

3 Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien und Lösungen

Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
L-Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
L-Arginyl-L-Arginin	Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland
L-Arginyl-L-Leucin	Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DEPC (Diethyl-pyrocyanat)	Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Dispase I (from <i>Bacillus polymyxa</i>)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DNA-Molekulargewichtsmarker VIII	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dynabeads (M-450)	Dynal., Oslo, Norwegen
Dynemic ET Terminator Cycle Sequence Kit	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Endothelzell-Medium (EGM-MV); mit bzw. ohne Phenolrot	Cellsystems, St. Katharinen, Deutschland
Entwickler & Fixierlösung (GBX Developer & Fixer Twin Pack)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Eosin	Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
Ethanol (absolut)	Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Gentamycin	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
D-Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Glycerol (85%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hanks' Balanced Salts (HBSS)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Hoechst 33258 Färbelösung	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Isotonische Lösung	Coulter-Immunotech-Diagnostics, Krefeld, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Keratinocyte-SFM (inkl. REGF, BPE)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
L-Lysin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Glücksklee Nestlé, Frankfurt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Methanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N-(1-Naphthyl)-ethylen-diamin- dihydrochlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid (NaCl) reinst p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Natriumnitrit (NaNO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
O'range G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
L-Ornithin-HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PCR-Nukleotiden-Mix (dNTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ponceau-S-Lösung	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Protein-Assay Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ready-To Go™ You-Kit (Mix-Beads incl. dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Murine Reverse Transkriptase)	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA

Rinderserumalbumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
(6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin-HCl (BH ₄)	Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
Salzsäure (HCl) 37 %ig (purissimum)	VEB Laborchemie Apolda, Deutschland
SDS (Sodium dodecyl sulfat)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Sulfanilamid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Taq-Polymerase (incl. MgCl ₂ -Puffer)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
TRIS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,05 %)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Tritium-Thymidin [³ H]Thymidin	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
Tween20	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
ECL-Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<u>Antikörper und Primer</u>	
Anti-human-eNOS, polyklonal	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Anti-human-iNOS, polyklonal	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Anti-PECAM-1 (CD31), monoklonal	R&D Systems, Abingdon, UK
Anti-Rabbit IgG, Peroxydase-konjugiert	Calbiochem, Canada
Anti-von Willebrand (anti-vWF-FITC)	CellSystems Biotechnologie, St. Katharinen, Deutschland
Goat-IgG-FITC	Caltag Laboratories, Burlingame, Kanada
Primer (sense) und (antisense) für eNOS, iNOS, GAPDH	Metabion Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH, Martinsried, Deutschland
Randomprimer (pd(N) ₆)	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
<u>Zusammensetzung der Puffer</u>	
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

Ladepuffer	1 mM EDTA + 30% Glycerol + 1 Spatel- spitze O'range G
Mc Ilvain Puffer	Lösung A: 0,1 M Zitronensäure Lösung B: 0,2 M Na ₂ HPO ₄ 8,6 ml Lös. A + 10,4 ml Lös. B, pH 5,5
PBS-Puffer (phosphat buffered saline)	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g Na ₂ HPO ₄ + 0,2 g KH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O ad 1000 ml A. bidest. pH 7,4 (mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl)
Puck/EDTA	0,4 g KCl + 8,0 g NaCl + 0,35 g NaHCO ₃ + 1,0 g D-Glucose + 5 mg Phenolrot + 0,255 g EDTA ad 1000 ml A. bidest.
Sammelgelpuffer (10%) SDS-Probenpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,5), 0,8% SDS 5% Mercaptoethanol, 2,8% SDS, 14% Glycin, 90 mM Tris pH 6,8, 0,1 % Bromphenolblau
Szintillator	4,0 g 2,5-Diphenyloxazol + 0,1 g 1,4-bis-2- (5-Phenyloxazolyl)-benzen ad 1000 ml Toluol, 2-3 h kräftig schütteln
TBE-Puffer (10 ×)	500 mM TRIS + 500 mM Borsäure + 20 mM EDTA ad 1000 ml A. bidest., pH 8,2
TBS-Puffer (10 ×)	0,1 M Tris pH 7,4, 1,54 M NaCl in A. bidest.
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,8% SDS
Tyrode-Eosin-Lösung	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 0,2 g CaCl ₂ + 0,1 g MgCl ₂ + 0,05 g NaH ₂ PO ₄ + 1,0 g NaHCO ₃ + 1,0 g Glucose + 0,625 g Eosin ad 1000 ml A. bidest.
Westernblotpuffer	20 mM Tris pH 8,8, 150 mM Glycin, 0,02% SDS, 20% Methanol

3.2 Geräte und Hilfsmittel

Absorptionsreader (MTP-Photometer)	Labsystems iEMS Reader MF, Helsinki, Finnland
------------------------------------	--

