

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Die verschiedenen Zelllinien wurden bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxid (CO₂) und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

3.1.1 Kultivierung der Endothelzellen

Als Modell für Untersuchungen am Endothel wurde die humane Endothelzelllinie ECV304 (ECACC 92091712) in den Passagen 3-14 verwendet (Suda et al. 2001). Die Zellen wurden in Medium 199 unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in einem Inkubator kultiviert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

Als zweite Endothelzelllinie wurden immortalisierte Zellen aus humanen Nabelschnurvenen (EA.hy 926) in den Experimenten verwendet. Die Kultivierung erfolgte in DMEM + Glucose unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage.

3.1.2 Kultivierung der Makrophagen

Als Modell für Untersuchungen an Blutzellen wurde die murine Makrophagenzelllinie J774 verwendet. Die Kultivierung erfolgte in DMEM + Glucose unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage.

3.1.3 Kultivierung der Nierenepithelzellen

Zur Bestimmung der cyclischen Nukleotide wurde zusätzlich die Nierenepithelzelllinie LLC-PK-1 vom Schwein (*porcine kidney epithelial cells*, ATCC CL 101) verwendet. Die Zellen wurden in Ham's F12 Zellkulturmedium mit 20% DMEM, 15% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle 3 Tage gewechselt.

3.1.4 Kultivierung der stabil transfizierten NIH3T3-Zellen

Für die Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität mit Hilfe des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens (BLI) wurden NIH3T3-Zellen verwendet, welche stabil mit einem murinen 15kB HO-1-Reportergenkonstrukt transfiziert sind (Hajdena-Dawson et al. 2003). Die embryonalen Fibroblasten der Maus wurden in DMEM unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

3.2 Western-Blot-Analyse

Beim Western-Blot-Verfahren werden die zu untersuchenden Proteine mit immunochemischen Methoden detektiert (Towbin et al. 1979). Dazu werden die Zellen nach der Inkubation lysiert und das Gesamtprotein mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli 1970). Anschließend transferiert man die Proteine mit Blotting-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran. Die Detektion der Proteine erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper.

3.2.1 Inkubationsprotokoll zur Western-Blot-Analyse

Endothelzellen wurden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach einer 24stündigen Inkubation mit Medium ohne Serum erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Substanzen über die jeweils angegebenen Zeiträume. Danach wurden die Zellen mit Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) bzw. durch Abschaben geerntet und in Lysispuffer resuspendiert.

3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) mit Hilfe eines Kits der Firma Roth (Karlsruhe) vorgenommen. Hierbei bilden Proteine Komplexe mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau, die über ihr Absorptionsmaximum bei 595 nm photometrisch quantifiziert werden können. Der Proteingehalt wird anschließend über eine Kalibriergerade berechnet, die parallel zu den Proben mit Rinderserumalbumin (12,5-200 µg/ml) erstellt wurde.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese trennt Proteine der Größe nach auf. Dabei binden die Proteine im Überschuss zugesetztes Natriumlaurylsulfat (SDS) und erhalten dadurch eine negative Ladung. Da diese zu ihrem Molekulargewicht proportional ist, werden die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix der Molmasse nach aufgetrennt (Sambrook 1989).

Bei der verwendeten Methode nach Laemmli (Laemmli 1970) werden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 5% Polyacrylamid konzentriert und anschließend im 15%-igen Trenngel aufgetrennt. Es wurden dabei vertikale Minigel-Elektrophoresekammern von Biometra (Göttingen) verwendet.

Die Proben (100 µg Protein für HO-1, 20 µg Protein für Ferritin) wurden mit 5fach konzentriertem Ladepuffer und 2,5 M Dithiothreitol (DTT) versetzt und über 10 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 V über 4-5 Stunden in den mit Laufpuffer gefüllten Gelkammern. Als Molekulargewichtsmarker diente ein gefärbtes Proteingemisch bekannter Molekulargewichtsgrößen (Peqlab, Erlangen).

3.2.4 Proteintransfer durch Western-Blot

Das Proteinmuster des Gels wurde mit Hilfe des Tankblot-Verfahrens in einem vertikalen Puffertank (Eigenbau) auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond-ECL; GE Healthcare, Freiburg) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 80 mA und 5°C über Nacht. Hierbei diente der vorgefärbte Molekulargewichtsmarker zur Kontrolle der Transfereffizienz. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurden die Gele nach dem Transfer mit Coomassie-Brillantblau angefärbt und photographiert.

3.2.5 Detektion mit spezifischen Antikörpern

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über die angegebenen Zeiten.

Nach zweimaligem Waschen der Membranen mit Blockierungslösung folgte eine 30minütige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen IgG-HRP; Sigma, Taufkirchen). Die Verdünnung des Sekundärantikörpers betrug 1:5000 für das HO-1-Protein bzw. 1:2000 für das Ferritinprotein in Blockierungslösung. Im Anschluss wurden die Membranen dreimal 5 Minuten mit Blockierungslösung und zweimal 10 Minuten mit Tris/Tween-Puffer gewaschen.

