

3. Untersuchungsmaterial und Methoden

3.1. Verwendete Zellen

Für die Untersuchung wurden Endothelzellen verwendet, die im Rahmen vorhergehender Untersuchungen aus dem Gelbkörper des Rindes isoliert wurden (Plendl, 1997; Budde, 1999). Dazu wurden unmittelbar nach der Schlachtung Ovarien aus den Schlachtkörpern von Rindern der Rasse Deutsches Fleckvieh entnommen. Es wurden nur Ovarien ohne pathologische Veränderung wie Zysten oder Vernarbungen ausgewählt. Wichtiges Kriterium für die Auswahl der Ovarien war die eindeutige Zuordnung der Corpora lutea zu den verschiedenen Entwicklungsstadien, nämlich Corpus luteum in Anbildung, Blüte und Rückbildung. Die Beurteilung der einzelnen Stadien erfolgte anhand makroskopischer Kriterien (Leiser, 1999; Rüsse und Sinowatz 1998).

Mit einer Schere wurden die Ovarien aus der Bursa ovarica freipräpariert, von Resten der Tuba uterina befreit und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung in steriler, antibiotikahaltiger (100 mg Streptomycinsulfat und 30 mg Penicillin G Natrium/1000 ml Lösung), eisgekühlter PBS-Lösung (Zusammensetzung: 8 g NaCl/l, 0,2 g KCl/l, 1,15 g Na₂HPO₄/l, 0,2 g KH₂PO₄/l, pH 7.4, Biochrom KG, Berlin) aufbewahrt.

Zur Isolierung der Endothelzellen wurden die Ovarien mehrfach in sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Corpora lutea herauspräpariert und in sterile Glaspetrischalen mit auf 4°C gekühltem Kulturmedium (DMEM⁺, Zusammensetzung siehe Punkt 3.4.3.1.) verbracht.

Alle weiteren Arbeiten an den Zellen wurden nun unter einer Reinraumwerkbank (BDK, Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkiken) unter sterilen Bedingungen fortgeführt.

Das Gewebe wurde mit Hilfe einer Schere und Einmalskalpellen in kleine Stückchen (1 x 1 x 1 mm) zerteilt, in kaltem Nährmedium gewaschen, in Zentrifugenröhrchen verbracht und bei 200 x g 5 Minuten lang zentrifugiert.

Nach Absaugen des Überstandes wurde das so gewonnene Zellpellet in eine Enzym-Lösung aus 10 ml Kulturmedium (DMEM, Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Deisenhofen) mit 25 mg Collagenase II, 25 mg Collagenase IV, 10 mg DNAase I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) und 10 µl Nu-Serum (Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg) gegeben und unter leichtem Schütteln bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit auf 37°C erwärmtem Kulturmedium aufgeschwemmt und bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in einer Dextran-Lösung (15 % in PBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) resuspendiert und diesmal 20 Minuten bei 4000 x g zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet mit warmem Kulturmedium gewaschen, um dann bei 200 x g 5 Minuten lang zentrifugiert zu werden.

Zuletzt wurde das Kulturmedium entfernt, das Zellpellet in einem Selektivmedium (Zusammensetzung siehe Punkt 3.4.3.2.) resuspendiert und in gelatinebeschichtete Gewebekulturschalen von 35 mm Durchmesser ausgesät.

Dafür wurden die Schalen zuvor mit einer Gelatine-Lösung (1,5 % in PBS, Bacto Gelatine, Difco Laboratories, Detroit, USA) beschichtet und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen der Gelatinereste wurden die Schalen mit PBS gewaschen und mit einigen Tropfen Selektivmedium (Zusammensetzung siehe Punkt 3.4.3.2.) für die Aufnahme der Zellen vorbereitet.

Spätestens 40 Minuten nach Aussaat wurde das Medium mit den noch nicht adhären Zellen vorsichtig abgesaugt. Die verbleibenden Zellen wurden mit frischem Selektivmedium versorgt. Nach 24 Stunden wurde dieser Vorgang wiederholt. Im weiteren Verlauf wurde das Medium alle 3-4 Tage ersetzt.

3.2. Identifizierung der Endothelzellen

Die Identifizierung der Endothelzellen erfolgte sowohl bei der Isolierung wie auch vor der Verwendung anhand mehrerer Nachweise, die als Marker für Endothelzellen beschrieben wurden (Plendl, 1997). Dazu zählt die in vitro-Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein (acLDL), die Lokalisation des von Willebrand-Faktors (vWF) mittels Immunhistochemie und die zelluläre Bindung des Lektins *Bandeiraea simplicifolia* Agglutinin I (BS-I).