Software zum Absorptionsreader	Sero Calc Vers. 4.0
Analysenwaage	Typ MC5_OCE, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Blot-Apparatur	Hofer SemiPhor, Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
Brutschrank	Vitromat Mytron, Typ sbs-11, Heiligenstadt, Deutschland INCO 2 Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Cell-Harvester und Vakuum-Controller	INOTECH, ICH-110, Wohlen, Schweiz
Deckgläser	VEB Ilmenau, Deutschland
Durchlichtmikroskop	Zetopan, Reichert AG Wien, Österreich
Durchflußcytometer (FACScan)	Becton Dickinson, San Jose, USA
Software zum Durchflußzytometer	PASCAL 3.22 (Systemsoftware) Lysis II Vers. 1.1 CellFit-Software Vers. 2.01.2
Elektrophoresekammer (incl. Gelschlitten) [horizontal]	OWI Separation Systems, Porthmouth, Niederlande
Elektrophorese-Apparatur [vertikal]	Hofer, Amersham Pharmacia Biotech; San Francisco, Kalifornien, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml, 0,7 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Zentrifuge	EC 5402, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Falcon-Tubes	Becton Dickinson, San Jose, USA
Flüssigkeitsszintillationszähler	WINSPECTRAL 1414 Liquid Scintillation Counter, WALLAC-ADL-GmbH, Freiburg, Deutschland
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Faust GmbH, Halle, Deutschland
Füllspatel	VEB Dentalfabrik Treeurt, Deutschland
Gelblotting-Filterpaper (0,37 mm)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Gewebekulturflaschen und -schalen (25-cm ² , 75-cm ² , Ø 60 mm)	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Glasfiberfilter	Typ G-7, INOTECH, ICH-110, Wohlen, Schweiz
ImageMaster VDS	Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA

Kühlzentrifuge	Biofuge primo R, Heraeus Instruments, Gera, Deutschland
Software für ImageMaster VDS	Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
Küvette (4,5 ml)	Coulter-Immunotech-Diagnostics, Krefeld, Deutschland
Laminarbox	HS 12, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Magnetrührer	MLW Rührerätewerk Medingen, Sitz Freital, Deutschland Typ R3T Variomag Elektronorührer Poly15, Laborbedarf K.J. Werner GmbH, Leipzig, Deutschland
„Magnetic Particle Concentrator“ (MPC)	Dynal, Oslo, Norwegen
Mikroskope	Telaval 3, Carl Zeiss Jena, Deutschland Olympus CK 2, Tokyo, Japan Olympus BX50, Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland
96er und 24er Mikroliterplatten (MTP)	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mikrowelle	Typ M 633, Samsung electronics GmbH, Steinbach, Deutschland
Nitrocellulose Blotting Membran	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	Digital pH-Meter pH 525, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaagen	Typ 870-13, G. Kern & Sohn, Albstadt, Deutschland UMC 5, Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Quarzküvette (50 µl)	Typ Hellma, Novodirekt GmbH, Kehl, Deutschland
Röntgenfilm (FCW-Retina XBD 13 × 18)	B.W. Plus Röntgenvertrieb GmbH, Kamp/Lintfort, Deutschland
Schüttelgeräte	Thys 2, MLW Labortechnik Ilmenau, Deutschland Heidolph unimax 2010,

	Deutschland
	IKA-Schüttler MTS2, IKA-Labortechnik Janke & Kunkel GmbH & CoKG., Staufen, Deutschland
Sterilfilter	Sartorius Minisat, steril, 600kPa max, 0,22 µm
Stromversorgungsgeräte	Consort E835 OWI Separation Systems, Portsmouth, Niederlande
Szintillationsmeßgefäße	EPS 600, Pharmacia Biotech, Schweden Canberra-Packard GmbH, Dreieich, Deutschland
Thermocycler	Mastercycler 5330, Eppendorf-Netheler- Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 102 H, Bandlin Elektronik, Berlin, Deutschland
UV-Tisch	Syngene
UV-Vis-Spektrophotometer	UV mini 1240, Shimadzu Corp., Japan
VDS-Film für den ImageMaster	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Vortex genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad	Thermostad B3-DC 1, Haake, Karlsruhe, Deutschland
Zellcoulter	Beckman Coulter, Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Zellsieb	100 µm, Becton Dickinson, NJ, USA

3.3 Isolierung und Kultivierung humaner dermaler mikrohämovaskulärer Endothelzellen (HDMEC)

3.3.1 Isolierung von HDMEC

Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) wurden aus Vorhautgewebe von 1 bis 10jährigen Spendern gewonnen. Die bereits bekannte Methode von Hewett and Murray (1993) zur Isolierung von HDMEC wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert und optimiert. Das Prinzip dieser Methode ist die

immunomagnetische Separierung der mikrovaskulären Endothelzellen mit Hilfe von Mikrobeads (Dynabeads), die mit Antikörpern gegen zellspezifische Oberflächenmoleküle beschichtet sind.

Bei den eingesetzten Mikrobeads handelte es sich um uniforme, superparamagnetische, monodisperse, polymere Partikel aus $\delta\text{Fe}_2\text{O}_3$ und Fe_3O_4 , die eine Größe von $4,5\ \mu\text{m}$ haben. Diese wurden mit anti-PECAM-1 Antikörpermolekülen (CD31) beschichtet, die Endothelzellen-spezifisch binden. Dabei bilden sich Dynabead-Endothelzellkomplexe, die durch den Einsatz eines „Magnetic Particle Concentrator’s“ von der heterogenen Zellsuspension separiert werden können. Auf eine solche Weise isolierte Zellen sind lebensfähig, kultivierbar und für in vitro Versuche einsetzbar (Drancourt et al., 1992; George et al., 1992; Leach et al., 1994).

Zum Anlegen der Primärkultur wurden die nach der Exzision erhaltenen, ca. $2\ \text{cm}^2$ großen Hautstücke in einer Transportlösung ($25\ \mu\text{g}$ Gentamycin in 5 ml SFM) bei $4\ ^\circ\text{C}$ bis zur Präparation maximal für 4 h gelagert. Nachdem das subkutane Fettgewebe mechanisch entfernt und die Haut in $5 \times 5\ \text{mm}$ große Stücke geschnitten wurde, erfolgte eine Inkubation über Nacht bei $4\ ^\circ\text{C}$ in einer sterilen Dispaselösung I ($2\ \text{mg/ml}$ in HBSS mit $25\ \mu\text{g}$ Gentamycin). Die Hautstücken wurden aus der Dispaselösung genommen, die Epidermis mechanisch entfernt (Abb. 3) und das dermale Gewebe in einer sterilen HBSS/Gentamycinlösung mit Hilfe von Pinzette und Schere zerkleinert.

