

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die Grundchemikalien wurden in analysenreiner Qualität (p.a.) von den folgenden Herstellern bezogen:

- Merck, Darmstadt,
- Riedel-de Haen AG, Seelze,
- Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg,
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen,
- Roth, Karlsruhe.

Zellkulturprodukte der Firma Clonetics wurden über CellSystems[®] Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen bezogen.

Zur Herstellung von Lösungen, Puffern, Medien und Reaktionsansätzen wurde deionisiertes Wasser (dH₂O) verwendet (Seralpur Delta UF, Seral, Ransbach-Baumbach).

Die Reagenzien für die RT und PCR wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

In RNA-Analysen wurde für Lösungen und Reaktionsansätze dH₂O eingesetzt, das durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) RNase-frei ist. Dazu wurde 1 l dH₂O mit 100 µl DEPC versetzt, über Nacht inkubiert und das verbleibende DEPC durch Autoklavieren inaktiviert.

2.1.1 Zellkulturprodukte

Produkt	Hersteller
Antibiotic-Antimycotic (AB/AM;100×) 10000 U Penicillin 10000 µg Streptomycin 25 µl/ml Amphotericin B in phys. NaCl	Invitrogen, Karlsruhe
Newborn calf serum hitzeinaktiviert	Biochrom KG, Berlin
Dulbeccos phosphate-buffered saline I (PBS I) ohne Zusatz von Natriumbikarbonat	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbeccos phosphate-buffered saline II (PBS II) ohne Zusatz von Natriumbikarbonat ohne Zusatz von Kalzium und Magnesium	Invitrogen, Karlsruhe
Endothel cell growth suppl. (ECGS)	cc pro, Neustadt
Microvascular Endothelial Cell Growth Medium 2 (EGM2 [®] -MV)	CellSystems, St. Katharinen
Fungizon 250 µg/ml Amphotericin B	Invitrogen, Karlsruhe
Gelatine	Serva, Heidelberg
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS-Lösung) ohne Kalzium und Magnesium ohne Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
Medium 199 (M199) Earle's Salze L-Glutamin 1,25 g/l Natriumbikarbonat Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
LURIA BROTH BASE (LB-Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
LURIA AGAR (LB-Agar)	Invitrogen, Karlsruhe
OPTIVA [®] 2 Venenverweilkanüle (18G)	Johnson-Johnson Medical, Brüssel
OBTURATOR Mandrin (18G)	Johnson-Johnson Medical, Brüssel

2.1.2 Zellkulturmedien

Collagenaselösung	0,05%ig Collagenase IV in PBS II
Endothelzellmedium 10 (10% Serum)	10% Newborn calf serum 15 mM HEPES 1:100 AB/AM 1:100 Fungizon in Medium 199 mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen
Endothelzellmedium 0,5 (0,5% Serum)	0,5% Newborn calf serum 15 mM HEPES 1:100 AB/AM 1:100 Fungizon in Medium 199 mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen
Endothelzellwachstumsfaktor	8,3% Newborn calf serum 1,67 mg/ml endothelial cell growth supplement (ECGS) 1250 U Heparin pro ml in Medium 199 steril filtrieren
Nabelschnurpuffer	1:100 AB/AM 1:100 Fungizon in PBS I
Gelatinelösung	1% Gelatine gelöst in deionisiertem, sterilem Wasser

2.1.3 Puffer und Lösungen

10 × TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	0,89 M Tris-Base 0,89 M Borsäure 25 mM Natrium-EDTA in deionisiertem Wasser (für RNA-Gel: DEPC-behandelt)
TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)	10mM Tris-HCl (pH 8) 1 mM Natrium-EDTA in deionisiertem Wasser (für RNA-Gel: DEPC-behandelt)
Probenpuffer für Agarose-Gele	50% Glycerin 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM Natrium-EDTA 0,25% Bromphenolblau in deionisiertem Wasser (für RNA-Gel: DEPC-behandelt)
Lyse-Puffer (Proteine)	50 mM Tris-HCl, (pH 7,0) 1% (w/v) SDS Protease Inhibitor Cocktail P8340 (Sigma)
Sammelgel-Puffer (SDS-PAGE)	1 M Tris-HCl (pH 6,8)
Trenngel-Puffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
4 × Lauf-Puffer (SDS-PAGE)	50 mM Tris-Base 380 mM Glycin 0,1% SDS
Transfer-Puffer (Western-Blot)	25 mM Tris-HCl (pH 8,2) 192 mM Glycin 20% Methanol 0,0375% SDS
TBS-T-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 155 mM NaCl 0,1% Tween 20
Blockierungslösung (Western-Blot)	TBS-T-Puffer 3% Milchpulver
Ponceau-Lösung	0,5 % Ponceau 1% Essigsäure in Wasser
CsCl – Lösung	5,7 M CsCl 100 mM Natrium-EDTA 6 mM β -Mercaptoethanol (ME) in DEPC-behandeltem Wasser ansetzen, sterilfiltrieren und ME erst vor Gebrauch zusetzen

