

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien, Spezialpuffer

Acrylamid/Bisacrylamid	Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
Agarose	Seakem (Rockland, USA)
AG 1478	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
Albumin, bovines	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumpersulfat(10%)	Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen)
APS	BDH (Poole, UK)
BAPTA-AM	Sigma (Deisenhofen)
Bacto-Agar	Difco (Detroit, USA)
BCA (Protein Assay Reagent)	Pierce (Rockford, MD, USA)
Chloramphenicol (Radionuklid)	NEN TM Life Science
Coomassie	Serva (Heidelberg)
DTT (Dithiothreitol)	Boehringer (Mannheim)
Endothelin	Sigma (Deisenhofen)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
Glyzin	Gibco (Eggenstein)
1 kb-DNA-Leiter	Gibco BRL (Eggenstein)
L-Glutamin	Gibco BRL (Eggenstein)
Lysophosphatidsäure (LPA)	Sigma (Deisenhofen)
Lumiglo	BioLabs (Beverly, MA, USA)
MEM	Gibco BRL (Eggenstein)
β-Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg)
Maxiprep-Kit	Quiagen

Miniprep-Kit	Quiagen
n-Butyryl Coenzym A	Sigma (Deisenhofen)
PBS ⁺⁺ -Dulbecco	Seromed (Biochrom, Berlin)
Penicillin/Streptomycin	Seromed (Biochrom, Berlin)
Phenol	Gibco BRL (Eggenstein)
Phospho-MEK-Antikörper	New England BioLabs (Beverly, MA, USA)
Phospho-MAPK-Antikörper	New England BioLabs (Beverly, MA, USA)
Protein-Kinase-Inhibitor-Peptid	Peptide Express (Ft. Collins, CO, USA)
Reporter Lyse Puffer, 5fach	Promega (Madison, WI, USA)
SDS	Roth (Karlsruhe)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Thrombin, bovines	Sigma (Deisenhofen)
Tris	Gibco (Eggenstein)
Tryptose-Phosphat-„Brühe“	Sigma (Deisenhofen)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen)
Xylencyanol	Serva (Heidelberg)
Xylol (Isomeregemisch)	Aldrich (Deisenhofen)

DNA-modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Gibco-BRL (Eggenstein) oder Boehringer (Mannheim) bezogen. Die vom Hersteller mitgelieferten Puffer wurden unter Einhaltung der empfohlenen Reaktionsbedingungen verwendet.

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Riedel-de Haen (Seelze) oder Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen.

Blockierungspuffer:

1xTBS, 0,1% Tween-20, 5% fettfreie Trockenmilch

Elektrophoresepuffer:

25mM Tris-Base, 0,19 M Glyzin, 0,1% SDS, H₂O

Lysepuffer:

0.5 % Triton X 100, 50 mM β -Glycerophosphat, pH 7.2, 0.1 mM Natriumvanadat, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mg/ml Leupeptin, 4 mg/ml Aprotinin

Natriumdodecylsulfat-Probenpuffer:

62,5mM Tris-HCl , 2% SDS, 10% Glycerin, 50nM DTT, 0,1% Bromphenolblau

TBS (zehnfach):

50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl

TTBS:

TBS (einfach), 0,1% Tween 20

Transferpuffer:

25nM Tris-Base, 0,2 M Glyzin, 20% Methanol; pH 8,5

2.1.2 Seren, Medien**Komplettmedium (CM):**

Minimum Essential Medium mit **Earls Basal Salts** (MEM-EBSS, Gibco,USA)

+ 10% fötales Kälberserum (Gibco-BRL, Eggenstein)

+ 200 mM Glutamin (Gibco-BRL, Eggenstein)

+ 10.000 μ g/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco-BRL, Eggenstein)

+ 10 ml Tryptose Phosphate Broth Medium (Sigma, Deisenhofen)

Quiescent Medium (QM):

Minimum Essential Medium mit **Earls Basal Salts** (MEM-EBSS, Gibco,USA)

+ 200 mM Glutamin (Gibco-BRL, Eggenstein)