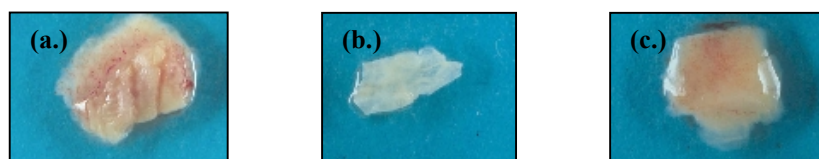


Abb. 3: Hautgewebe vor und nach der Dispasebehandlung; (a.) komplettes Hautgewebe, (b.) Epidermis, (c.) Dermis.

Anschließend erfolgte eine 10 minütige Inkubation in 2–5 ml 0,05% Trypsin/EDTA bei $37\ ^\circ\text{C}$, wobei die Lösung mehrmals leicht geschüttelt wurde. Daran schloß sich die Filtration der Zellsuspension durch ein Zellsieb ($100\ \mu\text{m}$ Porengröße) an. Um eine

weiterführende Trypsinaktivität zu vermeiden, wurden 2 ml 5% FKS/HBSS zugegeben. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 1500 U/min wurde der Überstand entfernt, das Zellpellet in 0,5 ml 5% FKS/HBSS resuspendiert und mit anti-CD31-beschichteten Dynabeads leicht schüttelnd bei 4 °C für 20 min inkubiert.

Die Beschichtung der Dynabeads wurde zuvor folgendermaßen durchgeführt:

1. 25 µl (entsprechen 10^7 Beads) in steriles 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführen
2. Reaktionsgefäß in den „Magnetic Particle Concentrator“ (MPC) für 1 min stellen
3. Überstand mit einer Pipette entfernen
4. Reaktionsgefäß aus dem MPC nehmen, Dynabeads mit 0,5 ml 0,1% BSA/PBS resuspendieren
5. Reaktionsgefäß in den MPC für 1 min stellen
6. Schritte 3 bis 5 fünfmal wiederholen
7. Überstand entfernen, Reaktionsgefäß aus dem MPC nehmen, in 20–40 µl 0,1% BSA/PBS resuspendieren und 2 µl anti-CD31-AK ($2 \mu\text{g}/10^7$ Dynabeads) zugeben
8. Inkubation bei 4 °C und leichtem Schütteln für 30 min
9. Reaktionsgefäß für 1 min in den MPC stellen
10. Waschschritte wie Punkte 3 bis 5 dreimal wiederholen
11. Anti-CD31-beschichtete Dynabeads in 50 µl 0,1% BSA/PBS resuspendieren und bis zum Gebrauch bei 4 °C lagern.

Im Anschluß an die Inkubation der Zellen mit den anti-CD31-beschichteten Dynabeads erfolgte die Zellseparierung ebenfalls mit Hilfe des MPC, wobei das Reaktionsgefäß mit den Zellen und den Dynabeads so lange im MPC verblieb (ca. 2 bis 5 min), bis das Pellet an der Gefäßwand sichtbar wurde. Hohe Mengen an herausgelöstem Zellmaterial verursachen eine starke Trübung. In diesem Fall muß die Verbleibdauer im MPC verlängert werden. Nachdem sich ein klares Pellet gebildet hatte, wurde der Überstand, der sämtliche Zellen enthielt, die nicht mit den anti-CD31-beschichteten Dynabeads komplexierten, mit einer Pipette entfernt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß dem MPC entnommen, das Pellet in 0,5 ml 5% FKS/HBSS resuspendiert und mittels MPC fünfmal mit 5% FKS/HBSS gewaschen. Schließlich wurden die separierten Zellen in EGM-MV (mit 5% FKS, 50 µg/ml Gentamycin, 50 ng/ml Amphotericin-B, 1 µg/ml Hydrocortison, 10 ng/ml hEGF, 12 µg/ml Rinderhirnextrakt) suspendiert und in 25-cm²-

Kulturflaschen, gefüllt mit 5 ml EGM-MV, bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90% und in 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Es wurden pro Hautprobe eine Kulturflasche zum Anlegen der Primärkultur angesetzt, wobei eine adhärente Einzelschicht (Monolayer) nach etwa 9 bis 11 Tagen erhalten werden konnte. Ein Mediumwechsel fand jeden zweiten Tag statt.

