

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Advanced Biotechnologies, Hamburg

- Micro-Strips 0.2 ml
- DNA-Polymerase
- PCR-10-fach-Puffer (75 mM Tris-HCl, pH: 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄)
- 25 mM MgCl₂-Lösung für PCR

AGS GmbH, Heidelberg

- Qualex Gold Agarose (für DNA und RNA)
- RNase Zap

Ambion, Austin, Texas, USA

- RNAlater
- UltraHyb[®] Hybridisierungslösung

Axygen Scientific, Union City California, USA

- Gefäße 0.2 ml für Real-Time PCR

Bachem, Heidelberg

- 5-Br-4-Cl-3-indoxyl-phosphate

Becton Dickinson Pharmigen, Heidelberg

- 50 ml Blue-Max Reaktionsgefäße
- Primaria-Petrischalen
- sterile Einwegpipetten
- Anti-eNOS Monoklonale Antikörper

Biochrom KG/Seromed, Berlin

- Hanks´ Balanced Salt Solution (HBSS)
- MCDB 131 (Knedler, A.; Ham. R. G., 1987)
- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

- Trypsin/EDTA Lösung (500 U Trypsin + 180 µg EDTA/ml in PBS)
- Kollagenase II (Trockensubstanz), spez. Aktivität: 125-250 Mandl-Einheiten/mg, aus *Clostridium histolyticum*

Boehringer Mannheim, Mannheim

- ECGF (aus Rinderretina; 12 ng/µl)

Braun, Melsungen

- Ringerlösung

Collaborative Research, Bedford

- Dispase (0.012%, 5.000 U/ml)

Dynal, Hamburg

- *Ulex europäus*-1 Lektin-konjugierten paramagnetische Beads
- *Bandeiraea simplicifolia* (BS)-1 Lektin-konjugierten paramagnetische Beads

Falcon, Heidelberg

- Zellkulturflaschen (T-75/T-25)
- 40 µm und 100 µm Nylonnetze

Karow, Berlin

- Nylonnetz (200 µm)

Kodak, Stuttgart

- X-OMAT Scientific Imaging Film, Format 24cm x 30cm
- Entwickler und Fixierlösung

MWG Biotech GmbH, Ebersberg

- Primer für PCR

New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus

- 100 bp DNA-Ladder, N3231S
- RNA-Ladder (Bright Star™ Biotinylated RNA Millennium™ Markers)

Pharmacia Biotech

- Oligo-dT (pd(T)₁₂₋₁₈)

Pierce, Rockford Illinois, USA

- West Pico Chemiluminescent Substrat

Promega/Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg

- Natriumacetat 3 H₂O
- Tris-Base
- Mineralöl
- M-MLV reverse Transkriptase und 5-fach RT-Puffer

PromoCell, Heidelberg

- Endothelial Cell Basal Medium MV (MCDB 131)
- Supplement Pack: 25 ml fetales Kälberserum, 5 µg hEGF, 500 µg Hydrokortison, 25 mg Gentamycinsulfat

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

- Biotin-16-2'-desoxy-uridin-5'-triphosphat
- Complete Mini Proteinase Inhibitoren

Roth-Chemie GmbH & Co, Karlsruhe

- Aceton
- Ammoniumperoxydisulfat (APS)
- Borsäure
- Chloroform
- Diethylcyanophosphonat (DEPC)
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- dNTP Roti-Mix PCR 3
- Ethanol (70% und 95%)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
- Ethidiumbromid
- Formaldehyd (37%), stabilisiert mit 10 % Methanol
- Glycerol
- Harnstoff
- Isopropanol
- MOPS (C₇H₁₅NO₄S)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)

- Sodiumdodecylsulfat (SDS)
- Trinatriumcitratdihydrat
- Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen

Schleicher & Schuell, Dassel

- Nylonmembrane (Nytran SuPerCharge)
- Chromatographiepapier (Nytran TurboBlotter-System), GB002, GB004
- Protran BA83 Nitrocellulosemembrane

Seromed, Berlin

- Medium 199 (fetales Kälberserum 20 %, Streptomycin 100 µg/ml, Penicillin 100 U/ml, ECGF 10 ng/ml)

Serotec, Düsseldorf:

- anti-human Properdin Antiserum

Serva, Heidelberg

- Acrylamid (38%)/Bisacrylamid (2%)-Lösung
- Trypsin (0.012%, 1:250)

Sigma-Chemie GmbH, Deisenhofen

- Anti- α -Aktin Monoklonale Antikörper
- β -Mercaptoethanol
- Dimethylformamide
- Glycin
- HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure)
- Krebs-Henseleit Puffer
- Kasein
- Kollagenase II (0.074%)
- Kälberserum-Albumin (Fraktion V, 7,5%)
- Natriumchlorid
- Nitroblue Tetrazolium
- Penicillin (100 U/ml)
- Prazosin Hydrochlorid
- Protein-A Sepharose CL-4B
- Streptomycin (100 µg/ml)

- Triton X-100
- Tween 20
- Ulex europäus-1 Lektin (für paramagnetische Beads)

Statens Serum Inst., Dänemark

- Maus Monoklonal anti-human Properdin Antikörper

Tebu, Frankfurt a. M.

- rekombinanter humaner “vascular endothelial growth factor” (VEGF)

2.1.2 Antikörper

- Siehe Tabelle 2-2.

2.1.3 Kits

Ambion, Texas, USA

- Lig’n Scribe

Bio-Rad, California, USA

- Bio-Rad Protein Assay

Pierce; Rockford, USA

- North 2 South Biotin in vitro Transcription

Qiagen, Hilden

- Qiaquick Purification
- Mini-Elute PCR Purification
- RNeasy Mini
- QuantiTect SYBR Green PCR

SuperArray Bioscience Corporation, Maryland, USA

- Human Angiogenesis GEArray Q Series
- Mouse Angiogenesis GEArray Q Series
- GEArray RT-Labeling

Tropix/Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA

- Southern-Star/CDP-Star-Kit

2.1.4 Geräte

Biometra, Göttingen:

- Thermoblock Uno-II Thermocycler
- Typ WT 15 Standard Wipptisch „Rocking Platform“

Bio Rad Laboratories, California, USA

- DNA/RNA Elektrophoresekammer Mini Sub-Gel GT
- Protein Elektrophorese- und Blottingapparat Mini-Protean II
- Power PAC 300, Elektrophorese-Steuereinheit

Corbett Research, Australien

- Real-Time Cyler, Rotor Gene-2000

Coulter Electronics LTD, Luton, Bedfordshire, Großbritannien

- Quecksilber-Viskosimeter

Eppendorf AG, Hamburg

- Zentrifuge 5417R
- Pipetten

Heraeus GmbH, Hanau:

- Reinraumwerkbank Typ Laminair HB 2448
- Brutschrank Hera-cell

Hybaid, Teddington, England

- Shake`n Stack, Hybridisierungssofen

Merk AG, Darmstadt

- Autoklav Typ 23

MWG Biotechnologie, Ebersberg

- GelPrint 2000i Workstation
- CO₂-Begasungsbrutschrank Typ B 50 60 EK/CO₂

Nikon, Tokio, Japan

- Phasenkontrast-Mikroskop DIAPHOT

Pharmacia Biotech, Cambridge, England:

- Gene Quant II Spektrophotometer und 5 mm Quarz ultramicro Küvetten:

Scanalytics/CSDI, Fairfax, Virginia, USA:

- OneDScan

Schleicher & Schuell, Dassel:

- TurboBlotter Transferapparat

Siemens, Cupertino, Kalifornien, USA:

- Infrarotlichtschranke

Stanford University, USA

- ScanAlyze Version 2.35

Victor Recker Krankenhaus- und Laborbedarf, Berlin

- UV-Leuchtschirm Typ OJ II

World Star Atlanta Technology Center, Georgia, USA:

- FotoFinish Zsoft 3.0

Das Kegel-Platte-Gerät wurde in der institutseigenen Werkstatt gebaut

2.1.5 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden angesetzt:

Assay-Puffer 10x Tris Base 200 mM; MgCl₂ 6H₂O 10 mM

Blotting Puffer (Western Blot): 25 mM Tris, pH 8.3, 193 mM Glycin, 20% Methanol

Blockierungspuffer 0.2% Block Pulver-I (Tropix, Bedford, USA) in Waschpuffer

DEPC-Wasser: 1% DEPC in Aqua bidest; über Nacht schütteln; 2 x für 50 min. bei 1 bar autoklavieren

FA-Puffer 10-fach: MOPS 41,9 g, Na-Acetat 3H₂O 6,8 g, 20 ml EDTA 0,5 M, DEPC-H₂O (auf 1000 ml auffüllen)

IP-Puffer: PBS 2X, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Kasein

Ladepuffer 5X (RNA): FA Puffer 10-fach 2 ml, Formaldehyd 37% 360 µl, Glycerol 100% 1 ml, Formamid 1.6 ml, EDTA 0.5 M pH 8.0 40 µl, gesättigte Xylencyanol Lösung 8 µl, gesättigte Bromphenol Blau Lösung 8 µl, H₂O-DEPC auf 5 ml

Ladepuffer 6X (DNA): 10% Ficoll, 1 M Tris, 500 mM EDTA, 1% Bromophenolblau, 1% Xylencyanol

Laufpuffer (Northern Blot): FA Buffer 10x 100 ml, Formaldehyd (37%) 20 ml, DEPC-H₂O (auf 1000 ml auffüllen)

Laufpuffer (Western Blot): 25 mM Tris, pH 8.3, 193 mM Glycin

PBS 5x: Na₂HPO₄ 2H₂O (0,58 M) 51,6 g, NaH₂PO₄ H₂O (0,17 M) 11,7 g, NaCl (0,68 M) 20 g, Aqua bidest (auf 1000 ml auffüllen)

SDS 20%: SDS 40 g in Aqua bidest

SDS-PAGE Lade Puffer: 62 mM Tris, pH 6.8, 10% Glycerol, 2% SDS, 0.01% Bromophenol Blau

SSC 20x: NaCl 175,3 g, Na-Citrat 88,2 g, Aqua bidest (auf 1000 ml auffüllen)

TBE 10 x: 89 mM Tris, 89 M Borsäure, 25 mM EDTA

TBST: 25 mM Tris, pH 7.6, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20

Waschlösung 1: SSC 2x, SDS 1 %

Waschlösung 2: SSC 0.2x, SDS 1 %

Waschpuffer: 1x PBS, SDS 0.1%

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Humane Nabelschnurvenen Endothelzellen (HUVEC)

Endothelzellen wurden aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) gewonnen (Jaffe, E. A. et al., 1973). Die Nabelschnüre wurden nach Trennung von der Plazenta in HBSS bei 4°C aufbewahrt. Mit einer Knopfkanüle erfolgte die Sondierung der Vene, Blutrückstände wurden durch Spülen mit 50 ml PBS entfernt. Zur Ablösung der Endothelzellen wurde die Vene mit einer Nabelschnurklemme verschlossen und mit Kollagenase Typ II (0,2 % in PBS) bei 37°C für 15 min inkubiert. Nach Spülen der Außenseite mit Ethanol 70% wurde das untere Ende der Nabelschnur oberhalb der Klemme abgeschnitten und der austretende Inhalt in einem Blue-Max-Reaktionsgefäß aufgefangen. Es folgten zwei weitere Spülungen mit je 20 ml HBSS. Dann wurden die Endothelzellen pelletiert (5 min bei 200×g) und in 10 ml Kulturmedium (MCDB 131: Knedler, A.; Ham. R. G., 1987) plus Supplement Pack MV[®] (25 ml fetales Kälberserum, 2 ml endothelialer Wachstumszusatz (Heparin, 5 µg hEGF, 500 µg Hydrokortison, 25 mg Gentamicinsulfat) resuspendiert. Die Zellen wurden in eine mit Fibronectin beschichtete Zellkulturflasche eingesät und bei 37°C, 5% CO₂ und 99% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage erneuert. Nach Erreichen der Konfluenz (4-10 Tagen) wurden die Endothelzellen mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gespült und mit 5 ml Trypsin (0,5 %)/EDTA (0,2 %) für ca. 5 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in ein steriles 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml PBS aufgenommen und zentrifugiert (200×g, 5 min). Das Zellpellet wurde in 20 ml Medium resuspendiert und in zwei Petrischalen eingesät. Nach erneuter Konfluenz wurden die Zellen für die Strömungs- oder VEGF Versuche eingesetzt.

2.2.1.2 Humane koronare mikrovaskuläre Endothelzellen (HCMEC)

Humane koronare mikrovaskuläre Endothelzellen wurden von explantierten menschlichen Herzen gewonnen (Zakrzewicz, A. et al., 1997). Unmittelbar nach der Explantation des Herzens wurde ein Muskelsegment von ca. 25 g Gewicht, das dem von einer Koronararterie versorgtem Areal (meistens das der linken absteigenden Arterie) entspricht, herausgeschnitten und in Ringerlösung bei 4°C bis zu 24 Stunden aufbewahrt. Die Oberfläche des Muskelsegments wurde kurz mit 70 %igem Ethanol gespült, um die endokardialen Endothelzellen zu devitalisieren. Das Präparat wurde in einem modifizierten Langendorff-Perfusionssystem befestigt. Nach Einlegen einer Kanüle in die Koronararterie wurde das Segment mit Krebs-Henseleit Puffer mit Ca^{2+} und anschließend ohne Kalzium Zusatz bei 37°C durchspült. Der Herzmuskel wurde mit einer Enzym-Lösung, bestehend aus Kollagenase II (0.074 %), Dispase (0.012 %, 5.000 U/ml), Trypsin (0.012 %) und Kälber-Serumalbumin (0.27 %) in kalziumfreiem Krebs-Henseleit Puffer durchspült. Der Perfusionsdruck wurde auf 60 cm H_2O eingestellt. Nach 30-minütiger Perfusion wurde das schon teilweise zersetzte Gewebe weiter in der Enzymlösung für 20 min verdaut. Das unverdaute Gewebe wurde mittels Filtrierung durch ein Nylonnetz (200 μm Maschenweite) zurückgehalten, während Kapillarfragmente das Netz passierten. Die Kapillarfragmente wurden pelletiert und anschließend in Gelatine-beschichtete T-75 Flaschen ausgesät. Die Zellen wurden in Medium 199 weiter kultiviert. Bei der ersten Passage erfolgte eine weitere Aufreinigung der mikrovaskulären Endothelzellen, indem sie durch Bindung an *Ulex europäus-I* beschichtete paramagnetische Beads von Perizyten getrennt wurden. Konfluenten HCMEC (3-5 Passage) Monolayer in Petrischalen wurden für Strömungsexperimente eingesetzt.

