

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Homogenisator Ultra Turrax T25, Jahnke und Kunkel

Kühlzentrifuge Eppendorf 5417 R, Eppendorf AG

Photometer, Shimadzu

Gelkammer (90 Volt) Biorad

Fotogerät und -drucker für Gele, SONY

ThermoCycler PTC-200 und PTC-100, MJ Research Peltier

Taqman-Apparat ABI-Prism 7000 STS, Applied Biosystems, Darmstadt

Pipette Reference 10-100 µl, 100-1000 µl, Eppendorf

Mikrozentrifuge II, The Griffin Group, Inc. OHIO, USA

Respirator, Rodent Ventilator 7025, UGO Basile

Restrainer, Werkstatt UKBF

Blutdruckmessgerät, TSE Biosystems GmbH

Präzisionswaage, Satorius Laboratory

Glasgefäße mit Schraubverschluss 20ml, Packard, Econoglass

Makrolonkäfige Typ 4, Tecniplast

Messzylinder, Brand Duran

Szintillationsgefäße aus Glas 20 ml, Packard

Stoffwechselkäfige für Ratten, Ehret

2.1.2 Instrumente und Nahtmaterial

Anatomische Pinzette, Aesculap Standard BD 47/ BD 35

Chirurgische Pinzette, Aesculap Standard BD 557

Chirurgische Schere, Aesculap Standard-Modell BC 320

Feine Präparierschere, Aesculap BC 2

Feine Präparierschere, Aesculap Jameson-Werber BC 175

Micro-Pincette Uhrmacher Modell, Aesculap BD 329

Mikro-Nadelhalter, Aesculap Barraquer FD 230

Nadelhalter, Aesculap Crile-Murray BM 219

Wundspreizer, Aesculap Mellinger OA 241

Haken, Werkstatt Lorenz

Nahtmaterial Perma Handseide 0, Sutupak, Ethicon
Nahtmaterial geflochten 3-0, Dexon II, B. Braun Dexon GmbH
Nahtmaterial Monofilament 6-0, Biosyn, Surgalloy, USSC
Braunülen 20 GA, 16 GA; BD Adsyte Pro
Catheter Transducers Model SPC-330, 3F; Millar, Micro-Tip
Kanülen Gr.1, Gr. 12, Gr. 26; Braun, Sterican
Sterile Einwegspritzen 2ml, 5ml, 10ml; Braun
Sterile Einwegspritzen 1ml; Plastipak, Becton Dickinson

2.1.3 Futtermittel

Standardhaltungsfutter für Ratten, Altromin

2.1.4 Medikamente und Arzneimittel

ACE - Hemmer Ramipril, Astra-Zeneca
Bepanthen Augensalbe, Roche
Povidon - Iod; Braunol, Braun
Desinfektionsmittel für Instrumente, Braun
S - Ketaminhydrochlorid 43mg / kg KG Parke-Davis, Ketanest, S 25mg/ml
Hautdesinfektionsmittel, Braun
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %, Braun
Novalgin, Aventis
Paracetamol-Saft, Ratiopharm
Xylazin Hydrochlorid, Bayer

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Eppendorf-Gefäße Safe Lock, 1,5 ml, 0,5 ml Eppendorf AG
Eppendorfpipetten Standarttips 1000µl, 500µl, 50µl, 20µl, 10µl, Eppendorf AG
Falcon Gefäße gross, mittel, klein, Sarstedt
96-Well-Platten für Taqman-apparat, Applied Biosystems
Reaktionsgefäße Safe - Lock 1,5 ml, 2 ml, Eppendorf
Standarttips 20 µl, 100 µl, 1000 µl, Eppendorf
Sterile Mullkompressen 5x5 mm, GAZIN, Lohmann
Untersuchungshandschuhe M, Kimberly-Clark, Safeskin PFE
Verpackungsfolie, Saran
Wattestäbchen 15 cm, Lohmann Rauscher Inter. GmbH & Co.KG

2.1.6 Reagenzien

flüssiger Stickstoff

Trizol™Reagenz, Gibco Life Technologies, Mannheim

Chloroform

Ethanol 75%, Braun

DEPC (Diethylpyorpcarbonat)-Lösung 0.01%(RNase-frei)

2 - Propanol 70%, Braun

Agarosegel 2% Biozym, Oldendorf

TAE-Puffer (Trisacetat + EDTA)

Ethidiumbromid, Sigma, Steinheim

Ficoll, Firma Fluka, Taufkirchen

Master Mix für Taqman, Applied Biosystems, Darmstadt

Aqua dest.

2.1.7 Kits

First Strand cDNA Synthesis Kit, MBI Fermentas

QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen

2.1.8 Oligonukleotide

2.1.8.1 Standardprimer (bezogen durch Proligo LLC, USA)

PBGD	Forward 5'-CgA CAC TgT ggT AgC gAT gC-3' Reverse 5'-CTC TgT AgC TgC gCC ACT CTC CTC-3'
ANP	Forward 5'-CCT CCg ATA gAT AgA TCT gCC CtC TT-3' Reverse 5'-CCg CTC Tgg gCT CCA AT-3'
Serca2a	Forward 5'-gAC Cgg CAC ACT TAC CAC AA-3' Reverse 5'-ggT AAA CTC ATT AAg ggA ACA AgT ATC A-3'
Phospholamban	Forward 5'-CAT CAT TgT gAT gCT TCT gTg ACA-3' Reverse 5'-ACA TTg Tgg CAC ACT AgT CgT gTA-3'
Na/Ca-Exchanger	Forward 5'-TgC gTC CAT Agg CAA TgT CA-3' Reverse 5'-CCC ACg TTg ATg AAA gCA AA-3'

2.8.1.2 Taqmanprimer (bezogen durch Proligo LLC, USA)

PBGD	Forward 5'-TgA AAA CCT TgT ACC CTg gCA TA-3' Reverse 5'-TCC AAT CTT AgA gAg TgC AgT ATC AAg A-3'
ANP	Forward 5'-gAg CgA gCA gAC CgA TgA Ag-3' Reverse 5'-TgC AgC TCC Agg Agg gTA TT-3'
Serca2a	Forward 5'-gAC Cgg CAC ACT TAC CAC AA-3' Reverse 5'-ggT AAA CTC ATT AAG GGA ACA AgTATC A-3'
Phospholamban	Forward 5'-CAC CAT gCC AAC gCA gTT AC -3' Reverse 5'-ggC TgC CAT CAg TCT CAC TCT-3'
Na/Ca-Exchanger	Forward 5'-Cgg AAg CAA CgC TgT gAA-3' Reverse 5'-Tgg TAg ATg gCA gCA ATg gA-3'

2.1.8.3 Taqmansonden (bezogen durch TIB-Molbiol, Berlin)

PBGD	5'-TTg AAA TCA TTg CTA TgT CCA CCA Cag g-3'
ANP	5'-CTC TgC TCg CTg gCC CTC ggA-3'
SERCA2A	5'-TCC AgA ATg AAC ATC CTg CAG Acg gA-3'
Phospholamban	5'-CCT gCT ggg ACA TCg TCg TgA Agg T-3'
Na/Ca-Exchanger	5'-CAg gCC ACg CCg ATT CCC AgT-3'

Alle Taqmansonden waren am 5'-Ende mit FAM, am 3'-Ende mit TAMRA markiert.