Antikörper	Inkubationszeit	Lösung	Hersteller
HO-1, primär	2 Stunden	1:1000 in 25% Blockierungslösung und 75% Tris/Tween	Axxora, Grünberg
Ferritin, primär	1 Stunde	1:500 in 25% Blockierungslösung und 75% Tris/Tween	Sigma, Taufkirchen
Anti-Kaninchen IgG, sekundär	30 Minuten	1:5000 (HO-1) 1:2000 (Ferritin) in Blockierungslösung	Sigma, Taufkirchen

Tabelle 4: Eingesetzte Antikörper.

Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurde das ECL-Plus-Detektions-Kit der Firma GE Healthcare (Freiburg) eingesetzt. Die Peroxidase oxidiert das Substrat Lumigen PS-3 zu einem Acridiniumester. Durch Reaktion mit Peroxiden entsteht eine intensive Chemilumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei 430 nm. Diese kann durch die Exposition eines Autoradiographiefilms (Hyperfilm ECL; GE Healthcare, Freiburg) mit der Membran nachgewiesen werden. Die Expositionszeit lag bei 1-10 Minuten. Die densitometrische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms *Quantity One Basic* (Bio-Rad, USA) durchgeführt.

3.3 Genreporter-Assay

Mit einem Genreporter-Assay kann man die transkriptionelle Aktivität von Promotoren messen. Weiterhin können mit diesem Assay auch Aussagen über die Regulation des Gens getroffen werden. Dazu wurden die HO-1-Promotoren in ein Reporterplasmid kloniert, welches die Expression einer Luciferase unter Kontrolle des Promotors ermöglicht. Die Luciferase als „Reporterogen“ wurde ausgewählt, da sie eine viel höhere Sensivität zeigt als andere „Reporterogene“ (Mülhardt 2006). In Zellen, die mit diesem Reporterplasmid transfiziert worden sind, ist die Luciferase-Aktivität daher proportional zur Aktivität des klonierten Promotors. Um Aussagen über die Regulation von Genen zu treffen, kann die Promotorsequenz verändert werden. Es können z.B. bestimmte Sequenzen auf dem Promotor „ausgeknockt“ werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Kotransfektion von Expressionsplasmiden für verschiedene Transkriptionsfaktoren (Alam et al. 1990).

3.3.1 Konstruktion von Reporterplasmiden

Die verschiedenen Konstrukte für die HO-1-Promotorstudien wurden freundlicherweise von PD Dr. Stephan Immenschuh (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. Die Plasmid-DNA lag mit bekannter Konzentration als Lösung vor.

Promotorkonstrukt	Größe	Herkunft	Kontrollplasmid
mHO4045	4,045 kB	Maus	pGL2 basic
hHO4.5luc	4,5 kB	Human	pGL3 basic
hHO4.9luc	4,9 kB	Human	pGL3 basic
hHO4.9luc_M1	4,9 kB	Human	pGL3 basic
hHO3.8luc	3,8 kB	Human	pGL3 basic

Tabelle 5: HO-1-Promotorkonstrukte.

Die Promotorsequenzen waren in kommerziell erhältliche Plasmide (Promega, Mannheim) kloniert. Die Plasmide enthielten als Reporterogen die Luciferase des nordamerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) und zusätzlich ein Resistenzgen gegen Ampicillin (Abbildung 6).

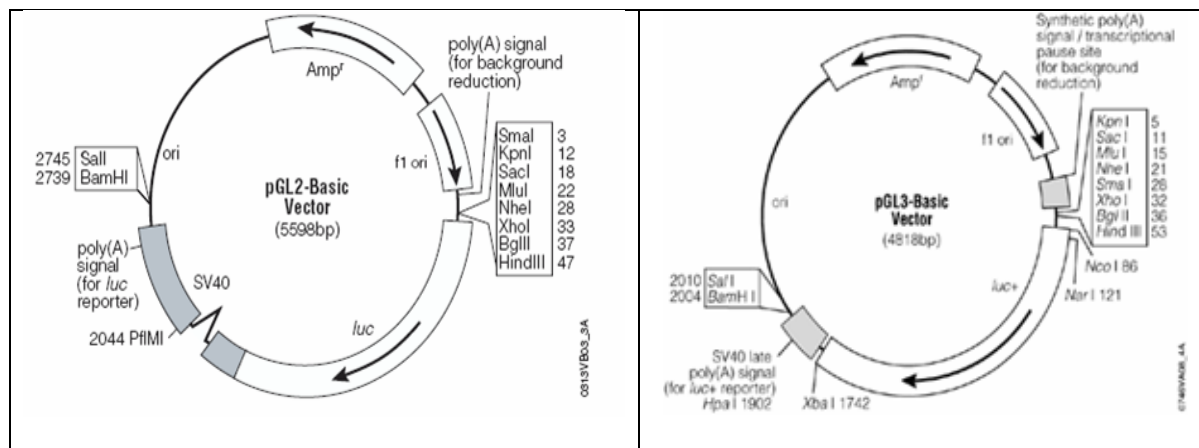


Abbildung 6: Kontrollplasmide (Promega, Mannheim).

3.3.2 Transformation von kompetenten Zellen

Die kompetenten Zellen vom Typ E.coli Stamm DH-5 α wurden auf Eis aufgetaut. Pro Ansatz wurden zu 100 μ l Bakteriensuspension 1 bis 5 μ l entsprechender Plasmid-DNA pipettiert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein so genannter Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 20 Sekunden. Nach erneut zwei Minuten auf Eis wurde 900 μ l warmes LB-Medium (Luria-Broth-Medium) zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden 10 μ l der Bakteriensuspension direkt auf eine Ampicillin-haltige Agarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Am nächsten Morgen wurde mit einer sterilen Impföse eine Kolonie aufgenommen und in 50 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert.

