

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Substanzen

Die verwendeten Chemikalien wurden „reinst“ oder in analytischer Qualität bezogen. Der Begriff H₂O steht grundsätzlich für Aqua bidest. und wurde entweder von PAN bezogen (PAN, Aidenbach, D) oder wurde mittels einer Reinstwasseranlage der Firma MILLIPORE (Milli Q) aufbereitet.

Acrylamid	Roth, Karlsruhe, D
Agarose	QA-Agarose TM , Q-BIOgene, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen, D
Ampicillin (<i>D</i> -[-]-alpha-Aminobenzylpenicillin)	Sigma, Taufkirchen, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen, D
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen, D
Collagenase II	Biochrom, Berlin, D
Elastase	Sigma, Taufkirchen, D
FAS-Ligand (FasL)	Biomol, Hamburg, D
High molecular weight Kininogen, single chain	Enzyme Research, Swansea, UK
High molecular weight Kininogen, two chain	Enzyme Research, Swansea, UK
Interferon-gamma (IFN γ)	Biomol, Hamburg, D
Interleukin-1alpha (IL-1alpha)	Chemicon, Hofheim, D
LB-Agar, Miller (Ausgangssubstanz, pulverisiert)	Becton Dickenson, Sparks, USA
LB-Broth, Miller (Ausgangssubstanz, pulverisiert)	Becton Dickenson, Sparks, USA
Lipopolysaccharid <i>S. typhimurium</i>	Calbiochem, Schwalbach, D
NP40 10% (v/v)	Sigma, Taufkirchen, D
10x PCR-Puffer und MgCl ₂ (25 mM)	Promega GmbH, Mannheim, D
5x M-MLV-Puffer	Promega GmbH, Mannheim, D
Phenylarsine oxide	Sigma, Taufkirchen, D
Proteaseinhibitoren Complete-Mini	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D

Sodium-Nitroprussid	Sigma, Taufkirchen, D
TEMED	Sigma, Taufkirchen, D
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha)	Biosource, Belgium, NL

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Substanzen wurden von den folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D), Serva (Heidelberg, D), Sigma (Taufkirchen, D) und Biorad (München, D).

2.1.2. Kits

BCA TM Protein Assay Reagent Kit	Perbio Science, Piece, Bonn, D
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham-Pharmacia, Freiburg, D
NucleoSpin Plasmid Quick Pure	Macherey-Nagel, Düren, D
ProteoExtract TM Subcellular ProteomeExtractionKit	Calbiochem, Schwalbach, D
Apo Logix TM -FAM Caspase-8 Detection Kit	Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, US
Magic Red TM Cathepsin B Detection Kit	Serotec, Düsseldorf, D
Caspase Colorimetric Substrate Set II Plus	BioCat, Heidelberg, D
Alexa Fluor [®] 555 Protein labeling kit	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.3. Nukleinsäuren und Nukleotide

Nukleotide

dNTP Set (4x 100 µmol)	Sigma, Taufkirchen, D; MBI Fermentas, St Leon-Rot, D; Promega GmbH, Mannheim, D
------------------------	---

Real-time PCR-Mastermix

„Stammkomponente“	Zusammensetzung der „Stammkomponente“	µl pro Ansatz bei 25 µl Gesamtansatz
H ₂ O		10,225
	100 mM Tris HCl	
	15 mM MgCl ₂	
10x PCR-Puffer	500 mM KCl (pH 8,3)	2,5
MgCl ₂	50 mM	2,5
dNTPs	10 mM pro Nukleotid	0,5
	20% DMSO in H ₂ O mit 10x SYBR (1:1000 Dilution der Lösung)	
SYBR Green		2,5
	0,5% NP40 (v/v)	
NP40/ Tween 20	0,5% Tween 20 (v/v)	0,25
	Ein Kristall ROX in ca. 50 ml H ₂ O lösen.	
ROX		0,25
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,075
forward Primer	10 µM	0,6
reverse Primer	10 µM	0,6
cDNA		10
Gesamt		30

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Real-Time PCR Mastermixes.

Die Komponenten H₂O, 10x PCR-Puffer, MgCl₂, dNTPs, SYBR GreenI, NP40/Tween 20 und ROX wurden in den jeweiligen Mengen zusammen gegeben und in 10-mL-Falconröhrchen im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Alle anderen Komponenten wurden für jede real-time PCR einzeln pipettiert.

Primer

Alle Primer wurden mit dem Programm Primer3 unter <https://biotools.umassmed.edu> entworfen, basierend auf Sequenzdaten des entsprechenden Organismus unter

www.ensembl.org bzw. www.pubmed.gov. Dabei wurden die Primersequenzen so gewählt, dass diese eine Exon-Exon-Grenze des Zielgens überspannen und dadurch sichergestellt wurde, dass es sich bei dem späteren Amplifikat ausschließlich um mRNA handelt. Beide Primer blastete man jeweils gegen das gesamte Organismusgenom unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> und überprüfte auf die Amplifikation unerwünschter Fragmente.

Alle Primer wurden von Sigma (Taufkirchen, D) bezogen.

Gen	Forward 5'-3'	Reverse 3'-5'	Annealing-Temp. (°C)
18S rRNA	CCgCAgCTAggAATAA TggAA	TCTAgCggCgCAATAC gAAT	60
Rat caspase 3	gAAACCTCCgTggATT CAAA	AgCCCATTTCagggTA ATCC	60
Rat cathepsin B	TCgCACAgATCAgAgA CCAg	CAGCAgACACCTCCA CATTg	60
Rat Bcl-X _L	AAggAgATgCAggTATT ggTgAgT	TCCCgTAgAgATCCAC AAAAGTg	60
Rat HMWK (semi)	gAgAgggATCCAaggAAA TgAACAA	CCTCTgTCCTCCCCTg TATCTgTg	60
Rat HMWK	gggTCCCATAgTgACA AACgA	TCCgAgAgCAAAgAgg Tg	60
Rat T-Kininogen	TTCACTACTTCCCAAg AAATgCT	AgCAACCACCTgTgAT gTTg	60
Human HMWK (semi)	ACCgCATAACTgAAgC CACT	TCTgCgTTgATATAggA TgC	60

Tabelle 2.2: Verzeichnis der verwendeten Primer. (semi = semiquantitative PCR)

Vektoren

Das genutzte Plasmid pCEP4 (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D) wurde freundlicherweise von dem Kollegen Jan H. Scheffe überlassen. Zur Identifikation wurden Restriktionsverdau durchgeföhrt bzw. Teile des Inserts sequenziert.

2.1.4. Molekulargewichtsmarker

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder

MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D

Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder

MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D

Prestained Page Ruler

MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.1.5. Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme

Die für die Experimente verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D) bezogen: *XhoI*, *NheI*, *NotI* (10 U/ μ L).