2.1.9 Tierstämme

Von besonderer Bedeutung für die Untersuchungen war die Auswahl passender Rattenstämme: ein geeignetes Modell für die Induktion eines operativen Nephronverlustes, ein zweites mit genetisch verminderter Nephronanzahl. Beide Stämme sollten morphologisch und funktionell ausreichend charakterisiert sein. Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene Rattenmodelle ausgesucht, die den genannten Kriterien entsprachen:

Die Munich-Wistar-Frömter-Ratte, kurz MWF-Ratte, ein Rattenmodell mit ausgeprägter kongenitaler Oligonephronie, deren Nephronanzahl nach unveröffentlichten Daten unserer AG um 40% verringert ist (siehe Abbildung) [71]. Es vereint in sich die klinisch bedeutsamen Risikofaktoren der Progression der chronischen Niereninsuffizienz: die Entwicklung eines spontanen arteriellen Hypertonus und einer Proteinurie.[71] Das Tiermodell eignet sich daher hervorragend zur Identifizierung von kardialen Veränderungen, die als Folge oder Ursache einer kongenitalen Oligonephronie in Frage kommen.

Der Stamm wurde 1996 am UKBF, FU Berlin durch Inzucht etabliert [72], die Tiere stammten aus der ursprünglichen Kolonie des MWF/Ztm- Stammes des zentralen Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule Hannover.

Die Wistarratte, ein gesundes Rattenmodell, dass sich im Alter von 12-14 Wochen bei gesunder Niere normoton und ohne Proteinurie darstellt und regelmäßig als Referenzstamm bei Untersuchungen an MWF-Tieren genutzt wird.[73] Wistartiere liegen genetisch sehr nahe am Ursprungsstamm der MWF-Ratte, wodurch genetische Unterschiede - von der Nephronanzahl abgesehen – minimiert werden. Wistar - Ratten wurden von Charles River, Sulzfeld bezogen.

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir insgesamt 53 männliche MWF - Ratten und 50 männliche Wistar - Ratten. Da die kongenitale Oligonephronie der MWF-Ratten geschlechtsspezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt ist [74], wurden in dieser Arbeit ausschließlich männliche Tiere verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden über einen Zeitraum von insgesamt acht Monaten durchgeführt. Die Eingriffe erfolgten unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes und standen im Einklang mit den Richtlinien für Tierversuche des Instituts für Klinische Pharmakologie, Campus Benjamin Franklin, Charité. Unter der Genehmigungsnummer G 0093 / 01 vom 6.7.2001 wurden die beschriebenen Tierversuche durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt. Die Eingriffe erfolgten sämtlich nach dem

nach den Richtlinien festgelegten methodischen Vorgehen. Je nach Gruppenzugehörigkeit unterzog man den Ratten das entsprechende gruppenspezifische operative wie postoperative Procedere.

2.2.1.1 Haltung der Tiere

Die Haltung der Ratten erfolgte in den Räumen der Forschungsanstalt für Experimentelle Medizin (FEM) der Freien Universität Berlin. Bei freiem Zugang zu Wasser und Standard-Rattenfutter (20% Proteinanteil) lebten maximal sechs Ratten in einem Makrolon - Gemeinschaftskäfig (Typ 4). Die Temperatur in den Haltungs- und Versuchsräumen des FEM betrug durchgehend 20 °C, die Luftfeuchtigkeit lag bei 50%. Ein natürlicher zwölfständiger Tag - Nacht - Rhythmus wurde durch eine automatisierte Beleuchtung gewährleistet.

2.2.1.2 Durchführung der 5/6-Nephrektomie

Die Narkotisierung der Tiere erfolgte mittels intraperitonealer Injektion von Ketanest S25 (0,174 mg/100g KG) plus Xylazin 2% (0,065 mg/100 g KG), bei unzureichender Narkosetiefe wurden jeweils die Hälfte der Initialdosis von Ketanest bis zum Erreichen der ausreichenden Narkosetiefe nachappliziert. Die Narkosetiefe wurde während des Eingriffs mehrmals überprüft und bei Bedarf weitere Dosen Ketanest gegeben. Die Tiere wurden in Rückenlage auf dem OP-Tisch fixiert und der Bauch rasiert. Zum Schutz vor Austrocknung bestrichen wir die Augen der Ratten mit Bepanthen Augensalbe. Eine Intubation war bei persistierender Spontanatmung der Tiere obsolet.

Nach großzügiger Desinfektion mit Braunol erfolgte die Eröffnung der Abdominalhöhle durch einem 4cm langen Medianschnitt. Zunächst wurde durch Verdrängung von Darm, Magen und Milz die freie Einsehbarkeit des linken Nierenlagers gewährleistet. Die weiteren Operationsschritte wurden bei neunfacher Vergrößerung unter Zuhilfenahme eines binokulären Operationsmikroskops der Firma Zeiss durchgeführt.

Das Peritoneum parietale wurde hilusnah inzidiert, die Vena und Arteria renalis wurden durch stumpfe Präparation mittels eines Wattestäbchens von Peritoneum und Fettgewebe befreit. In ca. 80% der Fälle teilte sich die Arteria renalis vor Eintritt in die Niere dichotom in einen ventralen und einen dorsalen Ast. Durch Unterstechung und Ligatur des ventralen Astes mit Monofilament 6-0 wurde die

arterielle Versorgung des ventralen Nierenparenchyms unterbrochen. Das ischämische Nierengewebe färbte sich innerhalb weniger Sekunden dunkel, so dass eine Kontrolle des Infarktgebietes in situ möglich war. Dank recht konstanter anatomischer Verhältnisse reichte die Unterbindung eines Arterienastes in der Regel aus, um ein Infarktgebiet von 80% des Nierengewebes zu erhalten. In Ausnahmefälle musste ein weiterer Nebenast der Arteria renalis ligiert werden, um die angestrebten 80% Infarktgebiet zu erreichen.

Zur Darstellung der rechten Niere und ihrer versorgenden Gefäße wurden Darm und Magen auf die linke Seite verlagert. Durch stumpfe Präparation wurde die Niere aus ihrem Lager gelöst sowie Ureter und Nierenhilus von Peritoneum und Fettgewebe befreit. Der Ureter sowie die Vena und Arteria renalis wurden mit einer gebogenen Pinzette umstochen und mit Dacron Handseide der Stärke 0 ligiert und durchtrennt. Anschließend wurde die rechte Niere in toto entfernt. Die rechte Nebenniere wurde unter Schonung in situ belassen. Nach Kontrolle der Gefäßstümpfe war die 5/6-Nephrektomie abgeschlossen. Peritoneum und Bauchmuskulatur wurden mit fortlaufender Naht verschlossen. Die abschließende Hautnaht wurde intrakutan genäht, um ein eigenständiges Eröffnen der Wunde durch die Ratten zu unterbinden. Im Untersuchungszeitraum eröffnete sich keines der Tiere die Wunde. Nach Säuberung der Bauchdecke konnte die Operation abgeschlossen werden.

