

2. Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl molekularbiologische als auch physiologische Methoden verwendet. Der molekularbiologische Teil bestand aus der Gewinnung von Rattennierengewebe mit nachfolgender RNA-Extraktion, der DNA-Herstellung, der Vervielfältigung dieser DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction) und der Längen- und Sequenzidentifikation der vervielfältigten DNA durch Gelelektrophorese und Sequenzierung. Der physiologische Teil dieser Arbeit bestand aus Isolation der Rattenniere und nachfolgender Perfusion mit oxygenierter physiologischer Lösung, wobei verschiedene Purinrezeptoragonisten, Purinrezeptorantagonisten und Testsubstanzen appliziert wurden. Die Perfusionsdruckänderungen wurden dabei mit Hilfe eines Schreibers permanent registriert.

Im folgenden sollen diese Methoden näher beschrieben werden.

2.1 Expressionsuntersuchungen

2.1.1 Gewebegewinnung und RNA-Extraktion

Zur Gewebegewinnung wurden männliche 3-6 Monate alte Wistar-Kyoto-Ratten mit einem Gewicht von 250-350 g verwandt. Die Ratten wurden durch eine intraperitoneal applizierte Überdosis von Urethan (1,4g/kg KG) getötet. Anschließend wurde die Bauchhöhle mit einem Unterbauch-Medianschnitt eröffnet. Die Bauchdecke wurde dann Y-förmig zur rechten und linken Seite bis unter die Rippenbögen aufgeschnitten. Die linke Nierenarterie wurde vorsichtig vom umliegenden Binde- und Fettgewebe isoliert, und es wurde eine Ligatur platziert. Nach der Nephrektomie wurde Nierenmark und -rinde unter mikroskopischer Sicht (40 x Vergrößerung) voneinander getrennt. Die Proben wurden in sterile Reaktionsgefäße überführt und mit flüssigem Stickstoff zur Konservierung der

RNA tiefgefroren. Die RNA wurde mit Hilfe Guanidiniumthiozyanat-Phenol-Chloroform-Einschritt-Extraktion durchgeführt, wobei die Substanz Trizol (Life Technologies) verwandt wurde.

200 mg Gewebe wurden in 4 ml Trizol homogenisiert (1ml Trizol pro 50 mg Gewebe), und es wurden 800 µl Chloroform hinzugegeben, welches für 15 Sekunden geschüttelt (0,2 µl pro 1 ml Trizol) wurde. Daraufhin mußten die Proben ca. 2-3 Minuten stehengelassen und nochmals 15 Sekunden geschüttelt werden. Anschließend zentrifugierte man die Proben bei 11800 g für 15 Minuten bei einer Temperatur von 4°C, wobei ein Festwinkelrotor verwandt wurde (Zentrifuge der Firma Hermle Z 323K). Hierbei entstand eine obere wäßrige Phase, die abpipettiert und in ein neues Gefäß gegeben wurde. In dieses wurden 2 ml Isopropanol hinzugefügt (0,5 ml pro 1 ml eingesetztem Trizol) und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde bei 12000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nun sollte sich auf dem Boden des Reaktionsgefäßes ein Pellet bilden. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen. Im Rahmen des zweimaligen Waschvorganges wurde das Sediment jeweils nach Gabe von 4 ml Ethanol (70%), welches nach jedem Waschvorgang abgegossen wurde, bei 7500 g für 5 Minuten gewaschen (1 ml Ethanol pro 1ml eingesetztem Trizol). Das entstandene Sediment, welches der extrahierten RNA entsprach, wurde nun bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 50 µl sterilem RNase-freiem H₂O aufgelöst. Dieses RNA-Extrakt konnte nun bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C im Kühlschrank gelagert werden.