M-MLV RT RNase H Minus (200 U/ μ L)	Promega GmbH, Mannheim, D
Superscript-II-Reverse Transcriptase	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
RNasin (40 U/ μ L)	Promega GmbH, Mannheim, D
Taq-Polymerase (5 U/ μ L)	Promega GmbH, Mannheim, D

2.1.6. Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Cleaved Caspase 3 (Asp175), monoklonal	Kaninchen	1:750	New England BioLabs, Frankfurt a.M., D
Caspase 9, polyklonal	Kaninchen	1:600	New England BioLabs, Frankfurt a.M., D
Cathepsin B, polyklonal	Kaninchen	1:200	Chemicon, Hofheim, D
Cytochrom C, monoklonal	Maus	1 μ g/ml	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Phospho-p44/42 MAPK (Thr 202/ Tyr 204), polyklonal	Kaninchen	1:1000	New England BioLabs, Frankfurt a.M., D
p44/42 MAPK, polyklonal	Kaninchen	1:1000	New England BioLabs, Frankfurt a.M., D
Bcl- X _L , polyklonal	Kaninchen	1:700	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, D
Bcl- 2, polyklonal	Kaninchen	1:700	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, D
Fas (FL-335), polyklonal	Kaninchen	1:700	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D

Anti- Kaninchen IgG	Schwein	1:2000	Dako Diagnostica GmbH, Hamburg, D
Anti-Maus IgG	Kaninchen	1:2000	Dako Diagnostica GmbH, Hamburg, D

Tabelle 2.3: Verzeichnis der verwendeten primären und sekundären Antikörper.

2.1.7. Medien und Zusätze für die Kultur eukaryotischer Zellen

Dulbecco's (DMEM)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
Opti-MEM	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) (w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
Trypsin/ EDTA (0,25%/0,5 mM w/v)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
Hanks' Salzlösung (HBSS)	Sigma, Taufkirchen, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen, D
Fötales Kälberserum (FBS)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Penicillin-Streptomycin (100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin) (P/S)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	PromoCell GmbH, Heidelberg, D

2.1.8. Versuchstiere, Bakterien und Zelllinien

Rattus norvegicus, Stamm:

Männliche Wistar-Ratten (Stamm: HsdCpb: WU)	Harlan Winkelmann GmbH, Borchen, D
männliche Brown Norway-Ratten	Harlan Winkelmann GmbH, Borchen, D
männliche Brown Norway/Katholiek-Ratten	Katholische Universität Leuven, Belgium

Bakterienstamm:

Escherichia coli (XL1-Blue)	Stratagene, Amsterdam, NL
-----------------------------	---------------------------

Homo sapiens, Zelllinien:

humane aortische SMC

PromoCell GmbH, Heidelberg, D

2.1.9. Ausgewählte Geräte und Zusatzmaterialien

Elektrophorese und Blotsysteme

Vertikale Elektrophorese-Systeme, Midi und Maxi Harnischmacher, Kassel, D

Horizon™58

Bethesda Research Laboratories,
Gaithersburg, USA

Horizontale Elektrophorese-Systeme, Mini-Protean® Bio-Rad, München, D

Semi-Dry Blot-System

Bio-Rad, München, D

Zentrifugen/ Rotoren

Tischzentrifugen Mikro 20, Typ2004

Hettich, Zentrifugen, Tuttlingen, D

Galaxy Mini

Merck KGaA, Darmstadt, D

Zentrifuge 5415R

Eppendorf, Hamburg, D

Kühlzentrifuge Mikro 22R

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D

Mikroskop

Lichtmikroskop Leica DMIL

Leica, Wetzlar GmbH, Frankfurt
a.M., D

Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRE2

Leica, Wetzlar GmbH, Frankfurt
a.M., D

Filmmaterial

Hyperfilm™ ECL

Amersham-Pharmacia, Freiburg, D

Membranen und Filter

Hybond-C extra Nitrozellulose Membran

Amersham-Pharmacia, Freiburg, D

Sterilfilter 0.2 µm

Schleicher&Schuell, Nürnberg, D

Operationszubehör

Diverse Scheren und Pinzetten Becton Dickenson, Sparks, USA

Zellkulturzubehör

Zellkulturplatten und serologische Pipetten Becton Dickenson, Sparks, USA
in diversen Größen und Nunc, Wiesbaden, D

10 µL-, 100 µL-, 1000 µL-Eppendorfspitzen Eppendorf, Hamburg, D

Zentrifugenröhrchen Becton Dickenson, Sparks, USA

2 mL-Kryoröhrchen Nunc, Wiesbaden, D

Eppendorfgefäße Eppendorf, Hamburg, D

Sonstige Geräte

Benchmark Plus microplate spectrophotometer Biorad, München, D

ThermoStat-plus Eppendorf, Hamburg, D

Thermomixer Comfort Eppendorf, Hamburg, D

Inkubationsschüttler Polymax 1040 Heidolph Instruments, Nürnberg, D

Universalwaage BL310 Sartorius, Göttingen, D

Feinwaage SC2 Sartorius, Göttingen, D

2.1.10. Medien für die Produktion kompetenter *E.coli*-Stämme und Transformation

LB-Medium: 10 g/L Trypton
5 g/L Hefeextrakt
5 g/L NaCl
pH-Wert $7,0 \pm 0,2$

Inkubationsmix TSB: 5 % DMSO (v/v)
10 mM MgSO₄
10 mM MgCl₂
10 % PEG 6000/8000 (v/v)
in LB-Medium

Transformationsmix (5x KCM):	500 mM	KCl
	150 mM	CaCl ₂
	250 mM	MgCl ₂
	in H ₂ O	

2.1.11. Puffer und Lösungen

Proteingewinnung

Proteinlysepuffer:	20 mM	Tris-Base (pH 7,5)
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	2,5 mM	1% Triton-X 100
	2,5 mM	Natriumpyrophosphat
	1 mM	Natriumorthovanadat
	1 Tablette	Proteaseinhibitoren Complete Mini auf 10 mL

Western Blot Lösungen

1x Elektrophoresepuffer:	3 g	Tris-Base
	14,4 g	Glycin
	1 g	SDS
	ad 1 L H ₂ O	

Semi-Dry Blotpuffer:	5,82 g	Tris-Base
	2,93 g	Glycin
	200 mL	Methanol
	0,375 g	SDS
	ad 1 L H ₂ O	
pH-Wert 9,0 – 9,4		

10x Tris-buffered saline (TBS): 60,57 g Tris-Base
 43,83 g NaCl
 ad 500 mL H₂O
 pH-Wert 7,5

1x TBS-T: 100 mL 10x TBS
 1 mL Tween 20
 ad 1 L H₂O

Argarose-Gelelektrophorese-Puffer

50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) : 40 mM Tris-HCl
 5 mM Natriumacetat
 1 mM EDTA
 ad 1 L H₂O
 pH-Wert 8,0

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Isolation von mRNA

Die Isolation von mRNA aus kultivierten Zellen und Gewebeteilen erfolgte nach dem Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktion mit TRIZOL[®] nach Angaben des Herstellerprotokolls (Invitrogen, D).

Vor der Isolation der mRNA aus Gewebeteilen wurden diese mit Hilfe eines elektrischen Homogenisators zerkleinert.

Die kultivierten Zellen wurden von ihrem Überstand befreit, mit PBS gewaschen, mit TRIZOL[®] überschichtet und nachfolgend abgeschabt.

2.2.1.2. Kontrolle der mRNA-Qualität

Zur Sicherstellung der Qualität der isolierten mRNA wurde der Absorptionskoeffizient bei 260 nm zu 280 nm bestimmt, das Verhältnis der Extinktionen berechnet und nur

Proben mit einem Zahlenwert größer als 1,6 verwendet. Ein kleineres Verhältnis weist auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Salzurückständen hin, die die reverse Transkription in cDNA und die Real-time PCR stören. Ebenfalls wurde mit Hilfe eines TBE-Agarose-Geles auf fehlende Degradation der mRNA überprüft. Die Abbildung 2.1 stellt die diskreten 28S- und 18S-rRNA Banden, die man nur bei nicht-degradierter mRNA erhält, aufgetrennt in einem 1,5%igen TBE-Agarose-Gel dar.