3.3.2 Subkultivierung und Passagierung von HDMEC

Zur Subkultivierung wurde das Kulturmedium entfernt und die adhärenen mikrovaskulären Endothelzellen mehrmals mit PUCK/EDTA gespült. Danach wurden 2 ml (pro 25-cm²-Kulturflasche) 0,05% Trypsin/EDTA zugegeben und für maximal 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml 5% FKS/HBSS wurde die proteolytische Trypsinwirkung inaktiviert, woran sich eine Zentrifugation bei 1500 U/min für 10 min anschloß. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1–2 ml EGM-MV suspendiert und die Zellanzahl bestimmt. Hierfür wurden 50 µl der Zellsuspension mit 200 µl Thyrode-Eosinlösung (Vitalfärbung) gemischt (Verdünnung 1:5), in eine Fuchs-Rosenthal-Kammer gefüllt, die lebenden Endothelzellen in fünf Gruppenquadraten unter einem Lichtmikroskop ausgezählt, addiert und die Gesamtzellanzahl unter Berücksichtigung des Kammerinhaltes ($\times 1000$), des Verdünnungsfaktors und des Suspensionsvolumens berechnet. Die Zellsuspension wurde anschließend mit dem entsprechenden Volumen an Kulturmedium ergänzt, um eine Konzentration von 1 Mio Zellen pro ml zu erreichen. In Abhängigkeit von den nachfolgenden Zellversuchen wurden Zellen in 24er MTP mit einer Aussaatdichte von 10000 Zellen/1 ml oder in Kulturschalen (\varnothing 60 mm) bzw. Kulturflaschen (25 cm²) mit 0,16 Mio/5 ml angesetzt. Die Passagierung erfolgte in 75-cm²-Kulturflaschen (1 Mio Zellen/20 ml), wobei ebenfalls jeden 2. Tag ein Mediumwechsel stattfand. Nach 5–7 Tagen Wachstumsdauer konnte eine konfluente Monolayer erhalten und für die nächste Passage genutzt werden. Die Kultivierung erfolgte, wie bereits oben beschrieben, in EGM-MV bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90% und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre. Für Zellversuche wurden die 1.–3. Passage verwendet.

3.4 Charakterisierung von HDMEC

3.4.1 Flowcytometrische Bestimmung des von Willebrand Faktors

Die Identität und Reinheit einer Zellkultur kann nicht nur anhand von morphologischen Kriterien, sondern auch anhand von bestimmten biochemischen Parametern festgestellt werden. Um die Effizienz der Methode zur Separierung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen unter Verwendung von anti-CD31-beschichteten Dynabeads zu untersuchen, wurde der von Willebrand Faktor (Faktor VIII) als ein weiterer charakteristischer Marker für Endothelzellen bestimmt (Jackson et al., 1990; Ruszczak et al., 1990; Bull et al., 1991; George et al., 1992; Ades et al., 1992; Detmar et al., 1992; Bernd et al., 1993; Swerlick and Lawley, 1993; Petzelbauer et al., 1993; Heckmann et al., 1994; Xu et al., 1994; Cornelius et al., 1994; Jones, 1996; Gille et al., 1996; Kluger et al., 1996; Gupta et al., 1997; Heckmann et al., 1997; Mason et al., 1997; Chan et al., 1998; Richard et al., 1998).

Adhärente Zellen der Primärkultur wurden, wie bereits unter 3.3.2 beschrieben, mit PUCK-EDTA gespült, mit 0,05% Trypsin-EDTA und 5% FKS/HBSS behandelt und nach Bestimmung der Zellanzahl mit Hilfe eines Zellcoulters eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 1 Mio Zellen in 0,5 ml PBS-B (PBS, pH 7,4 + 1% BSA) hergestellt und in Falcon-Tubes überführt. Anschließend wurden die Zellen folgendermaßen für die flowcytometrische Analyse präpariert:

1. Zentrifugation (3 min, 1250 U/min), Überstand dekantieren, Zellpellet aufklopfen
2. Zugabe von 1 ml eiskaltem (-20 °C) Methanol (Fixierung)
3. Zentrifugation (siehe Punkt 1.)
4. Zugabe von 1 ml PBS-B
5. Zentrifugation (siehe Punkt 1.)
6. Zugabe von 1 ml PBS-T (PBS-B + 0,2% Tween20 v/v) (Permeabilisierung)
7. Zentrifugation (siehe Punkt 1.)
8. Zugabe von 10 µl vorverdünnten Anti-human-vWF-FITC (1 µg/10 µl in PBS-B) bzw. 10 µl Goat-IgG-FITC (Isotypkontrolle, Konzentration: 1 µg/10 µl)
9. 30 min Inkubation im Dunkeln
10. Waschen mit 1 ml PBS-B und Zentrifugation (siehe Punkt 1.), 2× wiederholen

11. Zugabe von 0,5 – 1 ml PBS und flowcytometrische Messung innerhalb 1 h.

Parallel zur Untersuchung des vWF in einer Primärkultur von gereinigten HDMEC wurde eine Zellpopulation eingesetzt, die zuvor nicht mit anti-CD31-beschichteten Dynabeads separiert wurden. Diese heterogene Population wurde identisch präpariert und ebenfalls der flowcytometrischen Analyse zugeführt.

3.4.2 Mycoplasmentest

Die Zellkultur einzelner Passagen der isolierten HDMEC wurde stichprobenartig auf Mycoplasmenfreiheit überprüft. Hierzu wurden die Zellen für 48–72 h auf sterilen Deckgläsern, die in EGM-MV gefüllten Kulturschälchen lagen, im Brutschrank bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90% und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die mit einzelnen Zellcluster bewachsenen Deckgläser wurden mit PBS gespült und 5 min mit 3 ml Fixierungslösung (Eisessig:Methanol = 1:3) fixiert. Der Fixierungsvorgang wurde dreimal wiederholt. Nachdem die Deckgläser an der Luft getrocknet waren, wurden diese 10 min mit einer Färbelösung (0,1 µg/ml, Hoechst 33258) behandelt und nach zweimaligem Waschen mit A. bidest. auf Objektträgern mit 1 Tropfen Mc Ilvain-Puffer gebettet. Dem schloß sich die Auswertung an einem Fluoreszenzmikroskop an (Chen, 1977).

3.4.3 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von HDMEC

Zur weiteren Charakterisierung der isolierten HDMEC wurde das Proliferationsverhalten bzw. die DNA-Syntheseleistung in Abhängigkeit von der Zeitdauer der Kultivierung untersucht. Als Marker für die Synthesephase des Zellzykluses wurde der Einbau von radioaktiven [³H]Thymidins gemessen.