GTC - Lösung	4 M GTC 1% <i>N</i> -Lauroylsarcosyl 25 mM Natriumacetat (pH 6,0) 1 mM Natrium-EDTA 1 M β -Mercaptoethanol (ME) steril ansetzen und ME erst vor dem Gebrauch zusetzen
TSPE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,0) 1 % <i>N</i> -Lauroylsarcosyl 5 % Phenol 1 mM Natrium-EDTA in DEPC-behandeltem Wasser ansetzen und sterilfiltrieren
PFA-Lösung	5% PFA in PBS I lösen
Sucrose-Puffer (EMSA)	0,32 M Sucrose 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 3 mM CaCl ₂ 2 mM MgOAc 0,1 mM EDTA 0,5% NP-40 1 mM DTT (vor Gebrauch zugeben) Protease Inhibitor Cocktail P8340 (Sigma) Phosphatase Inhibitor Cocktail II P5726 (Sigma)
Niedrig-Salz-Puffer (EMSA)	20 mM HEPES (pH 7,9) 1,5 mM CaCl ₂ 20 mM KCl 0,2 mM EDTA 25% Glycerin (v/v) 0,5 mM DTT (vor Gebrauch zugeben) Protease Inhibitor Cocktail P8340 (Sigma) Phosphatase Inhibitor Cocktail II P5726 (Sigma)
Hoch-Salz-Puffer (EMSA)	20 mM HEPES (pH 7,9) 1,5 mM CaCl ₂ 800 mM KCl 0,2 mM EDTA 25% Glycerin (v/v) 1% NP-40 0,5 mM DTT (vor Gebrauch zugeben) Protease Inhibitor Cocktail P8340 (Sigma) Phosphatase Inhibitor Cocktail II P5726 (Sigma)
5 × Bindungspuffer (EMSA)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 750 mM KCl 2,5 mM EDTA 0,5% Triton-X 100 62,5% Glycerin (v/v) 1 mM DTT (vor Gebrauch zugeben)

20 × PBS (pH 7,4) (ISH)	2,74 M NaCl 0,05 M KCl 0,2 M Na ₂ HPO ₄ 0,04 M KH ₂ PO ₄
20 × SSC (ISH)	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat pH 7,0 mit NaOH einstellen
Tris-Glycin-Puffer (ISH)	0,5 M Tris-Base 0,5 M Glycin
Hybridisierungspuffer (ISH)	40% Formamid 25% 20 × SSC 35% DEPC-H ₂ O
Hybridisierungslösung (ISH)	40% Formamid 25% 20 × SSC 1% 100 × Denhardt's 1% tRNA (10µg/µl) 1% Heringssperma (100µg/µl) 1% markierte RNA-Sonde in DEPC-H ₂ O 4 min bei 95°C denaturieren, auf Eis abkühlen
Posthybridisierungspuffer (ISH)	20% Formamid 2,5% 20 × SSC in DEPC-H ₂ O
100 × Denhardt's (ISH)	20 g Ficoll (Type 400, Pharmacia) 20 g Polyvenylpyrolidone 20 g BSA (Fraktion V, Sigma) in 1 l DEPC-H ₂ O lösen und steril filtrieren
NTMT-AP-Puffer (ISH)	100 mM Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 0,1% Tween 20
Färbelösung (ISH)	4,5 µl Nitroblautetrazonium 3,5 µl 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat 1 ml NTMT-AP-Puffer
10 × TBS (ISH)	250 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1,37 M NaCl 0,03 M KCl

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung humaner Endothelzellen

Die Isolierung von Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) erfolgte durch Modifikation der Methode von Jaffe (Jaffe *et al.*, 1973).