Zur Vermessung der RNA-Menge wurden 2 µl des RNA-Extraktes mit 78 µl sterilem Wasser versetzt. Die RNA-Menge dieser Probe konnte nach Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) durch ein Photometer (Eppendorf 206) errechnet werden:

RNA-Konzentration (µg/µl) = $A_{260} \times 80 \text{ µl}$ (Gesamtvolumen der vermessenen Probe) / (20 x eingesetztes Testvolumen). Der RNA-

Korrekturfaktor entspricht 80% der vermessenen A_{260} für DNA, so daß nach folgender Formel die Konzentration der extrahierten RNA errechnet werden kann:

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 1,6.$$

Die Reinheit der RNA wurde mit Hilfe des Quotienten von A_{280} zu A_{260} bestimmt. Für RNA liegt der Quotient zwischen 1,6 - 1,8.

2.1.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese bietet eine Möglichkeit, RNA oder ein Endprodukt der PCR optisch direkt nachzuweisen. Sie besteht darin, eine kleine Menge der zu bestimmenden Probe auf einem Agarosegel aufzutrennen. Das 2%-ige Agarosegel wurde mit Ethidiumbromid, einem Fluoreszenzfarbstoff, der mit RNA oder DNA (PCR-Produkt) interkaliert, versetzt. Zur Größenbestimmung der RNA bzw. PCR-Produkte wurden zusätzlich 10 μl eines 100-bp-Marker in einer nebenliegenden Gelkammer auf dem Agarosegel aufgetragen. Daraufhin wurden 3 μl der RNA-Probe mit 3 μl Gelladungspuffer (1 Teil Gelladungspuffer mit 5 Anteilen H_2O) und 4 μl sterilem H_2O versetzt. Für das PCR-Produkt galt es, ein Gemisch aus 9 μl der DNA, versetzt mit 1 μl Gelladungspuffer (1:5), in die Kammern aufzutragen. Nun wurde in der Agarosegelkammer eine Spannung von 100 Volt für 60 Minuten angelegt. Anschließend konnten die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Eine Photographie des Gels dokumentierte die experimentellen Ergebnisse.

2.1.3 DNA-Herstellung durch reverse Transkription (RT)

Zur Gewinnung der DNA mußte die zuvor extrahierte RNA einer reversen Transkription unterzogen werden. Diese wurde hierbei mit Hilfe einer Mulv-Transkriptase durchgeführt. Die hier eingesetzte RNA-Menge war abhängig von deren Konzentration. Das eingesetzte Volumen mußte so gewählt werden, daß eine Menge von 2 µg RNA erreicht wurde.

Zunächst wurde 2 µg RNA mit 2,5 µl Random Hexamers (200 pmol/2 µg) versetzt und anschließend auf 15µl mit H₂O (steril, Nuclease-frei) aufgefüllt. Diese Probe wurde nun auf 72°C für 5 Minuten zwecks Zerstörung von Sekundärstrukturen in der RNA und einer Effektivitätssteigerung der reversen Transkriptase erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin auf Eis gelegt, um erneute Sekundärstrukturbildungen zu verhindern. Nun wurden die Proben noch einmal kurz zentrifugiert. Danach mußte der RT-Master-Mix hergestellt werden. Hierzu wurde ein Gemisch aus 5 µl 5-fach Mulv-reverse-Transkriptase Puffer (bestehend aus 50mM Tris-HCl [pH 8,3], 1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 0,1 M NaCl, 5 mM DTT) 1,5 µl dNTP (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 µl RNasin (25 units/2 µg RNA) und 1 µl Mu-MLV reverse Transkriptase (20 units/µl) zusammengestellt. Der Master-Mix wurde nun mit 2 µl nukleasefreiem H₂O versetzt und kurz geschüttelt. Der fertige Master-Mix konnte jetzt der RNA zugesetzt werden. Anschließend wurde die RNA bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Am Ende mußten die Proben bei 95°C für 5 Minuten erhitzt werden, um die Wirkung der Mulv-reverse-Transkriptase aufzuheben. Die entstandene DNA konnte nun für die folgende DNA-Vervielfältigung mittels PCR benutzt werden.

Mit Hilfe einer PCR mit β-Actin-Primern wurde überprüft, ob die erhaltene DNA aus der vorangegangenen Reversen Transkription funktionell ist (Raff et al., 1997).

