

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Material

14 ml Röhrrchen (steril)
 10 ml Röhrrchen (steril)
 50 ml Röhrrchen (steril)
 96-Well Optical Reaction Plate
 Objektträger Elka
 Optical Adhesive Covers
 Supercells
 Zellkulturflaschen T 25
 Zellkulturflaschen T 75
 Zellkulturflaschen T 175
 PCR Softstrips 0,2 ml, 711030
 Reaktionsgefäße 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml

Bezugsnachweis

Greiner Bio-One, Frickenhausen
 Sarstedt, Nürnberg
 Sarstedt, Nürnberg
 Applied Biosystems, USA
 Assistent, Dtl.
 Applied Biosystems, USA
 Becton Dickinson, Heidelberg
 Becton Dickinson, Heidelberg
 Becton Dickinson, Heidelberg
 Becton Dickinson, Heidelberg
 Biozym Diagnostik, Oldendorf
 Eppendorf, Hamburg

3.1.2 Gebrauchsfertige Kits

Kit

BCA Protein Assay Kit
 First Strand cDNA Synthesis Kit[®]
 QIAquick PCR Purification Kit[®]
 TaqMan 2x PCR Mastermix[®]

Bezugsnachweis

Pierce, Irland
 MBI Fermentas, Dtl.
 Quiagen, Düsseldorf
 Applied Biosystems, USA

3.1.3 Chemikalien

Substanz	Bezugsnachweis
Acetatbuffer	Sigma, Taufkirchen
Agarose	Sigma, Taufkirchen
Angiotensin II	Sigma, Taufkirchen
Azeton	J.T. Baker, England
Bovines Serum Albumin	Sigma, Taufkirchen
Blotting Grade Blocker (Non-Fat Dry Milk)	Bio-Rad, München
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	Sigma, Taufkirchen
DEPC, Diethylpyrocarbonat	SERVA, Heidelberg
Ethanol (verschiedene Konz.)	J.T. Baker, England
Ethidiumbromid (MG = 420,3)	Sigma, Taufkirchen
Fetales Kälberserum	GIBCO Invitrogen, Eggenstein
Glycin (MG = 75,07)	Sigma, Taufkirchen
Ziegenserum	DAKO, Dänemark
3 % Hydrogenperoxidase	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Sigma, Taufkirchen
Kaisers Glycerin Gelatine Mikroskopie	Merck, Darmstadt
Kulturmedium RPMI 1640	GIBCO Invitrogen, Eggenstein
Mayer's Hematoxylin Solution 0,1 %	Sigma, Taufkirchen
2-Mercaptoethanol (5 %)	BASF, Ludwigshafen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (0,9 %)	Berlin-Chemie, Berlin
Nitroblautetrazolium (NBT)	Th Geyer, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Lösung	GIBCO Invitrogen, Eggenstein
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	GIBCO Invitrogen, Eggenstein
Propanol	J.T. Baker, England
Rotiphorese (40 % Acrylamid 2 % Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) 20 %	ICN Biomedicals, CA, USA
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) MG=288,38	Sigma, Taufkirchen

Temed (N, N, N', N' - Tetramethyl-ethylendiamid)	Sigma, Taufkirchen
Trizma Base (MG = 121,1)	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (1x) in HBSS W/O	GIBCO Invitrogen, Eggenstein
Tween 20	Roth, Karlsruhe
RNase Erase	ICN Biomedicals, CA, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma, Taufkirchen
Xylol	J.T. Baker, England

3.1.4 Antikörper für Immunhistochemie

Antikörper

Kollagen Typ I (1:100)
Kollagen Typ III (1:100)
Fibronectin (1:50)
Laminin vorverdünnt
Osteopontin (1:100)
Anti-mouse IgG Biotin conjugate (1:10.000)
Rabbit-Anti-Mouse HRP (1:40)
Schwein-Anti-Rabbit HRP (1:40)

Bezugsnachweis

Sigma, Taufkirchen
Monosan, Beutelsbach
Sigma, Taufkirchen
Sigma, Taufkirchen
University of Iowa, Hybridoma Bank, USA
Sigma, Taufkirchen
DAKO, Hamburg
DAKO, Hamburg

3.1.5 Westernblot-Analyse

Antikörper

Kollagen Typ I (1:1000)
Kollagen Typ III (1:1000)
Fibronectin (1:1000)
TGF- β_1 (1:1000)
β_1 -Integrin (1:1000)
VEGF (1:1000)
PARP (1:1000)
Fik-1 (1:1000)

Bezugsnachweis

Chemicon, Hofheim
Sigma, Taufkirchen
Coulter, Heidelberg
Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Anti-mouse IgG/Alkal. Phosphatase konjugiert	Chemicon, Hofheim
Laminin (1:1000)	Chemicon, Hofheim
Osteopontin (1:1000)	University of Iowa, Hybridoma Bank, USA

Lysis-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7,2
150 mM NaCl
1 % Triton X-100
1 mM Natriumorthovanadat
50 mM Natriumpyrophosphat
100 mM Natriumfluorid
0.01 % Aprotinin
4 µg/ml Pepstatin A
10 µg/ml Leupeptin
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid

Block-Reagenz

Non Fat Dry Milk (2 %)
Tween (0,05 %)

Laufpuffer:

25 mM Trizma Base
192 mM Glycine
2,5 % (v/v) SDS

Transfer-Puffer:

48 mM Trizma Base
39 mM Glycine
0,037 % (v/v) SDS
Methanol 20 %

Trenngel:

13 % Rotiphorese (38 % Acrylamid 2 % Bisacrylamid)
375 mM Trizma Base
0,01 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v)APS
0,0001 % (v/v)TEMED

Tris-Puffer

Sammelgel:

7 % Rotiphorese (38 % Acrylamid 2 % Bisacrylamid)
125 mM Trizma Base
0,01 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v)APS
0,0001 % (v/v)TEMED

Marker:

- 100 bp-Leiter (1 µg/µl) GIBCO Invitrogen, Eggenstein
- Protein Standard (161-0324) Bio-Rad, München

3.1.6 PCR Untersuchung:

- 10 x PCR-Puffer Rapidozym, Berlin
- dNTPs (100 mM) Rapidozym, Berlin

Agarosegelelektrophorese:

- Diethylpyrocarbonat-Wasser 0,1 % (w/v)
- Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50 x)
242 g Tris-Base (0,8 M)
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0
ad 1 l Aqua bidest.
- Tris-Acetat-EDTA -Lauf-Puffer (1 x)

40 ml TAE-Puffer (50 x)

ad 2 l DEPC-H₂O

- TAE-Diethylpyrocarbonat-Agarose-Gel (2 %)
 - 2 g Agarose (*Ultra Pure Agarose, Life Technologies, Schwalbach*)
 - 100 ml Tris-Acetat-EDTA -Lauf-Puffer (1 x)
 - 1 µl Ethidiumbromid (Konzentration 10 mg/ml,)

- Lade-Puffer
 - 1,00 mM EDTA (*Sigma*)
 - 0,25 % (w/v) Bromphenolblau (*Sigma, Taufkirchen*)
 - 0,25 % (w/v) Xylele Cyanole FF (*Sigma, Taufkirchen*)
 - 50 % (v/v) Glycerol (RNase-frei) (*Sigma, Taufkirchen*)

3.1.7 Oligonukleotide

Die Primer wurden von der Firma Proligo in Frankreich, die TaqMan[®]-Sonde von TIBMolbiol in Berlin hergestellt.

Bezeichnung	Sequenz
TGF-β ₁ Standard F	ATTCGCGGCCAGATTCTGT
TGF-β ₁ Standard R	GAGCTCCGACGTGTTGAACA
TGF-β ₁ TaqMan F	CGAGCCAGAGGCGGACTAC
TGF-β ₁ TaqMan R	GATTTGGTTGCCGCTTTCC
TGF-β ₁ TaqMan-Sonde	CCAAGGAGGTCACCCGCGTGC
18S Standard F	CGA AAGCATTGCCAAGAATG
18S Standard R	AGCATGCCGAGAGTCTCGT
18S TaqMan F	GGAGCCTGCGGCTTAATTT
18S TaqMan R	CAACTAAGAACGGCCATGCA
18S TaqMan [®] -Sonde	CAATCTGTCAATCCTGTCCGTGTCCG

Tab. 1: Die in der TaqMan-PCR eingesetzten Sonden und Primer; alle Sonden waren am 5'-Ende FAM-markiert und am 3'-Ende TAMRA-markiert

3.2 Methoden

3.2.1 Hämoperfundiertes arbeitendes Schweineherz

3.2.1.1 Versuchsaufbau

Für die Untersuchungen wurden Fibroblasten aus hämoperfundierten arbeitenden Schweineherzen verwendet. Die Herzen stammten von Schlachttieren der Rasse Deutsches Landrasseschwein (Gewicht 60-90 kg), welche vor der Schlachtung einer Schlachttieruntersuchung gemäß Fleischhygieneverordnung (Anlage 1, Kapitel 1, Absatz 2) unterzogen wurden. Nach der gemäß den EU-Richtlinien des Veterinärkonsils erfolgten Tötung und dem Ausbluten wurde eine Sternotomie durchgeführt, das Herz durch zwei Veterinärmediziner sorgfältig herauspräpariert und in eine Kardioplegielösung nach Modersohn et al. (2001) gegeben. Die Herzen erreichten nach ca. einer Stunde bei 4 °C (kalte Ischämiezeit) das Labor, wo sie nochmals untersucht wurden. Die Organe sollten keine krankhaften Veränderungen aufweisen, eine weiche Konsistenz haben und 350-450 g wiegen.

Die Hämoperfusion erfolgte mittels eines von der Firma Mediport Biotechnik GmbH, 12247 Berlin (1998) entwickelten Versuchsaufbaus, der aus drei Teilkreisläufen besteht; dies sind der Perfusat-, der Dialysat- sowie der Wärmekreislauf. Die Hauptprinzipien des Verfahrens sind die Oxygenierung des Perfusionsblutes, seine Normothermierung (37° C warmes Wasser) sowie die Dialyse desselben. Das Perfusat bestand aus autologem Schweineblut, welches mit Krebs-Henseleit-Lösung nach Modersohn et al. (2001) verdünnt wurde und dessen Temperatur im Normbereich lag. Das Perfusat wurde konstant auf 37° C erwärmt, wobei die Temperatur kontinuierlich durch Thermometer gemessen wurde. Durch die permanent über das Dialysem modul (High-Flux Polysulphon Kapillardialysator Hemoflow F-7; Firma Fresenius AG, 61343 Bad Homburg) stattfindende Oxygenierung wurde der Perfusatkreislauf in einen venösen und einen arteriellen Schenkel geteilt.