2.2.2 Endothelzellenstimulation

2.2.2.1 Strömungsexposition mit dem Kegel-Platte-System

In Zusammenarbeit mit der Feinmechanikabteilung des Instituts wurde für die Strömungsversuche ein Kegel-Platte-System konstruiert, dessen Aufbau sich an

den Vorgaben von Bussolari und Dewey orientiert (Bussolari und Dewey, 1982) (Abb. 2-1).

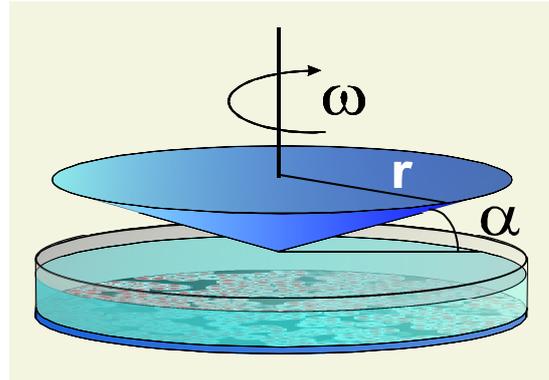


Abb. 2-1 Kegel-Platte-System (Photo)

Endothelzellen wurden in Petrischalen zur Konfluenz kultiviert und in einem solchen Kegel-Platte-Apparat platziert. Während des Versuchs wurde die Apparatur im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Durch Mitnahme des Zellkulturmediums über dem am Boden der Petrischale haftenden Endothel-Monolayer, erzeugt ein rotierender Kegel Scherkräfte, die auf die Endothelzellen wirken. Die Wandschubspannung in einem solchen System wird durch die Formel (1) berechnet.

$$(1) \tau = \eta \cdot \frac{\omega \cdot r}{\tan \alpha \cdot r}$$

τ : Wandschubspannung (dyn/cm²)
 ω : Winkelgeschwindigkeit (rad/s)
 η : dynamische Viskosität (dyns/cm²)
 α : Kegelwinkel (rad)
 r : Bahnradius (cm)



Bei einem festen Kegelwinkel und bekannter Viskosität des Mediums (0.0075 dyn·s·cm⁻²) ist die Wandschubspannung von der Winkelgeschwindigkeit abhängig und durch Änderung der Umdrehungszahl wählbar.

Analog zur Reynoldszahl kann der durch Gleichung (2) beschriebene Parameter genutzt werden um abzuschätzen, ob die Strömung in einem Kegel-Platte-Apparat laminar oder turbulent ist.

$$(2) Re = \frac{r^2 \cdot \omega \cdot \alpha^2}{12 \cdot \nu}$$

ν = kinematische Viskosität = η/ρ (Dichte)

Nach den von Sdougos erweiterten Navier-Stokes-Gleichungen liegt bei Werten von $Re < 1$ vorwiegend laminare Strömung vor (Sdougos et al., 1984). Vorwiegend turbulente Strömung wird bei $Re \geq 1$ beobachtet.

Typischerweise wurden Endothelzellen bei einem Kegelwinkel $\alpha=1^\circ$ Wandschubspannungen von 0.6 dyn/cm² (13 UpM), 1.0 dyn/cm² (22 UpM), 2.0 dyn/cm² (45 UpM), 3.0 dyn/cm² (67 UpM) und 6.0 dyn/cm² (134 UpM) über jeweils 24 h ausgesetzt. Unter diesen Bedingungen liegt über der gesamten Petrischale laminare Strömung vor.

Zur Erzeugung überwiegend turbulenter Strömung wurde ein Kegelwinkel $\alpha=2,5^\circ$ bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 300 UpM verwendet. Unter diesen gewählten Versuchsbedingungen werden über 90 % der Endothelzellen turbulenter Strömung ausgesetzt. Für laminare Strömung rechnerisch ergäbe sich eine Wandschubspannung von $5,4 \text{ dyn/cm}^2$, da jedoch die Umdrehungsgeschwindigkeit des Kegels kontrolliert wird, muss bei turbulenter Strömung eine höhere Wandschubspannung auf die Endothelzellen wirken.

Als Kontrolle zu strömungsexponierten Endothelzellen dienten Zellen derselben Isolation und Passage, die unter statischen Bedingungen, d.h. ohne Strömung kultiviert wurden.

2.2.2.2 VEGF Behandlung

HUVEC wurden in Petrischalen zur Konfluenz kultiviert und mit "vascular endothelial growth factor" (VEGF) (40 ng/ml; Tebu, Frankfurt a. M) für 24 Stunden stimuliert. In zusätzlichen Versuchen wurden HUVEC nach Zugabe von VEGF für 24 Stunden einer laminaren Wandschubspannung von 6 dyn/cm^2 ausgesetzt.

2.2.3 Zellernte

Nach der Strömungsexposition oder VEGF-Stimulation erfolgte die Ernte. Das Zellkulturmedium wurde abgegossen und der Zellrasen zweifach mit 5 ml PBS gespült. Nach Ablösung durch fünfminütige Inkubation mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (0,5% Trypsin/0,2% EDTA) bei 37°C wurden die Zellen in ein 50 ml Blue-Max[®] Reaktionsgefäß übertragen und fünf Minuten bei $300\times g$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Kryogefäß übertragen und erneut mit $300\times g$ fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Kryoröhrchen mit dem Zellpellet bei -196°C in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.2.4 RNA-Isolierung von Endothelzellen

Die Gesamt-RNA (gRNA) der geernteten Endothelzellen wurde mit dem RNeasy-Kit der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. Dabei kam das Protokoll des Herstellers zur Anwendung. Nach Auftauen der gelagerten Zellen wurden diese unter Verwendung eines milden Detergens (RLT-Puffer) und β -Mercaptoethanol durch Scherkräfte lysiert. Bei der anschließenden Zentrifugation adsorbiert die freigewordene RNA an der Silikongelmembran einer kleinen Trennsäule. Nach mehreren Waschkvorgängen wird die adsorbierte RNA mit 40 μ l RNase-freiem Wasser ausgewaschen und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

2.2.5 Reverse Transkription

Die gRNA wurde mittels reverser Transkriptase und Oligo-dT als Primer in Komplementär-DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurden 2 μ g gRNA und 2.5 μ M Oligo-dT mit DEPC-Wasser auf 15 μ l aufgefüllt. Die RNA wurde für 8 min bei 70°C denaturiert und zur Vermeidung von Rückfaltungen sofort in ein Eisbad überführt. Zehn μ l eines RT-Puffer-Mix (2.75 μ l H₂O; 5 μ l 5-fach RT-Puffer; 1.25 μ l 10 mM dNTP, 1 μ l [= 200 U] reverse Transkriptase) wurden zu der denaturierten gRNA hinzugefügt. Die reverse Transkription erfolgte bei 42°C für 60 min. Nach Inaktivierung der reversen Transkriptase (70°C für 10 Minuten) wurde die cDNA mit 18 μ l DEPC-Wasser verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.6 Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Primer für die PCR Amplifizierung sind in Tabelle 2-1 aufgelistet. Die Primer wurden mit dem „Primer3“-Programm (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) des Whitehead Institute for Biomedical Research in Cambridge, Massachusetts, USA, ausgesucht (Rozen und Skaletsky, 1996). Für

die Suche wurden folgende Kriterien gewählt: 100-1000 bp Produktlänge, 20-27 bp Primerlänge, 58-65°C „annealing“ Temperatur, 40-60% CG Gehalt.