Für alle Nachweise wurden die Zellen auf Glasplättchen in 24-Loch-Platten bis zum Erreichen eines subkonfluenten Monolayers angezüchtet. Dafür wurden zuerst

die Glasplättchen mit 12 mm Durchmesser in die Vertiefungen der 24-Loch-Platten gegeben, dann erfolgte die Beschichtung mit Gelatine wie im Punkt 3.1. beschrieben.

Für Negativkontrollen wurden Granulosazellen aus dem Gelbkörper des Rindes verwendet.

Alle Plättchen wurden nach der immunhistochemischen Markierung auf Objektträger aufgebracht, mit Fluorostab (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg) eingedeckelt und bei 4°C unter Lichtabschluss aufbewahrt.

Die Objektträger wurden mit dem Auflichtfluoreszenzmikroskop Dialux 20 (Leitz GmbH, Wetzlar) ausgewertet, die Ergebnisse mit dem Kamerasystem Leitz Vario Orthomat (Leitz GmbH, Wetzlar) festgehalten und mittels eines Kodak Elite chrome 400-Films für Farbdiaspositive (Kodak GmbH, Stuttgart) dokumentiert.

3.2.1. In vitro-Aufnahme von acetyliertem Low Density Lipoprotein

Den Zellen wurde acLDL angeboten, das mit dem Fluorochrom 1,1'-Dioctadecyl-tetramethyl-Indocarbocyanine Perchlorate (DiI) markiert war (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln).

Nachdem die auf Glasplättchen angezüchteten Zellen mit PBS gewaschen worden waren, wurden sie für 12 Stunden bei 37°C in Kulturmedium mit DilacLDL (10 µg/ml in DMEM mit 5 % FBS und je 1 % Penicillin-Streptomycin und L-Glutamin) inkubiert. Nach Absaugen des DilacLDL wurden die Zellen nochmals mit Kulturmedium gewaschen und dann für 5 Minuten mit einer gepufferten Formalin-Lösung (3,5 %) fixiert. Zuletzt wurden die Zellen mit Aqua dest. gewaschen und auf Objektträger aufgebracht.

Zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen dienten Zellen, die nicht in dem mit DilacLDL versetzten Medium inkubiert worden waren.

3.2.2 Lokalisation des von Willebrand-Faktors

Es wurde Normalserum von der Ziege (DAKO, Glostrup, Dänemark), ein gegen menschliches Antigen gerichteter Primärantikörper aus dem Kaninchen (Kaninchen anti-human von Willebrand-Faktor, DAKO, Glostrup, Dänemark) und ein mit

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugierter Sekundärantikörper (goat anti-rabbit IgG FITC Conjugate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) verwendet.

Die Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen, mit gekühltem Methanol-Aceton (1:1) bei 4°C für fünf bis sieben Minuten fixiert und mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen in Normalserum von der Ziege (Verdünnung mit PBS 1:20) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen des Serums wurde der Primärantikörper (Verdünnung mit PBS 1:100) auf die Zellen gegeben und diese für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach 12 Stunden wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und im Dunklen bei Raumtemperatur für 60 Minuten mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung mit PBS 1:400) inkubiert. Die Zellen wurden nochmals mit PBS gewaschen und auf Objektträger aufgebracht.

Um unspezifische Reaktionen auszuschließen, wurde bei einigen Proben während der ersten Inkubation nicht der Primärantikörper verwendet, sondern das Serum auf den Zellen belassen.

3.2.3 Markierung mit dem Lektin *Bandeiraea simplicifolia* Agglutinin I

Die Markierung erfolgte mit dem mit FITC-konjugierten Lektin BS-I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen).

Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, mit eisgekühltem Methanol-Aceton (1:1) bei 4°C für 5 Minuten fixiert und nochmals mit PBS gewaschen. Danach wurden sie mit dem FITC-konjugierten Lektin BS-I (Verdünnung in PBS 25 µl/ml) für 60 Minuten unter Lichtabschluss inkubiert, erneut mit PBS gewaschen und auf Objektträger aufgebracht.

Auch hier wurden unspezifische Reaktionen ausgeschlossen, indem Zellen nur mit PBS ohne das Lektin inkubiert wurden.