Über eine Rollenpumpe (Watson Marlow 505U; Firma Watson-Malow Limited; Falmouth, England) wurde das Perfusat aus dem Reservoir in das Dialysem modul geleitet, wo es über eine Membran (Oberfläche: 1,6 m², Porengröße: 5000 Dalton) floss. Hierbei kam es zum Gas-, Flüssigkeits- und Wärmeaustausch zwischen dem Perfusat und dem Dialysat (Krebs-Henseleit-Lösung nach Modersohn) entlang eines Konzentrationsgefälles bis zum Konzentrationsausgleich (Hämodialyse).

Eine zweite Rollenpumpe beförderte das aufbereitete arterielle Dialysat über eine Luftfalle weiter in die transperikardial kanülierten rechte und linke Koronararterie des Herzens. Das venöse Blut wurde wiederum von dem auf einer Waage (Sartorius PT6, Sartorius AG, 37075 Göttingen) befindlichen Reservoirbehälter aufgefangen. Das so überwachte Gewicht des Perfusatesreservoirs wurde kontinuierlich digital an die Steuerungseinheit der Perfusionsapparatur übermittelt. Hierüber erfolgte eine Kontrolle und Regelung des im Dialysem modul stattfindenden Flüssigkeitsaustausches. Klinische Chemie und Hämodynamik inklusive Bestimmung kontraktile Parameter waren Gegenstand einer anderen Dissertation (Habighorst B, 2005). In dieser wurden Herzfrequenz, linksventrikulärer systolischer Druck, linksventrikulärer enddiastolischer Druck, der koronare Blutfluss sowie der koronare Perfusionsdruck bestimmt.

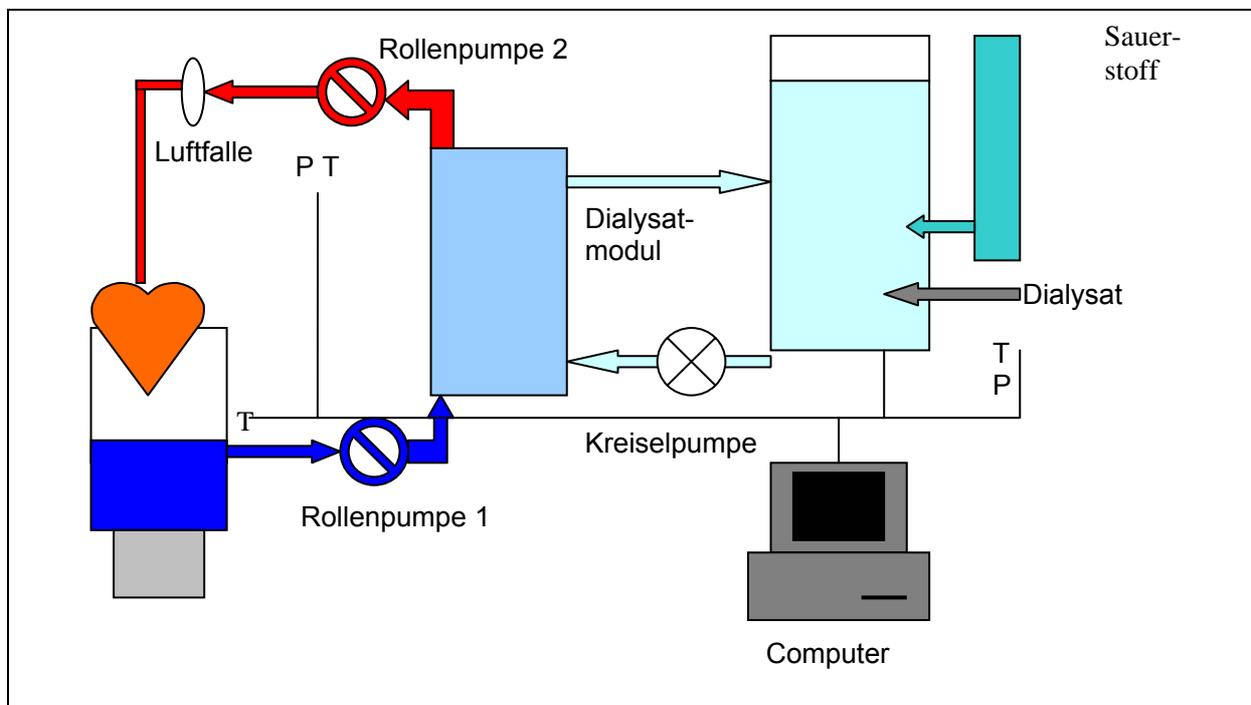


Abb. 7: Schematischer Versuchsaufbau des Modells des hämoperfundierten ischämischen Schweineherzens

3.2.1.2 Versuchsaufbau

22 Herzen wurden präpariert und an den Perfusionsapparat angeschlossen. Als Kontrolle für den Zeitpunkt 0 direkt nach Erreichen des Labors dienten 5 nicht-perfundierte Herzen. Nach einer einstündigen Präperfusion (Adaptationszeit) schlugen die Herzen rhythmisch. Bei den zur Infarzierung vorgesehenen Herzen wurde dann für 2 h ein Verschluss des Ramus circumflexus der linken Koronararterie vorgenommen. Nach 2 h erfolgte ein Wiedereröffnen des Gefäßes, und das Herz

wurde für weitere 4 h perfundiert (Reperfusionzeit). Bei den als Kontrolle der Perfusionsorgane dienenden Herzen wurde nach dem Anschluss an den Perfusionsapparat für sechs Stunden ohne Intervention perfundiert.

3.2.2 Primärkultur kardialer Fibroblasten

Im Anschluss an den Versuch wurden die Fibroblasten isoliert. Bei Kontrollherzen erfolgte die Anzucht aus Myokard des linken Ventrikels, bei Infarkt Herzen aus dem Infarktgebiet und dem nicht-infarzierten Gebiet (Remotearial).

Das Gewebe aus dem Infarktgebiet, aus dem Remotearial sowie das Gewebe aus dem linken Ventrikel von Kontrollherzen wurden mechanisch zerkleinert. Dies geschah unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank. Zunächst zerschnitten wir das Gewebe mit einem Skalpell in kleine Stückchen, welche daraufhin mit Nadeln zerrieben wurden. Anschließend wurden die entstandenen sehr kleinen Teile mit einigen Tropfen RPMI 1640 Medium versehen, das 10 % Foetales Kälberserum (FKS: Invitrogen, Eggenstein, Deutschland) enthielt. Diese Mischung wurde durch Kannulieren mittels einer Kanüle (Sterican, B. Braun, Melsungen) weiter zerkleinert und aufgetrennt, bis sie durch einen Gazefilter filtriert werden konnte.

Der entstandene Gewebepulver aus kleinen Verbänden weniger Zellen wurde für 30 Minuten bei 37 °C mit 2 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (Invitrogen, Eggenstein, Deutschland) behandelt in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂. Durch diese Behandlung wurden die interzellulären Verbindungen zwischen den Fibroblasten getrennt, sodass wir letztlich eine Lösung mit einzelnen Zellen erhielten.

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 30 min wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von RPMI 1640 Medium, das 10 % Foetales Kälberserum (FKS: Invitrogen, Eggenstein, Deutschland) und 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin (GIBCO Invitrogen, Eggenstein) enthielt, gestoppt. Die Zellen wurden in einem 50 ml fassenden Polypropylenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) für 10 min bei 1500 g abzentrifugiert (Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen, und das Sediment (Pellet) wurde in Kompletmedium resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde dann in 75 cm² Kulturflaschen (10⁵ Zellen pro Flasche) pipettiert und bei standardisierten Zellkultur-Bedingungen (37 °C, Raumluft mit 5 % CO₂) in komplettem Medium im Brutschrank inkubiert. Primäre Kulturen benötigten alle zwei Tage einen Wechsel des Nährmediums, bis die Zellen subkonfluent waren. Im Durchschnitt war nach 5-7 Tagen Subkonfluenz erreicht. Um mögliche morphologische Unterschiede zwischen Fibroblasten festzustellen, die aus

Kontrollherzen sowie aus ischämischen und reperfundierten Herzen stammten, wurden die Zellen subkonfluenten Kulturen unter dem Phasenkontrast-Lichtmikroskop untersucht.

3.2.3 Passage/Subkultivierung

Bei Konfluenz wurden die Zellen nach dem Absaugen des Nährmediums zweimal mit PBS gewaschen. Dann fügten wir 10 ml Trypsin/EDTA (Invitrogen, Eggenstein, Deutschland) in eine T 75 cm² Flasche hinzu und beließen die Kulturflasche zur Inkubation im Brutschrank, bis alle Zellen abgelöst waren. Die Kontrolle der Ablösung erfolgte lichtmikroskopisch mit dem Phasen-Kontrast-Lichtmikroskop von Olympus (Olympus, Hamburg). Im Durchschnitt waren nach 5 Minuten alle Zellen von dem Flaschenboden abgelöst. War dies erfolgt, so wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 30 ml RPMI 1640 Medium komplett gestoppt. Die Zellen wurden in ein 50 ml Röhrchen transferiert und bei 1000 g für 10 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt war, wurden die Zellen in 20 ml Kulturmedium resuspendiert und durch Auf- und Abpipettieren gut durchmischt. Dann wurden die suspendierten Zellen in 4 neue 75 cm²-Kulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) pipettiert und zur weiteren Kultivierung in den Brutschrank gestellt. Nach 5-7 Tagen war Subkonfluenz erreicht, worauf die Zellen im Verhältnis 1:4 passagiert wurden bis maximal zur Passage 4. Nach Passage 1 erfolgte die Aussaat von Zellen auf Kammerobjektträger (Supercells) zur zytochemischen Untersuchung im Rahmen der Ang II-Versuche. Nach der zweiten Passage erfolgte die Fixierung von Zellen für durchflusszytometrische Untersuchungen, nach der dritten Passage wurden Zellen für Westernblot-Untersuchungen und zur Bestimmung der Genexpression benutzt. Die Zellen für die Stimulation mit TGF- β 1 wurden nach der vierten Passage gewonnen.