Die Kontrolloperationen folgten in Vorbereitung und Narkose dem beschriebenen Ablauf. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde das Peritoneum über der linken und rechten Niere stumpf mit einem Watteträger entfernt. Eine weitere Manipulation erfolgte nicht, beide Nieren wurden in ihrer vollen Integrität belassen. Die Versorgung der Bauchdecken und die abschließende Hautnaht erfolgten wie beschrieben.

Die frisch operierten Ratten kamen in Käfige mit Zellstoffauslegung. Eine Wärmematte unter dem Käfig sorgte in der ersten Stunde für eine Erhöhung der Umgebungstemperatur. Die aufwachenden Tiere hatten sofort Zugriff auf Trinkwasser und Futter. Zur postoperativen Schmerztherapie versetzten wir das Trinkwasser an den folgenden drei Tagen mit Paracetamolsaft (20 mg/kg KG). Die Ratten erholten sich in der Regel sehr schnell von der subtotalen Nephrektomie.

Nach erfolgreicher Operation wurden die Tiere drei weitere Wochen in ihren Gemeinschaftskäfigen gehalten. Sie hatten während der gesamten Versuchsdurchführung freien Zugang zu Wasser und Futter. Ihr Allgemein- wie Ernährungszustand wurde täglich kontrolliert. Marker hierfür waren das Aussehen

des Fells, der Bewegungsradius sowie der allgemeine Eindruck, den die Ratten in ihren Käfigen erweckten. Tiere in sehr schlechtem Allgemein- wie Ernährungszustand wurden eingeschläfert, um ein unnötiges Leiden der Tiere zu vermeiden. In der vierten postoperativen Woche erfolgten die abschließenden Untersuchungen.

2.2.1.3 Postoperative Behandlung mit einem ACE-Hemmer

Bei einem Teil der 5/6-nephrektomierten Tiere erfolgte unmittelbar postoperativ eine Behandlung mit einem ACE-Hemmer. Ramipril wurde dem Futter in einer Dosis von 1mg/Kg Körpergewicht beigemischt.

2.2.1.4 Bestimmung der Kreatininclearance

Zur Bestimmung der Kreatininclearance wurden die Tiere in der 16. Lebenswoche (zwei Tage vor Tötung) einzeln in Stoffwechsellkäfige gesetzt. Das 24-Stunden-Urinvolumen wurde aufgefangen und gemessen.

Die Kreatininkonzentration im Urin sowie im Plasma wurde im Standardverfahren mittels Autoanalyser durch die Firma Labor 28, Berlin, bestimmt.

Die Kreatininclearance wurde anschliessend nach der Standardformel

$$\text{Kreatinin-Clearance} = \frac{\text{Urinkonzentration von Kreatinin} \times \text{Harnvolumen}}{\text{Plasmakonzentration von Kreatinin} \times \text{Zeit}}$$

berechnet.

2.2.1.5 Messung des systolischen Blutdrucks

Die Bestimmung des systolischen Blutdrucks erfolgte zu Beginn der vierten postoperativen Woche. Die Blutdruckmessung wurde mittels einer nicht-invasiven Tailcuff-Methode an wachen und entspannten Tieren durchgeführt. Wir verwendeten eine automatisierte, computergestützte, oszillatorische Technik der Firma TSE, Bad Homburg. Zur Messung des Blutdruckes wurden die Tiere einzeln in eine schmale Kunststoffröhre (Restrainer) gesetzt, welche wiederum in einer auf 35°C aufgeheizten abgeschlossenen Kammer stand. Durch die hohe Umgebungstemperatur erhöht sich die Durchblutung des Rattenschwanzes. Dies ist eine notwendige Voraussetzung für die korrekte Bestimmung des Blutdrucks mittels der Tailcuff - Methode. Über den Schwanz der Ratten befestigten wir eine

aufblasbare Druckmanschette sowie einen mit dem Computer verbundenen Pulssensor. Um stressbedingte Blutdruckspitzen zu vermeiden, gingen der eigentlichen Datenermittlung simulierte Messungen voraus, um die Tiere an dieses Procedere zu gewöhnen. An drei aufeinander folgenden Tagen führten wir täglich drei Messungen im Abstand von wenigen Min bei jedem Tier durch. Anschließend wurde der Mittelwert dieser neun Messungen ermittelt.

Zum Ende der vierten postoperativen Woche wurden die Tiere gewogen und ihr Allgemein- wie Ernährungszustand beurteilt. Für die Narkosevorbereitung setzten wir die Ratten wiederum in Einzelkäfige. Durch intraperitoneale Injektion von Ketamin S25 (0,174 mg / 100g KG) und Xylazin 2% (0,065 mg / 100 g KG) wurden die Tiere narkotisiert. Nach Durchführung einer Katheteruntersuchung (Ergebnisse sind Gegenstand einer anderen Dissertationsarbeit) trat der Tod der Tiere durch Ausbluten über eine Verweilkanüle ein. Das aufgefangene Blut wurde 20 min bei Raumtemperatur gelagert und anschließend für 15 min bei 8000 U / min und 4°C zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und in 2 ml Eppendorfröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei - 79 °C. Aus dem Serum erfolgte die Messung von Elektrolyten und Kreatinin.

2.2.1.6 Organentnahme

Unmittelbar nach der Blutentnahme eröffneten wir Bauch- und Brusthöhle mittels Medianschnitt. Herz, Niere und Leber wurden makroskopisch begutachtet. Das Herz wurde entnommen und nach Abtrennung der großen Gefäße sowie Entfernung von Blutresten gewogen. Der rechte Ventrikel wurde septumnah vom linken Ventrikel abgetrennt und in einem 2 ml Eppendorfröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der linke Ventrikel wurde erneut gewogen. Die Herzspitze wurde abgetrennt und schockgefroren. Alle anderen Organe wurden gesäubert und in 2ml Eppendorfröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Rattenkadaver wurden separat gesammelt und durch die Tierkörperbeseitigung des Hauses entsorgt.

Sämtliche in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Organproben wurden bei - 79 °C in den Räumen der Klinischen Pharmakologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Charité Berlin gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

2.2.2.1 RNA-Isolation

Von den bei -80° C eingefrorenen Rattenherzen wurde unter konstanter Kühlung mit flüssigem Stickstoff ein ca. 100 mg großes Stück des linken Ventrikels abgetrennt. Zur Vorbereitung wurde dieses in 1 ml Trizol-Lösung eingebettet und auf Eis gekühlt. Vor jeder Homogenisierung wurde das Stator-Rotor-System zunächst dreimalig mit DEPC-Wasser einmalig mit Trizol zur Vermeidung von RNAsen vorgespült. Die Proben wurden dann jeweils dreimal für 30 s bei 10.000 U/min homogenisiert. Die Homogenisate wurden anschliessend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend gevortext.

In einem nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von jeweils 0,2 ml Chloroform. Die Proben wurden geschüttelt, 3 min bei RT inkubiert und bei 4° C mit 12000 U/min für 15 Min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase des Zentrifugates wurde vorsichtig abpipettiert. Zur Ausfällung der RNA erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Isopropanol. Die Proben wurden invertiert, 10 min bei RT inkubiert und erneut mit 12.000 U/min bei 4° C für 15 min zentrifugiert. Das entstandene RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75%er Ethanollösung versetzt und weitere 5 min bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet 15 min luftgetrocknet, dann in 50µl DEPC-Wasser gelöst. Die extrahierte RNA wurde anschliessend bei -80° C gelagert.