Tab. 2-1 Primer für die PCR

Name	Acc. Nr.	Sequenz (5'-3')	Produkt Länge (bp)	Zyklen Bedingungen	Anz.
GAPDH	X01677	l: GGTCGGAGTCAACGGATTTGGT r: TGTGGGCCATGAGGTCCACCAC	977	94°C für 30" 58°C für 30" 72°C für 75"	22
CNP	M64710	l: TGCGCGTGGACACCAAGTCG r: GGGGCGCCGCACTAACATCC	167	94°C für 30" 58°C für 30" 72°C für 30"	25
ET-1	BC009720	l: GTTTGTCTTAGGTGTTCTC r: TCAACACTCCCAGACACGTT	308	94°C für 30" 58°C für 30" 72°C für 30"	25
TSP-1	NM_003246	l: CTCAGGGATACTCGGGCCTTTCT r: AATCTTTCCAGCCTATGTGACGAGG	150	94°C für 30" 63°C für 30" 72°C für 30"	20
TSP-2	NM_003247	l: CTTCTATGTGGTGATGTGGAAGCAG r: AGGAGGTGCTGCTAGAGAGAGAAGC	515	94°C für 30" 63°C für 30" 72°C für 60"	33
METH-1/ ADAMTS-1	AF060152	l: TACACGATGAGGGAATGTGACAACC r: GCAAAACGAAGAAGTAGCCAATGC	280	94°C für 30" 63°C für 30" 72°C für 30"	25
METH-2/ ADAMTS-8	AF060153	l: GCCAAGTACCAGTCATGCCACAC r: CTCGAACACTTTGAACTCGCTCCT	210	94°C für 30" 63°C für 30" 72°C für 30"	38
pNPI/ ADAMTS-2	HSAJ3125	l: CCATCCTGACAACCCCTACTTTTG r: GTCCTCGTCTCTGTACTCCCACTCC	850	94°C für 30" 63°C für 30" 72°C für 75"	38
BAI-1	NM_001702	l:ACAGAGATTTTCCGGAGAGCGTACT r:ACAGGCAGAAGTTGATGAGGATGAC	889	94°C für 30" 63°C für 30" 72°C für 75"	33
Properdin	X57748	l: AGACTGCTGTCTCAACACTGCCTTT r: ACACTTGGGAGCAGGGTGATTACAG	349	94°C für 30" 63°C für 30" 72°C für 30"	28
CD36	NM_000072	l: GTGCAATCTTCGAACCTTCACTA r: TGTCTGGGTTTTCAACTGGAGAG	570	94°C für 30" 63°C für 30" 72°C für 60"	31
GAPDH- nested *	X01677	l: CATGACAACCTTTGGTATCGTGG r: GTAGAGGGCAGGGATGATGTTCT	140	94°C für 15" 56°C für 30" 72°C für 75"	45
CD36- nested *	NM_000072	l: GCTGCATCCCATATCTAT r: CGGAACCAAACCTCAAAAA	144	94°C für 15" 56°C für 30" 72°C für 75"	45

* Primer für Real-Time PCR

2.2.7 Semiquantitative PCR

Vier µl (entsprechend 200 ng der ursprünglichen gRNA) der cDNA-Präparation (2.2.5) wurden für die semiquantitative PCR eingesetzt. Als negative Kontrolle galt ein PCR Ansatz in dem nicht umgeschriebenen gRNA (keine reverse Transkription) als Template benutzt wurde. Der PCR-Ansatz (50 µl) enthielt: 1x PCR-Puffer (7.5 mM Tris-HCl, pH: 8,8; 2 mM (NH₄)₂SO₄); 1.5 µM MgCl₂; 1 µM Primer (für GAPDH 0.02 µM); 0.2 µM dNTP, 1 U Taq Polymerase. Um Verdampfung zu vermeiden wurde der Ansatz mit Mineralöl überschichtet. Im Thermocycler wurden die Proben zu Anfang denaturiert (94°C, 2 min), in einer variablen Anzahl von Zyklen amplifiziert (siehe Tab. 2-1 für Amplifizierung Bedingungen) und zum Abschluss einer Endelongation unterzogen (72°C, 5 min). Für jedes Gen wurde eine Anzahl von Zyklen ausgewählt, bei dem die PCR sich im linearen Bereich der Amplifizierung befand (siehe Ergebnisse). Um die Konzentrationsschwankungen unterschiedlicher cDNA-Pools zu glätten, wurde das „House-Keeping-Gene“ Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) amplifiziert (Wang et al., 1989). GAPDH ist ein konstant exprimiertes Gen und die Ergebnisse der Amplifizierung für jedes untersuchte Gen wurden mit den Werten für GAPDH normiert.

Die Produkte der semiquantitativen-PCR wurden durch Agarosegel Elektrophorese aufgetrennt. Zehn µl der PCR-Reaktion wurden mit 2 µl des 6-fach Ladepuffers vermischt und auf ein 1-2 % Agarosegel in 1x TBE geladen. Als Elektrophoresepuffer diente 1x TBE. Die Betriebsspannung betrug 80 Volt, die Laufzeit ca 1 h. Die Gele wurden durch ein fünfminütiges Tauchbad in Aqua bidest. mit 0,5% Ethidiumbromid auf dem Wipptisch gefärbt. Nach einem weiteren fünfminütigen Tauchbad in Aqua bidest. erfolgte die digitale Erfassung der Banden sowie ihre densitometrische Auswertung.