3.2.4 Proben für Immunzytochemie

Kardiale Fibroblasten (Passage 1-2) wurden von jeder Zellanzucht auf 4-Kammer Supercell-Kammerobjektträgern (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) (2000 Zellen pro Kammer) gezüchtet und unter Standard-Zellkultur-Bedingungen in komplettem Medium inkubiert.

Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen für die Angiotensin II-Versuche inkubiert mit entweder 0 μ M, 0,1 μ M oder 1 μ M Ang II (eine Dosis pro Well; Sigma, Taufkirchen, Deutschland), das in Serum-freiem Medium gelöst war. Für

Immunfluoreszenz und Immunzytochemie wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS für 10 min bei -20 °C mit Aceton fixiert.

3.2.5 Zellernte zur Untersuchung

Zur Zellernte wurde das Medium abgesaugt und die Zell-Layer in den Kulturflaschen zweimal mit PBS gewaschen. Dann fügten wir 10 ml Trypsin/EDTA (Invitrogen, Eggenstein, Deutschland) hinzu. Die Kontrolle der Ablösung erfolgte lichtmikroskopisch mit dem Phasen-Kontrast-Lichtmikroskop von Olympus (Olympus, Hamburg), im Durchschnitt waren nach 5 Minuten alle Zellen vom Flaschenboden abgelöst. War dies erfolgt, so wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 30 ml RPMI 1640 Medium komplett gestoppt. Die Zellen wurden in ein 50 ml Röhrchen pipettiert und mittels der Tischzentrifuge bei 2500 rpm für 10 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt war, erfolgten zwei Waschvorgänge mit PBS. Anschließend wurden die Zellsedimente in den 50 ml-Röhrchen mit 70 % igem Alkohol fixiert und im Kühlschrank bei 4 °C bis zur Durchführung der durchflusszytometrischen Analyse nach 24 h aufbewahrt. Es lagen im Durchschnitt 10^6 Zellen pro Untersuchung vor.

3.2.6 Konservierung von Zellen zur Wiederanzucht

Zudem kryokonservierten wir Zellen verschiedener Herzen (Passagen 2-4), um die Möglichkeit zu haben, sie später nochmals anzuzüchten bzw. zu untersuchen. Hierzu verbrachten wir die Zellen nach wie oben beschrieben durchgeführten Ablöse- und Waschvorgängen in 5 ml einer 10 %igen Dimethylsulfoxid-Lösung. Die Lösung wurde aus vollständigem Kulturmedium mit 20 % FKS und Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland) in einem Verhältnis von 9:1 hergestellt.

Das Zelllysat wurde in 2 ml Kryoröhrchen (NUNC, Wiesbaden, Deutschland) pipettiert, die anschließend für 2 h bei -20 °C aufbewahrt wurden. Nach 2 h erfolgte die Überbringung in den Gefrierschrank (-86 °C ULT Freezer, Klatt, Berlin, Deutschland) bei -80 °C, und nach 24 h konnten die Behälter mit den Zellen in den Aufbewahrungstank mit flüssigem Stickstoff überführt werden.

3.2.7 Kryokonservierung von Zellen für PCR und Westernblot-Analyse

Für spätere molekularbiologische Untersuchungen konservierten wir Zellen verschiedener Herzen durch Einfrieren und Lagern im Gefrierschrank bei -80 °C.

Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von Trypsin/EDTA (Invitrogen, Eggenstein, Deutschland) abgelöst. Nach ca. 5-minütiger Inkubation im Brutschrank und lichtmikroskopischer Kontrolle der Ablösung wurde die Reaktion mit Kompletmedium gestoppt. Nach der anschließenden Überführung in ein 50 ml Röhrchen und 10minütiger Zentrifugation bei 1000 g wurde ein Waschvorgang mit PBS durchgeführt, anschließend resuspendierten wir das Zellsediment mit 1,5 ml PBS. Die Lösung wurde nun in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1500 g mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Eppendorf-Röhrchen geschlossen und mit einer Kanüle ein kleines Loch in den Deckel gestochen. Anschließend erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff und die endgültige Lagerung bei -80 °C. Die zu dieser Untersuchung verwendeten Zellen entstammten den Passagen 3-4.

3.2.8 Lichtmikroskopische Morphologie der Zellen

Die morphologischen Charakteristika von *in vitro* kultivierten kardialen Fibroblasten wurden mittels des Phasen-Kontrast Lichtmikroskops in allen Passagen regelmäßig untersucht, wobei wir ein Olympus Mikroskop verwendeten (Olympus, Hamburg, Deutschland). Kardiale Fibroblasten sind in den ersten Passagen spindelförmig mit z.T. multiplen Ausziehungen des Zytoplasmas, sodass sie oftmals ein sternartiges Äußeres präsentieren.

3.2.9 Zellcharakterisierung mittels Immunzytochemie

Zudem führten wir eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung durch, um kardiale Fibroblasten der Passagen 1-2 zu charakterisieren und den Anteil von vaskulären Gefäßmuskelzellen sowie Endothelzellen und Kardiomyozyten bestimmen zu können. Die Zellen wurden aus denselben Suspensionen entnommen, aus denen die Anzucht in Kulturflaschen erfolgte. Es erfolgte die zeitlich parallele Anzucht auf gekammerten Objektträgern unter Standardkulturbedingungen, Mediumwechsel wurde in denselben Abständen durchgeführt wie bei den in Kulturflaschen angezüchteten Zellen. Kurz vor dem Erreichen von Konfluenz führten wir die Färbungen durch. Die Färbungen wurden unter Verwendung von anti-Vimentin Antikörpern (AK), anti-Desmin AK und anti-Faktor VIII AK sowie anti- α -Smooth Muscle Actin (ASMA) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) durchgeführt. Kultivierte

Fibroblasten wurden zweimal in PBS gewaschen, anschließend mit Aceton behandelt und mit monoklonalen Antikörpern in optimaler Konzentration inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch indirekte Immunoperoxidase-Technik und Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Die Färbung mit indirekter Immunoperoxidase-Reaktion mit DAB-Entwicklung wurde auf demselben Objektträger durchgeführt, zur selben Zeit und in demselben Behälter. Alle Proben wurden parallel untersucht.

3.3 Durchführung der Experimente

3.3.1 Angiotensin II-Versuch

Angiotensin II (Ang II) wurde von uns in den gemäß Literatur üblichen Konzentrationsdosen 0,1 μM und 1 μM zur Behandlung der Zellen eingesetzt.

Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurden die in 75 cm^2 Kulturflaschen befindlichen Zellen der Ang II-Behandlung unterzogen. Hierzu saugten wir zunächst das Kulturmedium ab und führten einen Waschvorgang mit PBS durch. Im Anschluss wurden je drei Kulturflaschen mit 1 μM Ang II und weitere drei mit 0,1 μM Ang II behandelt. Von dem entsprechenden Ang II-Medium wurden auf jede Kulturflasche 15 ml gegeben und die Zellen im Anschluss im Brutschrank für 24 h und 72 h inkubiert. Danach erfolgte das Ernten der Zellen. Die Zellen auf den Supercell-Kammerobjektträgern wurden kurz vor dem Erreichen der Konfluenz für die Ang II-Versuche inkubiert, und zwar entweder mit 0,1 μM oder mit 1 μM Ang II (eine Dosis pro Well; Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Das Ang II war in Serum-freiem Medium gelöst und auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Die Zellen auf den Kammer-Objektträgern wurden mit Aceton bzw. Paraformaldehyd 4 % bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ für die anschließende immunhistochemische Analyse fixiert. Untersucht wurden Zellen der Passagen 1-2.

3.3.2 TGF- β_1 -Versuch

Es erfolgte eine Stimulation kardialer Fibroblasten aus Infarkt Herzen mit in Medium gelöstem TGF- β_1 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) des Schweins, um die Auswirkungen auf die Synthese von EZMP zu untersuchen. Da wir den genauen Zeitpunkt feststellen wollten, zu dem die Synthese in den Zellen beginnt, wurden jeweils Proben genommen nach Stimulationszeiten von 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min und 120 min. Die Stimulation wurde parallel in 16 Kulturflaschen

durchgeführt. Die Zellen der Kontrollreihe erhielten keine Stimulation, sondern lediglich die entsprechende Menge von Medium. Nach den entsprechenden Stimulationszeiten wurden jeweils Proben entnommen und mittels Westernblot untersucht. Es wurden Zellen der Passage 4 verwendet.

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Immunzytochemie

3.4.1.1 Übersicht über die Methode

In der Immunhistochemie macht man sich die Spezifität von Antikörpern zunutze, um die Verteilung von bestimmten Antigenen sichtbar zu machen. Die Methode kann an histologischen Schnitten angewendet werden, aber auch an Zellen, welche auf speziellen Objektträgern angezüchtet und fixiert wurden, wie dies in unseren Untersuchungen der Fall gewesen ist. Man setzt hierzu Antikörper ein, die spezifisch gegen das jeweils gesuchte Antigen gerichtet sein müssen und dadurch mit diesen eine Bindung eingehen, wodurch sie haften bleiben. Um diese Bindung darstellen zu können und somit die Anzahl der Bindungen sowie ihre Lokalisation demonstrieren zu können, stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung. Bei der direkten Nachweismethode ist der spezifische Antikörper direkt mit einem Marker konjugiert, wie z.B. einem fluoreszierenden Farbstoff. Der Vorteil besteht darin, dass dies eine sehr schnelle Nachweismethode ist. Allerdings weist die Methode einige Nachteile auf. So muss eine hohe Konzentration der AK verwendet werden, um eine gute Markierung zu erlangen. Dies ist zum einen sehr teuer, zum anderen verursacht dieses Vorgehen meist eine starke Hintergrundfärbung. Darüber hinaus ist die Sensitivität dieser Methode aufgrund zahlreicher unspezifischer Bindungen nicht besonders groß, und eine längere Archivierung bei Verwendung von Fluorochromen ist nicht möglich, da das Signal durch Lichteinwirkung verblasst (Noll, 2000).