2.2.2.2 Gelelektrophorese und optische Konzentrationmessung (Photometrie)

Zur Validierung der Qualität der Proben und der Ermittlung des RNA-Gehalts und der wurden diese in einer Gelelektrophorese bei 90 Volt aufgetragen und fotografiert. RNA lässt sich deutlich an zwei spezifischen Banden der 28S- und der 18S-Einheit erkennen und von Verunreinigungen unterscheiden.

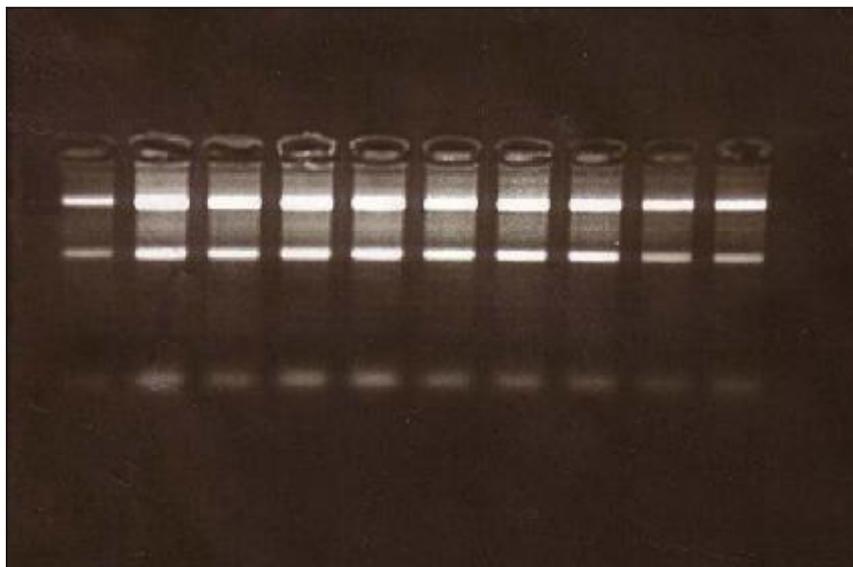


Abbildung 5: Nachweis der extrahierten RNA mittels Gelelektrophorese. Sichtbar sind die mRNA-spezifischen Banden der 28S und der 18S-Untereinheit.

Waren die Banden in allen Proben gut zu identifizieren, so wurde anschliessend die genaue RNA-Konzentration mittels Photometrie gemessen. Dazu wurden 4µl der RNA mit 96µl DEPC versetzt und nach vorheriger Leerkontrolle die Dichte der Probe bei 260 (A1) und bei 280 (A2) nm Wellenlänge im Photometer gemessen. Zur optimalen Qualität der Probesollte der Quotienten A1/A2 zwischen 1,5 und 2 liegen, da sonst von einer Proteinverunreinigung oder einer Degradation der RNA ausgegangen werden musste.

Die Konzentration wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet.

$$\text{Konzentration RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD } 260 * 40 * \text{Verdünnungsfaktor} / 1000$$

Die errechnete Konzentration stellte die Grundlage für weitere quantitative Analysen mittels Taqman-PCR dar.

2.2.2.3 Reverse Transkription

Die mRNA ist ein sehr empfindlicher Stoff, der durch Temperaturschwankungen und Ribonukleasen ständig von Zerstörung bedroht wird. Für die weitere molekularbiologische Analyse musste die extrahierte RNA zunächst in stabilere cDNA umgeschrieben werden. Diese Reaktion wurde mittels des First Strand cDNA Synthesis Kit, MBI Fermentas in zwei Schritten durchgeführt:

Annealing der Random Hexamer Primer

In einem ersten Schritt wird ein so genannter Random Hexamer Primer gebildet: dieser entsteht aus einem Nukleotidmix, dass sich an der zu vervielfältigenden Stelle zu einem passenden Primer zusammenfindet, um die gewünschte Sequenz umschreiben zu können. Dabei wurden zu 2µg der jeweiligen RNA (Berechnung des entsprechenden Volumens erfolgte anhand der photometrisch gemessenen RNA-Konzentrationen)

1µl des Random Hexamer Primers gegeben. Diese Mischung wurde dann auf 11µl Gesamtvolumen mit DEPC-Wasser aufgefüllt.

Mit diesem Ansatz wurde dann eine PCR durchgeführt, und zwar für 5 Min bei 70°, dann für weitere 5 Min bei 4°C.

Reverse Transkription

Im zweiten Schritt wurde dem aus der ersten PCR entstandenen Ansatz noch jeweils 4µl Puffer, 1µl RNase-Inhibitor, 2µl dNTP-Mix sowie 2µl reverse Transkriptase-Enzym hinzugefügt und eine weitere PCR nach folgendem Pogramm durchgeführt:

10 Min bei 25°, 60 Min bei 37°, 10 Min bei 70° und 10 Min bei 4° C.

Das Produkt dieser Reaktion stellte nun die Basis für weitere Untersuchungen mittels Taqman-PCR dar.

2.2.2.4 Die Taqman-PCR

Die Polymerase Chain Reaktion ist eine schnelle und sensitive Methode der DNA-Analytik. Sie ist eine primerdefinierte, enzymatische Replikation, mit deren Hilfe man eine annähernd exponentielle Amplifikation einer bestimmten Zielsequenz erreicht. Zur weiteren Quantifizierung der mRNA waren bisher Methoden wie Northern Blot oder dot blot notwendig, die viel Zeit sowie große Mengen an RNA erforderten.

Die Taqman-PCR ist eine Methode, bei der die Amplifikation der Zielsequenz und seine Quantifizierung simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden. Dies gelingt auch, wenn nur geringe Mengen RNA in der Probe vorhanden sind. Die Reduzierung der Arbeitsschritte und der im Vergleich geringe Zeitaufwand tragen dabei zur Minimierung der verschiedenen Fehlerquellen bei.

Es wird bei der Taqman-PCR zunächst eine für die zu amplifizierende Sequenz spezifische Sonde anfertigt. Dieses Oligonukleotid ist am 5' Ende mit einem fluoreszente Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat=FAM) markiert, das 3'-Ende trägt einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat=TAMRA). Die Wahl der Sonde erfolgt mit einem Programm (Primer Express, Applied Biosystems) das speziell für das Design der Taqmansonden sowie Primer geeignet ist. Die Sonde ist hochspezifisch für das zu amplifizierende Produkt.

Bei primärem Anlagern der Sonde an den cDNA-Strang unterdrückt der Quencher zunächst - durch die räumliche Nähe zum Reporter - das fluoreszierende Signal.