2.2.8 Erstellung biotinylierten RNA-Sonden

Zur Synthese biotinylierter RNA-Sonden wurden die RT-PCR Produkte (2.2.7) für TSP-1, METH-2, Properdin und GAPDH mit dem Qiaquick Kit (Qiagen, Hilden)

nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurden die Produkte durch eine T4-Ligase-Reaktion mit einem T7-Promotor verbunden (Lig'nScribe, Ambion, Austin, Texas, USA). Der Reaktionsansatz (10 µl) enthielt: 6,0 µl H₂O, 1 µl T4 DNA Ligase Puffer (10-fach), 1 µl T7 Adapter (Promotor), 1 µl PCR Fragment (ca. 20 ng), 1 µl T4 Ligase. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine PCR. In dieser PCR wurde ein Primer, der im Bereich des T7-Promotor-Adapters bindet entweder mit dem Gen-spezifischen 5'-Primer oder 3'-Primer kombiniert. Wird der Gen-spezifische 5'-Primer eingesetzt, so resultiert ein Amplifikationsprodukt, dessen sense-Strang den T7-Promotor am 3'-Ende trägt, sodass hiervon ausgehend die T7-RNA-Polymerase eine anti-sense RNA erzeugt. Wird der Gen-spezifische 3'-Primer eingesetzt, so resultiert ein Amplifikationsprodukt, dessen anti-sense-Strang den T7-Promotor am 3'-Ende trägt, sodass hiervon ausgehend die T7-RNA-Polymerase eine sense RNA erzeugt. Der Gen-spezifische 5'-Primer führt also zu einer anti-sense-RNA als Sonde für den Northern Blot, der Gen-spezifische 3'-Primer dagegen zu einer sense-RNA, die im Northern Blot als negative Kontrolle eingesetzt wurde. Der PCR-Ansatz (50 µl) enthielt: 32,6 µl H₂O; 5 µl 10x Puffer (75 mM Tris-HCl, pH: 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄); 3 µl MgCl₂; 1 µl dNTP; 1,25 µl Adapterprimer 1; 1 µl spezifischer Primer (5'- oder 3' Primer jeweils 2.5 µM); 1 µl Taqpolymerase und 2 µl aus der T4-Ligase-Reaktion als Template. Nach einer Anfangsdenaturierung (94°C, 2 min) folgten 30 PCR-Zyklen (94°C, 30 sek; 63°, 30 sek; 72°, 2 min) und eine Endelongation (72°C, 5 min). Die PCR-Amplifikate wurden mit Qiaquick Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und ihre Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt.

Mit dem North2South-Kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA) wurden die mit dem T7-Promotor verbundenen cDNA-Fragmente in RNA transkribiert und dabei mit Biotin markiert. Der Ansatz für die Transkription enthielt: 4 µl 5x Reaktionspuffer; 2 µl DTT 0.1 M; 10 µl 2x NTP Mix (4 mM ATP, 4 mM UTP, 4 mM GTP, 1 mM CTP/Biotin-14 CTP); 2 µl DNA Templates (entspr. 0,6 µg); 1 µl Ribonuclease Inhibitor; 1 µl T7-RNA-Polymerase; 2 µl nukleasefreies H₂O. Nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz durch Kochen für 5 min denaturiert. Zur Verdauung des DNA Templates wurden 2 µl DNase I (2 units) hinzugefügt und erneut bei 37°C für 15 min inkubiert. Die synthetisierte RNA-Sonde wurde durch

Zugabe von 12,5 µl Lithiumchlorid 7.5 M und anschließender Zentrifugation (15 000×g, 60 min., 4°C) präzipitiert. Das RNA-Pellet wurde mit eiskaltem Ethanol (500 µl, 70%) gewaschen und in 20 µl nukleasefreiem Wasser gelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurden biotinmarkierte RNA-Sonden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.9 Northern Blot

Gesamt-RNA (10-15 µg) aus den jeweils zu analysierenden Zellen wurde in 5-fach Ladepuffer aufgenommen, bei 70°C für 8 min denaturiert und durch Elektrophorese in einem Formaldehyd-Agarosegel (1%) aufgetrennt (60 V für 2-3 h). Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Aqua bidest. (3 min) und 0,05 M NaOH (5 min) gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen und durch partielle Hydrolyse den Transfer der RNA zu erleichtern. Anschließend wurde das Gel für 5 min in 10 x SSC gewaschen. Der Transfer der RNA aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran (Supercharge, Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland) erfolgte in der Form des „downward transfers“ mit einem TurboBlotter™ (Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland) in 20 x SSC (3-4h). Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran kurz in 10 x SSC gewaschen und durch beidseitige UV-Bestrahlung (254 nm, 2 x 2 min) wurde die RNA unter UV-Licht mit der Nylonmembran quervernetzt. Um die gleichmäßige Beladung des Gels zu dokumentieren, wurde mit einer digitalen Kamera die 18S- und 28S-Untereinheiten der ribosomalen-RNA aufgenommen.

Um durch Absättigung unspezifischer Bindungsstellen den Hintergrund zu minimieren wurde die Membran bei 68°C in 10 ml ULTRAhyb Puffer (Ambion, Austin, Texas, USA) unter drehender Bewegung für 1 h prähybridisiert. Anschließend wurde die Membran bei 68°C in 10 ml ULTRAhyb Puffer mit der zuvor hitzedenaturierten (96°C, 2 min) biotinylierten antisense RNA-Sonde (10 ng Sonde pro ml Puffer) für 16 h (über Nacht) inkubiert. Für die negative Kontrolle wurde die Membran mit der biotinylierten sense RNA-Sonde hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran bei 68°C 2 x 10 min mit Waschlösung 1 (niedrig-stringent) und 2 x 20 min mit Waschlösung 2 (hoch-stringent) gewaschen.

Zum Nachweis der Biotin-markierten Sonde wurde die Membran in Blockierungspuffer für 1 h und anschließend in Blockierungspuffer plus Streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase (Avidx-AP™, Tropix/Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) für eine weitere Stunde inkubiert. Nach 4 Waschvorgängen wurde die Membran mit 1x-Assay Puffer äquilibriert und anschließend mit dem Substrat CDP-Star™ inkubiert (5 min). Die ausgelöste Chemilumineszenz wurde autoradiographisch detektiert und die entwickelten Filme wurden mit einer CCD-Kamera digitalisiert. Die Banden wurden densitometrisch (One-D-Scan) ausgewertet und der Wert wurde in Relation zur korrespondierenden 18S-, 28S- oder GAPDH-Bande als Quotient angegeben.

2.2.10 Echt-Zeit-PCR (Real-Time PCR)

Die Real-Time PCR erlaubt Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der exprimierten mRNA einer Zelle. Für eine quantitative Messung ist die Erstellung einer Standardkurve für das zu untersuchende Gen (CD36) und für ein „Housekeeping“ Gen (GAPDH) notwendig. Die durch RT-PCR (2.2.7) generierten Produkte für CD36 (570 bp) und GAPDH (955 bp) (Tab. 2-1) wurden mit dem MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und als Standard benutzt. Die Konzentration der aufgereinigten Produkte wurde photometrisch (260 nm) bestimmt und durch Verwendung der Formel

Konzentration / (Basenpaarlänge x 660) x 6.022 x 10²³ = Anzahl der Moleküle / µl

die Anzahl der Moleküle / µl berechnet. Für CD36 und GAPDH wurde eine Verdünnungsreihe von 10¹⁰ bis 10² Kopien/µl hergestellt die für die Erzeugung der Standardkurve für die Real-Time PCR benutzt wurde (Abb. 2-2). Für die Real-Time Amplifizierung wurden „nested“ Primer (Tab. 2-1) verwendet, die innerhalb der Sequenz der Standards lagen und ein Produkt von ca. 150 bp generierten. Als Template diente die Verdünnungsreihe der Standards für CD36 oder GAPDH sowie die von den zu untersuchenden Endothelzellen durch reverse Transkriptase herstellte cDNA (2.2.6). Der Reaktionsansatz enthielt 1 µl der jeweiligen Probe oder Verdünnungsreihe, 4 µl der „nested“ Primer für CD36 oder GAPDH (1.6 µM), 5 µl