Bei der indirekten Methode setzt man ebenfalls einen spezifischen Antikörper ein, der allerdings unkonjugiert ist und Primärantikörper genannt wird. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe eines weiteren Antikörpers, des so genannten Zweitantikörpers oder Sekundärantikörpers. Dieser ist spezifisch gegen die Tierspezies gerichtet, in welcher der Primär-AK gewonnen wurde und seinerseits mit einem Fluorochrom konjugiert. Der Sekundär-AK bindet nun an den Primär-AK. Der hauptsächliche Vorteil dieser Methode besteht in der höheren Sensitivität (Romeis, 1989).

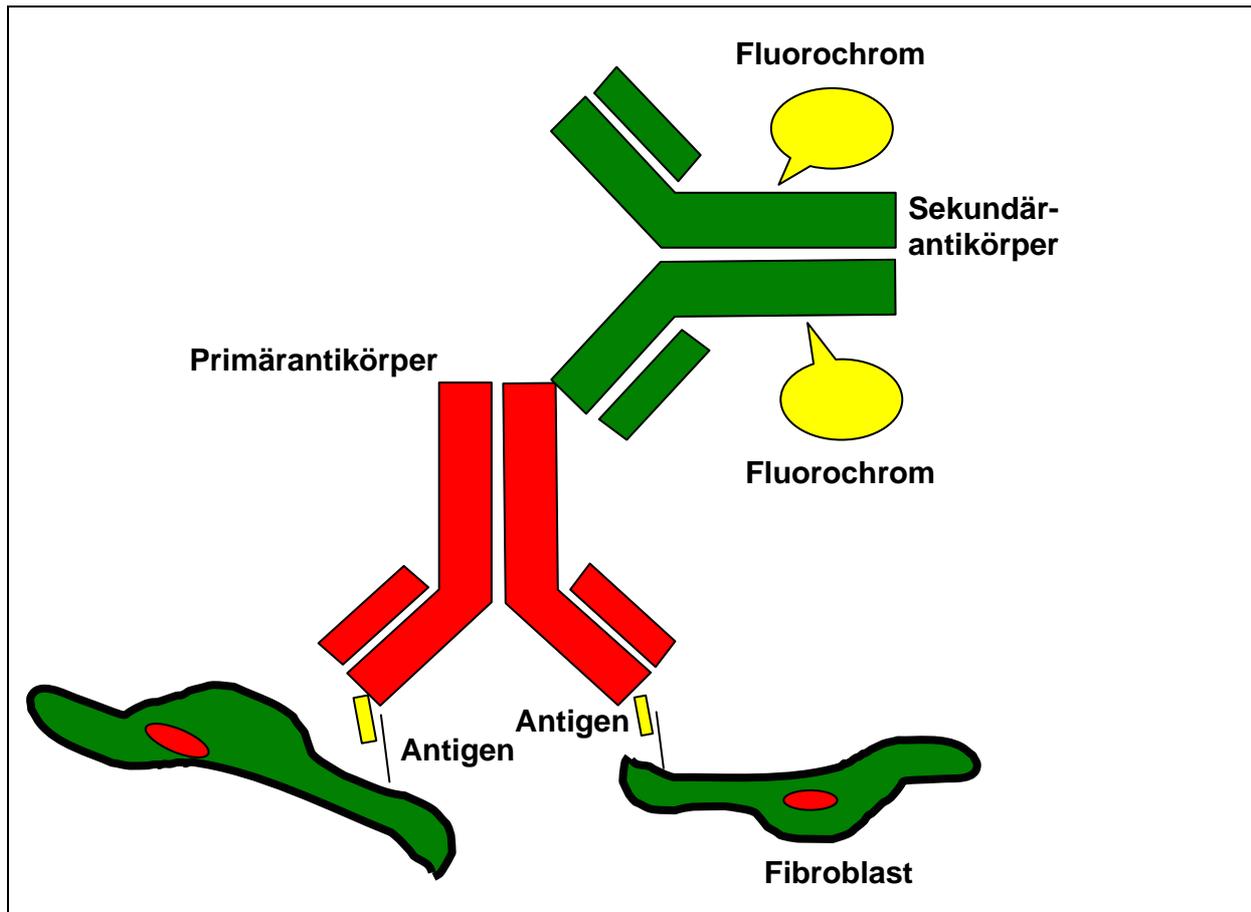


Abb. 8: Prinzip des Antigennachweises mit der indirekten Immunfluoreszenzmethode

3.4.1.2 Protokoll der Färbungsmethode

Die von uns zum Nachweis ausgewählten Komponenten der EZM bestanden aus den Proteinen Kollagen Typ I und III, Osteopontin, Fibronectin sowie Laminin. Der Nachweis erfolgte über eine immunzytochemische Färbung mit Antikörpern, die gegen diese Proteine oder Bestandteile von diesen gerichtet waren, den Primär-AK. Die Detektion und Sichtbarmachung dieser Primär-AK erfolgte durch Hinzugabe eines Sekundär-AK.

Wir setzten als Primär-AK monoklonale Antikörper gegen Kollagen Typ I (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und III (Monosan, Beutelsbach, Deutschland) ein, gegen Osteopontin den AK MPIIB10₁ der Universität von Iowa, (Hybridoma Bank, USA) gegen Fibronectin einen AK der Firma Chemicon (Hofheim) sowie gegen Laminin einen AK der Firma Sigma (Taufkirchen) ein. Als Sekundär-AK wurde ein aus dem Kaninchen gewonnener anti-Maus-AK (Rabbit-anti-mouse) bzw. ein im Schwein gewonnener anti-Rabbit-AK (swine-anti-rabbit) mit HRP in der Verdünnung 1:40 eingesetzt (beide Firma DAKO).

Die Färbungen wurden von uns nach dem folgenden Schema durchgeführt.

Zeitliche Abfolge	Lösungen	Ziel
1 min	500 µl PBS/Well	Waschvorgang
30 min	500 µl Goatserum 1 %/Well	Unterbinden unspezifischer Bindungen der Primär-AK
60 min	200 µl Primär-AK/Well	Inkubation
3 x 2 min	PBS	Entfernung überschüssiger Primär-AK
60 min	200 µl RAM-AK HRP oder 200 µl SAR-AK	Inkubation
während Inkubation:		
15 min	3 Tabletten DAB in 60 ml PBS	Auflösen mit Magnetrührer
1 min	10ml PBS mit 100 µl H ₂ O ₂	Katalysator
nach Inkubation:		
3 x 2 min	PBS	Entfernung überschüssiger Sekundär-AK
Kammer von Objektträgern entfernen, Objektträger in Küvetten mit DAB-Lösung stellen und 1200 µl Katalysator zugeben		
7 min	60 ml DAB/Küvette	Detektion der Sekundär-AK
10 min	Leitungswasser	fließend wässern
3 min	60 ml Hämalaun/Küvette Meyers Hämatoxylin pur	Zellkernfärbung
10 min	Leitungswasser	fließend wässern
je 1 min	aufsteigende Alkoholreihe (70, 96 u. 100 %)	Dehydratisierung
5 min	Xylol	Dehydratisierung
Eindeckeln der Objektträger mit Entellan und Deckgläschen		

Tab. 2: Protokoll der immunhistochemischen Färbemethode

3.4.1.3 Quantitative Bildanalyse

Die computergestützte Auswertung der gefärbten Zellen erfolgte in einem Bildausschnitt. Für die Quantifizierung wurden im Durchlicht 10 unterschiedliche Bildausschnitte mit einer Größe von $301146,94 \mu\text{m}^2$ aufgenommen.

Wir verwendeten für die Aufnahme der Bilder das Photomikroskop Axiophot der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, das mit einem Videosystem der Firma AVT-HORN verbunden wurde. Das Videosystem beinhaltet eine Farb-Videokamera mit drei 1/2"-CCD-Chips, ein externes Kamerasteuergerät und einen Frame Grabber. Um von dem Bildbereich digitale Bilder zu erhalten, wurde die Farb-Videokamera mit dem externen Kamerasteuergerät an einen Computer (Power Macintosh 8200/120) und an den Frame Grabber angeschlossen. Nach einer Aufwärmzeit der Bildanalyseeinheit von 10 Minuten wurden alle Bilder mit den gleichen Einstellungen am Mikroskop und der Kamera digitalisiert und anschließend im Tagged Image File Format (TIFF) gespeichert. Wir legten jeweils eine Sicherungskopie auf einer beschreibbaren CD an und werteten die aufgenommenen Bilder mit dem Freeware-Programm Scion Image 1.62a aus. Die Grundflächen der gefärbten Zellen wurden markiert und die Gesamtfläche automatisch unter Berücksichtigung der Vergrößerung berechnet. Für die Messung der gefärbten Zellen wurde die Bildanalyseeinheit zunächst mit einem Objektmikrometer auf metrische Einheiten kalibriert. Die Software wandelt das Bild auf der Grundlage von Grauwerten in schwarze und weiße Bereiche um. Die schwarzen Areale entsprechen den gefärbten Zellen, der weiße Hintergrund den nicht gefärbten Zellen. Der Schwellenwert für die Detektierung der Zellareale wird automatisch gesetzt und nach Vergleich mit dem Farbbild gegebenenfalls manuell neu eingestellt. Der quantitative Anteil der schwarzen Areale wird gemessen und als prozentualer Anteil vom Gesamtbild angegeben. Die Auswertung der Bilddaten konnte durch die im Bildanalyseprogramm integrierte Makrosprache Pascal weitgehend automatisiert werden, wobei das Prinzip dieser Bildanalyse als halbautomatisiertes Verfahren einzustufen ist. Von allen ausgemessenen 10 Bildausschnitten pro Schnitt wurde ein Mittelwert gebildet. In anderen Worten stellt sich also nach Inversion des Zell-Fotos in eine Schwarz-Weiß-Darstellung auf der Basis von Pixeln der nicht gefärbte Teil der Zelle als hell dar, da hier nur eine geringe Anzahl an Pixeln in „Schwarz“ konvertiert wurde. Demgegenüber erhält der angefärbte Bereich nach Inversion eine dunklere Darstellung. Durch Messung des Anteils der Dunkelfärbung an der Gesamtgrund-

fläche der einzelnen Zelle ermittelten wir den Grad der Anfärbung der Zellen. Wir fanden hierbei eine gute Übereinstimmung zwischen subjektiver Beurteilung des Bildes bei Betrachtung und dem von uns gemäß oben erläuteter Methode ermittelten Färbeanteil.