3.3. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die Untersuchung von auf Glasplättchen gewachsenen Zellen wurde zuerst das Kulturmedium abgesaugt. Die Plättchen wurden erst mit PBS, dann mit Cacodylat-Puffer (0,1 M, pH 7.2, Zusammensetzung s. 3.3.1.) gewaschen und 4 Stunden in Karnovsky-Lösung (2 % Paraformaldehyd + 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer, 0,1 M, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) bei 4° C fixiert. Danach

wurden die Zellen dreimal in Cacodylat-Puffer (0,1 M) gewaschen und mit 1 % Osmiumtetroxid und 1,5 % Kaliumferrocyanid (in Cacodylatpuffer, 0,1 M, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) unter Lichtabschluss für 2 Stunden bei 4° C kontrastiert. Anschließend wurde in 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen. Dann wurden die Zellen in BSA-Cacodylat-Lösung (20 %, bovines Serumalbumin in Cacodylatpuffer, 0,1 M, Carl Roth GmbH % Co KG, Karlsruhe) 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde durch Zugabe von ein bis zwei Tropfen Glutaraldehyd-Lösung (15 %, GAH, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) das Gelieren des BSA eingeleitet. Daraufhin wurde der Zellrasen von den Glasplättchen gezogen, die Probe in kleinere Stücke aufgeteilt und in 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen. Alle Proben wurden dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nach Überführung und Inkubation in Propylenoxid (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), Propylen-Epon-Gemisch und reinem Epon (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), wurden die Proben in eine Beem-Kapsel (PLANO, Marburg) eingebettet und polymerisiert. Mit einem Ultramikrotom Ultracut E (Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich) wurden 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, mit Methylenblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt. Von den für ultrastrukturelle Untersuchungen geeigneten Proben wurden Ultradünnschnitte hergestellt, auf Kupfergrids (PLANO, Marburg) aufgefangen und mit Ultrastain I (enthält Uranylacetat, Leica Microsystems AG, Wetzlar) und Ultrastain II (enthält Bleicitrat, Leica Microsystems AG, Wetzlar) kontrastiert.

Die Photodokumentation erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop EM 10CR (Zeiss Jena) und mit einem Kodak Electron Microscope Film (Kodak GmbH, Stuttgart).

3.3.1 Lösungen für die Elektronenmikroskopie

Cacodylat-Puffer, 0,2 M:

Na(CH ₃) ₂ AsO ₂ 3H ₂ O (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)	8,56 g
Aqua dest.	ad 200 ml
HCL, 0,5 M	auf pH 7.2-7.4 einstellen

Cacodylat-Puffer, 0,1 M, pH 7,2:

Cacodylat-Puffer, 0,2 M	50 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

Epon (alle Substanzen von Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg):

Epon-Glycidether	23,10 g
DDSA	14,25 g
MNA	12,55 g
DMP-30	0,75 ml

3.4. Zellkultur**3.4.1. Kulturbedingungen**

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Reinraumwerkbank unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank BK 5060 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau) im offenen System bei 37°C mit 5 % CO₂ und Wasserdampfsättigung (Lindl und Bauer, 1987) inkubiert.

3.4.2. Kulturschalen

Je nach Versuchsaufbau und Verwendungszweck wurden verschiedene sterile Gewebekulturschalen verwendet: Kulturschalen mit 35 mm Durchmesser und 10 mm Höhe, 60 mm Durchmesser und 15 mm Höhe und 100 mm Durchmesser und 20 mm Höhe, sowie Lochplatten mit 6 bzw. 24 Vertiefungen mit 17,6 mm Höhe und 34,6 bzw. 15,5 mm Durchmesser (Iwaki, Tokyo, Japan). Für die Identifizierung der Endothelzellen sowie für die immunhistochemischen und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Zellen auf sterilen Glasplättchen von 12 mm Durchmesser (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) angezüchtet.

3.4.3. Kulturmedien

Für die Herstellung von S 180-Tumor-konditioniertem Medium und die Anzüchtung nicht-angiogener Endothelzellen wurde ein Nährmedium (DMEM⁺, Zusammen-

setzung siehe Punkt 3.4.3.1.) verwendet. Angiogene Endothelzellen erhielten ein angereichertes Selektivmedium (Zusammensetzung siehe Punkt 3.4.3.2.).