Die Nabelschnur wurde direkt nach der Entbindung in Nabelschnurpuffer überführt und bei 4°C gelagert. Die Isolierung der Endothelzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur. Alle Medien und Lösungen wurden auf 37°C temperiert. Die Zellkulturgefäße wurden mit Gelatinelösung beschichtet (1 h bei 37°C im CO₂-Inkubator). Anschließend wurde in die Vene der Nabelschnur von beiden Seiten eine Knopfkanüle mit Schlauchansatz eingeführt und befestigt. Die Vene wurde mit Hank's balanced salt solution (HBSS)-Lösung gespült und anschließend vollständig mit Collagenase-Lösung gefüllt. Beide Gefäßenden wurden verschlossen und die Nabelschnur in einem Becherglas mit vorgewärmtem PBS I für 11 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden durch Ausspülen mit Endothelzellmedium 10 aus den Gefäßen in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt und sofort bei 250g für 6 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Endothelzellmedium 10 resuspendiert und in ein mit Gelatine vorbehandeltes Zellkulturgefäß überführt. Wurden Endothelzellen aus mehreren Nabelschnüren isoliert, so wurden alle resuspendierten Endothelzellen vereinigt, gemischt und dann auf eine entsprechende Anzahl Zellkulturgefäße verteilt. Die Endothelzellen wurden bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten CO₂-Atmosphäre (5% CO₂) kultiviert. Nach 1,5 h wurde das Medium entfernt und durch Endothelzellmedium 10 mit Endothelzellwachstumsfaktor (1:100) ersetzt und weiter im Inkubator kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 48 Stunden gewechselt.

Die Isolierung und Kultivierung der arteriellen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUAEC) erfolgte wie oben beschrieben. Abweichend wurde statt Knopfkanüle mit Schlauchansatz eine Venenverweilkänüle (18G) mit Mandrin (18G) in die Arterien eingeführt. Nach der Präparation wurden die Zellen in EGM2[®]-MV-Medium (Clonetics) kultiviert.

Humane Endothelzellen aus der Koronararterie (HCAEC) wurde von Clonetics erworben und entsprechend der Anleitung des Herstellers bei 37°C im CO₂-Inkubator (5% CO₂) in EGM2[®]-MV-Medium kultiviert. Die Vermehrung erfolgte durch Passagieren, wobei die Zellen durch Trypsinierung von den Zellkulturschalen gelöst wurden und dann im Verhältnis 1 : 7 auf neue Zellkulturschalen ausgesät wurden. Die Versuche erfolgten mit Zellen der jeweils angegebenen Passage.

2.2.2 Applikation von Schubspannung auf Endothelzellen

Die Applikation von laminarer Schubspannung auf konfluente Endothelzellkulturen erfolgte mit Hilfe eines nach (Sdougos *et al.*, 1984) modifizierten Plattenkegel-Viskometers. Sie besteht aus einer Petrischalenhalterung, einem drehbaren Plattenkegel aus Polycarbonat mit Justiereinrichtung, einer Motor-Getriebe-Kombination und einer Steuereinrichtung zur stufenlosen Einstellung der Geschwindigkeit des Plattenkegels. Die Plattenkegel-Viskosimeter-Apparatur ist schematisch in Abb. 2.1 dargestellt.