HDMEC wurden mit einer Zellaussaatdichte von 10000 Zellen/ml in 24er MTP (1 ml/well) in EGM-MV im Brutschrank kultiviert. Nach verschiedenen Kultivierungszeiträumen (1. Tag – 7. Tag) wurde dem Kulturmedium jeweils einer 24er

MTP radioaktives [^3H]Thymidin (20 μl /well; 0,5 μCi) zugesetzt und 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium mittels Cell-Harvester aspiriert und jedes well mit A. bidest. mehrmals gespült. Pro well wurden danach 200 μl 0,05% Trypsin-EDTA zugegeben und für 10 min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß daran wurden ebenfalls mittels Cell-Harvester die abgelösten Zellen aspiriert und auf bereits ausgestanzte, angefeuchtete Glasfiberfilter übertragen. Die MTP wurde mehrmals mit A. bidest gespült, wobei auch das Spülwasser den Filter passierte. Pro well wurde ein Filter erhalten und in ein Szintillationsmeßgefäß überführt. Nach dem Trocknen bei RT wurde in jedes Meßgefäß 4 ml Szintillatorflüssigkeit gegeben und unter Mitführung zweier Leerwerte im Flüssigkeitsszintillationszähler nach dem ^3H -Meßprotokoll vermessen.

3.5 Inkubationsschemata von potentiell NO-Synthase-modulierenden Substanzen

HDMEC der 1.–3. Passage wurden in Kulturschälchen (\varnothing 60 mm) kultiviert. Nach Erreichen einer 70–80%igen Konfluenz (ca. 3 Tage) erfolgte die Inkubation mit den verschiedenen Substanzen. Hierfür wurde das Kulturmedium (EGM-MV) entfernt und durch 3 ml Phenolrot-freies EGM-MV ersetzt, zu dem die gelösten Substanzen zugegeben wurden:

L-Arginin wurde in Phenolrot-freiem Medium gelöst und jeweils 300 μl der entsprechenden Konzentration pro Kulturschälchen zugegeben, so daß Endkonzentrationen von 5, 10, 25, 50 mM erreicht wurden. In der Kontrolle waren 0,5 mM L-Arginin enthalten, was der Basalkonzentration im Phenolrot-freien Kulturmedium entspricht.

CaCl₂ wurde in Phenolrot-freiem EGM-MV gelöst und 30 μl zur Zellkultur gegeben. Es ergaben sich Endkonzentrationen von 1 mM und 2 mM.

(6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin \times 2 HCl (BH₄) wurde ebenfalls im Medium gelöst und jeweils 30 μl /3 ml eingesetzt. Supplementiert wurden jeweils 25 μM , 250 μM und 500 μM .

L-Ornithin-HCl und L-Lysin, gelöst im Phenolrot-freiem Medium, wurden mit Endkonzentrationen von 1 mM und 2 mM (je 30 μl) in der Zellkultur eingesetzt.

Die **Dipeptide L-Arginyl-L-Arginin** und **L-Arginyl-L-Leucin** wurden im Phenolrot-freien EGM-MV gelöst und die HDMEC jeweils mit 5, 10, 25 und 50 mM inkubiert.

Alle Lösungen wurden frisch hergestellt und sterilfiltriert. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h.

3.6 Bestimmung des Proliferationsverhaltens

Das toxische Potential der eingesetzten Substanzen sollte anhand des Einflusses auf das Proliferationsverhalten der HDMEC untersucht werden. Als Maß für die Beeinflussung der Zellteilungsfähigkeit wurde die Zellanzahl nach Behandlung mit den verschiedenen Substanzen bestimmt.

Die adhärennten Zellen wurden trypsiniert und in 1 ml sterilem PBS suspendiert. Anschließend wurde die Zellanzahl mit Hilfe eines Zellcoulters bestimmt. Dabei wurden der Zellsuspension 100 µl entnommen, in einer Küvette (4,5 ml Füllvolumen) mit 4 ml einer isotonischen Lösung gemischt und dem Zählverfahren des Coulters zugeführt. Unter Berücksichtigung des Injektionsvolumens (0,5 ml), der Verdünnung in der isotonischen Lösung (Verdünnungsfaktor 41) und des Volumens der Zellsuspension wurde die Zellanzahl berechnet.

3.7 Untersuchungen zur Beeinflussung des L-Arginin/NO-Metabolismus in HDMEC

Nach erfolgter Inkubation der HDMEC mit den verschiedenen Substanzen wurde deren Einfluß auf die NO-Produktion untersucht. Hierzu wurden zum einen die Aktivität über die NO-Freisetzung und zum anderen die Expression von zwei NOS-Isotypen analysiert.

3.7.1 Bestimmung des Nitrit-Gehaltes nach Griess

Nitrit, ein stabiles Produkt von NO, wurde spectrophotometrisch mit der Griess-Reaktion, einer etablierten Methode für die Analyse von Nitrit und Nitrat in flüssigen Medien, bestimmt (Green et al., 1982; Arnal et al., 1995; Romero-Graillet et al., 1996; Wang et al., 1996). Dabei bildet Nitrit in einer zweischrittigen Reaktion mit den beiden Griessreagenzien ein Azoprodukt, das bei einer Wellenlänge von 540 nm ein Absorptionsmaximum aufweist und somit photometrisch erfasst werden kann.

Dem Kulturmedium wurden 100 µl entnommen, in 96er MTP überführt und mit 100 µl Griess-Reagenz gemischt. Anschließend wurde innerhalb 10 min die Extinktion bei 540 nm an einem Mikrotiterplattenphotometer bestimmt.