3.4.2 Durchflusszytometrie

Die Idee, eine große Anzahl von angefärbten Zellen schnell und präzise untersuchen zu können, wurde zum ersten Mal zwischen 1965 und dann 1970 umgesetzt. Das Grundprinzip besteht darin, eine Flüssigkeit mit Zellen in einem schnellen Strom so durch einen Messkopf zu führen (beziehungsweise am Objektiv des Mikroskops vorbeiziehen zu lassen), dass immer nur eine Zelle dessen Öffnung passiert. Mit elektronischem Licht, einem Laser, wird die Messung durchgeführt. Das Licht des Lasers wird hierzu auf die Mitte des Flüssigkeitsstroms fokussiert. Trifft es nun auf die Zellen, so wird es in bestimmten Winkeln abgelenkt und regt gleichzeitig Fluoreszenz- oder auch Lumineszenzerscheinungen an. Die Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Zellsuspensionen, die mit Fluoreszenzfarbstoffen versetzt sind, werden simultan gemessen und messtechnisch interpretiert.

Die Zellen können nicht nur auf Größe und Anzahl hin untersucht werden, sondern mittlerweile dank moderner Auswertungstechnik sowie weit fortentwickelter Färbemethoden auf eine Vielzahl von morphologischen und funktionellen Eigenschaften, wie z.B. Rezeptoreigenschaften, Proteingehalt, DNA-Gehalt, Proliferationsgrad und Enzymkinetik sowie viele andere Kriterien. Zudem ist es möglich, aus einer Lösung mit Zellen unterschiedlichster Natur die einzelnen Zelltypen zu diskriminieren und sogar Zellen zu klonieren. Durch diese umfangreiche Palette quantitativer und qualitativer Anwendungsmöglichkeiten ist die Durchflusszytometrie aus dem Gebiet der Zellbiologie nicht mehr wegzudenken, und auch in der klinischen Diagnostik ist sie mittlerweile zur Standardeinrichtung bei der Klärung bestimmter Fragestellungen geworden.



Abb. 9: Das FACScan Durchflusszytometer der Firma BD, Heidelberg, Deutschland

Die verwendeten Färbemethoden basieren weitestgehend auf den drei Prinzipien der Fluoreszenz, der Chromogenität, d.h. einer Änderung der Farbe, die durch biochemische Reaktionen der Färbelösung verursacht wird, sowie auf Verwendung monoklonaler Antikörper.

Für unsere Untersuchungen führten wir Färbungen mittels monoklonaler Antikörper durch, um die Fibroblasten hinsichtlich ihres Gehaltes an EZMP zu untersuchen.

3.4.2.1 Aufbau

3.4.2.1.1 Flüssigkeits-System

Das Flüssigkeits-System dient dem sachgerechten Transport der Probe. Die gefärbten Zellen werden in ein Proberöhrchen (5 ml BD Falcon, Heidelberg) gefüllt. Aus diesem werden sie durch Überdruck über eine Stahlkapillare in eine Messküvette eingeführt und in die Flüssigkeitskammer transportiert, wobei die Zellen durch die umgebende Trägerflüssigkeit beschleunigt werden und zum Analysepunkt gelangen. Wichtig für die Untersuchung ist, dass jede Zelle einzeln vermessen wird. Dies wird durch den laminaren Flüssigkeitsstrom erreicht, welcher die Zellen koaxial

umhüllt und somit in einem engen Bereich hält. Man bezeichnet dieses Arbeitsprinzip als hydrodynamische Fokussierung.

3.4.2.1.2 Optisches System

Das optische System des FACScan-Durchflusszytometers besteht aus drei Teilen, die im Folgenden kurz beschrieben werden.

- **Illuminations-Optik**

Die Lichtquelle besteht bei unserem Gerät aus einem luftgekühlten Argon-Ion-Laser. Der Lichtstrahl wird auf den Flüssigkeitsstrom gerichtet, entweder direkt oder aber mittels Umlenkung über Spiegel und Prismen. Bei einer Laserlichtquelle können zusätzliche Optiken benutzt werden, um den Laserstrahl zunächst zu zerstreuen und somit Prismen, Spiegel und Filter zu schonen.

- **Forward Light Scatter Sammel-Optik**

Diese Optik arbeitet mit Vorwärtsstreulicht (Englisch: forward light scatter FSC). Ein Mikroskop mit niedriger numerischer Öffnung observiert den Flüssigkeitsstrom von der Seite her, welche der Lichtquelle entgegengesetzt ist, also entlang der Richtung des einfallenden Lichtes. So kann es in einem Bereich von 2° - 20° abseits der Achse des Lichtstrahls das Licht auffangen, welches von Partikeln im Flüssigkeitsstrom in diesen Bereich abgelenkt wird. Das FSC stellt ein Maß für die Größe der zu untersuchenden Zelle dar.

- **Fluoreszenz und Side Scatter Sammel-Optik**

Hierbei handelt es sich um die Auswertung des Seitwärtsstreulichtes, auf Englisch side scatter (SSC). Ein zweites Mikroskop beobachtet die Zellen hierbei von der Seite, d.h. perpendicular zur Achse der Lichtquelle sowie zum Flüssigkeitsstrom. Das Objektiv hat eine lange Arbeitsdistanz und eine hohe numerische Apertur. Indem das Licht aufgefangen wird, welches sich mit rechtwinkliger Abweichung ausbreitet, können Aussagen über die intrazelluläre Granularität gemacht werden.

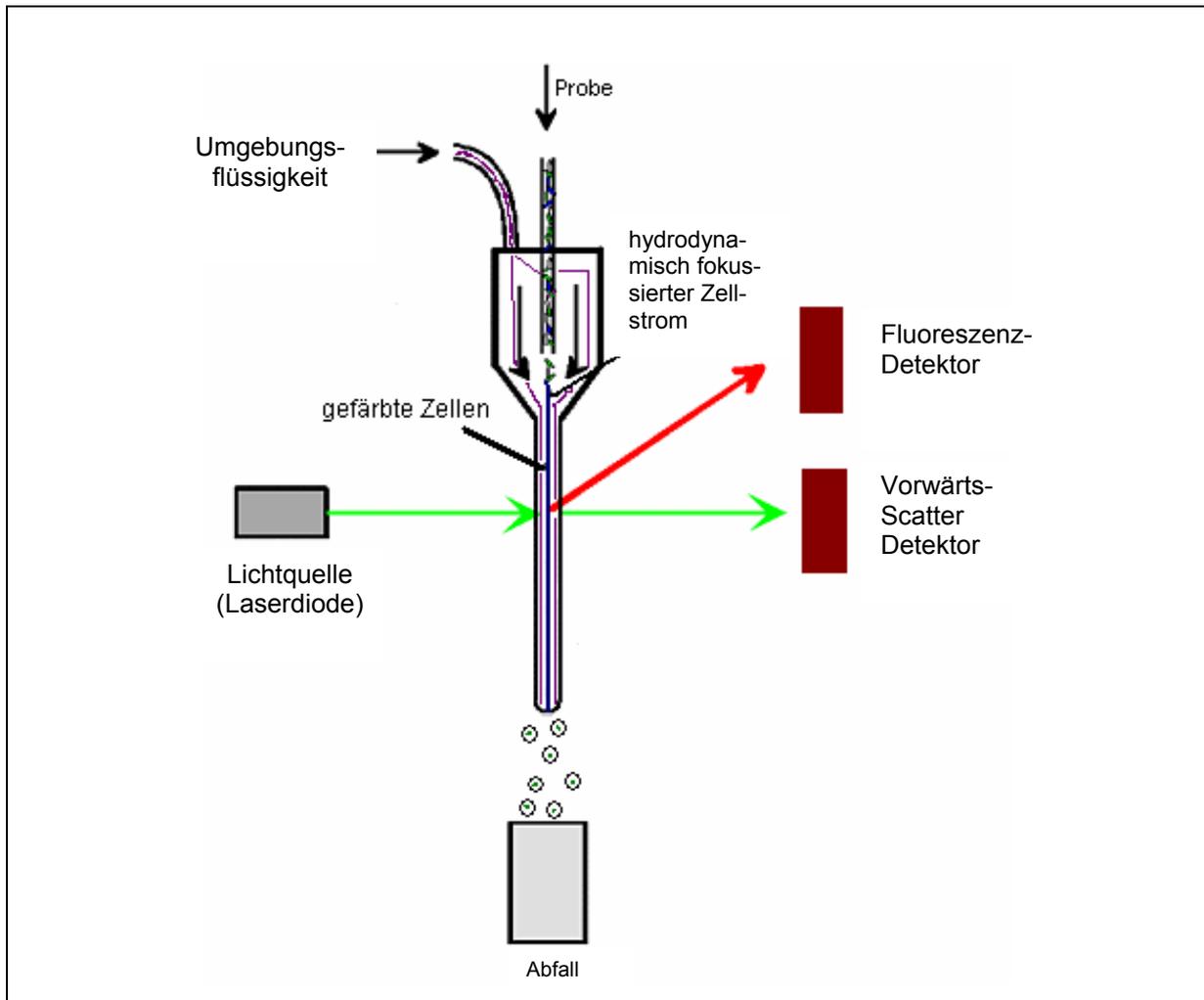


Abb. 10: Schematischer Aufbau des FACScan; abgeändert nach B. M. Fuchs, MPI Bremen

Parallel zu den oben beschriebenen Vorgängen wird die Fluoreszenz gemessen. Das Prinzip der Fluoreszenz besteht aus der Absorption von Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches, wodurch Elektronen zunächst auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Beim Rückfall dieser Elektronen auf das ursprüngliche energetische Grundniveau kommt es dann zu einer Photonemission, die aufgefangen und verwertet werden kann. Für jede fluoreszierende Verbindung existiert ein charakteristischer Wellenlängenbereich, in dem es zur Fluoreszenz-Anregung kommt.