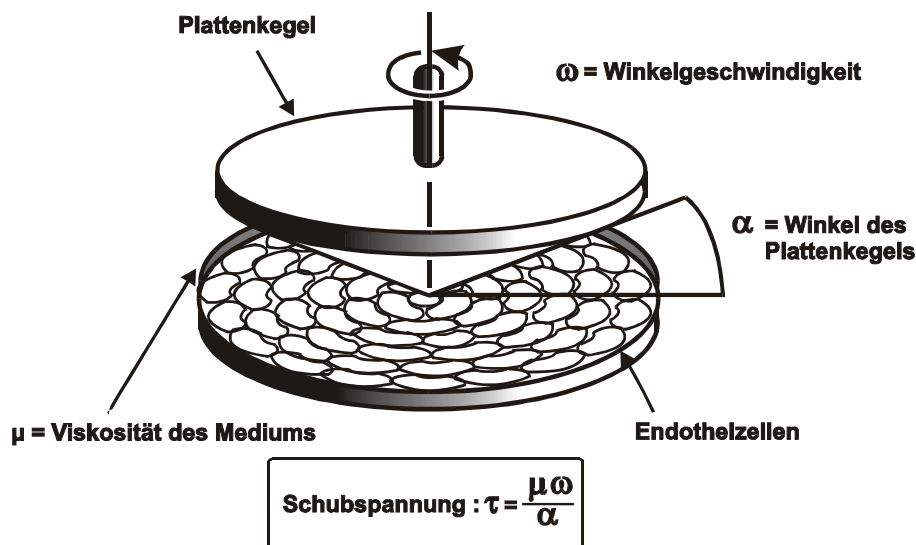


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Plattenkegel-Viskosimeter-Apparatur. Die Applikation von laminarer Schubspannung auf kultivierte Endothelzellen erfolgt durch einen rotierenden Plattenkegel mit einem Winkel α von $0,5^\circ$. Die Schubspannung ist außerdem von der Viskosität des Mediums und der Winkelgeschwindigkeit abhängig.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Endothelzellen mit frischem Endothelzellmedium ohne (bei Schubspannung von 1 bis 10 dyn/cm^2 , d.h. $0,1$ bis 1 N/m^2) bzw. mit 5% Dextran (bei Schubspannung von 15 bis 50 dyn/cm^2 , d.h. $1,5$ bis 5 N/m^2) für 1 h stationär kultiviert, in die Plattenkegel-Apparatur eingesetzt, der Kegel über die Zellen abgesenkt und die spezifische Schubspannung am Potentiometer der Steuerung durch Einstellung der entsprechenden Winkelgeschwindigkeit ausgewählt. Die Schubspannung ist neben der Winkelgeschwindigkeit und dem Winkel α von $0,5^\circ$ des Plattenkegels von der Viskosität des Mediums abhängig. Die Zugabe von Dextran (Sigma, MG 71,4) erhöht die Viskosität des Endothelzellmediums 2,95-fach von $0,007 \text{ dyn} \cdot \text{s/cm}^2$ auf $0,02065 \text{ dyn} \cdot \text{s/cm}^2$ und vermeidet einen Medienverlust durch zu hohe Fliehkräfte. Bei jeder Probe wurde eine zeitgleiche interne stationäre Kontrolle mit gleichem Medium (mit bzw. ohne Dextran) analysiert.

2.2.3 RNA-Präparation

2.2.3.1 RNA-Präparation von Gewebeproben mittels CsCl-Methode

Die RNA-Präparation von Gewebeproben wurde mittels der CsCl-Methode nach Chirgwin durchgeführt (Chirgwin *et al.*, 1979).

Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, mechanisch zerkleinert und dann in GTC-Lösung suspendiert. Sie wurden dann mit einem Ultraturrax-Gerät homogenisiert.

Für die Präparation wurde 1 ml CsCl-Lösung in ein BECKMAN-Röhrchen gegeben und mit dem Homogenisat überschichtet. Die Röhrchen wurden mit GTC-Lösung austariert und bei 100.000g in einer BECKMAN-Ultrazentrifuge für 21 h bei 22°C zentrifugiert. Dabei sedimentiert die RNA durch das CsCl-Kissen, während Proteine und DNA im Gradienten verbleiben. Der Überstand wurde vorsichtig bis zum CsCl-Kissen abgenommen. Die CsCl-Lösung wurde dekantiert und das RNA-Pellet auf Eis in 400 µl TSPE-Puffer gelöst. Die RNA wurde durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 6,0) und 10 ml 96%igem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 10.000g für 30 min bei -10°C sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 300 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde erneut über Nacht mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. 96%igem Ethanol bei -20°C gefällt und dann für 30 min bei 10.000g und -10°C sedimentiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und danach in einem Geschwindigkeitsvakuumkonzentrierer (speed vac) für 5 min getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und ihre Konzentration spektrophotometrisch bestimmt.

Zur Kontrolle der RNA wurde 1 µl Gesamt-RNA in einem 0,8%igem Agarose-Gel aufgetrennt.

2.2.3.2 RNA-Präparation von Zellkulturen mittels TriReagent™ (Sigma)

Die Präparation der RNA aus Zellkulturen erfolgte mittels TriReagent™ nach Anleitung des Herstellers. Dazu wurden die Zellkulturschalen je zweimal mit PBS I gewaschen und anschließend mit 600µl TriReagent™ die RNA isoliert. Die erhaltene RNA wurde in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und ihre Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Zur Kontrolle der RNA wurde 1 µl Gesamt-RNA in einem 0,8%igem Agarose-Gel aufgetrennt.

2.2.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration durch Absorption

Um Qualität und Quantität von DNA- und RNA-Proben zu bestimmen, wurde nach Verdünnung (1:50) die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Zusätzlich kann eine Hintergrundkompensation bei 320 nm erfolgen. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} ist der Reinheitskoeffizient und gibt über die Verunreinigungen mit Proteinen Aufschluss. Er sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1997).

Die Nukleinsäurekonzentration wurde mit Hilfe folgender Koeffizienten bestimmt:

1 A_{260} -Einheit = 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA

1 A_{260} -Einheit = 37 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngige DNA

1 A_{260} -Einheit = 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA

2.2.5 Reverse Transkription

Zur anschließenden Amplifikation von Zielgenen wurde RNA durch reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Die RT erfolgte mit random hexamer-Primern und SuperScript II RNase H⁻ reverse transcriptase.