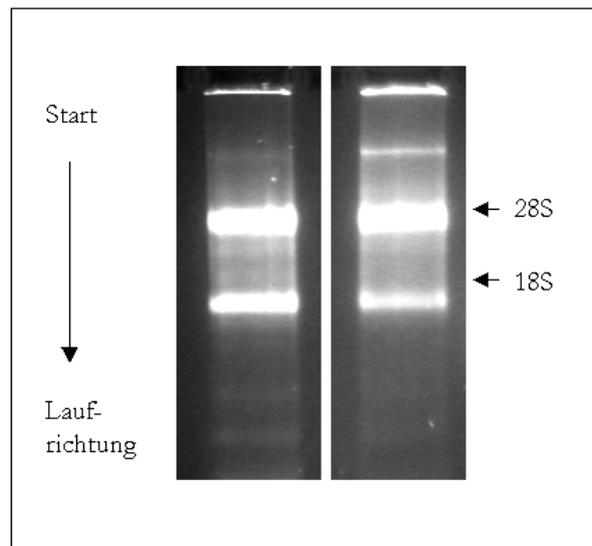


Abbildung 2.1: mRNA-Qualitätskontrolle mittels eines 1,5%igen TBE-Agarose-Gels.

2.2.1.3. RT-Reaktion zur cDNA-Synthese

Vor der cDNA-Synthese wurde zunächst ein DNase Verdau durchgeführt. Dazu wurde 1 µg RNA mit je 1 µL RQ1 RNase free 10x Reaction Buffer und DNase (1U/ µg RNA) versetzt und mit H₂O auf 10 µL ergänzt. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten wurde 1 µL Stop-Solution zugefügt und 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Die Probe wurde bis zur Fortsetzung des Protokolls auf Eis gekühlt.

Der RNA wurde dann 1 µL Random-Hexamer-Primer zugesetzt und die Mixtur 5 Minuten bei 70 °C denaturiert.

Nach erneuter Überführung auf Eis wurde die RNA dann mit folgenden Reagenzien versetzt:

Komponente	eingesetztes Volumen (μL)
5x M-MLV-Reaktionspuffer	5
dNTPs (je 10 mM)	1,25
M-MLV (200 U/ μL)	0,5 (100 U pro Ansatz)
RNAsin	0,5
H ₂ O	ad 14

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des RT-Reaktionansatzes zur cDNA-Synthese.

Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 μL wurde für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluss erfolgte die Analyse der cDNA mittels PCR.

2.2.1.4. Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt DNA-Fragmente vervielfältigen kann. Für die Amplifizierung benötigt man eine thermostabile DNA-Polymerase, geringe Mengen der DNA-Matrize, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), sequenzflankierende Oligonukleotidprimer und geeignete Reaktionsbedingungen. Der PCR-Zyklus besteht am Anfang aus der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges. Nach der Hybridisierung des Primers an die einzelsträngige DNA (Annealing) beginnt die Polymerase vom freien 3'-OH Ende des Primers aus einen neuen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren (Elongation). Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Das eigentliche Merkmal der Amplifikation liegt in der zyklischen Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die vorhandene Menge an DNA exponentiell vermehrt wird, da auch die neusynthetisierten DNA-Stränge als Matrize dienen.

Für die Amplifizierung wurde die *Taq*-Polymerase, ein hitzestabiles Enzym aus dem Eubakterium *Thermus aquaticus*, eingesetzt. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler nach der in Tabelle 2.5 angegebenen Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturprogramm. Der Erfolg und die Ausbeute der PCR wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Komponente	eingesetztes Volumen (μL)
cDNA (≈ 40 ng)	1
10x Puffer	2,5
MgCl ₂ (50 mM)	1
dNTPs (je 10 mM)	0,5
forward Primer (10 μM)	0,5
reverse Primer (10 μM)	0,5
Taq-Polymerase (5U/ μL)	0,125
H ₂ O	ad 25

Zyklus	Temperatur	Zeit
1 (1x)	95 °C	5 min
2 (35x)	94 °C (Denaturierung)	1 min
	60 °C (Annealing)	1 min
	72 °C (Elongation)	1 min
3 (1x)	72 °C	10 min

Tabelle 2.5: PCR-Reaktionsansatz und Temperaturprogramm.

2.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund des negativ geladenen Phosphat-Rückgrates ist die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe eines elektrischen Feldes möglich. Die Mobilität der DNA ist im Wesentlichen von der Fragmentgröße abhängig. Größere Fragmente bewegen sich langsamer als kleinere, bedingt durch die Siebstruktur der Agarose, deren Poren kleineren Fragmenten weniger Widerstand bieten. Die analysierbare Fragmentgröße hängt von der Porengröße eines Gels und damit von der Konzentration an Agarose ab. Gebräuchliche Konzentrationen an Agarose sind 1,5 % bis 2 % (w/v). Durch das Versetzen der Gellösung mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) - einem Farbstoff, der in die doppelsträngige DNA interkaliert - wird die nachfolgende Detektion der DNA-Fragmente durch Bestrahlung mit UV-Licht (UV-Transilluminator mit Photographiereinheit) ermöglicht. Die DNA-Proben werden mit einem 10x Ladepuffer versetzt und in die im Gel vorhandenen Taschen pipettiert. Zur

Größenbestimmung des zu analysierenden Fragmentes wird ein Größenmarker mit aufgetrennt. Der Gelelektrophoreselauf wird in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer bei einer Spannung von 80 – 100 V in 1x TAE-Puffer für 30 bis 45 Minuten durchgeführt. Die Methode der Gelelektrophorese kann sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt werden.

2.2.1.6. Real-Time PCR (quantitative PCR)

Während der PCR kann man vier verschiedene kinetische Stadien, die grundsätzlich der Kinetik des Bakterienwachstums ähneln, unterscheiden. Zu Beginn findet die lag-Phase statt, in der eine exponentielle Amplifizierung des PCR-Produktes stattfindet, ohne dass ein Fluoreszenzsignal messbar ist. In der sich anschließenden log-Phase ist eine exponentielle Zunahme des PCR-Produktes als Fluoreszenzsignal messbar. Idealerweise erfolgt eine Verdopplung des PCR-Produktes mit jedem Zyklus. In der Verzögerungsphase findet durch die Akkumulation von PCR-Produkten und dem Verbrauch an Substrat und Enzym eine Verlangsamung der Reaktion statt. Letztlich erreicht die Reaktion einen „steady state“ in der stationären Phase, in der keine weiteren PCR-Produkte mehr gebildet werden. Für die Datenanalyse der Real-time PCR ist die zweite Phase - die log-Phase - von entscheidender Bedeutung (Abbildung 2.2).



Abbildung 2.2: Beispiel einer Amplifizierungskurve in der Real-Time PCR.

Die quantitative Real-time PCR bietet die Möglichkeit, die Amplifizierung durch Akkumulation und Messung eines (spezifischen) Fluoreszenzsignals in Echtzeit zu

verfolgen. Dem Reaktionsansatz wird z.B. der Farbstoff SYBR GreenI[®] zugesetzt, der nach sequenzunabhängiger Anlagerung an doppelsträngige DNA fluoresziert. Somit kann nach jedem Zyklus der Gehalt an PCR-Produkt gemessen und mit einem Schwellenwert, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt, verglichen werden. Der PCR-Zyklus, in dem die kinetische Kurve der PCR einen Benutzer- oder Programm-definierten Schwellenwert der Fluoreszenz erreicht, wird als Threshold-Zyklus (C_T) bezeichnet und ist umso kleiner, je mehr cDNA enthalten war. Dabei wird der Schwellenwert innerhalb der exponentiellen Phase definiert. Wie viele Amplifikationszyklen erforderlich sind, um diesen Schwellenwert zu erreichen, ist von der PCR-Effizienz und der Ausgangsmenge an cDNA abhängig.