Wird die Sonde nun im Rahmen der PCR und der einhergehenden Aktivität der Taq-Polymerase (ein Enzym mit zusätzlicher Exonuklease-Aktivität) Nukleotid für Nukleotid abgebaut, entfernt sich der Reporterfarbstoff vom Quencher und die Fluoreszenz wird nicht länger unterdrückt. Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes steigt die Fluoreszenz mit jedem weiteren Zyklus an. Das Signal kann nun im Zeitverlauf durch die Anregung zur Fluoreszenz bei 488nm gemessen werden. Es ist dabei strikt sequenzspezifisch, da nicht komplett passende Sondenmoleküle vor Beginn der Reaktion verdrängt werden.

Funktionsweise der Taqman-PCR

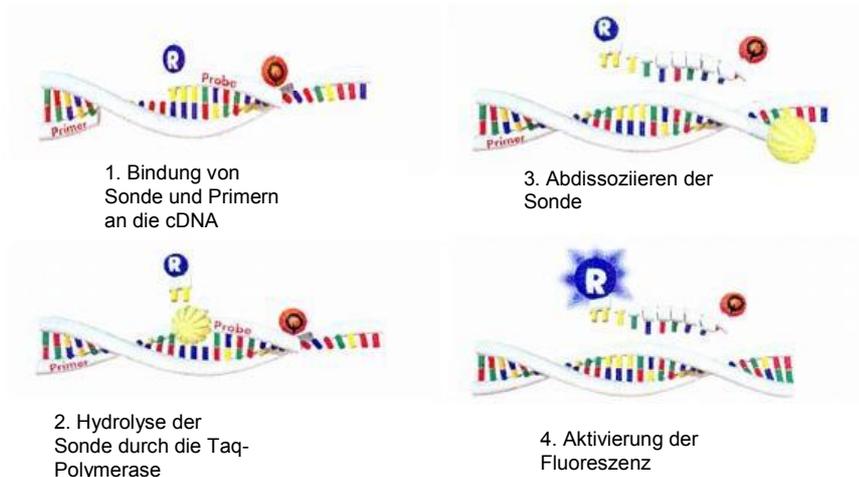


Abbildung 6: schematische Darstellung der Reaktionsabläufe bei der Methode der Taqman-PCR (modifiziert nach der Taqman-Arbeitsanleitung von Applied Biosystems).

Zur Auswertung der TaqMan-Assays wird die relative Quantifizierung mit Standardkurven benutzt. Dabei wird das Expressionslevel des untersuchten Gens auf die Expression eines sog. Housekeeping-Gens normiert. Ein Housekeeping-Gen ist ein Gen, welches idealerweise ungeachtet experimenteller Bedingungen *in vitro* oder Krankheiten *in vivo* im untersuchten Gewebe konstant in der gleichen Menge exprimiert wird. Bekannte und häufig eingesetzte Vertreter dieser Klasse sind z.B. β -Actin, GAPDH, Cyclophilin, 18S-rRNA, PBGD (Porphobilinogen Deaminase) und andere. Letzteres wurde in der vorliegenden Arbeit als Housekeeping-Gen benutzt. Eine Normierung auf diesen endogenen Standard hat den Vorteil, dass z.B. verschiedene reverse Transkription-Ansätze mit möglicherweise unterschiedlichen Effizienzen direkt miteinander verglichen werden und Pipettierfehler bei der Dosierung der RNA ausgeglichen werden können.

Das Expressionslevel der zu bestimmenden mRNA-Sequenz und der Sequenz des Housekeeping-Gens wird mit Hilfe von Standardkurven bestimmt. Dazu werden PCR-Fragmente benutzt, die die beim TaqMan-Assay amplifizierten Sequenzen enthalten. Es werden sieben serielle 1:10 Verdünnungen hergestellt, die auf jedem Assay des jeweiligen Gens als Standards bekannter Konzentration mitbestimmt werden. Die Zuordnung der Konzentrationen der Standards kann zwar absolut durch

die enthaltene Kopienanzahl (photometrisch bestimmt) erfolgen, im Falle der hier gewünschten Analyse, nämlich eines relativen Vergleiches verschiedener Behandlungsgruppen miteinander, können vereinfachend arbiträre Einheiten korrespondierend zum Verdünnungsgrad gewählt werden. Dem ersten Standard wird dementsprechend die Konzentration 1 zugeordnet, dem zweiten Standard die Konzentration 0,1 usw.

Trägt man die erhaltenen C_{DS} der Standards über den Logarithmus ihrer Konzentrationen auf, so erhält man eine Kalibriergerade, welche die Konzentrations- bzw. Expressionsbestimmung (E) der unbekanntenen Proben ermöglicht.

Die relative Expression (RE) des untersuchten Gens wird durch

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

berechnet.

Die erhaltenen Quotienten sind einheitenlos und haben keine reale Entsprechung. Die Werte eignen sich jedoch gut zum relativen Vergleich verschiedener Gruppen untereinander. Die Auswertung erfolgt, indem der Mittelwert der rE einer Kontrollgruppe als 100% definiert wird und die Mittelwerte der anderen Gruppen als Prozent der Kontrolle angegeben werden.

Die PCR-Reaktion ist in ihrer frühen exponentiellen Phase reproduzierbarer als an ihrem Endpunkt. Betrachtet man Amplifikationsplots von Wiederholungen derselben Probe, so erkennt man, dass die Kurven mit zunehmender Zyklenzahl im Bereich ihrer Sättigung immer mehr divergieren, während sie anfänglich praktisch perfekt übereinander liegen. Dies liegt an der exponentiellen Natur der PCR, durch die sich kleinere Schwankungen am Anfang der Reaktion im Laufe der Zeit zu immer größeren Effekten „aufschaukeln“ können. Je früher eine Auswertung der Amplifikationskurve erfolgt, desto präziser ist daher das Ergebnis.