RT-Ansatz (25 μl):

- 5 μl RNA (100 ng/ μl)
- 4 μl random hexamer Primer (30 ng/ μl)
- 6 μl DEPC-H₂O

Inkubation des Ansatzes für 3 min bei 72°C, Abkühlung auf 4°C, anschließend Zugabe von:

Reaktions-Mix (10 μl):

- 5 μl 5 × first strand buffer
- 1 μl dNTP (je 12,5 mM)
- 0,25 μl Dithiothreitol (DTT, 100 mM)
- 0,5 μl RNase OUT™ Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μl)
- 0,25 μl SuperScript™ II reverse transcriptase (2 U/ μl)
- 3 μl DEPC-H₂O

Inkubation für 1 h bei 42°C, 3 min bei 95°C, Abkühlung auf 4°C.

2.2.6 Polymerasekettenreaktion

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation revers transkribierter cDNA genutzt (Mullis *et al.*, 1987).

PCR-Ansatz (25 μ l):

- 2,5 μ l 10 \times Taq-Reaktionspuffer
- 5 μ l dNTP (je 0,1 mM)
- 1 μ l sense-Primer (10 pmol/ μ l)
- 1 μ l antisense-Primer (10 pmol/ μ l)
- 0,3 μ l Taq-DNA-Polymerase (4 U/ μ l)
- 2 μ l RT-Ansatz mit cDNA
- 13,2 μ l steriles deionisiertes Wasser

Dieser Ansatz wurde mit ca. 50 μ l Mineralöl (3 Tropfen) überschichtet und die cDNA nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 1 min mit einem spezifischen PCR-Programm durch zyklisches Denaturieren (95°C, 30 sec), Annealing (30 sec bei primerspezifischer Annealing-Temperatur) und DNA-Synthese (72°C, 30 sec) im Trio-Thermoblock (Biometra) amplifiziert. Der Ansatz wurde anschließend für 3 min bei 72°C inkubiert und auf 4°C abgekühlt. Die verwendeten genspezifischen Primersequenzen und PCR-Protokolle sind in Tab. 2.1 zusammengefasst.

2.2.7 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA bzw. die Kontrolle der RNA-Integrität erfolgte in 0,8% - 1,4%igen Agarose-Gelen mit Ethidiumbromid (100 ng/ml) in 1 \times TBE-Puffer bei 8-10 V/cm Laufstrecke in Standard-Elektrophorese-Apparaturen (Sambrook *et al.*, 1989). Die Nukleinsäuren wurden dabei mit 0,1 Volumen Probenpuffer versetzt. Die Länge linearer DNA-Fragmente wurde mit Hilfe parallel aufgetrennter DNA-Längenstandards (100 bp bzw. 1 Kilobasenpaar-Leiter, Invitrogen) bestimmt. Die DNA bzw. RNA wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators nachgewiesen und mit Polaroidfilm Typ 665 fotografiert.

Tab. 2.1: Genspezifische Primersequenzen und PCR-Protokolle.

Gen	Primer	5'-3'-Primersequenzen	Annealing-Temperatur	PCR-Zyklen
18S rRNA	sense	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG	60°C	11
	antisense	AGGGCAGGGACTTAATCAACGC		
GAPDH	sense	CATCACCATCTTCCAGGAGCG	60°C	18
	antisense	TGACCTTGCCCACAGCCTTG		
Ephrin-B2	sense	GGGAGGCACTCGCTGTTATC	65°C	24
	antisense	GGGAGGGGGATCTGACCTAC		
EphB4	sense	TGTCACCACTGACCGAGAGG	66°C	27
	antisense	ACTGCGACCACAATGACCAC		
Angiopoietin-2	sense	TGGCAGCGTTGATTTTCAGAG	64°C	26
	antisense	CGTTGTCTCCATCCTTTGTGC		
Tie2	sense	TGTCTCTGCTCTCCAGGATGG	64°C	25
	antisense	TGTTCACACTGCAGACCCAAA		
ACE	sense	GCAGCCACTCTACCTCAACC	65°C	35
	antisense	CAGGTCCTCCAAGTTCACG		
ppET-1	sense	TGCTCCTGCTCGTCCCTGATGGATAAAGAG	60°C	32
	antisense	GGTCACATAACGCTCTCTGGAGGGCTT		
ECE-1	sense	ACTTCCACAGCCCCGGAGT	68°C	30
ECE-1a	sense	AGACAGGAGGCAGCCCTGAT	68°C	33
ECE-1b	sense	ACAGCATGCGGGGCGTGT	68°C	35
ECE-1c	sense	CGGAGCACGCGAGCTATG	68°C	30
ECE-1d	sense	GGCGCGAGAGCCATGGAG	68°C	32
ECE-1	antisense	GGTTGGCCTTGATCCAGC	68°C	
ET _A	sense	CACTGGTTGGATGTGTAATC	58°C	27
	antisense	AGAGGGAACCAGCAAAGAGC		
ET _B	sense	CGAGCTGTTGCTTCTTGGAGTAG	69°C	27
	antisense	ACGGAAGTTGTCATATCCGTGAT		
eNOS	sense	GGAACCTGTGTGACCCTC	65°C	40
	antisense	CCACGTCATACTCATCCA		
eNOS (rat)	sense	CTGCGCTGGTATGCCCTCC	60°C	32
	antisense	AAGAGCCTCCCCAGCTGCTG		
iNOS (rat)	sense	TACATGGGCACCGAGATTGG	64°C	34
	antisense	TGAAGGCGTAGCTGAACAAGG		
ppET-1 (rat)	sense	TCTTCTCTCTGCTGTTTGTG	64	34
	antisense	TTAGTTTTCTTCCCTCCACC		