Der Farbstoff SYBR GreenI[®] ermöglicht keine Unterscheidung zwischen Produkt und eventuell auftretenden Nebenprodukten, wie Primerdimeren und unspezifischen Amplifikationsprodukten. Bei der Nutzung dieser Real-Time PCR Nachweismethode wird deshalb im Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Abbildung 2.3). Die beiden Einzelstränge der farbstoffassoziierten DNA werden bei ansteigender Temperatur in Abhängigkeit zum Schmelzwert T_m des Doppelstranges mehr oder weniger stark voneinander getrennt. Dadurch wird der Farbstoff wieder freigesetzt, was zu einer Abnahme der Fluoreszenz führt. Sie erreicht ihr Maximum, wenn beide Stränge vollständig voneinander getrennt werden. Bei der Schmelzkurvenanalyse trägt man die erste Ableitung der Fluoreszenzabnahme (ΔR_n) über der Temperatur auf. Spezifische Primer führen zu einem Maximum für das Hauptprodukt, wohingegen weitere Maxima für unspezifische Nebenprodukte nicht auftreten sollten.

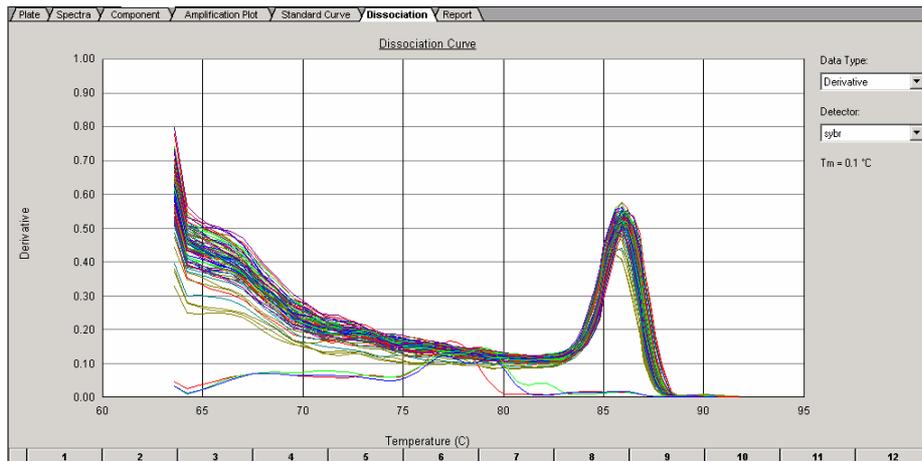


Abbildung 2.3: Beispiel einer Schmelzkurve in der Real-Time PCR.

Die Reaktion wurde in speziellen 96-well Real-time PCR Platten durchgeführt. Dabei wurde für jeden Reaktionsansatz der Mastermix vorgelegt und die cDNA nachfolgend zugegeben.

Komponente	eingesetztes Volumen (µL)
2x SYBR GreenI [®] Mastermix	15
forward Primer (10 µM)	0,6
reverse Primer (10 µM)	0,6
Taq-Polymerase (5 U/ µL)	0,075
H ₂ O	ad 20
cDNA (2ng/ µL)	10

Tabelle 2.6: Real-Time PCR Reaktionsansatz.

Den Amplifikationszyklen gingen eine Aktivierung der Taq-Polymerase und die Denaturierung der cDNA für 2 Minuten bei 95 °C voraus. Ein Amplifikationszyklus von insgesamt vierzig Zyklen bestand aus der Denaturierung bei 95 °C und der anschließenden Primer-Hybridisierung (Annealing) bei 60 °C für jeweils 15 Sekunden sowie der Synthese (Elongation) bei 72 °C für 30 Sekunden. Nachfolgend wurden die Produkte einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen. Dafür wurden sie erneut bei 60 °C

für 30 Sekunden hybridisiert und anschließend mit einer Heizrate von 0.5 °C/5 sec. auf 99 °C erwärmt. Die PCR-Produkte wurden bei ihrer spezifischen Schmelztemperatur denaturiert und der temperaturabhängige Fluoreszenzabfall gemessen. Jede Probe wurde mindestens dreifach gemessen und zu der Expression eines stabil exprimierten Genes (housekeeping-Gene), meist auf die mitochondrielle Untereinheit 18S, normalisiert. Zur Messung wurde ein ABI7000 Sequence Detection System, ausgerüstet mit der firmeneigenen Software in der Version 2.0, verwendet.

Die Effizienz der PCR ist von zentraler Bedeutung in der Datenanalyse der Real-Time PCR. Unter perfekten Umständen wird eine Verdopplung des gen-spezifischen Applikons von Zyklus zu Zyklus erreicht, entsprechend einer Effizienz von 100 %. Da die Effizienz allerdings oft kleiner als 100 % ist, stellt sie einen schwer reproduzierbaren Parameter für jede PCR dar. Viele Faktoren, wie Phenol, Ethanol, Hämoglobin, Heparin und ebenfalls die Reverse Transkriptase, inhibieren die Effizienz der PCR. Aus diesem Grunde ist es wichtig, die jeweilige Effizienz der PCR bei der Berechnung der Daten mit zu berücksichtigen. Die geläufigsten Methoden zur Analyse von Real-time PCR-Daten sind die absolute und die relative Quantifizierung. Eine absolute Quantifizierung bestimmt die eingesetzte Kopienzahl an Molekülen durch Vergleich des PCR-Signals mit einer Standardkurve. Bei der relativen Quantifizierung wird das PCR-Signal mit einer Referenz, wie z.B. unbehandelte Kontrolle oder unstimulierte Probe, verglichen. Bisher gebräuchlich war die Benutzung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, um die relativen Veränderungen der Genexpression aus Real-time PCR-Daten zu bestimmen. Da beide Methoden jedoch eine Effizienz von 100 % annehmen bzw. voraussetzen, wurde in der vorliegenden Arbeit die GED (Gene Expressions's C_T Difference)-Methode, die ebenfalls auf dem Prinzip der relativen Quantifizierung beruht, benutzt, um eine akkuratere Kalkulation des relativen Expressionsverhältnisses zu ermöglichen.¹⁷³

Die folgende Gleichung beschreibt die relative Genexpression unter Berücksichtigung der durchschnittlichen Effizienz für jedes Gen:

$$rER = \frac{R_{norm}(US)}{R_{norm}(REF)} = \frac{(1 + E(ZG))^{-\Delta C_T(ZG)}}{(1 + E(HKG))^{-\Delta C_T(HKG)}}$$

mit

$$\Delta C_T(Gen) = C_T(Gen; US) - C_T(Gen; REF)$$

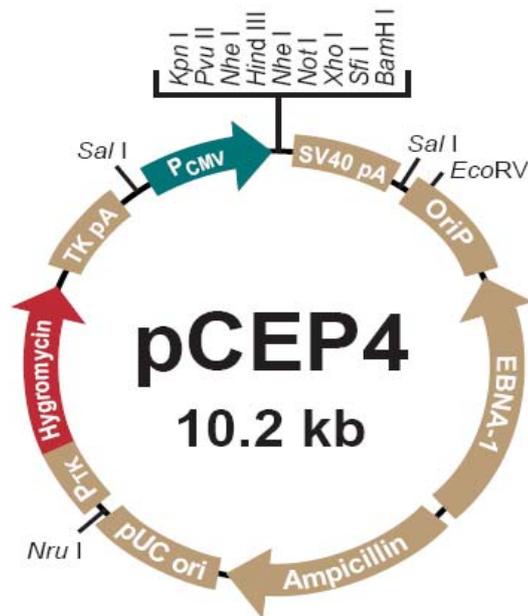
rER	: relative Expressionsrate eines Zielgens
R _{norm}	: Menge des Fluoreszenzsignals
US	: Untersuchungsprobe
ZG	: Zielgen
REF	: Referenzprobe
HKG	: Bezugsgen; „house-keeping gene“
C _T	: Threshold-Nummer der Genamplifikation
E	: durchschnittliche Effizienz der PCR