3.3.3 Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA

Die Ernte der Bakterien erfolgte am nächsten Tag durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 6000 rpm und 4°C. Die erhaltenen Pellets wurden entweder bei -20°C gelagert oder sofort aufgeschlossen. Mini- und Midipräparation unterschieden sich nur in der Menge der eingesetzten Bakterienkultur und der Menge der verwendeten Lösungen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *HiSpeed Plasmid Midi Isolation Kit* der Firma Qiagen (Hilden). Dieses System basiert auf einer modifizierten alkalischen Zellyse (Birnboim et al. 1979), gefolgt von einer spezifischen DNA-Bindung an eine Anionen-Austauscher-Säule unter geeigneten Salz- und pH-Bedingungen. Die Isolation wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend erfolgte noch eine Konzentrationsbestimmung der vorliegenden Plasmidlösung am UV-Spektrometer (Amersham, Freiburg).

3.3.4 Identifikation durch Restriktionsverdau

Zur Überprüfung, ob das Plasmid ein bestimmtes Insert enthielt, wurde das Plasmid mit einem oder zwei Restriktionsenzymen geschnitten. Der

Restriktionsansatz wurde entsprechend den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) hergestellt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der verdauten Plasmide in einem ethidiumbromidhaltigen 0,8%-igen TAE-Agarosegel (Tris-Acetat-EDTA-Puffer-Agarosegel) erfolgte eine Beurteilung der erhaltenen Fragmentlängen unter UV-Licht gegenüber einem DNA-Standard definierter Größe (Invitrogen, Karlsruhe). Zum Vergleich wurden die entsprechenden ursprünglichen DNA-Plasmide und Kontrollplasmide ebenso behandelt.

3.3.5 Transfektion

Endothelzellen wurden in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen bis zur 70%-igen Konfluenz kultiviert. Die Transfektion wurde nach der Liposomen-Methode mit dem FuGene6-Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim) durchgeführt. Dabei wurden entsprechend den Herstellerangaben 3 µl FuGene6 und 1,5 µg Promotorplasmid pro Vertiefung eingesetzt. Aus den negativ geladenen Nukleinsäuren und den synthetisch hergestellten, positiv geladenen Liposomen bildet sich ein Komplex, der auf die Zellen gebracht wird und mit der Zellmembran fusioniert. Der Komplexinhalt gelangt dabei durch Endocytose in das Zellinnere.

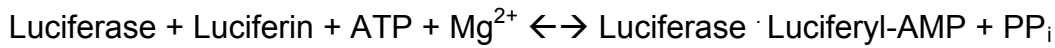
3.3.6 Inkubationsprotokoll zum Genreporter-Assay

Nach einer 24stündigen Transfektion wurden die Zellen für 6 bis 8 Stunden mit Medium ohne Serum inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen über 18 Stunden mit den angegebenen Substanzen. Bei Hemmstoffexperimenten erfolgte eine Vorbehandlung für 20 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor, bevor die Inkubation mit den Substanzen für 18 Stunden fortgesetzt wurde.

3.3.7 Probenaufarbeitung und Luciferase-Assay

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mit kalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen mit 500 µl *Passive Lysis Buffer* (PLB) (Promega, Mannheim; in einer 1:5 Verdünnung mit *Ultra Pure Water*) pro Well versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Das erhaltene Zelllysat wurde anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute bei 20000 rpm und 4°C zentrifugiert. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden 20 µl des Zelllysat-Überstandes in 100 µl vorgelegtes Luciferase-Assay-Reagenz (Promega, Mannheim) gegeben und in direktem Anschluss im Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold, Bad Wildbach) für 10 Sekunden vermessen.

Das Luciferase-Enzym des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (*firefly luciferase*) ist ein monomeres Protein (62 kDa), das keiner posttranslationalen Prozessierung unterliegt. Die Luciferase katalysiert die Umsetzung von Luciferin in Gegenwart von Magnesium-Ionen und ATP zu Luciferyl-AMP, das in einem weiteren Schritt unter Freisetzung von Licht der Wellenlänge 562 nm oxidiert wird (de Wet et al. 1987):



Liegt ein Substratüberschuss vor, ist die Stärke der emittierten Lichtblitze proportional der Luciferase-Aktivität und damit ein Maß für die Promotoraktivität. Die Photonen können mit Hilfe eines Photomultipliers gezählt werden. Als Rohdaten erhält man so genannte relative Lichteinheiten (RLU = *relative light units*), die aus den direkt gezählten Impulsen berechnet werden. Die so gemessene Luciferase-Aktivität wurde auf den Proteingehalt der Proben normiert.

3.4 Biolumineszenzmessung (BLI)

Mit dem BLI kann man die transkriptionelle Aktivität des zu untersuchenden HO-1-Promotors in lebenden Zellen messen. NIH3T3-Zellen wurden stabil mit einem 15kB HO-1-Promotorkonstrukt, welches die ganze Länge des HO-1-Promotors der Maus und eine Luciferase als Reportergen enthält, transfiziert. Die Aktivität des Proteins, der Luciferase, gilt dabei als Index für die Promotoraktivität des HO-1-Gens und kann nach Zugabe des Substrates Luciferin als Lichtemission gemessen und quantifiziert werden (Alam 1994; Hajdena-Dawson et al. 2003).