2.2.8 Elution von Nukleinsäuren

DNA- oder RNA-Fragmente spezifischer Größe können nach Elektrophorese auf dem UV-Transilluminator aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten und die Nukleinsäuren durch Elution isoliert werden. Die DNA-Fragmente im Gelstück wurden durch Elektroelution aus dem Gelstück in einen Dialyseschlauch (Spectra/Por[®] 6, MWCO 1.000, Roth) in einer Elektrophorese-Apparatur mit anschließender Ethanolpräzipitation isoliert.

2.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung von eluierten PCR-Fragmenten in Plasmidvektoren erfolgte mit dem TOPO[™] TA Cloning[®] Kit (pCR[®]II-TOPO[®], Invitrogen). Die in den Klonierungsvektor ligierten PCR-Fragmente wurden in kompetente Bakterien (TOP10F' One Shot[®] *E.coli*) transformiert. Die rekombinanten Bakterien wurden durch 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)-Selektion auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin, 50 μ l X-Gal-Stammlösung (50 mg/ml) und 25 μ l Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)-Stammlösung (100 mM) identifiziert.

2.2.10 Plasmid-DNA-Präparation

Rekombinante Bakterien wurden in LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C, kultiviert. Nach dem Erreichen der stationären Phase wurden die Bakterien sedimentiert (10 min, 5000g). Die Plasmid-DNA-Isolation (50-100 ml Kultur) erfolgte durch Modifikation der Methode der basischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989) mit anschließender Reinigung durch QIAGEN-Säulen (QIAGEN-Midi-Prep-Kit, QIAGEN).

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Eluierte DNA-Fragmente und linearisierte Plasmide wurden überlappend auf beiden Strängen durch Modifikation der Methode von (Sanger *et al.*, 1977) mit dem Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) sequenziert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben und die Auswertung der Sequenzierung erfolgte im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit einem ABI Prism 373 DNA Sequencer (Perkin Elmer). Die DNA-Sequenzen wurden mit dem DNA-Programm GeneRunner (Hastings Software) analysiert und mit DNA-Sequenz-Datenbanken (Altschul *et al.*, 1997) verglichen.

2.2.12 Transkriptionsfaktoranalyse mittels EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

2.2.12.1 Präparation der Kernextrakte

Für die Analyse der Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren wurden Kernextrakte hergestellt. Dazu wurden die Zellen spezifisch behandelte Proben zweifach mit PBS I (37°C) gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml PBS I (4°C) von den Kulturschalen abgeschabt und durch Zentrifugation (10 min, 500g bei 4°C) sedimentiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 100 µl Sucrose-Puffer aufgenommen und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Durch den Puffer wird die Integrität der Zellmembranen aufgelöst und das Zytosol freigesetzt, ohne die Zellkerne zu zerstören. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (15 min, 500g bei 4°C) gesammelt. Der Überstand enthält die zytosolische Proteinfraction und wurde für weitere Analysen bei -80°C gelagert. Das Zellkernpellet wurde einmal mit 500 µl Sucrose-Puffer ohne NP-40 gewaschen. Das gewaschene Zellkernpellet wurde mit 30 µl hypotonem Niedrig-Salz-Puffer versetzt und die Kerne vorsichtig resuspendiert. Der Suspension wurde in 5 µl Aliquots 30 µl Hoch-Salz-Puffer zugegeben und anschließend 30 min auf Eis unter Schütteln inkubiert. Dadurch wird das Kernplasma extrahiert, während die Kernhülle intakt bleibt und die genomischen DNA zurückhält. Die verbleibende Kernhülle wurde von den Kernextrakten durch Zentrifugation (30 min, 10.000g bei 4°C) separiert. Die erhaltenen Kernextrakte wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.12.2 Herstellung von radioaktiv markierten Oligonukleotid Proben

Für die Herstellung doppelsträngiger endmarkierter Oligonukleotid-Proben wurden einzelsträngige Oligonukleotide mit den entsprechenden Bindungsstellen in sense- und antisense-Orientierung synthetisiert (MWG-Biotech). Diese Oligonukleotide wurden durch den T4-Kinase-Kit (Amersham) endständig mit γ -ATP markiert.