In der halblogarithmischen Darstellung der R_n Daten auf der Ordinate und die Anzahl der Zyklen n auf der Abszisse beschreibt die log-Phase der PCR eine lineare Trendlinie, deren Anstieg zur Ermittlung der Effizienz benutzt wird.

$$E = \left(\frac{\lg R_1}{\lg R_2} \right)^{\frac{1}{C_T(1) - C_T(2)}} - 1$$

2.2.1.7. Restriktion von DNA

Die enzymatische Spaltung von DNA *in vitro* mit Hilfe sogenannter Restriktionsendonukleasen wird als Restriktion bezeichnet. Diese Enzyme spalten DNA innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz, was zu überhängenden (sticky ends) oder glatten (blunt ends) Enden der doppelsträngigen DNA führt. Die Abbildung 2.4 zeigt den für die Klonierung verwendeten Vektor pCEP und die nachfolgende Tabelle 2.7 das Protokoll für den Restriktionsverdau der Plasmid-DNA.



**Comments for pCEP4:
10188 nucleotides**

CMV promoter: bases 1-588
 Multiple cloning site: bases 619-676
 SV40 polyadenylation signal: bases 685-926
 OriP: bases 1344-3319
 EBNA-1 gene (complementary strand): bases 3620-5547
 Ampicillin resistance gene: bases 6173-7033
 pUC origin: bases 7042-7817
 TK promoter: bases 8185-8347
 Hygromycin resistance gene: bases 8411-9421
 TK polyadenylation signal: bases 9433-9704

Abbildung 2.4: pCEP4-Vektor (von www.invitrogen.com).

Protokoll zum Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

1 µg	Plasmid (pCEP Vektor)
40 U	Restriktionsenzym <i>Xho I</i>
20 U	Restriktionsenzym <i>Nhe I</i>
10 µL	10x Y ⁺ /Tango-Puffer

Gesamtansatz über Nacht bei 37 °C inkubieren

Aufreinigung des Ansatzes und anschließendes Kontrollgel zur Kontrolle des Verdaus

Tabelle 2.7: Protokoll zum Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.

2.2.1.8. Ligation von DNA

Das Enzym Ligase synthetisiert die Verbindung zweier getrennter geschnittener DNA-Moleküle. Dabei katalysiert sie die Bildung von Phosphodiester zwischen freien 5'-Phosphatgruppen und den freien 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA. Die Ligase benötigt ATP als Ko-Substrat.

Die nachfolgende Tabelle 2.8 zeigt das Protokoll für die Ligation.

Protokoll zur Ligation

	1. Ligationsansatz	2. Ligationsansatz	Kontrollansatz
Plasmid verdaut	2 µL	2 µL	2 µL
Insert	6 µL	3 µL	0 µL
T4 DNA-Ligase	1 µL	1 µL	1 µL
O ⁺ -Puffer	2 µL	2 µL	2 µL
ATP 10 mM	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
H ₂ O	8,5 µL	11,5 µL	16,5 µL

Gesamtansatz über Nacht bei 4 °C inkubieren

Tabelle 2.8: Protokoll zur Ligation.

2.2.1.9. Herstellung kompetenter *E.coli*

Eine frische *E. coli*- (XL1-blue) Kolonie wurde in 10 mL LB-Medium ohne Antibiotika inokuliert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Von der Übernachtskultur wurden 1 mL in 100 mL LB-Medium ohne Antibiotika in einen 500 mL-Kolben überführt. Die Kultur ist bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,4 - 0,6 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert worden. Anschließend wurde die Bakterienkultur bei 2500xg für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 7,5 mL TSB-Medium resuspendiert und dann für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Eine Aliquotierung der Bakterien erfolgte in 100 µL-Einheiten, welche in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurden. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

2.2.1.10. Transformation kompetenter *E.coli*

Kompetente *E. coli* (XL1-blue) Zellen wurden auf Eis lagernd langsam aufgetaut. Zu 100 μ L kompetenten Zellen wurden 4 μ L des Ligationsansatzes in 80 μ L H₂O gegeben und vorsichtig mit einer Pipette vermischt. Es wurden 20 μ L 5x KCM-Medium diesem Ansatz hinzugefügt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor dann 1 mL LB-Medium hinzugegeben wurde. Die Zellen wurden für mindestens 1 Stunde bei 37 °C und 750 rpm inkubiert. Zur Selektion der transformierten Bakterien wurden diese auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (Ampicillin) ausplattiert. Die Platten sind über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert worden. Am nächsten Tag wurden mit einer Pipette von jeder Platte fünfmal je eine gewachsene Kolonie in Reagenzgläser überführt, die jeweils 5 mL LB-Medium mit Antibiotikum enthielten. Die Kolonien wurden über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bevor am nächsten Tag die Präparation der Plasmide durchgeführt werden konnte.

2.2.1.11. Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels Mini-Präparation mit dem Plasmid-Kit „NucleoSpin Plasmid Quick Pure“ von Macherey-Nagel laut Hersteller-Protokoll.

2.2.1.12. DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen zur Bestimmung der DNA-Basenabfolge wurden von Herrn Dr. Meixner, Institut für Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin, an einem ABI 373/377 BigDye-Terminator-Chemie durchgeführt.

2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1. Proteinisolation aus kultivierten Zellen

Nach entsprechender Stimulation wurden die Zellen mit Hilfe eines Schabers abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation für 5 Minuten bei 4000xg wurde der Überstand entfernt, das Pellet in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert, um eventuelle Mediumrückstände zu entfernen. Danach wurde das Zellpellet in Lysepuffer aufgenommen. Nach der Behandlung mit Ultraschall (ca. 10

Impulse mit einer Sekunde Länge bei mittlerer Frequenz) zur vollständigen Freisetzung der Proteine, wurde das Gemisch 30 Minuten bei 11 000 xg zentrifugiert. Der Überstand (gelöste Proteine) wurde abgenommen und in ein neues Eppendorftube überführt und bei -20 °C gelagert.

Für die fraktionierte Proteinisolation, Zytosol- und Organellenfraktion, wurde das ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem) gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls benutzt.

2.2.2.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde das BCA™ Protein Assay Reagent Kit (Perbio Science, Pierce, Bonn, D) verwendet. Die BCA-Methode basiert auf der Komplexbildung von Cu^+ -Ionen mit Bicinchoninsäure (BCA) und nachfolgender Absorptionsmessung bei 562 nm. Die in der Ausgangslösung vorhandenen Cu^{2+} -Ionen komplexieren in alkalischem Medium mit den Proteinen und werden zu Cu^+ -Ionen reduziert. Durch Standardkurven wurden lineare Bereiche zwischen Proteingehalt und Absorption des Farbkomplexes ermittelt und für die Berechnung des Gehalts der Proben herangezogen.