Griess-Reagenz

Griess 1 (1% Sulphanilamid in 5%ige Phosphorsäure)

Griess 2 (0,1% N-(1-Naphthyl)ethylendiamin in 5% Phosphorsäure)

Griess 1 : Griess 2 = 1:1

Zuvor wurde eine Eichkurve mit Natriumnitrit im Konzentrationsbereich 0 – 50 µM in phenolrotfreiem EGM-MV aufgenommen. Hierbei wurde der Verdünnungsfaktor durch die Zugabe von 1 Vol Griess-Reagenz berücksichtigt. Außerdem wurde die Eigenabsorption des Mediums vom gemessenen Wert subtrahiert.

3.7.2 Analyse der Proteinexpression der NO-Synthasen mittels Westernblot-Analyse

Dem Verfahren der Westernblot-Analyse liegt der Transfer von in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennte Proteine auf eine Nitrocellulosemembran und eine anschließende Antikörper-Erkennungsreaktion zugrunde. Die Auftrennung der Proteingemische auf dem Polyacrylamidgel erfolgt mit hoher Trennschärfe. Die Grundsubstanz des Geles, das Acrylamid, ist ein Monomer und bildet durch Zugabe freier Radikale über ein Zweikomponenten-Redoxsystem (Ammoniumpersulfat und

TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) in einer Kettenreaktion Polymere aus, die zu einer Gelmatrix quervernetzt werden.

3.7.2.1 Zellaufschluß

Die im Zellpellet befindlichen HDMEC (1 Mio) wurden in 100 µl SDS-Probenpuffer (ohne Bromphenolblau) vollständig resuspendiert und durch 10minütiges Erhitzen bei 95 °C und 2 min Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nachdem die Suspension (Rohextrakt) auf RT abgekühlt war, wurde der Proteingehalt nach der Methode von Lowry bestimmt und die Proben in der SDS-PAGE eingesetzt.

3.7.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Es wurden 10 µl des Rohextraktes mit A. bidest. ad 1 ml in einem Eppendorfgefäß vermischt und die Proben mit Hilfe des Protein-Assay-Kits für die Proteinbestimmung vorbereitet:

1. Zugabe von 0,1 ml DOC-Lösung (Natrium-deoxycholat, 1,5 mg/ml) zu den Proben und zum Leerwert (1 ml A. bidest.)
2. Mischen und 10 min Inkubation bei RT
3. Zugabe von 0,1 ml Trichloressigsäure (72% w/v), mischen
4. Zentrifugation (5 min, 10000 U/min), Überstand verwerfen
5. Pellet in 1 ml Lowrylösung lösen und in Falcon-Röhrchen überführen
6. Eppendorfgefäß mit 1 ml A. bidest. spülen und ebenfalls zum Falcon-Röhrchen geben, mischen
7. 20 min Inkubation bei RT
8. Zugabe von 0,5 ml Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz, mischen
9. 30 min Inkubation im Dunkeln bei RT
10. 200 µl in 96er well MTP überführen und Vermessen der Extinktion bei 690 nm am Mikrotiterplattenphotometer

Zuvor wurde eine Proteineichkurve im Konzentrationsbereich 0 – 300 µg/ml mit Rinderserumalbumin (BSA) aufgenommen.

3.7.2.3 Westernblot

Mit Hilfe der vertikalen Gelelektrophorese wurden die einzelnen Proteine in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Hierzu wurde dem aufgeschlossenen Zellextrakt entsprechend soviel Volumen entnommen, daß 20 µg Protein in der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt wurden. Pro Geltasche eines 10%igen SDS-Polyacrylamid-Geles wurden 30 µl aufgetragen, wobei mit SDS-Probenpuffer (mit Bromphenolblau) aufgefüllt wurde.

SDS-Gel

Trenngel (10%):	A. bidest.	5 ml
	Trenngelpuffer	2,5 ml
	Acrylamid (38%)	2,5 ml
	Temed	5 µl
	10% APS	75 µl
Sammelgel (5%):	A. bidest.	2,5 ml
	Sammelgelpuffer	1 ml
	Acrylamid (38%)	0,5 ml
	Temed	5 µl
	10% APS	36 µl

Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 60 –80 V.

Der Proteintransfer erfolgte im „Sandwich-Verfahren“, wobei eine Blot-Apparatur, bestehend aus zwei Plattenelektroden eingesetzt wurde. Das SDS-Gel wurde luftblasenfrei auf die Nitrocellulosemembran gelegt und diese zwischen sechs, in Westernblot-Puffer eingeweichte Whatmanpapierlagen zwischen den Plattenelektroden 1 h bei 70 – 100 mA geblottet. Im Anschluß daran wurde die Membran mit 2%

Ponceau-Lösung gefärbt, um den die Banden sichtbar zu machen. Nach mehreren Waschsritten mit 1× TBS wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht in einer Blocking-Reagenz (1× TBS + 5% Trockenmilchpulver + 0,05% Natriumazid) bei leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Blocking-Reagenz entfernt und die Membran mit dem primären Antikörper (polyklonal Rabbit-anti-human eNOS bzw. iNOS) 1:1000 (in 1× TBS + 5% Trockenmilchpulver + 0,05% Natriumazid) für 3 – 4 h bei RT und leichtem Schütteln inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 1× TBS wurde die Membran mit den Sekundärantikörper dekoriert (Mouse-anti-Rabbit-IgG; 1:1000 in 1× TBS, 1 h bei RT). Nachdem mehrmals mit 1× TBS gewaschen wurde, erfolgte die Detektion der spezifischen Proteinbanden mittels Chemilumineszenz über die Peroxidaseaktivität des Sekundärantikörpers unter Benutzung des „Western blotting analysis ECL-Systems“ und anschließender Exposition auf einen Röntgenfilm.