Markierungsreaktionsansatz:

- 5 μ l 10 \times Kinase-Puffer
- 3 μ l T4 Kinase (1:10 in Dilutionpuffer verdünnt)
- 1 μ l Oligonukleotid (100 ng/ μ l)
- 1,5 μ l γ -³²P-ATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol)
- 42,5 μ l Wasser

Der Reaktionsansatz wurde für 45 min bei 37°C inkubiert und abschließend die Kinase durch eine 5-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide wurden mittels G25-Säulen (Amersham) nach Anleitung des Herstellers abgetrennt. Die markierten Oligonukleotide wurden im Szintillationszähler gemessen und die Konzentration auf 25.000 cpm/ μ l eingestellt. Identische Volumina der jeweiligen sense- und antisense-Oligonukleotide wurden gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine doppelsträngige Probe herzustellen. Analog wurden unmarkierte Kontroll-Oligonukleotide sowie Oligonukleotide, die in der Basenabfolge der Bindungsstelle mutiert waren, behandelt. Die Oligonukleotid-Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.12.3 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Für die electrophoretic mobility shift assays wurden folgende Bindungsreaktionen angesetzt:

Bindungsreaktion:	3 μ l 5 \times Bindungspuffer
	1,5 μ l poly dIdC (1 μ g/ μ l) Sigma
	1,5 μ l markierte Probe (25.000 cpm/ μ l)
	8 μ l Kernextrakt
	1 μ l Wasser

In Kontrollreaktionen wurden die Kernextrakten 30 min vor Zugabe zur Bindungsreaktion mit nichtmarkierten Proben bzw. nichtmarkierten mutierten Proben inkubiert. Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen sind in Tab. 2.2 zusammengefasst.

Die Bindungsreaktion wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend elektrophoretisch (2 h bei 1000 V) im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für die shift assays wurden 5%ige nichtdenaturierende Polyacrylamidgele in 0,5% TBE-Puffer hergestellt. Als Laufpuffer wurde 0,5% TBE verwendet. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Gele eine Stunde mit 300 Volt equilibriert.

Tab. 2.2: Oligonukleotidsequenzen für electrophoretic mobility shift assay

Transkriptionsfaktor	Oligo	5'-3'-Oligonukleotidsequenzen
AP-1	sense	CGCTTGATGACTCAGCCGGAA
	antisense	TTCCGGCTGAGTCATCAAGCG
AP-1 (mutiert)	sense	CGCTTGATGACTTGGCCGGAA
	antisense	TTCCGGCCAAGTCATCAAGCG
SP-1	sense	ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC
	antisense	GCTCGCCCCGCCCGATCGAAT
SP-1 (mutiert)	sense	ATTCGATCGGTTTCGGGGCGAGC
	antisense	GCTCGCCCCGAACCGATCGAAT
NF κ B	sense	AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC
	antisense	GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT
NF κ B (mutiert)	sense	AGTTGAGGCGACTTTCCCAGGC
	antisense	GCCTGGGAAAGTCGCCTCAACT
CREB	sense	AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG
	antisense	CTAGCTCTCTGACGTCAGGCAATCTCT
CREB (mutiert)	sense	AGAGATTGCCTGTGGTCAGAGAGCTAG
	antisense	CTAGCTCTCTGACCACAGGCAATCTCT

2.2.13 *in situ*-Hybridisierung (ISH)

Bei der *in situ*-Hybridisierung müssen alle benutzten Geräte und Lösungen RNase frei sein. Die eingesetzten Sonden wurden mit dem Digoxigenin Labeling-Kit von Roche markiert und freundlicherweise von Gudrun Dandekar vom Institut für Tumorbilogie in Freiburg zur Verfügung gestellt. Die eingesetzten Gewebe wurden in 4% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden auf SuperFrost®Plus (Menzel-Gläser) Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 42°C inkubiert.

Um die Gewebe für die Hybridisierung zugänglich zu machen, wurden die Schnitte entparaffiniert (absteigende Alkoholreihe). Dazu wurden sie zweimal für 10 min mit Xylol, zweimal für 5 min in Ethanol (100%) und dann je 1 min in Ethanol absteigender Konzentration (95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%) behandelt. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in PBS gewaschen, für 30 min in 4% Paraformaldehyd in PBS nachfixiert und erneut zweimal für je 5 min in PBS gewaschen.