2.2.2.3. Western Blotting

Je nach Zielprotein wurden 20 bis 50 µg Gesamtprotein mit der entsprechenden Menge an 6x Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C zur Denaturierung erhitzt. Die Proben wurden in die Taschen eines 10%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen (Tabelle 2.9) und unter Mitführung eines Molekulargewichtsmarkers elektrophoretisch bei 200 Volt für 40 Minuten aufgetrennt. Das Prinzip der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) eignet sich zur Auftrennung von Proteingemischen in einer Polyacrylamidgelmatrix. SDS überdeckt durch Bildung geladener Micellen die Eigenladung von Proteinen, welche nachfolgend elektrophoretisch getrennt werden können. Die Porengröße des Gels wird durch die Acrylamidkonzentration und dem Vernetzungsgrad bestimmt und dient zur Aufkonzentrierung (Sammelgel) bzw. Auftrennung der Proben (Trenngel).

Komponente	Sammelgel in μL	Trenngel in μL (10 %)
Acrylamid/Bis-, 30%	4000	670
Gelpuffer	3000	1000
H ₂ O	5000	2300
Ammoniumpersulfat 10 %	60	30
TEMED	6	5

Tabelle 2.9: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels.

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine unter Verwendung einer „semi-dry blotting“-Apparatur (Biorad) und eines Semi-dry Blotpuffers auf eine Nitrocellulosemembran für 45 Minuten bei 18 V transferiert. Zur Überprüfung des Erfolges des Proteintransfers wurden die Membranen mit Ponceaufarbstoff gefärbt. Ponceau S ist das Natriumsalz einer Diazoverbindung, die oft genutzt wird, um Proteine auf einer Nitrocellulose- oder PVDF-Membran reversibel anzufärben. Eine Ponceau S-Färbung ist sehr leicht mit Wasser wieder herunterzuwaschen, um die Membran z.B. für die Antikörperinkubation weiterzuverwenden

Die Membran wurde anschließend kurz in TBS-T-Puffer gewaschen und in 5 %igen Blockpuffer (TBS-Puffer mit 5 % Trockenmilchpulver) bei Raumtemperatur für 60 Minuten geblockt. Der Primärantikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung in 5 %igen Blockpuffer auf die Membran gegeben und diese über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch 3-maliges Waschen für je 5 Minuten mit TBS-T-Puffer entfernt, bevor die Membran mit dem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:2000 in 5 %igem Blockpuffer für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach weiteren 3 Waschschritten für je 5 Minuten mit TBS-T-Puffer erfolgte die Peroxidasereaktion mit ECL-Reagenz als Chemilumineszenz und die Auflage eines lichtempfindlichen Films. Nach entsprechender Expositionszeit (1 Minute bis 1 Stunde) wurde der Film entwickelt und digitalisiert.

Für die Standardisierung der Western-Blot-Analyse wurde ebenfalls die Färbung mit Ponceau S herangezogen.

2.2.2.4. Aktivitätsbestimmung von Proteinen

Für die Bestimmung der katalytischen Aktivität von bestimmten Proteasen wurden jeweils spezifische Kits eingesetzt.

Apo Logix™-FAM Caspase-8 Detection Kit	Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, US
Magic Red™ Cathepsin B Detection Kit	Serotec, Düsseldorf, D
Caspase Colorimetric Substrate Set II Plus	BioCat, Heidelberg, D
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega GmbH, Mannheim, D

Es wurden jeweils die Angaben des Herstellerprotokolls befolgt. Die photometrische Auswertung erfolgte an einem ELISA-Reader (Benchmark Plus microplate spectrophotometer).

Die Auswertung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM IRE2), ausgerüstet mit der firmeneigenen Software (Openlab 3, Improvision).

2.2.2.5. Immunzytofluoreszenz

Mit Hilfe dieser auf einer Immunreaktion basierenden Methode, können bestimmte Proteine innerhalb einer Zelle nachgewiesen und lokalisiert werden.

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf CoverSlips gesät und kultiviert sowie je nach Stimulationsprotokoll behandelt. Nachfolgend wurde folgendes Protokoll verwendet:

- 2x mit PBS waschen
- Methanol (-20 °C) 10 Min bei -20 °C [Fixierung und Permeabilisierung]
- Methanol absaugen und kurz an der Luft trocknen lassen
- 1x waschen mit PBS
- Blocken mit 10 %igem Eselserum 20-30 Min bei Raumtemperatur (RT)
- 1. Primärantikörper in 5 % Eselserum 30-60 Min bei RT oder über Nacht bei 4 °C
- 2x waschen mit PBS
- 1. Sekundärantikörper in 5 % Eselserum 30-60 Min bei RT unter Lichtausschluß
- 3x waschen mit PBS
- Blocken mit 10 %igem Eselserum 20-30 Min bei Raumtemperatur (RT)
- 2. Primärantikörper in 5 % Eselserum 30-60 Min bei RT oder über Nacht bei 4 °C
- 2x waschen mit PBS
- 1. Sekundärantikörper in 5 % Eselserum 30-60 Min bei RT unter Lichtausschluß

- 3x waschen mit PBS
- Höchst 33342 100 ng/ mL in PBS 30 Min bei RT
- 3x waschen mit PBS
- Coverslips mit Mounting Medium auf Objektträger auflegen
- bei 4 °C aushärten lassen

Die Auswertung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMIRF), ausgerüstet mit der firmeneigenen Software (Openlab 3, Improvision). Für die Berechnung der Überlappungskoeffizienten wurde ebenfalls die Software Openlab 3 benutzt.

2.2.2.6. Apoptotischer Index

Durch die DNA-Interkalation von Fluoreszenzfarbstoffen kann man apoptotisch veränderte Zellkerne, bedingt unter anderem durch die Chromatinkondensation, sichtbar machen und den apoptotischen Index aus dem Verhältnis apoptotische Zellkerne/ Gesamtzahl der Zellkerne kalkulieren. In Abbildung 2.5 ist der Verlauf der Zellkernveränderung unter apoptotischen Bedingungen dargestellt.

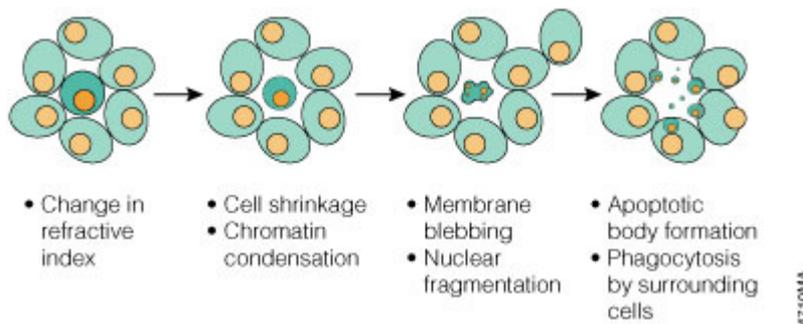


Abbildung 2.5: Zellkernveränderung im Verlauf der Apoptose (von www.Promega.de)

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf CoverSlips gesät und kultiviert sowie je nach Stimulationsprotokoll behandelt. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 4 %iger frisch angesetzter Paraformaldehyd-Lösung inklusive Höchst 33342 (10 µg/ mL) inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Mounting Medium auf Objektträger gebracht. Die Auswertung erfolgte mit polarisiertem Licht an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM IRE2).