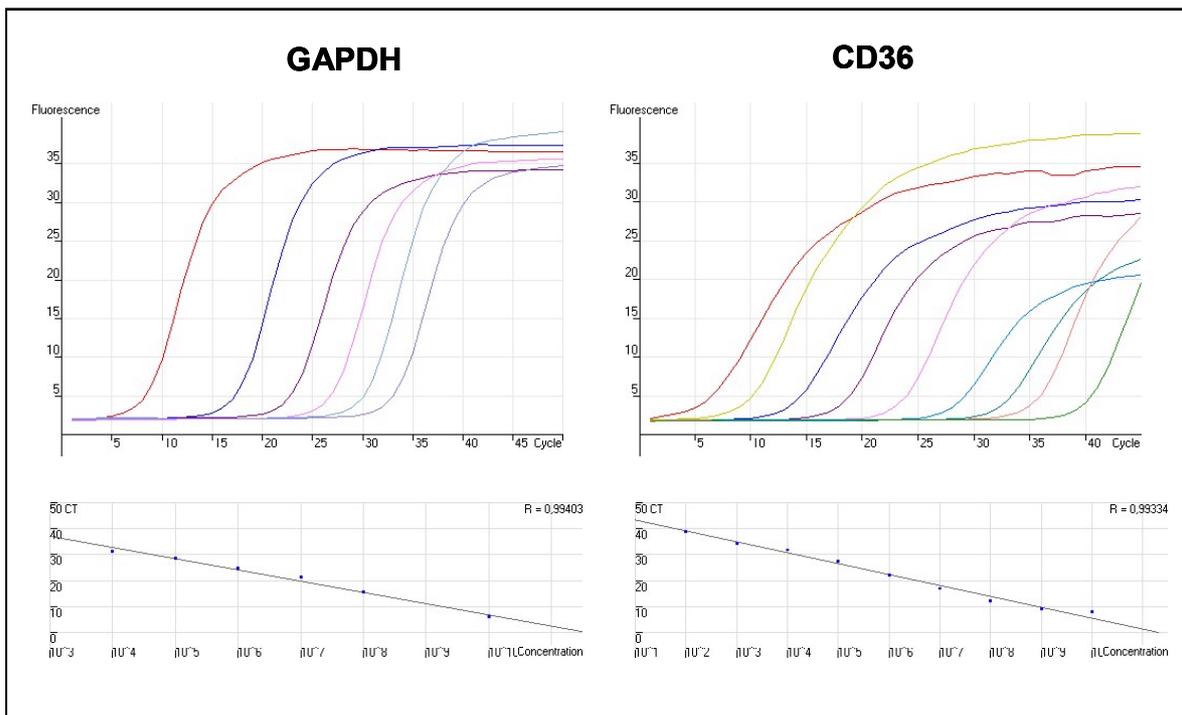


Abb. 2-2 Echtzeit-PCR: Standardkurven für GAPDH und CD36

Oben: Rohdaten der Echtzeit-PCR zur Erstellung von Standardkurven für GAPDH (10^{10} - 10^4 Moleküle/ μ l) und CD36 (10^{10} - 10^2 Moleküle/ μ l). Die Anwesenheit eines einzigen Produkts jeder Amplifizierung wurde durch Berechnung der Schmelzkurve und Agarose-Gel Analyse geprüft. *Unten:* Errechnete Standardkurven für GAPDH und CD36. Die Effizienz der Amplifikation beider Gene war vergleichbar.

DEPC-Wasser und 10 μ l Mastermix SYBR-Green (QantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen, Hilden). Folgende Schritte wurden für den Real-Time Cycler (Rotor Gene 2000, Corbett Research, Australien) eingestellt:

Denaturierung: 95°C für 900 s

Amplifizierung: 94°C für 15 s; 56°C für 30 s; 72°C für 75 s (45 Wiederholungen)

Endelongation: 50°C für 60 s

Schmelzung: 50°C bis 95°C je 5 s

Die Auswertung der so entstandenen Rohdaten und die Erstellung der Standardkurven erfolgte mit dem Rotor Gene Programm. Für jede der untersuchten Proben wurde der durch die Standardkurve errechnete Wert für CD36 mit dem entsprechenden Wert für das „housekeeping“ Gen GAPDH normiert ($CD36_{\text{Wert}}/GAPDH_{\text{Wert}}$). Damit konnten mögliche Schwankungen der verschiedenen cDNA-Pool ausgeglichen werden.

2.2.11 Prazosin-Behandlung, Gewebeentnahme und Verarbeitung

Gesunde männliche C57/B16 Mäuse (3 Monate alt, Gewicht 27 g bis 29 g) wurden mit 50 mg/l Prazosin (Sigma, München) im Trinkwasser für 3-17 Tage behandelt. Die Mäuse wurden durch Überdosierung einer Barbituratnarkose getötet und der Musculus tibialis anterior (TA) und/oder der Musculus extensor digitorum longus (EDL) entnommen. Das Gewebe wurde für die histochemische Untersuchung, die Isolierung von gesamt RNA (gRNA), die Isolierung der Endothelfraktion und die Bestimmung der Proteinexpression verwendet (2.2.12).

2.2.11.1 Histochemie

Für die histochemische Untersuchung wurde der jeweilige Muskel mit Tissue Tek auf Korkplatten befestigt und in Methylbutan (gekühlt mit flüssigem Stickstoff) eingefroren. Zehn µm dicke Kryoschnitte wurden angefertigt und in Chloroform/Aceton für 5 min bei 4°C fixiert. Für die Färbung der Kapillaren wurde die Reaktion der unspezifischen alkalischen Phosphatase genutzt, die nur in Kapillarendothelien exprimiert wird. Die Schnitte wurden in 1 ml Tris 0.1 M, pH 9.4, plus 0.3 mg 5-Br-4-Cl-3-indoxyl-phosphate (in 50 µl Dimethylformamide gelöst) und 1 mg Nitroblue Tetrazolium für 1 h bei 37°C inkubiert. Die histochemische Reaktion wurde durch gründliches Waschen gestoppt. Die Schnitte wurden mit PBS/Glycerol (1:2) montiert und mit einem Durchlichtmikroskop betrachtet.

2.2.11.2 RNA-Isolierung aus Muskelgewebe

Das entnommene Gewebe wurde in RNA-Later (Ambion, Austin, Texas, USA) stabilisiert und die gesamt-RNA mit dem RNeasy-Kit der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. Das Gewebe (30 mg) wurde mit einem Dounce Homogenisator in RLT Lysispuffer homogenisiert und anschließend bei 15000×g zentrifugiert. Der Überstand wurde nach dem Protokoll des Herstellers (2.2.4) weiterverarbeitet und die Konzentration der gewonnenen RNA photometrisch bestimmt.