3.7.3 Analyse der mRNA-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR

3.7.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus HDMEC erfolgte nach einem Standard-Protokoll für Kulturzellen des „High Pure RNA Isolation Kit“:

In 200 µl PBS wurden 10⁶ Zellen resuspendiert, anschließend mit 400 µl Lysepuffer (4,5 M Guanidiniumchlorid, 50 mM Tris-HCl, 30% Triton® X-100 (w/v), pH 6,6) gut vermischt und die Probe folgendermaßen weiterverarbeitet:

1. Probe auf den „High Pure Filter“ eines Filtrationsgefäßes pipettieren
2. Zentrifugation (15 s bei 10000 U/min), Durchlauf verwerfen
3. Pro Probe 90 µl DNase-Inkubationspuffer (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl₂, pH 7) mit 10 µl DNase 1 mischen und auf das „High Pure Filter“ pipettieren
4. 15 min Inkubation bei RT
5. Zugabe von 500 µl Waschpuffer 1 (5 M Guanidiniumchlorid, 29 mM Tris-HCl, pH 6,6 in Ethanol)

6. Zentrifugation (15 s bei 10000 U/min), Durchlauf verwerfen, Filter-Tube ins gleiche Auffanggefäß setzen
7. Zugabe von Waschpuffer 2 (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 in Ethanol)
8. Zentrifugation (siehe Punkt 6)
9. Zugabe von 200 µl Waschpuffer 2 und Zentrifugation (3 min bei 13000 U/min)
10. Filter-Tube in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß setzen und RNA durch Zugabe von 50 – 100 µl Elutionspuffer und anschließender Zentrifugation (1 min bei 10000 U/min) eluieren.

Die RNA-Ausbeute wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit der isolierten RNA wurde anhand des Verhältnisses $OD_{260} : OD_{280}$ überprüft. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde die RNA-Probe bei -20 °C gelagert.

3.7.3.2 cDNA-Synthese

Die reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktionsanalyse erfolgte über die „two step“-Methode. Zuerst wurde die isolierte Gesamt-RNA unter Verwendung von „Ready-To Go™ You-Prime First-Strand Beads“ in „full-length“ einzelsträngige copy-DNA (cDNA) umgeschrieben und danach mit spezifischen Primern in der PCR amplifiziert. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde die „Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV)“-Reverse Transkriptase verwendet, die in den Beads zusammen mit Puffer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP und RNase/DNase freiem BSA enthalten war.

Entsprechend der berechneten Nukleinsäure-Konzentration anhand der OD_{260} -Werte wurde soviel Volumen der Probe entnommen, daß 4 µg in der cDNA-Synthese eingesetzt wurden. Mit DEPC-behandeltem A. bidest wurde auf 32 µl aufgefüllt und die RNA 10 min bei 65 °C denaturiert. Nach sofortiger Inkubation für 2 min auf Eis wurde die RNA in die Reaktionsgefäße mit den „First-Strand Beads“ pipettiert, 1 µl Random-Primer (pd(N)₆) zugegeben und nach kurzem Mischen 1 h bei 37 °C inkubiert. Bis zum Einsatz in den verschiedenen PCR-Reaktionen wurden die cDNA-Proben bei -20 °C gelagert.

3.7.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ziel der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985) ist die selektive Vervielfältigung von bestimmten DNA-Abschnitten. Mit Hilfe von zwei chemisch synthetisierten Oligonukleotiden (Primer), die zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind, wird der Bereich zwischen den Primern durch eine thermostabile DNA-Polymerase dupliziert. Durch aufeinanderfolgende Zyklen der Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Primer (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation) wird eine exponentielle Vervielfachung des gewünschten DNA-Fragments erreicht, da jeder neugebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren Stranges genutzt wird.

Der Reaktionsansatz für die durchgeführten PCR-Reaktionen erfolgte nach einem Standardprotokoll:

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration im 20 µl Reaktionsansatz</u>
MgCl ₂ -Puffer	2 µl	1,5 mM
dNTP	0,4 µl	0,2 mM
fwd Primer	0,5 µl	0,5 µM
rev-Primer	0,5 µl	0,5 µM
DEPC-H ₂ O	13,6 µl	-
Taq-Polymerase	0,5 µl	0,625 U/20 µl
cDNA (Template)	3 µl	< 0,2 µg/20 µl

Die Reagenzien wurden in einem 0,7 ml-Reaktionsgefäß vermischt, wobei die Zugabe der Taq-Polymerase und der cDNA zum Schluß erfolgte. Dem schloß sich die Amplifizierung der spezifischen DNA-Fragmente in einem Thermocycler nach folgendem Protokoll an:

Initial-Denaturierung	95 °C	3 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95 °C	45 s	
Annealing	55 °C (eNOS)	45 s	
	63 °C (GAPDH)		
	55 °C (iNOS)		
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	

Die in der PCR eingesetzten Primer (5'→3') basierten auf Veröffentlichungen von Sasa and Michel (1995) und Teng et al. (1998):

eNOS: (for) CCAGCTAGCCAAAGTCACCAT
(rev) GTCTCGGAGCCATACAGGATT

iNOS: (for) GAGGAAGTGGGCAGGAGAATG
(rev) GTAGTAGAAAGGGGACAGGAC

GAPDH: (for) GTGAAGGTCGGTGTGAACGGATTT
(rev) CACAGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT.