+ 10.000 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco-BRL, Eggenstein)

+ 10 ml Tryptose Phosphate Broth Medium (Sigma, Deisenhofen)

+ Transferrin (4 mg/ml) (Sigma, Deisenhofen)

+ 500 mg/L Rinderserumalbumin (Sigma, Deisenhofen)

2.1.3 Bakterienstämme

E. coli DH5α (Gibco)

2.1.4 Zelllinien

Es wurden Primärkulturen neonataler, aortaler glatter Gefäßmuskelzellen von neugeborenen Ratten (braune norwegische Ratten, 2-5 Tage nach der Geburt) verwendet.

2.1.5 Zellkultur

Die verwendeten Primärkulturen glatter Gefäßmuskelzellen von neugeborenen Ratten (2-5 Tage nach der Geburt) wurden nach der von Ives und Mitarbeiter publizierten Vorschrift isoliert (Ives et al., 1978). Die Zellen wurden in MEM-Komplettmedium in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % Luft in einem wassergesättigtem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C vermehrt. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt bis die Zellen Konfluenz erreichten. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1%iger Trypsin-EDTA-Lösung subkultiviert. In den hier beschriebenen Experimenten kamen Zellen der Passage 14 bis 20 zum Einsatz.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation von Bakterien

Zur Transformation von Bakterien wurden kommerziell erhältliche DH5 α -Bakterienstämme (Gibco) verwendet. Die Zellen wurden bis zu ihrem Einsatz bei -70°C aufbewahrt. In sterilen 1,5-ml-Reaktionsgefäßen wurden 1 μ l Plasmid-DNA mit 10 μ l kompetenten Zellen gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 1-minütiger Hitzeschritt bei 37°C. Nach Zugabe von 100 μ l LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden nun in zwei Portionen (A: 10 μ l, B: restl. Volumen) auf LB-Ampicillin-Selektionsplatten (75 g/l Luria broth base, pH 7.5, 18 g/l Agar, 0.1 % Ampicillin) ausplattiert und im Inkubator über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Verwendete SM-MHC-Promotor-Konstrukte

Die verwendeten 5'-Deletionen des SM-MHC-Promotors der Ratte wurden als Fusionskonstrukte mit dem CAT-Reporter-Gen konstruiert und freundlicherweise von C. Madsen, Charlottesville, VA, USA zur Verfügung gestellt.

Die pCAT-basic und pCAT-control Konstrukte bezogen wir von der Firma Promega. Das pCAT-1352 Konstrukt, enthält -1352 bp des SM-MHC-Promotors und wurde uns ebenfalls von C. Madsen, Charlottesville, VA, USA zur Verfügung gestellt.

pCAT-basic:

-4364 bp, β -Laktamase-Gen, pUC/M13 reverse Primer-Bindungsstelle, MCS (HindIII-XbaI), CAT-Gen, SV40 small T Antigen, pUC/M13 forward Primer-Bindungsstelle

pCAT-control:

-4750 bp, pUC/M13 forward Primer-Bindungsstelle, SV40 Promotor-Region, CAT-Gen, SV40 small T Antigen, SV40 enhancer-Region, MCS (HindIII-PstI), pUC/M13 reverse Primer-Bindungsstelle, β -Laktamase-Gen

2.2.3 Plasmid-DNA-Preparation in kleinem Maßstab ("Mini"-Prep.)

Zur Isolation von kleineren Mengen Plasmid-DNA (z.B. für Testspaltungen) wurden jeweils 4-6 Klone von Selektionsplatten steril gepickt und in mit 3 ml LB-Ampicillin-Medium vorbereitete Röhrchen überführt. Diese Vorkulturen wurden im Anschluß im 37°C-Schüttler über Nacht geschüttelt. Bei erfolgreicher Vermehrung der Bakterien wurden 2 ml Zellsuspension pro Kultur bei 5.000 x g zentrifugiert und anschließend gemäß dem Protokoll der Fa. Quiagen die Plasmid-DNA über Mini-Säulchen isoliert. Eine Quantifizierung der DNA erfolgte mittels Vergleichsabschätzung bekannter DNA auf einem 1%-igen Agarose-Gel.