3.4.3.1. Zusammensetzung des Nährmediums DMEM⁺

Fetales bovines Serum	50 ml
L-Glutamin (200mM)	5 ml
Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml, 10 mg/ml)	5 ml
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	ad 500 ml

(alle Komponenten Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)

3.4.3.2. Zusammensetzung des Selektivmediums

Fetales bovines Serum	5 ml
BME-Vitamine	0,5 ml
Heparin-Lösung (0,25 %)	0,5 ml
ECGS	1 ml
S 180-konditioniertes Medium	10 ml
DMEM ⁺	ad 50 ml

(alle Komponenten mit Ausnahme ECGS und S 180-konditioniertem Medium Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)

3.4.3.3. Wachstumsfaktoren für das Selektivmedium

Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS, Collaborative Biomedical Products, Bedford, USA) wird aus bovinem Nervengewebe gewonnen und unterstützt selektiv das Wachstum und die Vermehrung der Endothelzellen.

S 180-Tumor-konditioniertes Medium: Es handelt sich hierbei um ein Medium, das aus der Zellkultur eines murinen Fibrosarkoms gewonnen wird. Diese Zellen produzieren spezielle Faktoren, die das Endothelzellwachstum fördern (Folkman et al., 1979; die Tumorzellen wurden von Prof. R. Auerbach, University of Wisconsin, Madison/USA zur Verfügung gestellt). Hierfür wurde die Sarkomzellen in DMEM⁺ kultiviert. Sobald ein Farbumschlag von rot nach gelb erfolgt war, wurde das

Medium abgesaugt und 5 Minuten lang bei 200 x g zentrifugiert. Nach Sterilfiltrierung mit 0,2 µm Filtern (Schleicher & Schüll GmbH, Dassel) konnte das Medium bei -20°C eingefroren werden.

3.4.4. Untersuchung der Morphologie der Endothelzellen

Die Zellen wurden regelmäßig mit dem Invert-Mikroskop Diavert (Leitz GmbH, Wetzlar) untersucht und mit dem angeschlossenen Kamerasystem Orthomat (Leitz GmbH, Wetzlar) fotografiert. Als Film wurde ein Agfa Pan APX 25 Film (Agfa-Gevaert AG, Leverkusen) eingesetzt. Als zweites Mikroskop kam das Invert-Mikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Jena) zum Einsatz. Die Bilddokumentation erfolgte hier mittels einer Videokamera Inteq 000610 (Inteq, Berlin) und dem daran angeschlossenen Bildverarbeitungssystem Axiovision (Zeiss, Jena).

3.4.5. Subkultivierung

Eine Subkultivierung der Zellkulturen erfolgte erst, wenn diese ein konfluentes Monolayer gebildet hatten. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Kultur mit PBS gewaschen und die Zellen dann durch Einwirkung von Trypsin-EDTA (0,5 g porcines Trypsin + 0,2 g EDTA x 4 Na/l HBSS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) abgelöst. Nach Ablösung der Zellen wurde die Enzymwirkung durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt, die Zellsuspension mit einer Pipette aufgenommen und auf zwei bis drei neue Kulturschalen verteilt. Um eine möglichst gleichmäßige Zahl der Zellen in den Schalen zu erreichen, wurde die Zellsuspension tropfenweise nacheinander in die Vertiefungen verteilt. Die Suspension in der Pipette wurde außerdem immer wieder durchmischt, um zu verhindern, dass durch Absinken der Zellen eine ungleichmäßige Verteilung erfolgte.

3.4.6. Kryokonservierung

Von allen Passagen wurden Zellproben eingefroren. Hierfür wurden die Zellen, wie bei der Subkultivierung beschrieben, vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst, mit reichlich Medium in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit dem

Einfriermedium aufgenommen und in Portionen von 1 ml auf Kryoröhrchen (Bibby Sterilin Ltd., Staffordshire, UK) verteilt. Die Zellzahl betrug ca. 1×10^5 Zellen pro ml Einfriermedium. Für das Einfrieren wurde das bisher verwendete Kulturmedium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, ICN, Biochemicals, Aurora, Ohio/USA) versetzt. Die Zellen wurden erst bei -70°C eingefroren, dann für die Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196°C) gegeben.

3.4.7. Zellzählung der in vitro kultivierten Zellen

Bestimmungen der Zellzahl erfolgten in einem Hämozytometer (Neubauer Zählkammer, GLW, Würzburg). Die Zellen wurden, wie bei der Subkultivierung unter Punkt 3.4.5. beschrieben, mit Trypsin abgelöst und zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert, eine Verdünnungsreihe hergestellt und die Suspension in die Zählkammer gegeben und unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Aus der Zellzahl und dem Verdünnungsverhältnis wurde dann die Zellzahl pro ml Grundsuspension ermittelt.