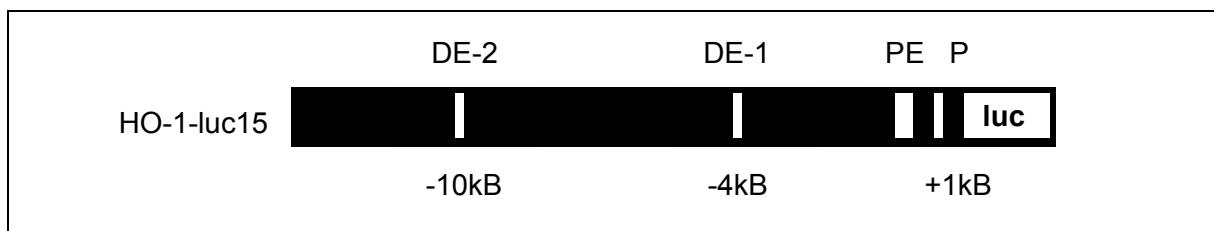


Abbildung 7: HO-1-luc15-Konstrukt des murinen HO-1-Gens (Hajdena-Dawson et al. 2003).

DE = distal enhancer, PE = proximal enhancer, P = Promotor, luc = Reportergen

Nach erfolgter Inkubation mit den entsprechenden Substanzen können die entstehenden Lichtquanten direkt als ein Maß für die transkriptionelle Aktivität des HO-1-Promotors gemessen werden. Der Unterschied zum Genreporter-Assay besteht darin, dass hier lebende Zellen vermessen werden können.

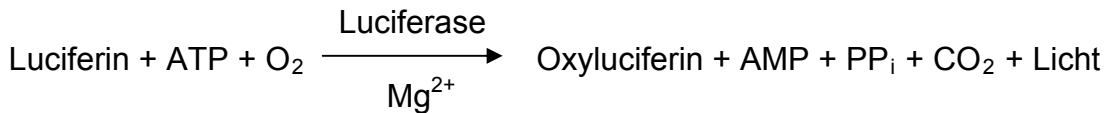
Die NIH-3T3-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Christopher H. Contag (Stanford University, Stanford, CA; USA) zur Verfügung gestellt und die Versuche von Frau Apothekerin Stephanie Schulz an der Stanford University (School of Medicine, Department of Pediatrics, Stanford, CA, USA) durchgeführt.

3.4.1 Inkubationsprotokoll BLI

Die NIH3T3-HO-1-*luc*-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen für 8 Stunden mit Medium ohne Serum inkubiert. Daran schloss sich die Inkubation mit den jeweiligen Substanzen über die angegebenen Zeiträume an.

3.4.2 Probenaufarbeitung und *in vivo* BLI

Nach der Inkubation wurde das Medium von der Zellkulturschale entfernt. Nach 5minütiger Inkubation der Zellen mit Luciferin (300 µg/ml) erfolgte die Bestimmung der Biolumineszenz über einen Zeitraum von 5 Minuten mit dem *In Vivo Imaging System* (IVIS™, Xenogen Corp., Alameda, CA, USA). Dabei dient das Luciferase-Gen als „Reportergen“. Durch das Enzym, die *Firefly*-Luciferase, wird Luciferin in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und Magnesium-Ionen oxidiert. Unter Bildung von Oxyluciferin wird dabei Licht der Wellenlänge 562 nm frei.



Die gebildeten Photonen werden mittels der *LivingImage* Software in entsprechenden Farbintensitäten visualisiert und sind der Promotoraktivität der HO-1 proportional. Als Rohdaten erhält man die Anzahl an Photonen/5 Minuten (Zhang et al. 2002).

3.5 Northern-Blot-Analyse

Für das Northern-Blot-Verfahren wird aus Proben isolierte Ribonukleinsäure (RNA) zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend werden die RNA-Moleküle aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägerschicht (z.B. Nylonmembran) übertragen und fixiert. Durch Hybridisierung mit geeigneten, markierten Sonden können spezifische RNA-Moleküle sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden. Als Sonden dienen Fragmente der kodierenden Regionen der entsprechenden Gene (Alwine et al. 1977).

3.5.1 DNA-Sonden

Für die Analyse der HO-1-mRNA wurde ein EcoR I-Hind III-Restriktionsfragment der HO-1-cDNA verwendet, welches freundlicherweise von PD Dr. Stephan Immenschuh (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt wurde (Shibahara et al. 1985; Immenschuh et al. 2003). Aufgrund der hohen Homologie reagiert die cDNA der Ratte auch mit den entsprechenden DNA-Sequenzen der Maus und kann daher für die Northern-Blot-Analyse verwendet werden (Bauer et al. 2003).

Für die Analyse des *House-keeping*-Gens β -Aktin wurde ein kommerzielles Fragment der Firma Boehringer (Mannheim) verwendet.

Gensonde	Größe	Restriktion
Hämoxxygenase-1 rat	883 bp	EcoR I / Hind III
β -Aktin human	450 bp	Nco I / Pst I

Tabelle 6: Verwendete DNA-Sonden.

