. Nun wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegeben und sofort ein Kamm hineingesteckt. So entstanden Taschen für die Proteine. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, konnte das Gel benutzt oder bei 4°C gelagert werden.

Bei unterschiedlichen Proteinmengen wurden die Proben mit H₂O auf gleiche Volumina verdünnt. Im Verhältnis 4:1 wurde den Proben ein reduzierender Gelladepuffer zugesetzt und das Gemisch 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden nach dem Abkühlen in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Die eingesetzten Proteinmengen betragen 12 oder 24 µg/Spur. Zur Bestimmung des Proteingewichts wurden pro Spur 5 µl des Proteingrößenmarkers aufgetragen. Die darauf folgende Elektrophorese im Elektrophoresepuffer zur Proteinauftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 100 V, Stromstärke 350 – 400 mA und einer Leistung 400W für 1h bei 4°C.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 10 min in frischem Transferpuffer gewaschen. Die Nitrozellulosemembran wurde gleichzeitig kurz in H₂O gewaschen und die letzten 10 min vor dem Blotten in Transferpuffer äquilibriert.

Western Blot

Die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Western Blots aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran überführt. Der Transfer erfolgte im „Tank-Blot-Verfahren“ als luftblasenfreies „Gel-Membran-Blot-Sandwich“ unter der Verwendung von Transferpuffer. Die verwendeten Gele wurden bei 4°C, 100V, 350mA, 400W und für 2h geblottet.

Um den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen, wurde die Nitrozellulosemembran nach Beendigung des Western Blots mit Ponceau-Rot-Lösung gefärbt. Dazu wurde die Membran eine Minute in Ponceau – Rot geschüttelt und anschließend zwei Mal in Wasser gewaschen. Anschließend wird sie auf Filterpapier getrocknet und bis zur Antikörperhybridisierung bei 4°C gelagert.

Antikörper – Hybridisierung

Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu minimieren, wurde die Nitrozellulose-Membran in 0,5%igem TBST-BSA für 1h unter sanftem Schütteln bei RT inkubiert. Dann wurde die Membran 1x 15 min und 2x 5 min in TBST gewaschen.

Danach erfolge die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper 1:1000 oder 1:100 in 0,25%igem TBST-BSA für 1h bei RT. Anschließend wurde die Membran wieder 1x 15 min und 2x 5 min in TBST gewaschen. Der spezies-spezifische Sekundärantikörper wurde 1:20000 in 0,25%igem TBST-BSA verdünnt und ebenfalls 1h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran wie beschrieben gewaschen.

Tabelle 2.2.10.3b: Antikörper – Verdünnungen für den Einsatz auf Nitrozellulosemembranen

Antikörper	Verdünnung
Anti EDG-2 Rabbit IgG	1:1000 in 0,25% TBS-T-BSA
Anti EDG-1 Rabbit IgG	1:100
Donkey Anti- Rabbit	1:20000 in 0,25% TBS-T-BSA

„Stripping“ – Protokoll

Zur erneuten Antikörperhybridisierung der Nitrozellulose-Membran kann diese mit Hilfe eines „Stripping“-Puffers von bereits gebundenen Antikörpern gereinigt werden.

Das Strippen der Membran erfolgte im Glycin-„Stripping“-Puffer für 30 min bei 50°C unter leichtem Schütteln im Heizofen „Mini oven“. Darauf folgten zwei Waschschriffe von je 30 min in TBS-T-Puffer. Zur Kontrolle der Proteine wurden die Membranen erneut mit Ponceau-Rot angefärbt.

Detektion

Zur Detektion des Immunkomplexes aus Primär- und Sekundärantikörper wurde das Detektions-Reagenz für 5 min auf die Membran gegeben. Durch die katalytische Umsetzung der an den Sekundärantikörper gebundenen Peroxidase wurde eine Chemoluminiszenz erzeugt. Die Membran wurde nach dem Abtropfen in der Dunkelkammer zusammen mit einem Röntgenfilm

in eine Röntgenkassette gelegt. Der Film wurde nach ein bis zehn Minuten Belichtungszeit entwickelt.