3.5. Immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis von Laminin

Für die Untersuchungen wurden Endothelzellen verwendet, die in 24-Loch-Platten auf Glasplättchen angezüchtet worden waren.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol-Aceton (1:1) bei 4°C für fünf Minuten fixiert. Danach wurden sie erneut zweimal mit PBS gewaschen.

Unspezifische Bindungsreaktionen wurden durch fünfminütige Inkubation mit einem Protein-Blocker (Protein Block Serum-Free, DAKO, Glostrup, Dänemark) verhindert. Nach Entfernen des Protein-Blockers wurde ein aus dem Hühnchen gewonnener, polyklonaler Primärantikörper gegen Laminin in einer Verdünnung mit PBS 1:500 auf die Zellen gegeben und für 12 Stunden im Kühlschrank inkubiert. Nach 12 Stunden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper Kaninchen anti-Huhn IgG (Verdünnung mit PBS 1:100, Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA) inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper mit 2 bis 3 Tropfen peroxidasekon-

jugiertem Streptavidin-Biotin-Horseradish-Komplex (DAKO, Glostrup, Dänemark) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Plättchen unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit Diaminobenzidin (DAB)-Lösung (Zusammensetzung Punkt 3.5.1) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Plättchen mit Glyzerin-gelatine (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) auf Objektträger aufgebracht.

Die Auswertung erfolgte mit dem Durchlichtmikroskop Aristoplan (Leitz GmbH, Wetzlar) und die Dokumentation über das angeschlossene Kamerasystem Orthomat-E (Leitz GmbH, Wetzlar) mit einem Kunstlichtfilm (Kodak EPY 64T, Kodak GmbH, Stuttgart) für Diapositive.

3.5.1. Lösungen für die immunhistochemischen Untersuchungen

Diaminobenzidin-Lösung (DAB-Lösung):

DAB-Tablette	30 mg
(Sigma Immuno Chemicals, St. Louis/USA)	
PBS-Lösung	60 ml
H ₂ O ₂ -Stammlösung	400 µl

3.6. Molekularbiologische Untersuchungen

3.6.1. Zellzählung

Die Zellzahl wurde, wie in Punkt 3.4.7. beschrieben, bestimmt. Wurden 24-Loch-Platten verwendet, dann wurde jeweils eine von vier Vertiefungen ausgezählt. Bei 6-Loch-Platten wurde bei einer von zwei Vertiefungen die Zellzahl bestimmt. Die Auswahl der auszählenden Vertiefungen erfolgte zufällig.

3.6.2. Vermeidung von Kontaminationen durch Ribonukleasen und DNA

Sobald RNA aus den Zellen freigesetzt worden ist, kann sie durch Ribonukleasen (RNasen) abgebaut werden. Diese treten ubiquitär auf und sind äußerst widerstandsfähig. Eine weitere Beeinträchtigung des Ergebnisses kann durch DNA-Kontaminationen entstehen. Im Labor wurden daher Einmalhandschuhe getragen,

die öfters gewechselt wurden. Es wurden nur zertifiziert RNase- und DNase-freie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet. Gefäßständer und Pipetten wurden autoklaviert und grundsätzlich nur getrennt für Arbeiten mit RNA oder DNA verwendet. RNase-freies Aqua dest. wurde durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat, (DEPC, Fluka Chemie AG, Buchs), das anschließend durch Autoklavieren zerstört wurde, hergestellt. Während der reversen Transkription wurde als zusätzlicher Schutz für die RNA RNasin (Boehringer, Mannheim) als RNase-Hemmer zugegeben.

3.6.3. Isolierung der Gesamt-RNA

Für die Isolierung der RNA wurde Tri Reagent (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode stellt eine Modifikation der Extraktionsmethode nach Chomczynski und Sacchi (1987) dar.