3.5.2 Inkubationsprotokoll zur Northern-Blot-Analyse

Makrophagen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach einer 24stündigen Inkubation mit Medium ohne Serum erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Substanzen über 12 Stunden. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA geerntet und die Pellets bei -80°C gelagert.

3.5.3 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA aus den Pellets wurde nach der *Single-Step*-Methode (Chomczynski et al. 1987) mit Hilfe des peqGOLD TriFast-Reagenz (Peqlab, Erlangen) isoliert. Das Reagenz besteht aus einem Phenol-Guanidinisothiocyanat-Gemisch. Die Zellen werden aufgeschlossen und die Zellkomponenten gelöst, ohne dass die RNA gespalten wird. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase. Die RNA verbleibt ausschließlich in der wässrigen Phase, aus der sie mit Isopropanol gefällt werden kann. Die Präparation der RNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

3.5.4 RNA-Gelelektrophorese

Die RNA-Konzentration wurde am UV-Spektrometer (Amersham, Freiburg) bestimmt. Anschließend wurden je 25 µg RNA mit 4fach konzentriertem Ladebuffer versetzt und 10 Minuten bei 60°C denaturiert. Die Auftrennung der RNA erfolgte in 1%-igen Formaldehyd-Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen bei 16 V über Nacht (Rave et al. 1979).

3.5.5 RNA-Fixierung auf Nylon-Membranen durch Vakuum-Blotting

Mit der Methode des Vakuum-Blottens kann RNA aus einem Agarosegel über Vakuum-verstärkte Diffusion auf eine Nylonmembran transferiert werden. Zur Dokumentation der Gelelektrophorese wurden die Gele zunächst photographiert. Anschließend wurden sie 20 Minuten in DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat-Wasser) mit 0,05 N Natriumhydroxid, 5 Minuten in reinem DEPC-Wasser und zweimal 15 Minuten in konzentriertem Transferpuffer (20x SSC) gewaschen. Mit Hilfe eines Vakuum-Blotters (Biometra, Göttingen) erfolgte der 90minütige Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺; GE Healthcare, Freiburg). Danach wurden die Membranen für 30 Minuten bei 80°C in einem Trockenschrank gelagert. Dieses so genannte *baking* fixiert die RNA-Moleküle auf der Nylonmembran durch Ausbildung von Bindungen zwischen den Basen der RNA und den positiv geladenen Aminogruppen der Nylonmembran.

3.5.6 Markierung der DNA-Sonde mit ³²P-Desoxycytidintriphosphat

Die Sonden wurden mit Hilfe des *Random Primed DNA Labeling Kits* der Firma Roche (Mannheim) markiert. Diese von Feinberg und Vogelstein entwickelte Methode basiert auf der Hybridisierung eines Gemischs aller möglichen Hexanukleotid-Kombinationen mit dem zu markierenden Fragment (Feinberg et al. 1983)

Die als Sonde einzusetzende doppelsträngige DNA (45 ng) wird zunächst für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend mit dem Reaktionsgemisch versetzt. Sobald ein Hexanukleotid aus dem Reaktionsgemisch als Primer an den DNA-Strang binden kann, wird der komplementäre Strang durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase synthetisiert. Durch Zugabe von ³²P-Desoxycytidin-Triphosphat (Hartmann Analytic, Braunschweig) und einer Mischung der übrigen Nukleotide wird der komplementäre DNA-Strang als radioaktiv markierte Sonde gebildet.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA (0,2 M, pH 8) gestoppt und die nicht inkorporierten Nukleotide durch Zentrifugation des Reaktionsansatzes auf *Quick Spin*-Säulen/Sephadex G50 (GE Healthcare, Freiburg) abgetrennt. Abschließend erfolgt eine 5minütige Denaturierung der doppelsträngigen Sonde bei 95°C.

3.5.7 Vor- und Haupthybridisierung

Die getrockneten Membranen wurden zunächst über 2 Stunden bei 65°C mit 100 µg/ml Fisch-DNA enthaltender Hybridisierungslösung vorhybridisiert, um unspezifische Bindungen der Sonde zu minimieren. Anschließend wurde die Haupthybridisierung über 24 Stunden bei 65°C mit der jeweiligen Sonde in Hybridisierungslösung durchgeführt.

3.5.8 Detektion, Quantifizierung und Beladungskontrolle

Nach der Haupthybridisierung wurden die Membranen zunächst jeweils zweimal 15 Minuten mit 2x SSC in DEPC-Wasser bei Raumtemperatur und 0,5x SSC (Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung) in DEPC-Wasser bei 65°C gewaschen. Im Anschluss folgte eine zweistündige Exposition einer Bildplatte des Fuji *Bio-Imaging Analysers* BAS 1500 (Fujifilm, Japan). Diese aus Europium-Kristallen bestehenden Schirme ermöglichen eine erste Auswertung der markierten Membranen.

Anschließend wurde ein Autoradiographiefilm (Kodak BioMax MS Film; Sigma, Taufkirchen) über 24 Stunden mit Hilfe eines so genannten *Hyperscreens* bei -80°C exponiert. Dieser Schirm absorbiert die Strahlung starker β-Strahler und gibt sie in Form von Licht wieder ab, das den Film schwärzt. Die densitometrische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms *Quantity One Basic* (Bio-Rad, USA) durchgeführt.