Um die Schnitte für die RNA-Sonde besser zugänglich zu machen, wurden sie partiell mit Proteinase K (25 µg/ml in PBS) für 3 min verdaut. Der Verdau wurde durch zweimaliges Waschen für 5 min mit PBS gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte nochmals für 15 min mit 4% Paraformaldehyd nachfixiert und abschließend zweimal in PBS für 5 min gewaschen. Vor der auf die Hybridisierung wurden die Schnitte zweimal für 5 min in 2 × SSC sowie für 30 min in Tris-Glycin-Puffer inkubiert.

Die Schnitte wurden dann mit je 60 µl Hybridisierungslösung bedeckt und in einer mit Hybridisierungspuffer befeuchteten Kammer über Nacht bei 65°C inkubiert.

Zur Entfernung nichthybridisierter einzelsträngiger RNA wurden die Schnitte nach der Hybridisierung mit RNase A behandelt. Dazu wurden die Schnitte dreimal für 15 min mit 5 × SSC gewaschen, für 40 min bei 60°C in Posthybridisierungspuffer inkubiert und für 15 min in 2 × SSC gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min bei 37°C mit RNase A (12,5 mg/l in 2 × SSC) behandelt. Abschließend wurden sie einmal für 15 min mit 2 × SSC gewaschen, für 20 min bei 60°C in Posthybridisierungspuffer inkubiert und zweimal für 15 min mit 2 × SSC gewaschen.

Die hybridisierten, digoxigeninmarkierten Sonden wurden dann mit dem Digoxigenin Nucleic Acid Detection-Kit (Roche) nachgewiesen. Dazu wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer mit 2 × SSC befeuchteten Kammer mit einem α-DIG-AP-Fab Antikörper (1 : 4000 in 1%iger Blockierungslösung aus dem Kit) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte intensiv (mindestens 4 h mit häufigem Wechsel des Puffers) mit TBS gewaschen und danach

dreimal für je 10 min mit NTMT AP-Puffer inkubiert. Der Nachweis der Sonden erfolgte durch Inkubation der Schnitte im Dunkeln mit der Färbelösung, wobei die an den Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase (AP) den löslichen Farbstoff in ein unlösliches Farbstoffpräzipitat umwandelt.

Die Färbereaktion wurde durch dreimaliges Waschen der Schnitte mit EDTA (1 mM in PBS) beendet. Abschließend wurden die Schnitte dehydriert (aufsteigende Alkoholreihe, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% Ethanol, Rotihistol) und mit Entellan (Merck) eingebettet.

Als Sonden wurden *in vitro* RNA-Transkripte von der humanen Ephrin-B2-mRNA (kodierende Sequenz Basenpaar 7 – 1028 in pcDNA3 kloniert) hergestellt. Für die antisense-Sonde wurde das Plasmid mit BamHI geschnitten und mit SP6-RNA-Polymerase transkribiert. Für die sense-Sonde (negative Kontrolle) wurde das Plasmid mit Not I verdaut und mit T7-RNA-Polymerase transkribiert.

2.2.14 Proteinpräparation

Die Zellen wurden zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und mit 100 µl/60 mm Kulturschale Lyse-Puffer lysiert. Die Proben wurden für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend die DNA durch Sedimentation (6000g für 10 min bei 4°C) abgetrennt. Die Konzentration der Proteine im Überstand wurde mit dem BCATM Protein Assay (Pierce, Rockfort, USA) bestimmt.

2.2.15 Western-Analyse

Die Proteine wurden auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen mit einem Protein-Molekulargewichtsmarker (BENCHMARKTM; Invitrogen) in einer Mini-Protean II cell-Apparatur (BioRad) elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert. Dazu wurde das Mini Trans-Blot Transfer Cell-System (BioRad) verwendet. Der Transfer erfolgte bei 4°C mit 200 mA für 45 min. Die Nitrocellulose-Membran wurde in TBS-T-Lösung mit 3% Blotto (Santa Cruz Biotechnology) für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifisch in Blockierungslösung verdünnten kommerziellen primären Antikörpern über Nacht bei 4°C. Die Detektion der gebundenen spezifischen Antikörper erfolgte mit einem sekundären horseradish peroxidase-linked rabbit immunoglobulin (Santa Cruz Biotechnology) durch Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation mit primärem sowie sekundärem Antikörper wurde die Membran jeweils 5-mal in TBS-T-Lösung für 5 min gewaschen. Die Aktivität der Peroxidase wurde mit dem ECL (enhanced chemiluminescence) Western blotting detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech) nachgewiesen.

2.2.16 Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student's t-test bzw. der ANOVA-Methode mit Bonferroni t-test bei multiplen Vergleichen (SigmaStat statistical software, SPSS Science). Ein Wert von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.