Dafür wurde zuerst das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Auf je 10 cm² bewachsene Kulturschalenfläche wurde 1 ml der Reaktionslösung gegeben und für 5 Minuten auf den Zellen belassen. Danach wurden die jetzt lysierten Zellen aufgenommen, durch mehrmaliges Pipettieren homogenisiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Suspension wurden jeweils 0,2 ml Chloroform (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) pro ml verwendete Reaktionslösung zugegeben und 15 Sekunden lang durch gründliches Schütteln vermischt. Nach einer Ruhezeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgefäß 20 Minuten bei 4° C und 10.000 x g zentrifugiert. Hierbei trennte sich die Mischung in eine untere, rötlich gefärbte Protein-Phase, eine schwache und trübe mittlere DNA-Schicht und einen farblosen, klaren Überstand, der schließlich die RNA enthielt, auf. Von dieser oberen Phase wurden 500 µl vorsichtig mit einer Pipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml verwendeter Reaktionslösung und zehnminütiges Zentrifugieren bei 4° C und 10.000 x g schlug sich die RNA am Boden des Gefäßes nieder. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1 ml Ethanol (75 %) gelöst und erneut bei 4°C und 10.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen der Flüssigkeit wurde der Niederschlag über 10-15 Minuten bei Raumtemperatur fast vollständig getrocknet und schließlich mit 50 µl DEPC-

behandeltem Aqua bidest. gelöst. Diese Stammlösung wurde bei -80° C aufbewahrt.

3.6.4. Bestimmung der RNA-Menge

Die Bestimmung der in der Stammlösung enthaltenen Menge RNA erfolgte über die Messung der optischen Dichte im Spektrometer Smart SpecTM 3000 (Biorad Laboratories, Hercules, USA). Dafür wurden je 2 μ l der Stammlösung 1:125 mit Aqua dest. verdünnt und die Absorption bei 260 nm gemessen.

3.6.5. Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurden, je nach RNA-Konzentration, unterschiedliche Mengen der RNA-Stammlösung verwendet, so dass der Ansatz schließlich 1,6 μ g RNA enthielt. Nach Zugabe von 1,6 μ g Oligo-Deoxythymidin wurde das Volumen mit DEPC-behandeltem Aqua bidest. auf 8,1 μ l aufgefüllt und im Thermocycler (iCycler, Biorad Laboratories, Hercules, USA) 10 Minuten bei 65° C denaturiert. Nach Schnellkühlung auf 4° C wurde der Rest des Ansatzes zugegeben und die Reverse Transkription bei 42° über 60 Minuten im Thermocycler durchgeführt.

Der Ansatz beinhaltete in insgesamt 20 μ l folgende Komponenten (alle Reagenzien Boehringer, Mannheim):

RNA	1,6 μ g
Expand TM Reverse Transcriptase Puffer (50 mM Tris-HCL, 40 mM MgCl ₂ , 0,5% Tween [®] 20 (v/v), pH 8.3)	1 x
Expand TM Reverse Transcriptase	50 U
RNasin (RNase-Hemmer)	30 U
Oligo dT	1,6 μ g
dNTP	0,75 mM
DTT	10 mM
MgCl ₂	3 mM

Die so entstandene cDNA wurde bei -20° C aufbewahrt.

3.6.6. PCR

Für die Amplifizierung der gewünschten Sequenzen wurden spezifische Primer eingesetzt. Die Primer für den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und dessen Rezeptoren wurden von der Firma TibMolbiol, Berlin hergestellt, der Primer für den Wachstumshormon-Rezeptor (GHR) von der Firma MWG, München, bezogen.

Tabelle 1: Übersicht über die bei der PCR verwendeten Primer

Primer	Primersequenz
Boviner VEGF	
forward	5'-CGA GAC CCT GGT GGA CAT CT-3'
reverse	5'-ACA AAT GCT TTC TCC GCT CT-3'
Autor	Garrido et al., 1993, modifiziert Fa. TibMolbiol
Boviner VEGFR-1	
forward	5'-CAC CAA GAG CGA CGT GTG-3'
reverse	5'-AAG AAG TCC TCG GAG AAG GC-3'
Autor	Gabler et al. (1999)
Boviner VEGFR-2	
forward	5'-GCA GTG ATG GCG TCT TCT G-3'
reverse	5'-CAG ACT GAC ACA TTG AGG TCT GA-3'
Autor	Gabler et al. (1999), modifiziert Fa. TibMolbiol
Boviner GHR	
forward	5'-ACC CAG TGG AAA ATG GAC CCT T-3'
reverse	5'-CTG TCT GTG TCT GAC CCT TCA GTC-3'
Autor	Scott et al. (1992)