2.2.11.3 Isolierung der Endothelzellfraktion

Die Endothelzellfraktion vom Skelettmuskel der Maus wurde durch sukzessiven Kollagenase-Verdau und BS-1 Lektin Bindung gewonnen (Abb. 2-3a). Gewebeprouben (250-500 mg) des TA und des EDL wurden mit dem Skalpell in kleine Stücke (kleiner als 5 mm³) in HBSS zerkleinert und durch Filtrierung durch ein Netz (40 µm Maschenweite, Falcon, USA) die Blutzellen entfernt. Das zerkleinerte Gewebe wurde mittels 0,5 ml Kollagenase II (0,8%; Biochrom, Berlin) bei 37°C für 30 min verdaut und anschließend durch ein weiteres Netz (100 µm Maschenweite, Falcon, USA) filtriert. Die so gewonnenen Zellen und Zellaggregate wurden durch Zentrifugation bei 400×g für 3-5 Minuten gesammelt und in 0,5 ml Kollagenase II (0,4%) bei 37°C für 5-10 Minuten unter Rotation inkubiert. Nach erneuter Filtration durch ein Netz mit 40 µm Maschenweite wurden die Zellen abzentrifugiert (400×g; 5 min) und in 2 ml HBSS plus 5% fetales Kälberserum aufgenommen (Zelluläre Fraktion).

Für die Isolierung der Endothelzellfraktion wurden *Bandeiraea simplicifolia* (BS)-1 Lektin-konjugierte Dynalbeads® (5 µg Lektin / 10⁷ Beads, Dynal, Hamburg) zu der zellulären Fraktion addiert und für 30 min bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die an die Beads bindenden Endothelzellen wurden 5x mit HBSS plus 0.1% BSA gewaschen und für die Proteinanalyse eingesetzt.

Die Reinheit der isolierten Endothelzellen wurde durch Western Blot für e-NOS (Endothelzell-spezifisch) und α-Aktin (Muskelzell-spezifisch) untersucht (Abb. 2-3b). Im Vergleich zu dem Gesamt-Muskelhomogenat zeigte die Endothelzellfraktion eine deutliche Anreicherung des e-NOS-Gehaltes während α-Aktin nicht mehr nachweisbar war.

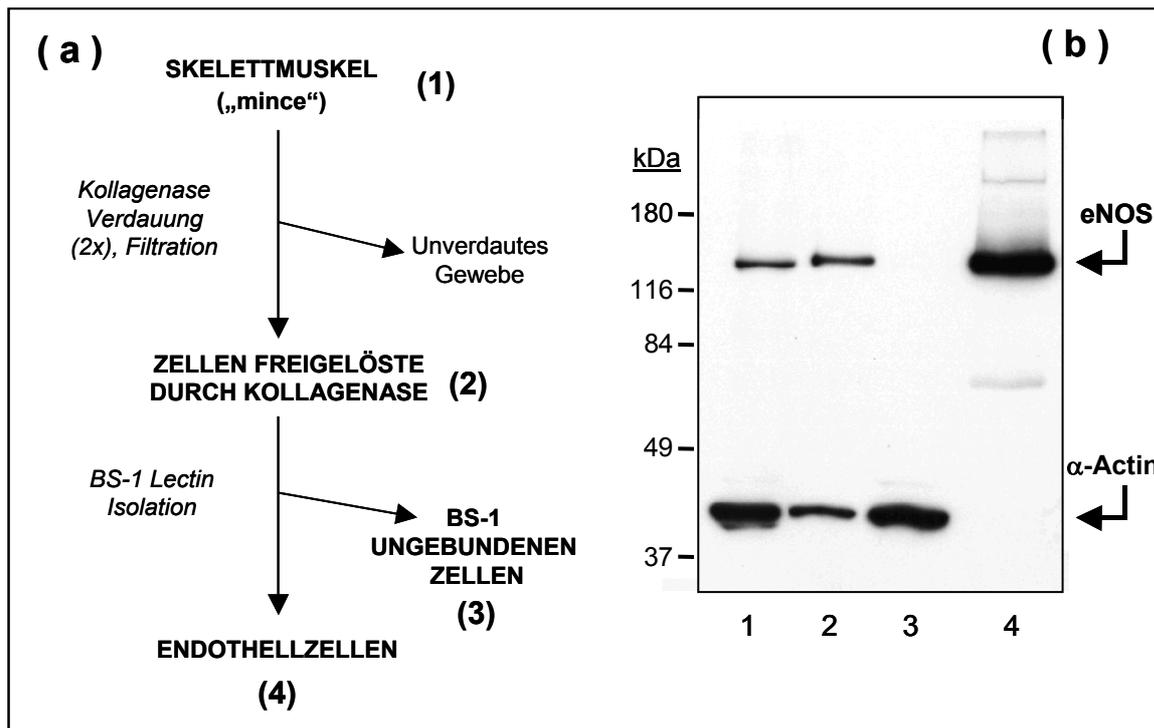


Abb. 2-3 Isolierung der Endothelzellfraktion aus der Skelettmuskulatur der Maus. (A) Schematisches Diagramm des Aufreinigungsvorganges, basiert auf zwei Kollagenase Verdauungen und einen anschließenden Isolierungsschritt mit BS-1 Lektin. (B) Nachweis von eNOS (Endothelzellmarker) und α -Aktin (Skelettmuskelmarker) in den verschiedenen Fraktionen während des Aufreinigungsvorganges. Zwanzig μ g Proteine jeder Fraktion wurden durch Western Blot mit Antikörper gegen e-NOS und α -Aktin untersucht. Die Zahlen an den Spuren entsprechen den Zahlen in dem schematischen Diagramm.

2.2.12 Protein Analyse

2.2.12.1 Proteinextraktion

Für die Analyse der Proteinexpression in wand Schubspannungsexponierten HUVEC wurde die Strömungsstimulation (6 dyn/cm^2 ; 24 h) in Abwesenheit von Serum ausgeführt. Nach der Strömungsexposition wurde das Kulturmedium (Überstand, 7-8 ml) abgenommen und mit Proteinase Inhibitoren (Complete Mini, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) stabilisiert. Der Endothelzellen-Monolayer wurde mit PBS gewaschen und mit 700 μ l Lysierungspuffer (50 mM Tris, pH 7.8, 150 mM NaCl, 3% CHAPS, 1 mM EDTA, 1 Tablett Complete Mini Proteinase Inhibitoren) für 20 min bei 4°C lysiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation ($20000\times g$; 20 min; 4°C) entfernt.

Für die Protein Untersuchung in Muskelhomogenaten wurden Teile des TA und des EDL von unbehandelten und Prazosin-behandelten Mäuse zerkleinert und mit einem Sorval Potter Homogenisator in Lysierungspuffer (50 mM Tris, pH 7.8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 Tablette Complete Mini Proteinase Inhibitoren) bei 4°C homogenisiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation (20000×g; 20 min; 4°C) entfernt.

Die aus Muskelpräparaten gewonnenen und an Dynabeads gebundenen Endothelzellen (2.2.12) wurden durch Zugabe von 100 µl Lysierungspuffer (50 mM Tris, pH 7.8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 Tablette Complete Mini Proteinase Inhibitoren) für 20 min bei 4°C lysiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation (20000×g; 20 min; 4°C) entfernt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten wurde mit dem Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Hierfür wurde das Protokoll des Herstellers angewandt.