2.2.10.4 ELISA-Detektion von Proteinen

Das ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)-Verfahren diente dem Nachweis von bestimmten Fibronectin- und TGF- β -Anteile im Zellkulturüberstand von mit LPA stimulierten Rattenfibroblasten. Dazu wurden die Zellüberstände aus den Zellkulturplatten in mit entsprechenden Antikörpern beschichteten 96-er Mikrotiterplatten pipettiert. Die sich formierenden Protein-Antikörper-Komplexe wurden mit Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern und Zugabe von Substrat (o-Penylendiamin) im ELISA-Platten-Reader nachgewiesen. Folgende Antikörper wurden in folgenden Konzentrationen verwendet:

<i>Primärantikörper</i>	<i>Konz.</i>	<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Konz.</i>
Fibronectin Ak	1:16.000	Pox-conjugated AffiniPure GoatAnti- Rabbit	1:4.000 in PBS-T

Eine erste Mikrotiterplatte wurde für 2,5h bei 37°C mit 100 μ l eines Gemisches aus Coating Puffer und Fibronectin Antigen (Fn Ag) vorbehandelt (10 μ l Fn Ag + 10,5 ml Coating Puffer). Parallel dazu wurde auf einer zweiten Mikrotiterplatte eine Standardkurve sowie die Proben in verschiedenen Verdünnungen und Doppelansätzen mit einem Fibronectin Antikörper vermengt und für 1h bei 37°C inkubiert.

Die Überstände auf der „gecoateten“ Platte wurden verworfen und die Reaktion mit Blocking Puffer für 1h bei 37°C gestoppt. Im Anschluss erfolgte nach fünf Wasch-Schritten mit PBS-T der Transfer der Proben-Antikörper-Gemische der zweiten Platte auf die nun vorbereitete erste Mikrotiterplatte und eine Inkubation für 1h bei 37°C. Nach weiteren fünf Waschgängen mit PBS-T wurde zu jedem Well 100 μ l des Zweitantikörpers in PBS-T hinzugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Nach weiteren zwei Mal Waschen wurde zu jedem Well der Mikrotiterplatte 200 μ l der OD-Lösung hinzugegeben und 30 min bei RT und Dunkelheit inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte dann mittels eines Standardkurvenabgleichs im ELISA-Platten-Reader als Änderung der Extinktion bei 450 nm. Für die Detektion von TGF- β Proteinen im Zellkulturüberstand wurde in ähnlicher Weise nach den Empfehlungen des Herstellers R&D Systems mit dem TGF- β Kit DY240 verfahren.

2.2.11 Paraffineinbettung von Myokard- und Nierengewebe

Myokardproben und Nierengewebe aus den Wistar-Ratten wurden mit Hilfe eines Automaten fixiert, eingebettet und für spätere Aufarbeitungen nutzbar gemacht. Das Probenmaterial wurde in gepuffertem Formalin (4 % in PBS) fixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben in Einbettkästchen gelegt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dafür wurden die Kästchen je eine Stunde in 70 %, 80 %, 96 % und 100 % Ethanol gelagert. Danach wurde das Probenmaterial eine weitere Stunde in Xylol gebadet und anschließend zwei Mal in Paraffin zu je 1,5h eingebettet. Die Proben verblieben nun bis zur Weiterverarbeitung bei RT in diesem Paraffinblock. Im Anschluss wurden die Blöcke mit Hilfe des Mikrotoms in 5 µM dünne Scheiben geschnitten und die Schnitte auf Objektträger gebracht. Mit Hilfe eines 45°C Wasserbades wurden die Paraffinschnitte glatt auf die Objektträger überführt und durch Lagerung über Nacht bei 60°C auf diesen fixiert getrocknet.

2.2.12 Histologische Färbungen

2.2.12.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE)

Die HE-Färbung dient der Darstellung von Gewebsstrukturen im Organschnitt mittels des Kernfarbstoffs Mayers Hämalaun und zur Kontrastierung des Plasmafärbestoffs Eosin. Diese Übersichtsfärbung weist die kollagenen Bindegewebsfasern sowie azidophile Strukturen rot und basophile Strukturen blau nach, während elastische Fasern blassrosa gefärbt werden. Je nach Färbegrad erscheinen also die Kerne bläulich, zytoplasmatische Strukturen je nach Aufbau in rötlichen Abstufungen (siehe Tabelle 2.2.12.1).