Jede Zellsuspension weist einen gewissen Anteil an Eigenfluoreszenz auf, welche die Ergebnisse verfälschen würde. Um diesem Problem zu begegnen, wird für jede Messreihe eine Kontrollreihe angefertigt, welche nicht mit einem Erst-Antikörper angefärbt wurde, sondern nur mit dem Zweit-Antikörper. Die so festgestellte Eigenfluoreszenz kann dann bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Bei der Analyse des Lichtes (FSC und SSC) sowie der Fluoreszenz werden

analoge Signale erzeugt. Um diese im Anschluss analysieren zu können, werden sie über einen Wandler digitalisiert und auf dem angeschlossenen Computer gespeichert. Die Auswertung kann dann sowohl direkt im Anschluss als auch zu einem späteren Zeitpunkt vorgenommen werden. Bei der Auswertung der aus den Daten konfigurierten und in Form einer Punktwolke bzw. eines Dichtediagrammes dargestellten Messergebnisse wird zunächst elektronisch ein Bereich ausgewählt (region gating), und zwar aus den Ergebnissen der Kontrollreihe. Diese Region wird auf die Ergebnisse der gefärbten Zellen übertragen, um eine Verfälschung der Daten durch Verunreinigungen zu verhindern.

3.4.2.2 Färbeprotokoll

Die wie oben beschrieben in 70 %igem Alkohol fixierten Zellen (Passage 2-3) aller Zellanzuchten werden zunächst durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Suspension wird auf Eppendorfcups verteilt, die anschließend bei 1500 g 10 min zentrifugiert werden (Biofuge, Heraeus). Der Überstand wird dekantiert, der restliche Alkohol mit PBS-FKS-Lösung (2 % FKS) abgewaschen und das ganze nochmals 10 min bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Proben mit 100 µl der jeweils optimalen Konzentration oder 2 Tropfen der vorverdünnten Erstantikörper bestückt und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Hierauf folgen zwei Waschvorgänge mit PBS+2 % FKS-Lösung, in deren Anschluss die Proben mit 200 µl Zweitantikörper bestückt werden. Dieser muss auf den Erstantikörper abgestimmt sein. Nachdem auch dieser Ansatz für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert hat, werden die Proben nochmals zentrifugiert, und die Überstände abgesaugt. Hierauf wird in jedes Röhrchen 500 µl FACSTFlow-Lösung gegeben und die Zellen darin gelöst. Die nun gefärbten Zellen werden in die zur Messung verwendeten Röhrchen pipettiert.

Die Messung wird an einem Durchflusszytometer der Marke FACScan durchgeführt. Die passenden Einstellungen für die jeweiligen Zellen sind in Vorversuchen ermittelt worden.

3.4.2.3 Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Charakterisierung mittels der Durchflusszytometrie wurde durch Bestimmung des Gehaltes an alpha-smooth muscle actin (ASMA) durchgeführt. Fibroblast-like cells unterscheiden sich von kardialen Fibroblasten durch einen deutlich höheren

intrazellulären Anteil dieses Proteins. Wir fügten zu 10^5 der gewaschenen und in 70 %igem Alkohol fixierten Zellen Antikörper gegen ASMA in sättigender Konzentration hinzu. Die Zellen wurden dann für 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und im Anschluss dreimal mit PBS+2 % FKS gewaschen. Nach diesem Vorgang inkubierten wir die Zellen für 45 Minuten unter Lichtausschluss bei RT mit einem FITC-konjugierten anti-Maus-IgG Antikörper, welcher an den Erstantikörper bindet. Nach wiederholten Waschvorgängen, welche der Entfernung überschüssigen Zweitantikörpers dienten, folgte die Analyse der Zellsuspension mittels des Facscan Durchflusszytometers (BD Heidelberg, Deutschland), das mit einem Argonlaser ausgestattet ist. Es wurden solche Zellen als positiv angesprochen, welche eine Fluoreszenz-Aktivität über der oberen Grenze der Fluoreszenzverteilung der Negativ-Kontrolle zeigten.

3.4.2.4 Auswertung

Die Messungen wurden mittels der Software FACScan Research Software Version 2.1 durchgeführt. Nach durchgeführter Messung und Datentransfer auf einen Computer werteten wir die Daten aus. Wir bedienen uns dafür des Programmes WinList 1.0.

3.4.3 Westernblot-Analysen

3.4.3.1 Protein-Extraktion und Westernblot

Die Zellpellets der geernteten Fibroblasten (Passage 3-4 aller Zellanzuchten) werden mit Hanks Salzlösung (8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,06 g KH_2PO_4 , 0,35 g NaHCO_3 , 1 g Glukose, ad 1000 ml H_2O , ph 7,4) dreimal gespült und anschließend sofort der Lyse zugeführt. Diese erfolgt nach Verteilung der Zellen auf Eppendorf-Röhrchen, wobei die Arbeitsschritte nun alle auf Eis durchgeführt werden. Es wird 1 ml eisgekühlter Lysispuffer hinzu gegeben, der Ansatz nach 15 min Inkubation mit der Pipette homogenisiert und nochmals für 15 min inkubiert. Nach einem weiteren Homogenisationsschritt wird der Ansatz bei 4 °C für 30 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Das Protein befindet sich nun im Überstand, der abgenommen wird und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt wird. Anschließend werden die

Überstände in neue Eppendorf-Röhrchen überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Die Proteinkonzentration wird mit dem BCA-Protein-Assay-Kit der Firma Pierce kalorimetrisch bestimmt. Dazu werden je 10 µl Proteinextrakt mit 20 µl des Reagenzes A und 20 µl des Reagenzes B (1:50) auf der Mikrotiterplatte versetzt. Zur Herstellung des Standards werden 10 µl des BSA (Bovines Serum Albumin) Standards mit dem Reagenz A+B vermischt. Nach guter Durchmischung der Proben und Standards erfolgt eine Inkubation für 30 min bei 60 °C, die im Anschluss durch Erwärmen auf Raumtemperatur gestoppt wird.

Im Spectrofotometer erfolgt die Messung der Farbstoffintensitäten bei einer Wellenlänge von 562 nm.

Die Gesamtproteinkonzentration errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Pro-Konz. [mg/ml]} = \frac{2 * \text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion Standard}}$$

Um die Proteine aufzutrennen, verwenden wir 10 % Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)-PAGE. Nach mehrmaligem gründlichen Reinigen der Glasplatten mit 80 %igem Ethanol wird das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erzeugen. Nach 30 min ist die Polymerisation abgeschlossen, das Trenngel wird nach Entfernung des Isopropanols mit Sammelgel überschichtet, in welches der Kamm eingefügt wird. Nach abgeschlossener Polymerisation kann der Kamm entfernt werden. Man versetzt nun 200 µl Proteinextrakt mit 50 µl Probenpuffer und 15,6 µl 5 % 2-Mercaptoethanol und lässt den Proteinansatz für 10 min bei 95 °C denaturieren. Im Anschluss werden die Proben in ein neues Eppendorf-Röhrchen-Set überführt und im Kühlschrank für 15 min abgekühlt. Die obere- und untere Pufferkammer werden vor dem Auftragen der Proben mit Laufpuffer gefüllt und die Geltaschen gründlich gespült, dann werden in die Kammern pro Probe je 20 µl pipettiert.

Die Auftrennung der Proben erfolgt für 15 min bei 80 Volt und dann für 60 min bei 120 Volt. Nach erfolgter Auftrennung entfernt man die Glasplatten und legt das Gel

auf ein Filterpapier und die Nitrozellulosemembran in eine mit Transfer-Puffer beschichteten Blot-Kammer. Nun wird ein Filterpapier auf das Gel gelegt, die Kammer luftblasenfrei geschlossen und zweimal das Blotten je 30 min lang bei 120 Volt durchgeführt. Die Membranen werden über Nacht in Blocking Puffer bei 4 °C inkubiert. Man verdünnt die Primär-Antikörper mit dem Blocking-Reagenz im Verhältnis 1:1000 und inkubiert nun 1 h lang bei RT mit der Membran, im Anschluss werden die Membranen 5 mal mit Blocking Puffer gewaschen. Der mit dem Blocking-Reagenz im Verhältnis 1:5000 verdünnte Sekundär-Antikörper wird 30 min lang bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Es folgt ein 5maliger Waschvorgang der Membranen mit Blocking Puffer, dreimalig mit 0,1 M Tris-Puffer mit 0,05 M MgCl₂ und einmalig mit 0,1 M NaCl. Zur Detektion spezifischer Bindungen werden die Entwickler Nitroblautetrazolium (NBT) und 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat (BCIP) verwendet. Die Membranen werden 160 min lang in eine abgedunkelte, mit Entwicklerlösung gefüllte Färbekammer gelegt, anschließend 2 mal 10 min lang mit destilliertem Wasser gespült, getrocknet und in Saran-Film luftblasenfrei eingepackt. Es wird mit einer Kamera ein Foto angefertigt, das für die folgende Densitometrie (Aida Image Analyse 2.11 –Programm, Raytest Isotopenmeßgeräte) eingescannt wird. Das Ergebnis der densitometrischen Auswertung, bei der für jede Bande gleichgroße Messfelder verwendet werden, wird als Integral zum Hintergrund in Prozent angegeben (Integral-Bkg [%]).