2.2.4 Plasmid-DNA-Preparation in großem Maßstab ("Maxi"-Prep.)

Erwies sich die in "Mini-Präparationen" isolierte DNA gemäß Restriktionsverdau als korrekt, wurde eine Großkultur (300 ml LB-Ampicillin-Medium) durch Zugabe von 1 ml Zellsuspension angeimpft. Die Großkultur wurde dann über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA gemäß dem Protokoll der Fa. Quiagen unter Einsatz des "Maxi-Prep.-Kits" isoliert. Die präzipitierte DNA wurde in TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert. Reinheit und Menge der isolierten DNA wurden spektrophotometrisch bei 260/280 nm bestimmt.

2.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau erfolgte nach den vom Hersteller der Restriktionsenzyme angegebenen Bedingungen. Je nach Enzym wurden 1-5 U/ μ g DNA eingesetzt. Der Verdau wurde in vom Hersteller angegebenen Puffer angesetzt, und abhängig vom Enzym bei 25°C beziehungsweise 37°C für 1-4 Std. inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/5 Vol. Bromphenolblau-Lösung abgestoppt. Die entstandenen Fragmente wurden durch 1-2%-ige Agarose-Gel-Elektrophorese in TBE-Puffer bei 120 Volt aufgetrennt und durch im Gel enthaltene Ethidiumbromidlösung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.6 Sequenzierung

Alle SM-MHC-CAT-Promotor-Konstrukte wurden zur Überprüfung der Sequenz vor dem Einsatz in Transfektionsstudien unter Einsatz eines ABI-Sequencers erneut sequenziert.

2.2.7 Transiente Transfektion glatter Gefäßmuskelzellen

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen in 6-Lochplatten subkultiviert, so dass am Tag der Transfektion eine 60-80%-ige Konfluenz der Zellen vorlag. Für eine Standardanwendung wurden folgende Regeln beachtet:

Entsprechend 1 μ g/DNA pro Loch einer 6-Loch-Platte in 40 μ l MEM in einem sterilen Reaktionsröhrchen verdünnen. Dann für jedes μ g DNA 10 μ l Superfekt (Quiagen) dazufügen. Dieses Gemisch wurde für 10-20 Sekunden auf dem Vortexer gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 Minuten wurde soviel Komplettmedium zum vorbereiteten Ansatz gegeben, daß es für jedes Loch 1 Milliliter Transfektionsansatz ergab. Der Transfektionsansatz wurde durch mehrmaliges vorsichtiges Pipettieren gemischt. Die zu transfizierenden Zellen wurden einmal mit PBS gespült. Im Anschluß wurde das Transfektionsgemisch auf

die Zellen gegeben und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 4-stündiger Inkubation wurde das Transfektionsgemisch durch Mediumwechsel entfernt. Weitere 48-72 Stunden später erfolgte die Analyse mittels CAT-Assay und Proteinbestimmung. Abweichungen von diesem Standardprotokoll sind bei den einzelnen Experimenten erwähnt.

2.2.8 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz in transient transfizierten neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte wurde durch CAT-Assays und durch histochemische Anfärbung der Chloramphenicolazetyltransferase bestimmt. Die histochemische Färbung ist zur Bestimmung des prozentualen Anteils transfizierter Zellen und damit zur Optimierung von Transfektionsprotokollen geeignet. Hierzu werden nach der Transfektion fixierte Zellen mit PBS gewaschen und mit Ferrizyanid-Färbelösung gefärbt. Zur Anfärbung der Zellen und Auswertung der Transfektionseffizienz wurde das CAT-Staining-Set, Boehringer Mannheim, eingesetzt.