2.2.2.7. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Für die Markierung eines Proteins mit einem Fluoreszenzfarbstoff wurde das Alexa Fluor® 555 Protein labeling Kit nach Angaben des Herstellerprotokolls benutzt.

Das Prinzip der Fluoreszenzmarkierung beruht auf der Reaktion von Farbstoff-Succinimidyl-Estern mit primären Aminen von Proteinen zu Farbstoff-Protein-Konjugaten. Nach der Reaktion erfolgt über eine Größenausschlußchromatographie die Trennung von markiertem Protein und ungebundenem Farbstoff. Über die Messung der UV-Spektren können die resultierende Konzentration des Proteins und die Markierungseffizienz bestimmt werden (Abbildung 2.6).

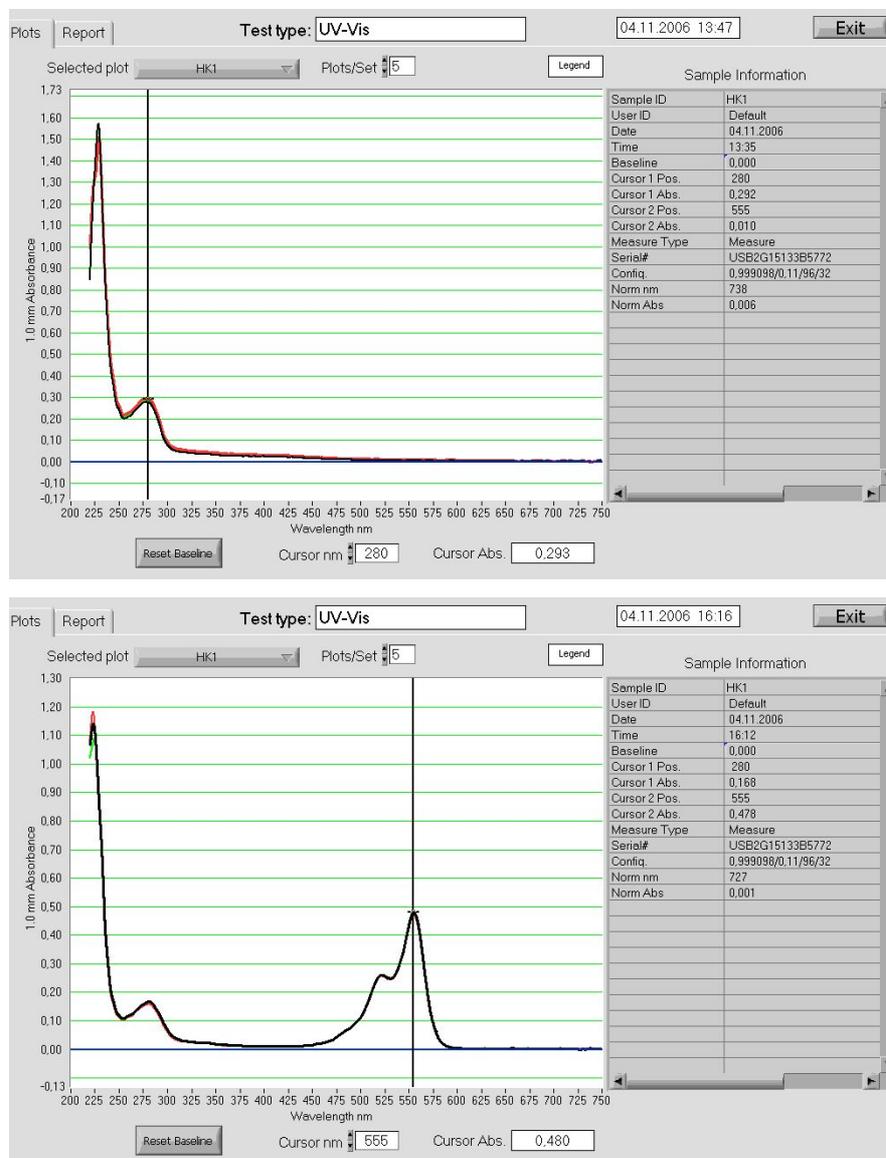


Abbildung 2.6: UV-Spektrum von HMWK vor und nach der Fluoreszenzmarkierung.

Es wurde jeweils 1 mg des ungelösten lyophilisierten Proteins von single-chain HWMK und two-chain HMWK eingesetzt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden nach 24 h Vorbehandlung mit Hungermedium für für verschiedene Zeiträume mit dem fluoreszenz-markierten Protein inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Fixierung mit 2 %iger Paraformaldehydlösung mit Hoechst 33342 (10 µg/ mL) für 10 Minuten.

2.2.3. Zellbiologische Methoden

2.2.3.1. Isolierung von primären VSMC aus Aorten von Ratten

Für die Etablierung der Kultur von primären glatten Gefäßmuskelzellen aus Aorten von Ratten wurden Protokolle bezüglich Zellisolation mittels Enzymverdau verglichen und optimiert.

Die Ratte wurde anästhesiert und der Brustraum geöffnet. Die Aorta wurde komplett entnommen, in HBSS gewaschen und für die weitere Prozedur in frisches HBSS/DMEM überführt. Nach der Entfernung des Fettgewebes und der Blutgefäße wurde die Aorta in eine Vorverdau-Enzymlösung (Tabelle 2.10) überführt und für 30 Minuten in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Aorta zweimal mit dem HBSS/DMEM-Gemisch gewaschen, um Reste der Collagenase zu entfernen, erneut in frisches HBSS/DMEM überführt und die Adventitia abgezogen. Um eine quantitative Entfernung der Adventitia zu gewährleisten, wurde an einem Dissektionsmikroskop gearbeitet. Zur Erzielung einer höheren Ausbeute an VSMC, wurde der glatte Muskelschlauch in DMEM mit 20 % FBS überführt und über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Aorta in PBS gewaschen und für ca. 30 Minuten in 5 mL DMEM mit P/S in einem 37 °C warmen Wasserbad platziert. Währenddessen wurde die Verdau-Enzymlösung hergestellt (Tabelle 2.10) und mittels Filtration (0.2 µm Porengröße) sterilisiert. Die Gewebestücken wurden mit einer geringen Menge des verwendeten Mediums in eine Petrischale gegeben und mit einem Skalpell in sehr kleine Ringe geschnitten. Dabei ist die Fragmentgröße entscheidend für den späteren Verdau und die Gewinnung der Zellen. Die zerkleinerten Gewebestücken, die im Mikroskop zunächst kompakt und undurchsichtig erscheinen, wurden in die

Enzymlösung überführt und diese nachfolgend in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Verlauf des Verdau wurde regelmäßig überprüft und die Reaktion mit DMEM, welches 10 % FBS enthält, gestoppt (meist nach 90 bis 120 Minuten), wenn die Gewebestücken durchscheinend und die Zellen aus der Matrix freigesetzt waren. Für die vollständige Freisetzung der Zellen wurden die Gewebestücken mehrmals mit einer Glas-Pasteurpipette aufgezogen. Das bei der Zentrifugation bei 600xg für 10 Minuten erhaltene Gewebs-/Zellpellet wurde in 4 mL DMEM mit 20 % FBS und 1 % P/S resuspendiert und in einer T25-Flasche überführt. Der erste Medienwechsel wurde nach 2 bis 3 Tagen durchgeführt.