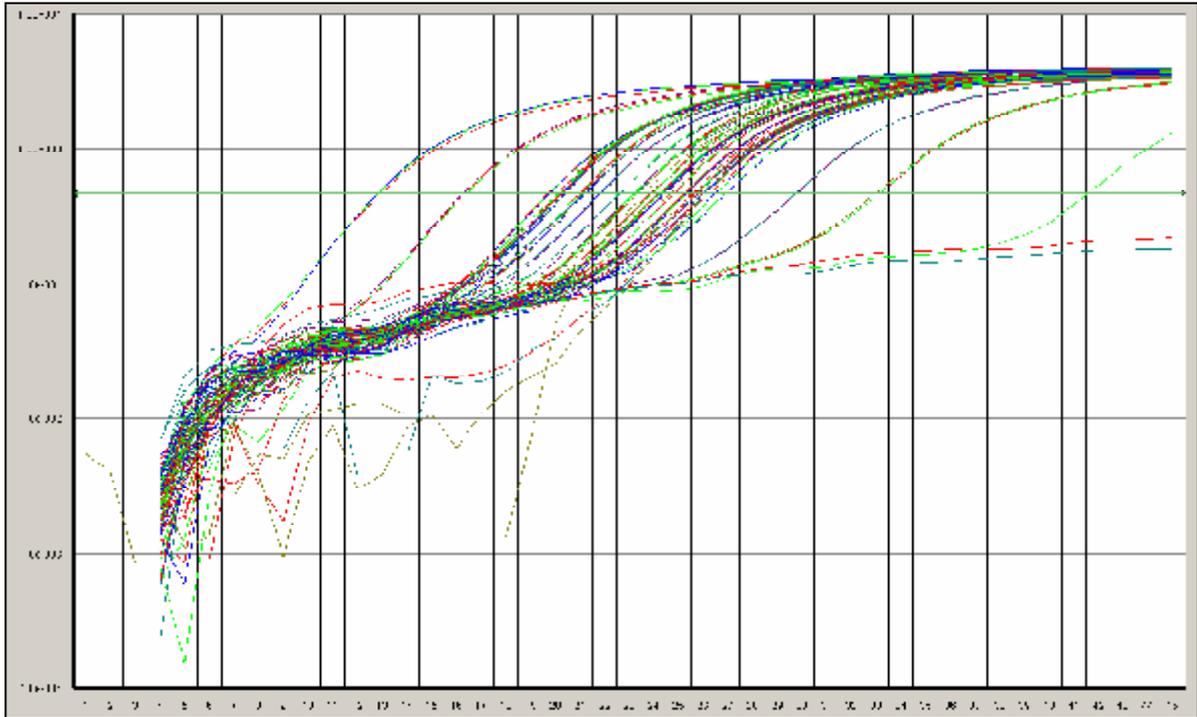


Abbildung 7: Screenshot eines Taqman-PCR-Laufs für ANP mit 45 aufeinander folgenden Zyklen. Die horizontale grüne Linie repräsentiert den Ct-Wert. Deutlich sichtbar ist der Verlauf der sieben Standardverdünnungen sowie die Leerkontrolle (mit einem Ausreisser) ganz rechts.

2.2.2.5 Primer-und Sondendesign (Programm Primer Express, Applied Biosystems)

Um aus der extrahierten RNA die gewünschten Abschnitte amplifizieren zu können, muss zunächst die für die Sequenz spezifische Sonde und dazu passende Primerpaare für die jeweilige Sequenz entworfen werden. Die Sequenz wird dazu zunächst einem so genannten „*alignment*“ unterzogen, d.h., mit allen bekannten Sequenzen des Genoms verglichen. Erst wenn sich keine Überschneidungen zeigen, kann sicher mit der ausgesuchten Sequenz gearbeitet werden. Es werden für die Methode der Taqman-PCR die Sonde sowie jeweils zwei Primerpaare benötigt: ein internes, nah an der Sequenz liegendes Paar, und ein externes, weiter entfernt liegendes Paar. Da diese Primer für die Methode spezifische Voraussetzungen erfüllen müssen, wird ein Programm (Primer Express) zum Design dieser Primer genutzt. Die gewählten Primer müssen zudem auf ihre einwandfreie Funktion für die Zielsequenz getestet werden.

Dazu dient ein Ansatz ohne Sonde, der die äußeren Primer testet, sowie ein weiterer Ansatz mit der Sonde, der die Spezifität der Sonde und der internen Taqman-Primer prüft. Beide Ansätze werden mittels einer Standard-PCR durchgeführt.

interner Primer(=Taqman-Primer)-

Test:

1µl cDNA
12,5µl Mastermix (Nukleotide und Taq-Polymerase)
2µl Primer forward
2µl Primer reverse
7,5µl H₂O

Die PCR erfolgt für 2 min bei 50°, für 10 min bei 95°. Anschließend folgen 45 Zyklen mit jeweils 15 s bei 95° und 1 min bei 60° C.

externer Primer(=Standard Primer)-

Test:

5µl Puffer
1µl Primer forward
1µl Primer reverse
5µl dNTP-Mix
1,5 µl MgCl₂
35 µl H₂O dest.
0,5 µl Taq-Polymerase

Die PCR erfolgt für 2 min bei 95°, dann in 30 Zyklen mit jeweils 30 s bei 95°, 30 s bei 65°, 40 s bei 72°, wobei die Temperatur in jedem Zyklus um 0,5 ° C gesenkt wird. Es folgen weitere 10 Zyklen mit 30 s bei 94°, 30 s bei 55° und 40 s bei 72°, abschließend ein Zyklus für 3 min bei 72° C.

Die Produkte werden auf ein Gel aufgetragen und fotografiert. Ist das Produkt als Bande deutlich zu sehen, funktionieren die Sonden und Primer.

Im nächsten Schritt wird der Standard als Grundlage der anschließenden Konzentrationsmessung mittels Taqman-PCR hergestellt.

Dazu wurde das im Primertest amplifizierte Produkt mittels des QIAquick PCR Purification Kit nach Protokoll von den Resten der PCR-Reaktion befreit.

Anschließend wurde der Standard in Zehnerpotenzen auf sieben verschiedene Konzentrationen verdünnt.