Durch Vorversuche wurde für die unterschiedlichen Primer die PCR optimiert. Die Amplifizierung erfolgte in 40 bzw. 50 µl Gesamtvolumen und enthielt folgende Komponenten (alle Reagenzien mit Ausnahme der Primer Boehringer, Mannheim):

Tabelle 2: Übersicht über die PCR-Reaktionsansätze

	VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2	GHR
cDNA	4 µl	1,3 µl
Primer (forward)	25 pmol	30 pmol
Primer (reverse)	25 pmol	30 pmol
Taq Polymerase	3,5 U	4 U
Reaktionspuffer (10 mM Tris, 50 mM KCL, 1,5 mM MgCl ₂ , pH 8.3)	1 x	1 x
dNTPs	0,3 mM	0,4 mM
MgCl ₂	0,3 mM	0,75 mM
Aqua bidest.	ad 40 µl	ad 50 µl

Die Amplifizierung wurde nachfolgend im Thermocycler (iCycler, Biorad Laboratories, Hercules, USA) mit folgenden Programmen durchgeführt:

Tabelle 3: Übersicht über die bei der PCR verwendeten Temperatur-Programme

Programmschritte	VEGF	VEGFR-1	VEGFR-2	GHR
1 Initiale Denaturierung: 94° C	4 Min.	4 Min.	4 Min.	
2 Denaturierung: 94° C	45 Sek.	45 Sek.	45 Sek.	45 Sek.
3 Annealing:	64° C 30 Sek.	62° C 30 Sek.	62° C 30 Sek.	60° C 30 Sek.
4 Synthese: 72° C	45 Sek. + 1 Sek. pro Zyklus			180 Sek.
5 Wiederholung Schritte 2-4	30 x	35 x	35 x	35 x
6 Abschlusssynthese: 72° C	7 Min.	7 Min.	7 Min.	7 Min.

Die PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.6.7. Auswertung der PCR

Für die elektrophoretische Auftrennung wurde ein mit $2\ \mu\text{l}$ einer 0,5%igen Ethidiumbromidlösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) versetztes Agarosegel (2 %, Metaphor Agarose, FMC Bioproducts, Rockland, USA) mit Taschen hergestellt und in einer DNA Pocket bloc-Elektrophoresekammer (Biozym Diagnostics, Hess. Oldendorf) gegossen. Dieses Gel wurde mit $60\ \text{ml}$ $1\times$ TBE-Puffer (Zusammensetzung s. Punkt 3.6.8.) und $12,5\ \mu\text{l}$ der 0,5%igen Ethidiumbromidlösung überschichtet.

Jeweils $18\ \mu\text{l}$ des PCR-Produktes wurden mit $2\ \mu\text{l}$ Blaupuffer (Zusammensetzung siehe Punkt 3.6.8.) vermischt und in die Taschen des Gels gegeben. Eine der Taschen enthielt als Größenvergleich $2\ \mu\text{l}$ eines $100\ \text{bp}$ -Markers (Amersham Pharmacia Biotech Europa GmbH, Freiburg), der in je $4\ \mu\text{l}$ Aqua bidest. und $2\ \mu\text{l}$ Blaupuffer gelöst worden war.

Die Elektrophorese lief zuerst bei einer Spannung von $15\ \text{Volt}$ für $10\ \text{Minuten}$, dann $150\ \text{Minuten}$ bei $35\ \text{Volt}$ (Power Supply Modell 1000/500, Biorad Laboratories, Hercules, USA).

Die Auswertung des Gels erfolgte unter UV-Licht mittels des Transilluminators TFX-20M (Vilbert Lourmat, Marne-LaVallée, France). Für die Dokumentation wurde das Instant Camera System Polaroid MP4+ (Polaroid, Cambridge, USA) und Polaroid Schwarz-Weiß-Filme vom Typ 667 (Polaroid, Cambridge, USA) verwendet.

Die entsprechenden Banden wurden nachfolgend aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aus dem Gel eluiert.

Die Sequenzierung der Produkte erfolgte durch die Firma SeqLab GmbH, Göttingen.

3.6.7.1. Lösungen für die Auswertung der PCR**TBE-Puffer (10x):**

Tris (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)	108 g
Borsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)	55 g
EDTA (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)	9 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml
ph mit Essigsäure auf 8.0 einstellen	

Blaupuffer (10x):

Ficoll-400 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)	1,5 g
EDTA (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)	0,3722 g
SDS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)	0,1 g
Bromphenolblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)	0,025 g
Aqua dest.	ad 10 ml