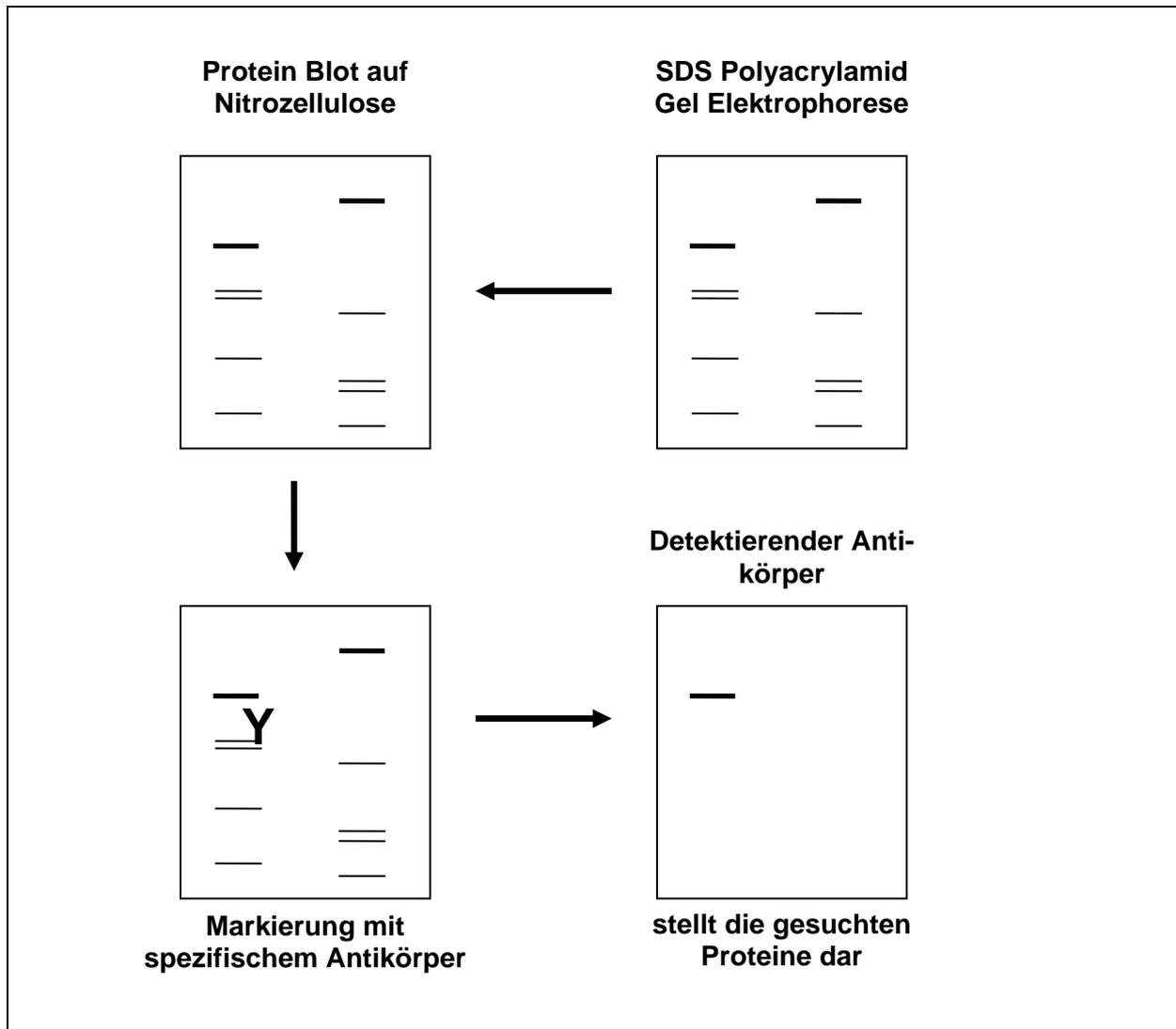


Abb. 11: Prinzip der Western Blot-Methode

3.4.4 Taq Man PCR

3.4.4.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wird mit TRIzol™ durchgeführt. Der Polytronschaft wird vor Beginn der Extraktion mit ddH₂O, absolutem Ethanol, 0,1 % Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC-Wasser) und abschließend mit TRIzol™ gereinigt. Zwischen den einzelnen Proben wird der Polytronschaft mit 0,1 % DEPC-Wasser und TRIzol™ gereinigt. Um die Arbeitsgeräte RNase-frei zu machen, werden sie mit RNase-

Erase[®] behandelt. Sämtliche Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt. Das Polytron wird auf eine Umdrehungsgeschwindigkeit von 22.000 U/min eingestellt. Nun werden die Zellsuspensionen mit 1 ml TRIzol™ versetzt, welches eine Mischung aus Guanidinisothiocyantlösung (GTC) und Phenol darstellt. GTC bewirkt eine Lyse der Zellen. Es werden für jede Probe sechs Homogenisationsschritte durchgeführt für je 30 s mit jeweils einer 30 sekundigen Pause in den Intervallen. Das nun gewonnene Homogenat wird in ein 1,5 ml Röhrchen überführt und auf Eis gestellt, anschließend wird es mit 0,2 ml Chloroform versetzt, geschüttelt, zentrifugiert (15 min /12.000 U/min/4 °C) und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diesen Vorgang kommt es zu einer Denaturierung und somit Inaktivierung aller Proteine. Es erfolgt eine Trennung von Proteinen, DNA-Fragmenten und RNA in den verschiedenen Phasen. Die RNA bleibt hierbei in der wässrigen Phase zurück, welche man im Anschluss an die Inkubation in ein neues 1,5 ml Röhrchen überführt und nun mit 0,5 ml eiskaltem Propanol versetzt. Der Ansatz wird gut geschüttelt, für 10 min bei RT inkubiert zur Fällung der enthaltenen RNA und daraufhin für 10 min zentrifugiert (12.000 U/min, 4 °C). Nach dem Verwerfen des Überstands erhält man ein Pellet mit der Gesamt-RNA, die hauptsächlich aus tRNA (transfer RNA) und rRNA (ribosomale RNA) sowie zu 2 % aus mRNA (messenger RNA) besteht. In einem weiteren Arbeitsschritt wird das Pellet mit 1 ml eiskaltem Ethanol (75 %) resuspendiert, zentrifugiert (10 min; 12.000 U/min, 4 °C) und nach dem Absaugen des Überstands für 10 min bei RT getrocknet.

Das RNA-Pellet wird in 30 µl DEPC-Wasser (0,1%) aufgenommen und bei 55 °C 10 min lang bis zur vollständigen Lösung inkubiert.

3.4.4.2 Spektrofotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Mit dieser Methode soll der Reinheitsgrad der Probe hinsichtlich der RNA bestimmt werden. Dazu werden 2 µl der RNA-Probe mit 98 µl ddH₂O (pH-Wert 7,5) versetzt (Verdünnungsfaktor = 50) und die Extinktionen verschiedener Wellenlängen gemessen. Bei 260 nm wird zwischen RNA- und DNA-Gehalt differenziert und bei 280 nm auf den Protein-Gehalt untersucht. Aus dem Quotienten A_{260}/A_{280} kann eine Beurteilung des Reinheitsgrades gemacht werden, es werden Proben mit einem Wert über 1,5 verwendet. Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgt über folgende Formel:

$$RNA - Konz. : [\mu g / \mu l] = \frac{OD260 \times 40(RNA - Multiplikationsfaktor) \times 50(Verdünnungsfaktor)}{1000}$$

3.4.4.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Um aus der gewonnenen RNA nun komplementäre DNA (cDNA) zu gewinnen, welche für die Durchführung der PCR vonnöten ist, wird diese mittels des QIAquick PCR Purification Kit[®] synthetisiert.

Die Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt; man verwendet 2 µg pro Probe, die mit 1 µl Hexamerprimer (0,2 µg/µl) in Minutubes überbracht werden und die man anschließend mit deionisiertem Wasser (Nuklease-frei) auf 10 µl auffüllt. Es folgt nach Durchmischung eine Erhitzung auf 70 °C im Thermozykler für 5 min, im Anschluss wird der Ansatz versetzt mit 4 µl Reaktionspuffer (5x reaction buffer), 1 µl Ribonuclease Inhibitor (20 U/µl), 2 µl dNTP-Mix (10 mM) und 2 µl Reverse Transkriptase (M-MuLV reverse transcriptase, 20 U/µl) pro Probe. Es wird gemischt und die Probenansätze für eine Stunde bei 37 °C im Thermozykler inkubiert, im Anschluss werden die nun fertigen Proben auf 4 °C abgekühlt und für die PCR verwendet. Bei späterer Verwendung erfolgt die Lagerung bei 20 °C.

3.4.4.4. Prinzip der DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung (Amplifizierung) eines gesuchten DNA-Fragmentes. Durch Erhitzung wird der DNA-Doppelstrang in Einzelstränge aufgelöst. Nun kann sich ein sequenzspezifisches Primerpaar an die DNA-Abschnitte anlagern bzw. hybridisieren. Diese Stelle dient der DNA-Polymerase als Startpunkt, um mithilfe von hinzugefügten Desoxynukleotiden einen komplementären Strang zu synthetisieren. Da dieser Arbeitsschritt im mehreren Zyklen hintereinander durchgeführt wird, kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des gesuchten DNA-Abschnittes.

Um das gewonnene DNA-Produkt sichtbar zu machen, wird im Anschluss eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Ansatz der PCR:

Pro Ansatz werden 2,5 µl Puffer-Lösung, 2,0 µl dNTP-Mix (2,5 mM), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,3 µl Forward-Primer (10 µM), 0,3 µl Reverse-Primer (10 µM) und 0,3 µl Taq-Polymerase pipettiert. Diese so genannte PCR-Stamm-Lösung wird nun mit 17,6 µl

ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 24,5 µl gebracht und anschließend kurz gemixt. Von jeder Template-DNA werden nun 0,5 µl, zusammen mit 24,5 µl PCR-Stamm-Lösung, in ein PCR-Röhrchen pipettiert, kurz geschüttelt und anschließend in den Thermozykler gegeben.

Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, wird eine Touchdown-PCR durchgeführt. Bei dieser Methode wird die „Annealingtemperatur“ schrittweise reduziert. Im ersten Zyklus liegt die Annealingtemperatur der Primer über dem geschätzten T_m-Wert (Schmelztemperatur). In den nachfolgenden Zyklen wird die „Annealingtemperatur“ schrittweise um 0,5 °C pro Zyklus erniedrigt, bis eine Temperatur erreicht wird, die ungefähr dem T_m-Wert der Primer entspricht. Dadurch wird die Hybridisierung der Primer an das Template erleichtert.

Temperaturprogramm des Thermozyklers:

1. 95 °C	2 min	
2. 95 °C	30 s	
3. 65 °C	30 s	Wiederholung der Schritte 2. bis 3. (29 mal); Reduzierung
4. 72 °C	40 s	der Temperatur im 3. Schritt um 0,5 °C pro Zyklus
5. 94 °C	30 s	
6. 55 °C	30 s	
7. 72 °C	40 s	Wiederholung der Schritte 5. bis 7. (9 mal)
8. 72 °C	3 min	

3.4.4.5 Agarosegelelektrophorese

RNA und DNA können in einem elektrischen Feld auf Grund ihrer negativen Nettoladung aufgetrennt werden. Daher nutzt man die horizontale Gelelektrophorese, um die gewonnenen Präparate auf ihre RNA-Integrität zu untersuchen, um die 18 S- und 28 S-rRNA-Fragmente nachzuweisen und um die PCR-Produkte zu charakterisieren.