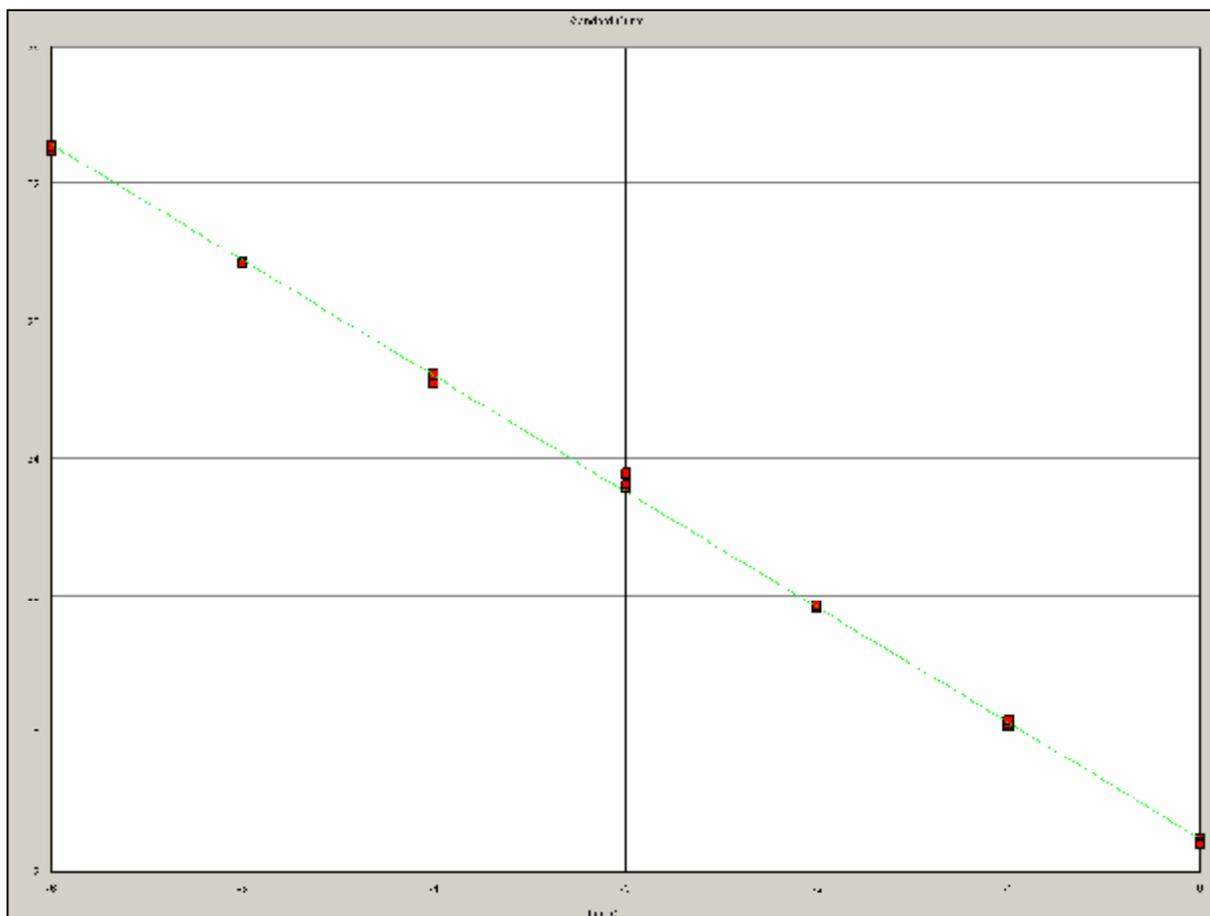


Abbildung 8: Logarithmische Darstellung der Standardkurve zur späteren Bestimmung der mRNA-Konzentration.

2.2.2.6 Bestimmung der mRNA-Konzentrationen mittels Taqman-PCR

Das Reaktionsgemisch für einen Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 μ l	cDNA-Probe
12,5 μ l	Mastermix (–Technologies)
0,075 μ l	Primer up (bei initialer Konzentration des Primersstocks von 100 μ M)
0,075 μ l	Primer down (bei initialer Konzentration des Primersstocks von 100 μ M)
0,05 μ l	Sonde (bei einer initialen Konzentration des Primerstocks von 100 μ M)
11,3 μ l	Aqua dest.

Die Reaktion wurde für jede cDNA-Probe dreifach durchgeführt, um eine höhere Genauigkeit der Ergebnisse zu erreichen, Pipettierfehler zu erkennen und die Fehlerrate zu minimieren. Auf einer 96-Well-Platte konnten also 32 Proben in dreifacher Ausführung in einem Durchgang untersucht werden.

2.2.3 Calciumtransportmessungen

2.2.3.1 Oxalat-abhängiger Calciumtransport über die Membran des sarkoplasmatischen Retikulums mittels SERCA2a

Homogenisation des Gewebes

Als Untersuchungsmaterial für die durchgeführten Messungen des Calciumtransportes dienten linksventrikuläre Homogenate. Bei der Homogenisation entstehen aus myozytären Membranen (diese beinhalten das Sarkolemm, das SR sowie mitochondriale Membranen mit den entsprechenden Regulatorproteinen) Membranfragmente. Das Homogenisationsmedium bewirkt dann thermodynamisch die spontane Bildung von Membranvesikeln. Jedes Vesikel bildet ein geschlossenes Kompartiment mit einer Membran und den entsprechenden Transportproteinen. Aufgrund dieser Vesikelbildung ist die Calciumflussmessung in Herzhomogenaten möglich. In Abhängigkeit von der gewählten Methode können dann sowohl Transportprozesse über das SR sowie über das Sarkolemm selektiv untersucht werden. [59] Bei 4 ° C wurden 20-30 mg tiefgefrorenes Myokard nach Zugabe des 30fachen Volumens an eiskaltem Homogenisationsmedium in einem Polykarbonröhrchen bei 2400 U/min mit Pausen von je 15 sec mit einem elektrischen Polytron-Dispergiergerät homogenisiert. Danach wurde das primäre Homogenat durch eine Polyamidgaze (Porenweite 140µm, Neolab. Heidelberg) filtriert um grössere Bindegewebsanteile zu entfernen. Der dabei entstandene Proteinverlust lag unter 5% des Gesamtproteins. Portionen von 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff bei -80 ° C gelagert.

Oxalatabhängige Calciumaufnahme

Die Bestimmung der Ca^{2+} -Aufnahme erfolgte mittels Millipore-Vakuum-Filtrationsmethode unter Einsatz von radioaktiv markiertem Calciumchlorid ($^{45}\text{CaCl}_2$) [75, 76]. Grundlage der Ca^{2+} -Transportmessungen ist das Prinzip der oxalatstimulierten Ca^{2+} -Aufnahme. Hierbei wird eine Probe des Homogenates mit einem Reaktionsmedium (siehe Tabelle) inkubiert, welches radioaktiv markiertes $^{45}\text{Ca}^{2+}$ enthält. Die freie Ca Konzentration wird mit Hilfe eines Ca/EGTA-Puffersystems eingestellt. Durch die in der Membran des SR lokalisierte Ca-ATPase SERCA2a werden unter ATP-Verbrauch Ca aus dem extravesikulären Raum in das Vesikellumen transportiert. Dieses Ca bindet dann im Inneren des Vesikels an

Oxalationen und bildet schwer lösliches Ca-Oxalat, das dort präzipitiert. Dadurch wird die freie Ca-Konzentration im Vesikel niedrig gehalten, was den Konzentrationsgradienten, gegen den die Ca-Pumpe Ca in den SR-Vesikel transportiert, wesentlich vermindert. Ausserdem wird der passive Ca-Efflux aus den SR-Vesikeln minimiert und bleibt dadurch vernachlässigbar klein. Durch diesen Oxalateffekt wird die in SR-Vesikeln transportierte Ca-Menge im Vergleich zur transportierten Ca-Menge ohne Oxalatzusatz um das 100fache gesteigert. Daher ist mit dieser Methode eine verlässliche Bestimmung des SR-Transports in Herzhomogenaten ohne eine aufwendige Präparation von SR-Membranfragmenten möglich.

Da in Herzhomogenaten auch nicht-SR-Membranfragmente mit anderen Ca^{2+} -Transportsystemen enthalten sind, wurden bei diesem Protokoll die Reaktionsbedingungen so gewählt, dass nur die SERCA2a das Calcium transportiert. Der Zusatz von 10nM NaN_3 diente als Hemmstoff der mitochondrialen CaATPase. Die Ausschaltung des NCX1 erfolgte durch das Arbeiten im Na-freien Milieu. Zur Einstellung der gewünschten freien Ca-Konzentration wurde die Zugabe von 5mM $^{45}\text{CaCl}_2$ variiert. Die EGTA-Konzentration betrug immer 200 μM (Ca7EGTA-Puffer)