3.6 Bestimmung der cyclischen Nukleotide

3.6.1 Inkubationsprotokoll zur Bestimmung von cAMP/cGMP

Die jeweils verwendeten Zellen wurden in 35 mm Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend mit 900 µl Medium ohne Serum inkubiert. Das Medium enthielt zusätzlich 500 µM des Phosphodiesterase-Hemmstoffes IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin). Nach 15 min im Trockenschrank bei 37°C wurden die Zellen mit den entsprechenden Prostaglandinderivaten inkubiert und wiederum für 15 min bei 37°C in den Trockenschrank gegeben. Das Endvolumen betrug 1 ml.

3.6.2 Probenaufarbeitung

Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt und die Reaktion durch Zugabe von unvergälltem Ethanol (96%) gestoppt (Friedl et al. 1985). Der Alkohol wurde bei 60°C im Trockenschrank vollständig abgedampft. Der Rückstand wurde anschließend in 250 µl Wasser aufgenommen, bei -80°C eingefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut, um die Zellen zu lysieren und so eine vollständige Freisetzung der cyclischen Nukleotide zu erreichen. Dieser Einfrier-Auftau-Zyklus wurde dreimal durchgeführt. Abschließend wurde kurz zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Durchführung aliquotiert (Hinz et al. 1998).

3.6.3 Enzymimmunoassay (EIA)

Der cAMP-Gehalt der Proben wurde mit einem EIA-Kit von Cayman (Ann Arbor, USA) nach den Angaben des Herstellers bestimmt (Pradelles et al. 1989; Maxey 1992). Hierbei handelt es sich um eine kompetitive Bestimmungsmethode. Bei diesem Test sind auf einer 96-well-Mikrotiterplatte spezifische cAMP-Antikörper immobilisiert, um deren limitierte Bindungsstellen freies, aus dem Zellüberstand gewonnenes und an Acetylcholinesterase-gekoppeltes cAMP konkurrieren. Nach Beendigung der Reaktion wurden die ungebundenen Reagenzien ausgewaschen. Die Acetylcholinesterase-Aktivität wurde mit Ellmanns Reagenz bestimmt. Dabei katalysiert das Enzym die Bildung von 5-Thio-2-nitrobenzoesäure, deren Extinktion bei 412 nm vermessen werden kann. Die Extinktion ist der Konzentration an freiem cAMP umgekehrt proportional. Eine Kalibrierung erfolgte mittels eines vom Hersteller mitgelieferten Standards (0,05-500 pmol/l). Die Bestimmung von cGMP (cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat) erfolgte auf gleiche Art und Weise mit einem entsprechenden EIA-Kit von Cayman (Ann Arbor, USA).

3.7 Bestimmung der Hämoxxygenase-Aktivität

Die Bestimmung der totalen HO-Aktivität beruht auf der enzymatischen Umwandlung von Häm über Biliverdin zu Bilirubin. Dazu werden die Zellen nach der Inkubation aufgeschlossen, um eine vollständige Freisetzung der Hämoxxygenase zu erreichen. Im zellfreien System wird dann NADPH-abhängig Bilirubin gebildet und anschließend extrahiert. Die Menge des extrahierten, gelbgefärbten Bilirubins wird am UV-Spektrometer bestimmt und korreliert mit der enzymatischen Aktivität der HO.

3.7.1 Inkubationsprotokoll zur Aktivitätsmessung

Endothelzellen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 150 mm ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Nach einer 24stündigen Inkubation mit Medium ohne Serum erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Substanzen über 24 Stunden. Danach wurden die Zellen mit kaltem PBS abgeschabt, in PBS-Mg-Puffer resuspendiert und bei -80°C eingefroren und gelagert.

3.7.2 Probenaufarbeitung

Die Zellen wurden durch dreimaliges Auftauen (bei 37°C im Wasserbad) und Einfrieren (mit flüssigem Stickstoff) schonend aufgeschlossen. Dadurch wird eine vollständige Freisetzung der Hämoxxygenase erreicht. Nach einer 15sekündigen Nachbehandlung im Ultraschallbad wurde der Zellschrott durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C) abgetrennt. Für den Reaktionsansatz wurden 400 µl des Überstandes verwendet. Anschließend folgte eine Proteinbestimmung nach Bradford.

3.7.3 HO-Aktivitätsbestimmung

Als Substrat für die HO wurde Hämin als Analogon des körpereigenen Häms verwendet. Glucose-6-phosphatdehydrogenase, Glucose-6-phosphat und NADPH stellen ein NADPH-generierendes System dar, welches als Reduktionsmittel beim enzymatischen Abbau des Häms zum Biliverdin wirksam ist. Als Quelle für die Biliverdinreduktase wurde der ultrazentrifugierte Überstand von Rattenlebercytosol verwendet (Erdmann et al. 2005).

	Pro Probe
PBS-Mg-Puffer	290 μ l
Lebercytosol	110 μ l
Glucose-6-phosphatdehydrogenase (50 U/ml)	15 μ l
Glucose-6-phosphat (20 mM)	50 μ l
Probe	400 μ l
Hämin (1 mM)	25 μ l
β -NADPH (40 mM)	25 μ l

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die HO-Aktivitätsbestimmung.

Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Um das gebildete Bilirubin zu extrahieren, wurden 800 μ l Chloroform zu den Proben gegeben und anschließend stark gevortext. Nach mehrmaliger Zentrifugation (5 Minuten bei 3000 rpm bzw. 5000 rpm, Raumtemperatur) trennt sich die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase (Motterlini et al. 1996). Die Vermessung der organischen Phase mit dem extrahierten Bilirubin erfolgte am UV-Spektrometer (Amersham, Freiburg) bei den Wellenlängen 464 nm und 530 nm (Referenzwellenlänge).

Die gebildete Menge an Bilirubin (Extinktionskoeffizient $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wurde über die Differenz der Absorptionen bei 464 nm und 530 nm errechnet und auf den Proteingehalt der Proben normiert. Die HO-Aktivität für jede Probe wurde als relative Bilirubinbildung (pro mg Protein und pro Stunde) zur Kontrolle angegeben.

3.8 Bestimmung freier Sauerstoffradikale

Durch Zugabe von NADPH zu den Zellen wird die NADPH-abhängige Oxidase stimuliert, Superoxidradikale zu bilden (Griendling et al. 2000; Guzik et al. 2000b).



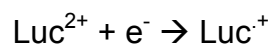
Die Konzentration an Superoxidradikalen kann mit Hilfe von Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz am Luminometer gemessen werden (Li et al. 1998; Tarpey et al. 1999). Durch Vorbehandlung oder direkte Inkubation der Zellen mit potenziell antioxidativ wirkenden Substanzen lässt sich an diesem Modell deren Auswirkung auf die intrazelluläre und extrazelluläre Konzentration an Superoxidradikalen bestimmen.

3.8.1 Inkubationsprotokoll zur Sauerstoffradikalmessung

Die Endothelzellen wurden in Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend für 24 Stunden mit Medium ohne Serum inkubiert. Zur Bestimmung der genomischen Effekte wurde über 24 Stunden mit den entsprechenden Prostaglandinderivaten vorinkubiert. Zur Ernte wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für eine Minute mit Trypsin/EDTA versetzt. Durch Spülen mit PBS wurden die Zellen von den Zellkulturplatten gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 100 μM NADPH und 50 μM Lucigenin für 20 Minuten inkubiert. Die Bestimmung der direkten radikalfangenden Eigenschaften von Alprostadil und Bilirubin erfolgte ohne Vorinkubation durch simultane Zugabe der Substanzen und der Reagenzien zu den resuspendierten Zellen.

3.8.2 Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz

Der Mechanismus für die Entstehung der Chemilumineszenz durch die Reaktion von Lucigenin (Bis-N-methylacridiniumnitrat) mit dem Superoxidradikal wird wie folgt diskutiert:



Das Lucigenin-Kation (Luc^{2+}) nimmt zunächst ein Elektron auf und wird zum Radikal reduziert ($\text{Luc}^{\cdot +}$). Dieses reagiert mit dem Superoxidradikal zu einem instabilen Dioxethan-Intermediat. Bei dessen Zerfall entsteht ein angeregtes Acridon, welches beim Rückfall in den Ruhezustand Licht emittiert (Vasquez-Vivar et al. 1997; Tarpey et al. 1999). Die Photonen können mit Hilfe eines Photomultipliers gezählt werden. Als Rohdaten erhält man so genannte relative Lichteinheiten (RLU = *relative light units*), die aus den direkt gezählten Impulsen berechnet werden. Es wird dabei auf die Kontrolle (Zellen ohne Vorinkubation) normalisiert. Die Messung erfolgte mit dem Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold, Bad Wildbad) entsprechend den Herstellerangaben.

3.9 Material

American Type Culture Collection, Manassas (USA)	J774 (ATCC TIB 67)
Axxora, Lörrach	HO-1-Antikörper, Iloprost, NADPH, PGE ₁ , <i>Ultra Pure Water</i>
DIFCO Laboratories, Detroit (USA)	Trypton
European collection of Cell Cultures (ECACC), Wiltshire (UK)	ECV304 (ECACC 92091712)
GE Healthcare, Freiburg	Dextransulfat, ECL Plus Detektionsreagenz, Hyperfilm ECL, Nitrocellulosemembran Hybond-ECL, Nylonmembran Hybond N ⁺ , <i>Quick Spin Säulen</i>
Hartmann Analytic, Braunschweig	³² P-dCTP
IBL, Hamburg	cAMP ELISA Kit, cGMP ELISA Kit
Invitrogen, Karlsruhe	Agarose, DNA-Standard, fetales Kälberserum, Ethidiumbromid, Fisch-DNA, PBS, Penicillin/Streptomycin, SDS, Trypsin/EDTA, Tris, Zellkulturmedien
Merck, Darmstadt	Ethanol, Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Methanol, Natriumhydrogenphosphat
Peqlab, Erlangen	Protein-Marker, TriFast-Reagenz
Promega, Mannheim	Luciferase-Assay-System, PLB, pGL3-Vektoren
Qiagen, Hilden	<i>HiSpeed Plasmid Midi Isolation Kit, Plasmid Midi Isolation Kit, Gel Extraction Kit</i>
Roche, Mannheim	FuGene6, <i>Random Primed DNA Labeling Kit</i> , Restriktionsenzyme
Roth, Karlsruhe	Bradford-Reagenz, Chloroform, Coomassie-Brillantblau, DEPC, DMSO, EDTA, Essigsäure, Formaldehyd, Formamid, Glycin, Hefeextrakt, LB-Agar, MOPS, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Natriumhydroxid, Tween 20