Tabelle 2.2.12.1: Färbeverhalten verschiedener zellulärer Strukturen bei HE-Färbung. Links die zelluläre Struktur, in der Mitte die Farbe, rechts der für die Färbung verantwortliche Farbstoffbestandteil.

Kerne:	<i>blau</i>	Mayers Hämalaun
Cytoplasma:	<i>blassrot</i>	Eosin
Kollagenes BG:	<i>rot</i>	Eosin
Elastisches BG:	<i>rosa</i>	Eosin
Muskulatur:	<i>dunkelrot</i>	Eosin
Erythrozyten:	<i>rot</i>	Eosin
Knochen:	<i>rot</i>	Eosin
Knorpel:	<i>blassblau-violett</i>	Mayers Hämalaun
Kalk:	<i>blau</i>	Mayers Hämalaun

Vor Beginn der Färbungen mussten die Paraffinschnitte entparaffinisiert und bewässert werden. Dazu wurden die Schnitte 10 min in RotiClear bei RT gebadet. Direkt im Anschluss folgte eine Behandlung der Schnitte mit einer absteigenden Alkoholreihe. Die Schnitte wurden hierfür je 10 min in 96 %, 80 %, 70 % und in H₂O gehalten. Nun wurden die Objektträger mit dem sauren Hämalaun nach Meyer oder dem Hämatoxylin nach Ehrlich gefärbt. Anschließend erfolgte das Bläuen der Präparate unter fließendem Leitungswasser für 10 min. Der Farbstoff wurde durch den pH-Wert des Wassers stabilisiert, und die Calciumsalze führten dazu, dass sich ein Lack bilden konnte. An dieser Stelle wurde der Erfolg der Färbung unter dem Mikroskop kontrolliert. Nun erfolgte die Färbung in einer 0,1 %igen Eosin-Lösung für 5 min. Damit der Farbstoff besser ins Gewebe ziehen konnte, wurde der Lösung ein Tropfen Eisessig zugesetzt. Abschließend wurden die Schnitte noch mit H₂O gespült, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (H₂O, 70 %, 80 %, 96 %) entwässert und mit Vecta Mount Medium eingedeckt.

2.2.12.2 PAS-Färbung

Die PAS-Färbung dient der Darstellung neutraler Mukopolysaccharide, Polysaccharide, Muko- und Glykoproteine, Glykolipide, ungesättigter Fette und Phospholipide. Eine exakte Unterscheidung dieser Substanzen wird dadurch möglich, dass Glykogen durch Diastase gelöst wird, saure Mukopolysaccharide eine metachromatische Farbreaktion mit Thiazinfarbstoffen geben und Lipide sich im Paraffinschnitt als extrahierte Stellen darstellen. Das zugesetzte Reagenz färbt Glykogen-haltige Bestandteile der Zellen rot.

Die Paraffinschnitte wurden wie bei der HE-Färbung entparaffinisiert und mit einer absteigenden Alkoholreihe äquilibriert, zweimal mit Aqua dest. gewaschen und für 5min in Perjodsäure getaucht. Dann wurde in Leitungswasser gewaschen, in Aqua dest. gespült und die Schnitte 30min mit Schiff'schem Reagenz gebadet. Nach einem weiteren Waschschrift wurde fakultativ mit Hämalaun nach Mayer gefärbt. Die Schnitte wurden in Leitungswasser gebläut, mit Aqua dest. gespült und nach einer aufsteigenden Alkoholreihe plus Xylolbehandlung mit Vecta Mount Medium eingedeckt.

2.2.12.3 Sirius Red Färbung

Die Sirius Red Färbung dient der Darstellung von Kollagenstrukturen z.B. von in Paraffin eingebetteten Rattenherzen. Das Prinzip der Färbung basiert auf der Reaktion des Farbstoffes

Sirius Rot mit den Kollagen Seitenketten. Der anionische Farbstoff hat NaSO_3 -Seitengruppen, die mit den basischen Seitengruppen der im Kollagen vorhandenen Aminosäuren eine Bindung eingehen. Hierbei lagert sich das langkettige Farbmolekül parallel an das Kollagen an. Unter dem Lichtmikroskop lassen sich dann intensiv rot gefärbte Areale mit Kollagenanteilen im Gewebe nachweisen (siehe Tabelle 2.2.12.3).