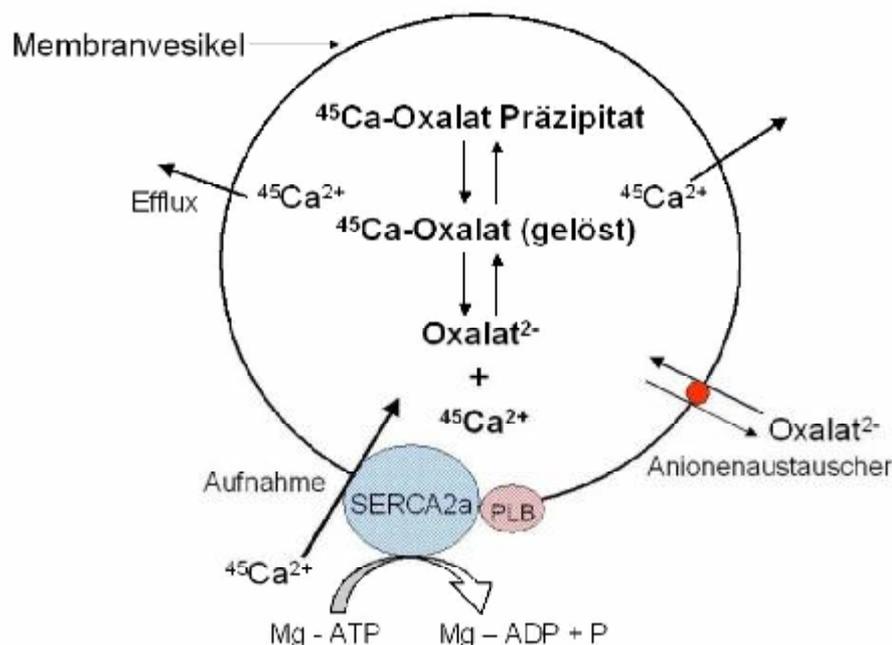


Abbildung 9: Prinzip der Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Aufnahme. Senkung der intravesikulären freien $[\text{Ca}^{2+}]$ durch Oxalatpräkzipitation. Dadurch arbeitet SERCA2a gegen einen niedrigeren Konzentrationsgradienten und es kommt somit zu einer Steigerung der aufgenommenen Ca^{2+} -Menge um den Faktor 100. Der passive Ca^{2+} -Efflux ist stark vermindert.

Die Ca-Aufnahme wurde durch Zugabe des Homogenates zum Reaktionsansatz gestartet. Der oxalatstimulierte Ca-Aufnahmeprozess wurde nach zwei Min wie folgt beendet: 150µl des Reaktionsmediums wurden auf einen Membranfilter (Sartorius, Porengrösse 0,45 µm) gegeben und vakuumfiltriert. Dadurch wurden die Vesikel von im Reaktionsmedium von im Reaktionsmedium befindlichem Ca, ATP und anderen Bestandteilen des Aufnahmemediums schlagartig getrennt. Durch sofortiges Spülen mit 2 mal 3 ml eiskalter Waschlösung (2 mM EGTA, 100mM KCl, 40mM Imidazol, pH 7,0) wurden eventuell noch laufende Ca-Transportvorgänge zusätzlich gestoppt. Die Waschlösung enthielt EGTA, welches das noch vorhandene Ca komplexiert und während der Filtration entfernt.

Die verbleibende filterassoziierte Ca-Menge entspricht der in den SR-Vesikeln durch die SR-Ca-ATPase transportierten Ca-Menge. Die Filter wurden in Szintillationsröhrchen überführt und bei 60° C für 30 min im Trockenschrank getrocknet. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Irgasafe Plus, Zinser Analytic) wurde die β -Strahlung als Maß für die filterassoziierte Ca-Menge im Flüssigkeitsszintillationszähler (Liquid Szintillation Analyzer, TRI-CARB 2200CA, Packard Bioscience, Dreieich) gemessen. Der Variationskoeffizient der Methode liegt bei <5%. Routinemässig wurden Doppelbestimmungen bei zwei verschiedenen freien Ca-Konzentrationen durchgeführt.

2.2.3.2 Natrium-abhängiger Calciumtransport über den NCX1

Die Präparation der Membranen erfolgte analog zu der für die oxalatabhängige Ca-Aufnahme.

Im ersten Schritt erfolgte die Anreicherung der Membranvesikel mit Na^+ , ein Kontrollansatz wurde mit K^+ beladen.

Die isolierten Membranen wurden dazu bei 30° C für 30 min in einer Lösung aus 160 mMol NaCl, 250mMol Saccharose und 20mMol Trisacetat-Puffer (pH 7,4) inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 5 µl der Na^+ -beladenen Membranvesikel am oberen Rand eines Eppendorfröhrchens aufgebracht, dass das Reaktionsmedium aus 150mMol KCl, 250mMol Saccharose, 5µM Valinomycin, 50µMol radioaktiv markiertem CaCl_2 sowie 20mMol Trisacetatpuffer enthielt. Die Reaktion wurde dann bei 37°C durch schnelles Vortexen des Röhrchens initiiert.

Der Abbruch der Reaktion erfolgte nach 2 Sekunden durch die schnelle Zugabe von LaCl_3 . Anschließend wurde der Reaktionsansatz in 3 ml eiskalter Pufferlösung

(160mMol KCl, 250mMol Saccharose, 1mMol LaCl₃, 20mMol Trisacetat pH 7,4) gewaschen und die Membranen über einen 0,45µm dünnen Nitrozellulosefilter vakuumfiltriert. Zwei weitere Waschvorgänge wurden durchgeführt, um überschüssiges Calcium entfernen.

Die verbleibende, filterassoziierte Ca-Menge entsprach der in den sarkolemmalen Vesikeln durch den NCX1 transportierten Ca-Menge.

Die Filter wurden anschließend in Szintillationsröhrchen überführt und bei 60° C für 30 min im Trockenschrank getrocknet. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Irgasafe Plus, Zinser Analytic) wurde die β-Strahlung als Maß für die filterassoziierte Ca-Menge im Flüssigkeitsszintillationszähler (Liquid Szintillation Analyzer, TRI-CARB 2200CA, Packard Bioscience, Dreieich) gemessen. [77, 78] [79]

2.2.4 Statistische Analyse

Die Auswertung der experimentell erhobenen Daten erfolgte mit SPSS 11.0 für Windows, der Firma SPSS Inc. Alle Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes (mean \pm SEM) angegeben, da der SEM sich besonders für Untersuchungen an kleineren Gruppengrößen bewährt hat. Die statistische Analyse erfolgte durch den nicht-parametrischen Mann-Whitney Test mit anschließender Adjustierung nach Bonferroni. Unterschiede wurden bei einem $p < 0,05$ als signifikant angenommen. Für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Sigmaplot 8.0 für Windows, der Firma SPSS Inc., verwendet.

2.2.5 Gruppeneinteilung und Studiendesign

Im Alter von 12 Wochen wurden insgesamt 53 MWF – Ratten sowie 50 Wistarratten randomisiert und den Eingriffen zugeteilt. So konnten vier Gruppen mit stufenweise abnehmender Nephronanzahl gebildet werden. Zwei weitere Gruppen mit 5/6-Nx erhielten postoperativ einen ACE-Hemmer.

W-Ko:	gesunde, kontrolloperierte Wistartiere
MWF-Ko:	gesunde, kontrolloperierte MWF-Tiere
W-Nx:	in Woche 12 5/6-nephrektomierte Wistartiere
MWF-Nx:	in Woche 12 5/6-nephrektomierte MWF-Tiere
W-NxACE:	in Woche 12 5/6-nephrektomierte Wistartiere unter postoperativer Ramipriltherapie
MWF-NxACE:	in Woche 12 5/6-nephrektomierte MWF-Tiere unter postoperativer Ramipriltherapie

Die Durchführung der 5/6-Nx bzw. Kontrolloperation erfolgte in der 12. Lebenswoche. Die Untersuchungen wurden nach der 16. Lebenswoche, also vier Wochen postoperativ durchgeführt.