Schwarz Pharma, Monheim	Alprostadil
Serva, Heidelberg	Acrylamid
Sigma, Taufkirchen	Ampicillin, APS, Bilirubin, BSA, Cadmiumchlorid, Captopril, Chloramphenicol, Cycloheximid, db-cAMP, 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J ₂ , DDA, DTT, Ferritin-Antikörper, Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphatdehydrogenase, Glycerol, Hämin, IBMX, KT5720, KT5823, Lucigenin, Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper, PGF _{2α} , PMSF, , SOD, TEMED, Triton-X 100
TSI GmbH, Zeven	Trockenmilchpulver

3.10 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

3.10.1 Substanzen

Bilirubin (10 mM) und Hämin (1 mM) wurden mit 50 µl 2N NaOH angelöst und mit PBS bzw. PBS-Mg-Puffer verdünnt.

DDA (10 mM), IBMX (50 mM), KT5720 (3,5 mM), KT5823 (4 mM), PGE₁ (10 mM) und PGF_{2α} (10 mM) wurden als Stammlösungen in DMSO bei -20°C gelagert. Iloprost und d-PGJ₂ lagen als Lösung vor. Die Verdünnungen wurden mit PBS hergestellt.

Soweit nicht anders angegeben wurden die Substanzen in den entsprechenden Mengen PBS gelöst. Alle Lösungen wurden am Versuchstag frisch hergestellt.

3.10.2 Puffer

PBS	138 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 8,1 mM Natriumhydrogenphosphat, 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,3 bei 37°C
MOPS	20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,0 bei 37°C
SCC	150 mM Natriumchlorid, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0 bei 37°C
Tris-Puffer	20 M Tris, pH 7,4 bei 37°C
Tris/Tween-Puffer	0,5% Tween, 20 M Tris, pH 7,4 bei 37°C

TAE-Puffer	40 mM Tris, 1mM EDTA, 0,1% Essigsäure, pH 8,0 bei 37°C
Laufpuffer für DNA-Agarose-Gelelektrophorese	1x TAE
Ladepuffer für RNA-Agarose-Gelelektrophorese	400 µl Formamid, 140 µl Formaldehyd, 80 µl 10x MOPS, 8 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)
Laufpuffer für RNA-Agarose-Gelelektrophorese	1x MOPS
Lysispuffer zur Proteinisolation	25 mM Tris, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 7,4 bei 37°C, 1 µM PMSF frisch zugeben
Sammelgelpuffer	334 mM Tris, 17 mM SDS, pH 6,8 bei 37°C
Trenngelpuffer	1 M Tris, 17 mM SDS, pH 8,8 bei 37°C
Ladepuffer für SDS-PAGE	100 mM Tris, 10 mM EDTA, 2% SDS, 20% Glycerol, 2,5 M DDT frisch zugeben
Laufpuffer für SDS-PAGE	50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0,1% SDS
Transferpuffer für Western Blot	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
PBS-Mg-Puffer	100 mM Kaliumhydrogenphosphat, 4,3 mM Magnesiumchlorid, pH 7,4 bei 37°C

3.10.3 Lösungen

TAE-Agarosegel (0,8%)	8 g/l Agarose in 1x TAE
Formaldehyd-Agarosegel (1%)	10 g/l Agarose, 10% MOPS in DEPC-Wasser, vor dem Gelgießen 17% Formaldehyd zugeben
Hybridisierungslösung für Northern-Blot-Analyse	10% Dextransulfat, 1 M NaCl, 1% SDS in DEPC-Wasser, 100 µg/ml Fisch-DNA frisch zugeben
Sammelgel für SDS-PAGE	5% Acrylamid, 20% Sammelgelpuffer, 1% APS (0,1 g/ml), 0,1% TEMED in bidestilliertem Wasser
Trenngel für SDS-PAGE	15% Acrylamid, 20% Trenngelpuffer, 1% APS (0,1 g/ml), 0,1 % TEMED in bidestilliertem Wasser

Coomassie-Brillantblau-Lösung	2,5 g/l Coomassie-Brillantblau, 10% Essigsäure, 45% Methanol in demineralisiertem Wasser
Entfärber	10% Essigsäure, 45% Methanol in demineralisiertem Wasser
Blockierungslösung	4% fettfreies Trockenmilchpulver in Tris-Puffer

3.10.4 Medien

LB-Ampicillin-Agar	5g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 170 mM Natriumchlorid, 15 g/l Agar, 100 mg/l Ampicillin, pH 7,5 bei 37°C
LB-Medium	5g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 170 mM Natriumchlorid, 100 mg/l Ampicillin, pH 7,5 bei 37°C

3.11 Statistik

Bei den Messungen zur cAMP-/cGMP-Stimulation, der Promotorstudien, der Chemilumineszenz und der HO-Aktivität sind die Messdaten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) von n unabhängigen Experimenten angegeben. Die densitometrischen Daten der Northern- und Western-Blot-Analysen basieren auf n=3-6 unabhängigen Experimenten.

Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen wurde unter Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ mittels des t-Tests nach Student für unverbundene Stichproben geprüft. Beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni's multipler Vergleichstest angewendet. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit P für $\alpha < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.