2.2.12.2 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation (IP) von Properdin aus statisch kultivierten und strömungsexponierten HUVEC wurden 5 µl anti-Properdin Antiserum (Serotec, Düsseldorf) mit 5 mg Protein-A Sepharose CL-4B (Sigma-Chemie GmbH, Deisenhofen) in 1 ml IP-Puffer (PBS 2X, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Kasein) für 2-4 h bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Der negativen Kontrolle wurde kein Antiserum zugegeben. Das Sepharose-Antikörper-Konjugat wurde mit IP-Puffer gewaschen und Zelllysate (500 µl) oder Überstände (6 ml) hinzugegeben. Nach der Inkubation über Nacht bei 4°C unter Rotation wurde das Sepharose-Pellet mit IP-Puffer zweimal gewaschen und die gebundenen Proteine wurden in SDS-PAGE Lade-Puffer bei 100°C für 5 min eluiert.

Für die Immunpräzipitation von TSP-1 aus Muskelhomogenaten von unbehandelten und Prazosin-behandelten Mäusen wurden 5 µg anti-TSP-1 polyklonale Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, USA) mit 1 mg Protein-A Sepharose CL-4B (Sigma-Chemie GmbH, Deisenhofen) in 1 ml IP-Puffer (PBS

2X, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Kasein) für 2-4 h bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Das Sepharose-Antikörper-Konjugat wurde mit IP-Puffer gewaschen und Muskellysate (2 mg Proteine) hinzugegeben. Nach der Inkubation über Nacht bei 4°C unter Rotation wurde das Sepharose-Pellet mit IP-Puffer zweimal gewaschen und die gebundenen Proteine wurden in SDS-PAGE Lade-Puffer bei 100°C für 5 min eluiert.

2.2.12.3 Western Blot

Für die Western Blot Analyse wurden Zelllysate, Gewebehomogenate oder Immunpräzipitate durch SDS-Polyacrylamid Elektrophorese (Gele: 10% für Properdin, e-NOS und α -Aktin; 7.5% für TSP-1) getrennt (Lauf Puffer: 25 mM Tris, pH 8.3, 193 mM Glycin) und anschließend die Proteine auf Nitrozellulose Membranen (Protran, Schleicher und Schuell, Dassel) geblottet (Transfer Puffer: 25 mM Tris, pH 8.3, 193 mM Glycin, 20% Methanol). Die Membranen wurden in 5% „non-fat“ Milch blockiert und mit dem ersten Antikörper bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Die Liste der angewandten Antikörper und ihre Verdünnungen ist in Tab. 2-2 erfasst.

Tab. 2-2 Antikörper für Western Blot Analyse

	<i>Antigen</i>	<i>Typ</i>	<i>Firma</i>	<i>Verdünnung (in TBS)</i>
<u>Erste Antikörper</u>	TSP-1 (Mensch)	Maus Monoklonal IgG	Neomarkers, USA	1:500
	Properdin (Mensch)	Maus Monoklonal IgG	Statene Serum Inst., Dänemark	1:2000
	TSP-1 (Maus)	Ziege Polyklonal IgG	Santa Cruz Biotech., USA	1:250
	eNOS (Maus)	Maus Monoklonal IgG	BD Transduction Lab., USA	1:5000
	α -Aktin (Maus)	Maus Monoklonal IgG	Sigma, Deutschland	1:5000
<u>Zweite Antikörper</u> (Peroxidase- konjugiert)	IgG von Maus	Rabbit Polyklonal	DAKO, Dänemark	1:5000
	IgG von Ziege	Rabbit Polyklonal	DAKO, Dänemark	1:5000

Nach drei Waschvorgängen mit TBSt (25 mM Tris, pH 7.6, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20) wurden die Membranen mit dem zweiten Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert) (Tab. 2-2) für 1-2 h inkubiert und anschließend fünf mal in TBSt gewaschen. Nach Zugabe des West Pico Substrats (Pierce, Rockford Illinois, USA) wurde die so entstandene Chemilumineszenz autoradiographisch detektiert und die entwickelten Filme wurden mit einer CCD-Kamera aufgenommen.

2.2.13 Gene Array

Die Erstellung und Biotinylierung der cDNA für die Gene Array Untersuchung wurde mit dem GEArray RT-Labeling Kit (SuperArray Bioscience Corporation, Maryland, USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Der Reaktionsansatz (3 µg gRNA, 3 µl Puffer A mit dem genspezifischen Primer Mix, RNase-freies Wasser auf 10 µl) wurde für 3 min auf 70°C erhitzt und für weitere 2 min auf 42°C gebracht. Zehn µl eines vorgewärmten (42°C) RT-Mix (4 µl Puffer BN, 2 µl Biotin-16-dUTP, 1 µl RNase Inhibitor, 1 µl reverse Transkriptase, 2 µl H₂O) wurden addiert und für 90 min auf 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl Puffer C gestoppt und nach Zugabe von 2 µl Puffer D und 25 µl Puffer E die biotinylierte cDNA bei 68°C für 30 min denaturiert.

Die Hybridisierung der GEArray Membranen erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Membranen wurden in 3 ml vorgewärmten (60°C) GEahyb Hybridisierungslösung mit 100 µg/ml Lachssperma DNA für 1-2 h bei 60°C unter Rotation prähybridisiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung durch einen vorgewärmten (60°C) Mix aus biotinylierter cDNA und 0.75 ml GEahyb Hybridisierungslösung ersetzt und weiter auf 60°C unter Rotation inkubiert (über Nacht). Die Membranen wurden danach bei 60°C 2x15 min mit 5 ml Waschlösung 1 (2X SSC, 1% SDS) und 2x15 min mit 5 ml Waschlösung 2 (0.1X SSC, 0.5% SDS) gewaschen.

Zum Nachweis der hybridisierten biotinylierten cDNA wurden die Membranen in 2 ml GEA-Blockierungspuffer Q für 40 min inkubiert und anschließend in 2 ml Puffer F plus Streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase (1:7500) für

weitere 10 min inkubiert. Nach vier Waschvorgängen (je 5 min) mit 4 ml Puffer F folgte die Äquilibration der Membranen in 1x-Assay Puffer und die Inkubation mit dem Substrat CDP-Star™ (5 min). Die ausgelöste Chemilumineszenz wurde autoradiographisch detektiert und der entwickelte Film mit einer CCD-Kamera digitalisiert. Die Bilder wurden mit ScanAlyze und GEArray Analyzer weiterbearbeitet und ausgewertet.

2.2.14 Statistische Auswertung

Bei Versuchen mit dem Kegel-Platte-System bezieht sich die „n“ Zahl auf die Anzahl der primären HUVEC Isolierungen. Für die semiquantitative PCR wurde jede Probe doppelt bestimmt und die Werte gemittelt. Relative Expressionsänderungen wurden im Paarvergleich auf die zugehörige, unbehandelte Kontrolle als 100%-Wert bezogen. Für alle statistischen Auswertung wurde der Student t-Test angewandt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet bei Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$.