In Negativ-Kontrollreaktionen wurden anstelle der cDNA-Templates die entsprechenden RNA-Proben (ohne vorherige cDNA-Synthese) eingesetzt.

Als eines der „house keeping genes“ wurde die Expression der GAPDH-mRNA (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) in der PCR erfaßt und für die semiquantitative Auswertung herangezogen. Hierzu wurde die Intensität der einzelnen Banden densitometrisch vermessen und jeweils das Verhältnis eNOS/GAPDH bzw. iNOS/GAPDH bestimmt (Bobadilla et al., 1999).

Nach Beendigung jeder PCR wurden die amplifizierte DNA-Fragmente (eNOS 354 bp, iNOS 294 bp, GAPDH 555 bp) auf 4 °C gekühlt und über eine horizontale Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

3.7.3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückrates bei allen pH-Werten negativ geladen (Ibelgaufs, 1990). Diese Eigenschaft ist die Grundlage der verschiedenen Methoden zur Gelelektrophorese. Sowohl DNA- als auch RNA-Fragmente wandern in einem elektrischen Feld stets in Richtung Anode, und zwar um so langsamer, je größer sie sind. Visualisierbar werden im Gel aufgetrennte Nukleinsäuren durch eine Ethidiumbromidfärbung. Dieses Basenanalogen interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäure-Moleküle, die dann im UV-Licht (254 nm – 300 nm) durch ihre rot-orange Fluoreszenz sichtbar werden.

Die horizontale Agarosegel-Elektrophorese dient der Ergebnisauswertung verschiedener Modifikationen von RNA und DNA (PCR, Restriktion usw.).

Zur Herstellung der Gele (1,5%ig) wurde Agarose in 0,5× TBE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst, abgekühlt, 300 µg/l Ethidiumbromid zugegeben und in die Gelschlitzen gegossen. Nach vollständigem Erhitzen des Gels wurden die Proben (10 µl) mit 3 µl Ladepuffer gemischt und jeweils in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde an ein Stromversorgungsgerät angeschlossen und das Gel bei 80 V ca. 2 h laufen gelassen. Die einzelnen DNA-Fragmente wurden über die Fluoreszenz anhand der Ethidiumbromid-gefärbten Banden in einem UV-Imager identifiziert.

3.7.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die spezifischen PCR-Produkte wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mit Hilfe eines UV-Tisches aus dem Gel ausgeschnitten, wobei die Banden aufgrund der Ethidiumbromidfärbung sichtbar waren. Diese Agaroseblöckchen wurden durch ein dünnes Filterpapier (Whatman-Papier) in ein Eppendorfgefäß zentrifugiert (20 sec bei 13000 U/min). Anschließend wurde die aufgefangene DNA (50-100 µl) mit 1/10 Vol 7,5 M Natriumacetat und 3 Vol eiskaltem Ethanol (abs.) über Nacht bei -20 °C gefällt, dann abzentrifugiert und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen.

3.7.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens (Sanger et al., 1977). Diese Methode basiert auf die Ermittlung von DNA-Sequenzen durch kontrollierten Abbruch der DNA-Synthese. Nach einem Denaturierungsschritt der doppelsträngigen DNA schließt sich die Anlagerung eines sequenzspezifischen Primers an. Dann folgt eine Auffüllreaktion des Einzelstranges über die enzymatische Aktivität der DNA-Polymerase. Eine Limitierung der ddNTP's hat statistische, basenspezifische Kettenabbrüche zur Folge. Bei der nichtradioaktiven Sequenzierung sind diese mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kovalent markiert. Während der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente in einem denaturierenden Polyacrylamidgel erfolgt eine Anregung der vier Fluoreszenzfarbstoffe über Laserabtastung. Die emittierten Farbsignale werden über Filter in einen Photomultiplier geleitet und anschließend computergestützt in die entsprechende Nukleotidsequenz übersetzt.

Die aus dem Agarosegel eluierte und aufgereinigte DNA wurde in 11 µl A. bidest. aufgenommen und in der anschließenden Sequenzreaktion folgendermaßen eingesetzt:

8 µl „Dye Terminator Sequencing“-Stocklösung
1 µl Primer (eNOS, iNOS oder GAPDH)
11 µl DNA (ca. 2 µg).

In einem Thermocycler fand die Sequenzreaktion nach folgendem Programm statt:

1 min 96 °C (Vordenaturierung)	
30 sec 96 °C (Denaturierung)	} 27 Zyklen
15 sec 50 °C (Annaeling)	
4 min 60 C° (Elongation)	
4 min 60 °C (Elongation)	

Nach Reaktionsende wurde die DNA mit 7 µl 2 M Natriumacetat und 68 µl Ethanol (abs.) für 20 min auf Eis gefällt und anschließend für 15 min bei 13000 U/min und

10 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 150 µl 70 %igen Ethanol gewaschen, nach erneuter Zentrifugation luftgetrocknet und in 4 µl Formamid/EDTA-Puffer des Dynamic ET Terminator Cycle Sequence Kites aufgenommen. Die gelelektrophoretische Analyse der Sequenzierung erfolgte auf einem ABI-Sequencer 733 (Applied Biosystems) im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät der Universität in Halle.

3.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SigmaStat für Windows. Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug. Bei der Auswertung der Daten zur DNA-Syntheserate kam der parameterfreie Kruskal-Wallis Test (One Way Analysis of Variance on Ranks) zur Anwendung, der nicht normalverteilte Grundgesamtheiten miteinander vergleicht. Die Prüfung der signifikanten Unterschiede der übrigen zellbiologischen und molekularbiologischen erfolgte mit dem Mann-Whitney (Rank Sum) Test.