Zusammensetzung der Enzymlösungen für den Verdau von Aorten

Vorverdau-Enzymlösung

Collagenase Typ II	~450 U/ mL
DMEM (ohne FBS und P/S)	ad 2,5 mL

Verdau-Enzymlösung

Elastase	~3,3 U/ mL
Collagenase Typ II	~450 U/ mL
Rinderserum-Albumin BSA	1 mg/ mL
DMEM (ohne FBS und P/S)	ad 2,5 mL

Tabelle 2.10: Zusammensetzung Enzymlösungen zur Isolierung von VSMC.

2.2.3.2. Zellkultivierung von primären VSMC aus Rattenaorten

Die primären glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten sind adhären wachsende Zellen. Das für die Kultivierung verwendete Medium bestand aus DMEM, supplementiert mit 10 bzw. 20 % FBS, 100 U/ mL Penicillin und 100 µg/ mL Streptomycin. Die Kultivierung erfolgte in Inkubatoren bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt. Bei einer Konfluenz von 70-90 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit Mg²⁺- und Ca²⁺-freiem PBS gewaschen und mit Trypsin (0,25 % (w/v)) / EDTA (0,5 mM) für ca. 1 Minute bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (1 mL/ 25 cm²). Nach der Kontrolle mittels Mikroskop, ob die Zellen sich

gelöst haben, wurden noch anhaftende Zellen durch leichtes Klopfen des Kulturgefäßes gelöst und die Trypsin-Reaktion durch Zugabe der dreifachen Menge an serumhaltigen Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 900xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Wachstumsmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:3 in neue Kulturgefäße überführt. Alle 3 bis 4 Tage erfolgte der Mediumwechsel. Für eine höhere Überlebensrate der VSMC wurden diese bis zur Passage 2 bzw. 3 in Wachstumsmedium supplementiert mit 20 % FBS kultiviert und nachfolgend den FBS-Anteil auf 10 % reduziert.

Der Reinheitsgrad der VSMC wurde routinemäßig durch Immuncytofluoreszenz mit einem Antikörper gegen α -smooth muscle Actin bestimmt (Abbildung 3.1).

2.2.3.3. Kultivierung von primären humanen glatten Gefäßmuskelzellen

Die primären humanen aortischen VSMC sind adhärent wachsende Zellen und wurden in T25- bzw. T75-Flaschen in „Smooth Muscle Cell Growth Medium 2“ bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit Mg²⁺- und Ca²⁺-freiem PBS gewaschen und mit Trypsin (0,25 % (w/v)) / EDTA (0,5 mM) für ca. 30 Sekunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Kontrolle mittels Mikroskop, dass die Zellen sich gelöst haben, wurde die Trypsin-Reaktion durch Zugabe der doppelten Menge an Trypsin-Stop-Solution gestoppt. Die Zellsuspension wurde mit Wachstumsmedium aufgefüllt und in einem Verhältnis von 1:3 in neue Kulturgefäße überführt. Alle 3 bis 4 Tage erfolgte der Mediumwechsel.

2.2.3.4. Apoptoseinduktion in VSMC

Für die Induktion der Apoptose in VSMC wurden die Zellen nach 24 stündiger Vorinkubation in Wachstumsmedium mit 1 % FBS mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail (Tabelle 2.11) für verschiedene Zeiträume (30 Minuten bis 16 Stunden) inkubiert.

Zusammensetzung des Apoptoseinduktions-Cocktails

Sodium-Nitroprussid (NO-Donor)	3 mM
FasLigand	1 ng/ mL
TNF- α	1 ng/ mL
IFN- γ	500 U/ mL
IL-1 α	1000 U/ mL
in Wachstumsmedium mit 1 % FBS	

Tabelle 2.11: Zusammensetzung Apoptoseinduktions-Cocktails zur Induktion der Apoptose in VSMC.

2.2.3.5. Stimulation von VSMC mit Kininogen

Für die Untersuchung des Einflusses von Kininogen auf apoptotische Vorgänge in VSMC wurden die Zellen nach 24 stündiger Vorinkubation in Wachstumsmedium mit 1 % FBS mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem Hochmolekularem Kininogen (Enzyme Research, Swansea, UK) ko-stimuliert.

2.2.3.6. Transiente Transfektion von adhärennten Zellkulturen

Zur transienten Transfektion der hAoSMC wurde GeneJuice (Merck KG, Darmstadt, D) Reagenz benutzt. In Vorversuchen wurde dieses Verfahren als effizient und schonend für hAoSMC bestätigt. Die Anwendung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (Tabelle 2.12).

Zusammensetzung des Transfektionsmixes

Komponente	Menge für 24-well	Menge für 6-well
Wachstumsmedium pro well (mL)	0,5	3
Opti-MEM (μ L)	20	100
GeneJuice (μ L)	0,75	3
Plasmid-DNA (μ g)	0,25	1

Tabelle 2.12: Zusammensetzung des Transfektionsmixes.

Die Zellen wurden je nach Versuchsansatz in 24-well- oder 6-well-Kulturplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 50 % kultiviert. Für die Transfektion wurden die Zellen 1 bis 6 Stunden vorher mit frischem Wachstumsmedium inkubiert. Das serum-freie Transfektionsmedium (Opti-MEM) wurde in einem Eppendorf-Tube vorgelegt und das GeneJuice- Reagenz tropfenweise hinzugefügt. Nach sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde hinzugefügt und der Ansatz durch vorsichtiges Pipettieren gemischt. Nach erneuter Inkubation für 5 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsmix tropfenweise zu den kultivierten Zellen gegeben und diese für 24 h unter Standard-Kulturbedingungen (siehe 2.2.3.3.) kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen aufgearbeitet oder den entsprechenden Stimulationsprotokollen unterzogen.

2.2.3.7. Kryokonservierung von Zellen

Eine Lagerung von Zellen ist über mehrere Monate bei -80 °C möglich. Für die langfristige Lagerung, können die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden.

Für den Vorgang der Kryokonservierung wurden die Zellen zuerst entsprechend dem Protokoll der Passage behandelt. Das erhaltene Zellpellet wurde in Einfriermedium, welches aus Wachstumsmedium mit 20 % FBS und 10 % DMSO bestand, resuspendiert und je ein Milliliter der Suspension in ein Kryoröhrchen überführt (25 cm² Wachstumsfläche ergibt 1 mL Suspension). Um eine Schädigung der Zellen durch ungefrorenes DMSO zu minimieren, wurden die Kryoröhrchen schnellstmöglich auf Trockeneis überführt und 24 Stunden bei -80 °C gelagert, wonach die Zellen zur längeren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Die Zugabe von DMSO ist notwendig, um eine für die Zellmembran schädliche Kristallbildung zu unterbinden.

Die aufzutauenden Zellen wurden schnell im Wasserbad bei 37 ° aufgetaut und sofort nach Auflösen des letzten Eises in 10 mL Wachstumsmedium überführt, um das DMSO zu verdünnen. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 900xg für 5 Minuten und Abnahme des Überstandes wurde das DMSO entfernt. Das Zellpellet wurde resuspendiert und in Kulturgefäße überführt.

2.2.4. Statistische Berechnungen

Die Untersuchungsergebnisse aus Zellkulturexperimenten wurden mittels Student-t-Test auf Signifikanz geprüft. Diese ergab sich für $p < 0,05$ (signifikant) und $p < 0,01$ (hoch signifikant). Die graphische Darstellung erfolgte als Mittelwert \pm SEM (Standard error of the mean).

Als Programme zur Berechnung der Statistik und grafischer Darstellung der Daten wurden Excel XP und CorelDraw 11 benutzt.