Tabelle 2.2.12.3: Färbeschema der Sirius Red Färbung. Dargestellt sind die verschiedenen Schritte der Färbung mit ihren verwendeten Ingredienzien in Gegenüberstellung mit den jeweiligen Färbezeiten.

1. Entparaffinisieren:	
Objektträger mit Paraffinschnitten bei 67°C erwärmen lassen	20 min
In 44°C warmen Xylol inkubieren	20 min
Frisches Xylol	5 min
2. Absteigende Alkoholreihe:	
Ethanol (100%)	2 min
Ethanol (96%)	2 min
Ethanol (80%)	2 min
Ethanol (70%)	2 min
Ethanol (30%)	5 min
3. Färben:	
Aqua dest.	5 min
Aqua dest.	10 min
Sirius Red Lösung	60 min
0,01N HCL	2 min
4. aufsteigende Alkoholreihe & Eindecken:	
Ethanol (90%)	2 min
Ethanol (100%)	2 min
Xylol	2 min
Trocknen und Eindecken mit Vecta Mount	

Zum Herstellen der 0,1%ige Picro-Siriusrot Färbelösung wurden 0,5 g des Farbstoffes Picro-Siriusrot in 500 ml 1,2%iger flüssiger Pikrinsäure gelöst. Zur Aufsättigung der Farblösung wurden ca. 5 mg Pikrinsäure bis zum Ausfallen von Kristallen zugefügt.

2.2.12.4 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine lichtmikroskopische Technik zur Charakterisierung von zellulären Strukturen. Sie basiert auf der hohen Affinität zwischen Antikörpern und ihren Antigenen. Spezifische mono- oder polyklonale Antikörper, die aus zuvor immunisierten Tieren gewonnen wurden, detektieren dabei ihr Antigen in oder auf Zellen, Gewebeschnitten, etc.

Diese so genannten Primärantikörper tragen selbst antigene Determinanten, gegen die sich der Fluoreszenzmarker-gekoppelte Zweitantikörper richtet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop können die Fluoreszenzmarker FITC und Cy3 sichtbar gemacht werden. Kofärbungen können mit Primärantikörpern aus verschiedenen Spezies und Sekundärantikörpern mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern durchgeführt werden.

Indirekte Immunfluoreszenz auf Paraffinschnitten

Die Formalin-fixierten Nierenproben wurden in 5 µm dünne Schichten geschnitten, auf Objektträger gebracht und über Nacht bei 60°C getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte 2x 5 min in Roticlear oder Xylol entparaffinisiert. Die Äquilibration erfolgte durch eine absteigende Alkoholreihe, jeweils 10 min in 100%, 96%, 80% und 70% Ethanol. Zum Schluss verblieben die Schnitte 10 min in H₂O.

Da durch die Fixierung Antigene maskiert wurden und somit Bindungsstellen den Antikörper nicht zugänglich sein konnten, wurden die Schnitte 3x 5 min in Citratpuffer bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht. Der Puffer wurde dabei jedes Mal gewechselt und vorgekocht, damit die Temperatur konstant bleiben konnte. Nach der Antigendemaskierung verblieben die Schnitte 20 min im Puffer zum Abkühlen. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers möglichst zu verhindern, wurden die Präparate für 60 min mit 5% BSA in PBS-T geblockt.

Der Primärantikörper (bei Kofärbungen auch mehrere) wurde 1:100 in PBS-T-BSA verdünnt auf die Gewebeschnitte gegeben. Er wurde 60 min bei RT inkubiert. Nichtgebundene Antikörper wurden 3x 10 min in PBS-T abgewaschen. Danach wurde wieder 60 min geblockt (siehe erstes Blocking).

Die folgenden Schritte wurden so weit möglich in Dunkelheit durchgeführt, da die Fluoreszenzmarker lichtempfindlich sind: Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls 1:100 in PBS-T-BSA verdünnt und 60 min bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert. Nichtgebundene Antikörper wurden 3 x 10 min in PBS-T abgewaschen.