2.2.9 CAT-Assays

Zur Analyse der CAT-Aktivität der transfizierten Zellen wurde das "CAT Enzyme Assay System" der Fa. Promega unter Beachtung des Protokolls des Herstellers verwendet. Es wurden immer Triplikate für eine Transfektion erstellt und der Mittelwert der erhaltenen cpm als Meßpunkt berücksichtigt. Aus Gründen der besseren Handhabung wurden keine Dünnschichtchromatographien durchgeführt, sondern die alternative Möglichkeit der Flüssigkeitsszintillation eingesetzt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinbestimmung

Um gleiche Proteinmengen pro Tasche aufzutragen, wurde der Proteingehalt des Zelllysats ermittelt. Zur Proteinbestimmung wurde der BCA-Test (Pierce) angewandt. Der Nachweis beruht darauf, daß Proteine mit Cu^{2+} in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} dieses Komplexes werden zu Cu^{1+} reduziert, die mit Bicinchinon-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Die Absorption dieses Farbkomplexes wurde bei 595 nm gemessen. Als Proteinstandard diente bovines Serumalbumin in Konzentrationen von 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 und 2.0 mg/ml.

Zur Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung wurden 10 µl der Lösung bzw. des BSA-Standards mit 200 µl BCA-Reagenz in Reaktionsgefäße pipettiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen und Zentrifugation wurden 100 µl des jeweiligen Ansatzes in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben und die Extinktion bei 595 nm gemessen (Elisa-Reader MR 600, Dynatech, Denkendorf). Der Proteingehalt der zu bestimmenden Probe ergibt sich aus dem Vergleich der Extinktion der Probe mit der aus den Standardwerten ermittelten Eichgeraden.

2.3.2 Protein-Elektrophorese

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden vor dem Ablösen aus den jeweiligen Kulturschalen 2 mal mit PBS (4°C) gewaschen, anschließend für 4 Min. bei 3.000 x g zentrifugiert und mittels Lysepuffer (0.5% SDS in PBS) aufgelöst. Nach erneuter Zentrifugation bei 10.000 x g wurde der Proteingehalt des Überstandes mittels der BCA-Methode (Pierce, USA) bestimmt. Aliquote wurden dann in Elektrophorese-Probenpuffer (0.125 mMol/L Tris (pH 6.8), 2 % SDS, 10 % Glycerin, 0.75 mol/l β -Mercaptoethanol, 0,006% Bromphenolblau) für 5 Min. bei 100°C aufgeköcht. Die Auftrennung der im Zellysat enthaltenen Proteine erfolgte mittels eines 10%-igen Polyacrylamid-Gels in einer Mini-Protean-Elektrophoresekammer (Bio-Rad, Life Science Group, USA).

Diesem Trenngel war ein Sammelgel aufgeschichtet, in dessen Geltaschen die Proben aufgetragen wurden. Es wurden 10 µg Protein pro Spur aufgetragen. Bei einer Temperatur von 4°C und einer Spannung von 100 V wurden die Proteine in das Sammelgel transferiert, die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei einer Temperatur von 4°C und einer Spannung von 150 V.

2.3.3 Westernblots

Die mittels der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden für 2-3 h bei konstanter Stromstärke von 200 mA im Tanksystem bei 4°C (Bio-Rad) auf Nitrozellulose-Membranen elektroblottet. Dabei muß die Membran luftblasenfrei dem Gel aufliegen und die richtige Anordnung der Membran zwischen Gel und Anode beachtet werden. Der Transferpuffer enthielt Tris (25 mM), Glyzin (192 mM) und Methanol (20%). Nach dem Blotten wurden die Gele mit Coomassie Blue gefärbt, um den vollständigen Transfer der Proteine zu überprüfen. Die Membranen wurden anschließend in einem ersten Schritt mit fettfreier Trockenmilch in TTBS-Puffer zur Absättigung freier Bindungsstellen inkubiert. In einem zweiten Inkubationsschritt wurden die Membranen im gleichen Puffer mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TTBS erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen erfolgte zuletzt die Zugabe des Lumiglo-Chemolumineszenz-Reaktionsgemisches. Nach 1-minütiger Inkubation wurde die Membran in Frischhaltefolie luftblasenfrei eingepackt und ein Film in einer Filmkassette für 30 Sekunden bis zu einer Stunde, je nach Intensität des zu erwartenden Signales, damit exponiert.