Man pipettiert 2 µl RNA-Probe bzw. 5-50 µl PCR-Produkt (DNA) mit 1/10 Volumen Lade-Puffer in die Geltaschen in die Geltaschen eines 1 %igen Agarose-Gels [Lösung der Agarose in 100 ml 1 X TAE-Puffer durch Erhitzen und Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)]. Nun wird die RNA bei 90 V für ca. 25 min (72 V bei 20 min für DNA) in 1 X TAE-Lauf-Puffer aufgetrennt. Anschließend kann man die RNA bzw. DNA auf dem UV-Transilluminator sichtbar machen und die Ergebnisse durch

Kameraaufnahmen festhalten. Zum Einordnen und Vergleichen der Fragmentgrößen dient ein gleichzeitig aufgetragener 100 bp-Marker.

3.4.4.6 Isolierung von PCR-Amplifikaten

Zur Herstellung der Standards für die Realtime TaqMan[®]-PCR werden PCR-Produkte hergestellt und mit dem QIAquick-PCR-Purification-Kit[®] nach den Anweisungen des Herstellers gereinigt.

Zum Reaktionsansatz werden 500 µl „PB“-Puffer gegeben und vermischt. Ein QIAquick-spin column[®] wird in ein Röhrchen gestellt und das Gemisch aufgetragen. Bei der nachfolgenden Zentrifugation (30 s bei 10.000 U/min) binden die höhermolekularen (ab 100 bp) doppelsträngigen DNA-Fragmente an das Membran-Material. Der Durchfluss wird verworfen. Die gebundene DNA wird durch Auftragen von 500 µl „PE“-Waschpuffer und anschließende Zentrifugation (1 min bei 10.000 U/min) gewaschen.

Im Anschluss werden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt Reste des Waschpuffers entfernt. Die QIAquick-spin column[®] wird in ein neues Röhrchen überführt, zur Elution der DNA werden 50 µl „EB“-Puffer auf die Säule gegeben und erneut 10.000 U/min für 1 min zentrifugiert. Im Eluat befindet sich das aufgereinigte PCR-Produkt.

3.4.4.7 Realtime TaqMan[®]-PCR (Quantitative Echtzeit-PCR)

Das Prinzip der Real Time TaqMan[®]-PCR besteht in der Erzeugung fluoreszierender PCR-Produkte. Parallel mit der Menge an PCR-Produkt steigt hierbei die Fluoreszenz an. Im Gegensatz zu der „klassischen“ PCR besteht bei der Real Time TaqMan-PCR die Möglichkeit, Amplifikation und Nachweis des PCR-Produkts simultan darzustellen (real time).

Zur Detektion Sequenz-spezifischer Amplifikationen bedient man sich der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase und einer fluoreszierenden Sonde, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (FAM) und dessen 3'-Ende hingegen mit einem Quencher-Farbstoff (TAMRA) modifiziert ist [Livak et al. 1995].

Bei intakter Sonde wird die Fluoreszenz unterdrückt, trifft jedoch die Taq-DNA-Polymerase während der Extension auf die intakte Sonde, so wird diese hydrolysiert, wodurch die Suppression der Fluoreszenz entfällt und eine messbare Fluoreszenz

entsteht. Die Fluoreszenz steigt hierbei mit der Menge der synthetisierten DNA an, da umso mehr Reporterfarbstoffe freigesetzt werden. Das ABI PRISM 7000 Sequence Detection System registriert diese Fluoreszenz-Veränderungen bei jedem Zyklus. Zur Quantifizierung wird also die Kinetik der PCR-Reaktion und nicht die absolute Menge des PCR-Produktes erfasst. Zunächst findet eine exponentielle Vermehrung der DNA statt, jedoch verlangsamt sich in den späteren Zyklen der Prozess, bis die Reaktion letztlich zum Stillstand kommt.

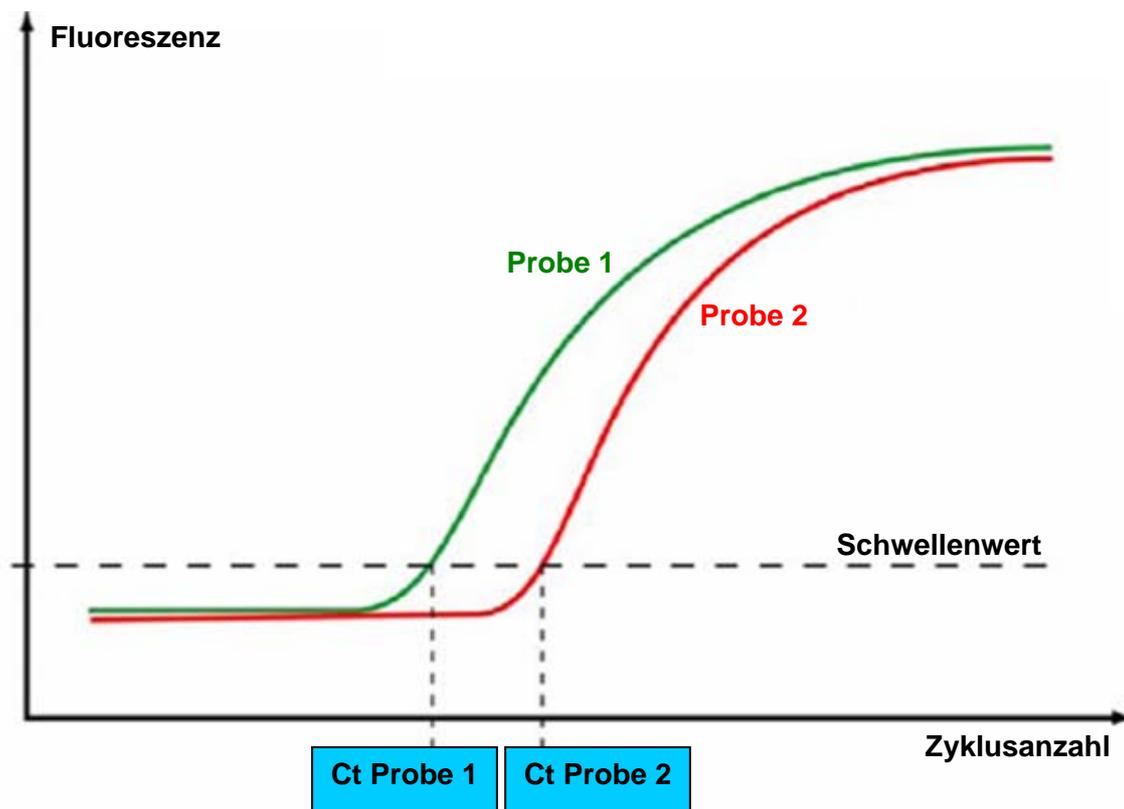


Abb. 12: Amplifikationskurve, abgeändert von Dr. M. Nowrousian, Ruhr Universität Bochum

Um eine Quantifizierung durchführen zu können, bestimmt man den Wert zu der Zykluszahl, bei der die Vermehrung noch exponentiell ist und bei der gleichzeitig zum ersten Mal die Reporter-Fluoreszenz über den Schwellenwert ansteigt. Diesen Wert nennt man den C_T -Wert. Zur Auswertung stehen Standardkurven zur Verfügung, die aus Messung der Verdünnungsreihe eines Standards gewonnen werden und mit deren Hilfe eine relative Quantifizierung vorgenommen wird. Zur Normierung des Expressionsniveaus des untersuchten Gens bedient man sich eines Gens, das im

untersuchten Gewebe stets mengengleich exprimiert wird. Dieses Gen wird ‚Housekeeping‘-Gen (18S-rRNA) genannt.

Die relative Expression (rE) des untersuchten Gens wird durch folgende Formel berechnet:

$$rE(\text{Gen}) = \frac{E(\text{Gen})}{E(\text{Housekeeper})}$$

Die erhaltenen Quotienten sind ohne Einheit, ermöglichen jedoch einen relativen Vergleich verschiedener Gruppen untereinander. Die Auswertung erfolgt, indem der Mittelwert der rEs einer Kontrollgruppe als 100 % definiert wird und die Mittelwerte der anderen Gruppen als % der Kontrolle angegeben werden.

Protokoll der TaqMan®- PCR:

Für ein Reaktionsvolumen von 25 µl werden 12,5 µl 2 x MM-Puffer, 0,1 µl Primer-up (Konzentration 100 µM), 0,1 µl Primer-low (Konzentration 100 µM), 0,5 µl Sonde (Konzentration 10 µM) und 10,8 µl ddH₂O benötigt. Nun werden 24 µl von diesem Gemisch zusammen mit 1 µl Template bzw. Standard in ein Well der Optical Reaction Plate gegeben. Von jedem Template und Standard wird eine dreifache Bestimmung durchgeführt. Nach dem Beschichten wird die Optical Reaction Plate mit einer speziellen Folie abgedeckt, kurz zentrifugiert und in das ABI Prism 7000 Sequence Detection System gegeben. Bei der Programmierung des Gerätes werden die belegten Positionen auf der Optical Reaction Plate, die Zyklenanzahl, die Reaktionsmenge, das TAMRA-Farbniveau sowie die Konzentrationen der Standardreihe angegeben. Das Programm wird gestartet und im Anschluss an die PCR werden die Schwellenwerte für die C_T-Berechnung festgelegt sowie die Standardkurve generiert.

3.5 Statistische Auswertung

Die Einzelwerte der jeweiligen Versuche werden graphisch in vertical points-scatter plots dargestellt. Die Angabe des Mittelwertes sowie der Standardabweichung erfolgt in der Beschriftung der Abbildungen oder in Tabellen. Für einen statistischen

Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Gruppen konnte in der Regel keine genügend hohe Fallzahl erreicht werden. Bei dem Nachweis von Osteopontin konnte eine Statistik erstellt werden, hier wird mit dem Mann-Whitney-U-Test ein nicht-parametrisches Verfahren verwendet. Die statistische Analyse wird mit SPSS 11.5.1 (2002) durchgeführt. Für die PCR und Westernblot-Analysen wurden jeweils 10^7 Zellen verwendet. Für immunhistochemische und durchflusszytometrische Untersuchungen kamen 10^4 Zellen zum Einsatz. Wegen der geringen Fallzahl der Herzen, aus denen die Fibroblasten isoliert wurden (meist $n=3-6$), konnte auch keine Überprüfung auf Normalverteilung vorgenommen werden. Die gewonnenen Daten sind auf Grund der geringen Fallzahl nur bedingt aussagefähig, eine weiterführende Versuchsanordnung zur Festigung der Ergebnisse ist für die Zukunft geplant. Zur Erstellung der Grafiken wurde das Programm SigmaPlot (Version Windows 8.0) verwendet.