Da Nierengewebe im Paraffinschnitt eine Eigenfluoreszenz besitzt, die evtl. spezifische schwache Signale überstrahlt, wurde eine Sudan Schwarz Färbung angeschlossen. Dazu wurde Sudan Schwarz 0,5%ig in 70% Ethanol gelöst und 30 min gefärbt. Anschließend wurden die Präparate 10 min in PBS-T gewaschen und mit Fluoreszenzmedium eingedeckt. Das Deckglas wurde mit Nagellack an den Rändern versiegelt und die Präparate bei -20°C gelagert.

Zum Anfärben von Zellkernen wurde eine DAPI- Färbung nach dem Sekundärantikörper zwischen den Wasch-Schritten durchgeführt. DAPI wurde 1:20.000 verdünnt und eine Minute auf das Präparat gegeben. Danach wurde das Waschen mit PBS-T wie oben fortgesetzt.

Indirekte Immunfluoreszenz auf Zellkulturobjektträgern

Die Zellen wurden auf 8-Kammer-Objektträgern („Chamber Slides“) in gewünschter Dichte subkonfluent ausgesäht. Die Bestimmung der Zellzahl geschah dabei nach der Neubauer Kammer-Zählmethode. Nach einem 24-stündigen Serumentzug wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und danach mit Formaldehyd (3% in BSA) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Es folgte ein 5-minütiger Waschschrift in PBS, danach Waschen für 5 min in PBS mit Glycin, wieder Waschen mit PBS und zuletzt Permeabilisieren bei Raumtemperatur 4 min in 0,1% TritonX-100 in PBS. Es folgten zwei weitere Waschvorgänge mit PBS. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers möglichst zu verhindern, wurde 30 min bei Raumtemperatur mit Rinderserum geblockt. Dazu wurden 1% BSA in PBS gegeben.

Der Primärantikörper wurde 1:100 in 0,1% BSA-PBS verdünnt auf den Objektträger gegeben. Er wurde 60 min bei RT inkubiert. Nicht- gebundene Antikörper wurden 3x 5 min in 0,1% BSA-PBS abgewaschen.

Die folgenden Schritte wurden so weit möglich in Dunkelheit durchgeführt: Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls 1:100 in 0,1% BSA-PBS verdünnt und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht- gebundene Antikörper werden 3x 5min in 0,1% BSA-PBS abgewaschen.

Nun wurden die Kammerwände vom Objektträger entfernt, dieser kurz luftgetrocknet und das Deckglas vor dem Zudecken mit Fluor Shield Eindeckmedium versehen. Die Ränder des Deckglases wurden auf dem Objektträger mit Nagellack verklebt und das Präparat bis zum Mikroskopieren dunkel bei -20°C aufbewahrt.

2.2.13 APAAP-Färbesystem

Für die Darstellung der Rezeptorlokalisierung von EDG-1 im Rahmen der Untersuchungen bei anti-THY-1-induzierter chronisch progredienter Glomerulosklerose der Ratte wurde das APAAP-Färbesystem verwendet. Die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP) ermöglicht einen indirekten Nachweis der Bindung eines Primärantikörpers. Hierfür wurden die Paraffinschnitte in gewohnter Weise mit einem Citratpuffer entparaffinisiert und vor dem eigentlichen Färben in einer 2%igen BSA in TBS-Lösung vorinkubiert, um

unspezifische Proteinbindungen zu verhindern. Der EDG-1-Rezeptor wurde mit dem polyklonalen EDG-1 rabbit-anti-rat Antikörper 1:50 in Kombination mit einem Zweitantikörper 1:100 (AP-conjugated goat-anti-rabbit) sichtbar gemacht: Dieser Zweitantikörper setzte über eine gebundene alkalische Phosphatase den Farbstoff „fast red“ um, der dann photometrisch bzw. lichtmikroskopisch ausgewertet wurde. Zusätzlich wurde das „Background Reducing Antibody Reagent“ verwendet.

2.2.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der m-RNA Expressionswerte aus den mit LPA stimulierten Rattenfibroblasten erfolgte mit Hilfe der SPSS Software Version 11.5. Dabei wurde der Man-Whitney-U-Test verwendet, weil von einer Normalverteilung der Proben nicht ausgegangen werden konnte. Ebenso wurden die Proben aus den XTT-Proliferations-Assays mit dem Man-Whitney-U-Test ausgewertet. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde bei der Auswertung als statistisch signifikant bewertet.