Der β -Actin-Primer und die PCR-Bedingungen wurden von van der Giet und Mitarbeitern bereits auf Funktionstüchtigkeit ausgetestet. Die Primersequenzen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: verwandte Primer mit Primersequenzen

Primer		Sequenz	Fragmentlänge
P2X1	Forward	5'-CTT CTT CGT GAG GCT GAG AA-3'	488 bp
	Reverse	5'-CCA ATC CCA GAA CCG ATA G-3'	
P2X2	Forward	5'-CTG CCT CCT CAG GCT ACA ACT TCA -3'	273 bp
	Reverse	5'-GAG TAC GCA CCT TGT CGA ACT TCT -3'	
P2X3	Forward	5'-AAT GCA AGG ATT CTG TCC AGA G-3'	634 bp
	Reverse	5'-AGC GTT CCC ATA TAC CAG CA-3'	
P2X4	Forward	5'-GAC CAA CAT GAT TGT CAC CG-3'	571 bp
	Reverse	5'-GTA GCC AGG AGA CAC ATT GTG TT-3'	
P2X5	Forward	5'-CGC TGG GGA GTC TGT TGT AG-3'	701 bp
	Reverse	5'-TCT CGG TAA AAC TCA CTC-3'	
P2X6	Forward	5'-CTG CAG CTC GGA GTG GTA G-3'	518 bp
	Reverse	5'-TAA GGC ATT GGT TCT GGA GAA-3'	
P2X7	Forward	5'-GGG GAC ATC TTC CAG GAA AT-3'	549 bp
	Reverse	5'-CTG GTC CAC CAT CCA AAT GT-3'	
β-actin	Forward	5'-TAC AAC CTC CTT GCA GCT CC-3'	630 bp
	Reverse	5'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CTG TC-3'	

2.1.4 DNA-Vervielfältigung durch PCR und PCR-Optimierung

Die PCR ist eine molekularbiologische in-vitro Methode zur Vervielfältigung von definierten Ziel-DNA-Sequenzen. Man kann mit ihr eine oder mehrere bestimmte Ziel-DNA-Sequenzen aus einer heterogenen Kollektion von DNA-Sequenzen selektiv vermehren. Als Ausgangsmaterial diente in der vorliegenden Arbeit DNA aus zuvor revers transkribierter RNA, die ihrerseits wiederum aus der Rattenniere extrahiert wurde.

Der erste Schritt war die Gabe von 2 Oligonukleotidprimern (forward und reverse Primer, jeweils 10 μ M), sogenannten Amplimeren, zu einer denaturierten genomischen DNA. Diese Primer sind in der Lage, spezifisch an komplementäre Sequenzen

zu binden, die die gesuchte DNA-Region einrahmen. Durch Zugabe von 0,75 Einheiten hitzestabiler DNA-Polymerase von *thermus aquaticus* (taq), der vier Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP, jeweils 2,5 mM, eines 10-fach-Puffers (bestehend aus 500 mM KCl, 100 mM TrisHCl, 1,0% Triton X-100), MgCl₂ (25 mM) und eine der Optimierung entsprechenden Menge an sterilem H₂O, sind die Amplimere in der Lage, die Synthese neuer DNA-Stränge zu starten. Dabei sind die neuen DNA-Stränge komplementär zu der gesuchten Zielsequenz. Um eine optimale Darstellung der gesuchten DNA zu gewährleisten, mußte die DNA vervielfältigt werden. Dazu diente ein Cyclor (Techne Genius), mit dessen Hilfe man in 30 Zyklen ca. 10⁵ Kopien des gewünschten PCR-Produkts erhielt. Vor Beginn der 30 Zyklen erfolgte eine einmalige Anheizphase zur initialen Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C für 3 Minuten. Ein Zyklus bestand aus Renaturierung (annealing) bei 55°C für 60 Sekunden, in der die Bindung des Primers an die denaturierte Matrize erfolgte, der Verlängerung des Primers (extension = DNA-Synthese) bei 72°C für 60 Sekunden und der Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, das heißt der Trennung der neu synthetisierten komplementären DNA-Stränge. Nach Abschluß der 30 Zyklen erfolgte eine Abkühlungszeit auf 4°C für 3 Minuten. Anschließend wurde mit diesem PCR-Produkt eine Gelelektrophorese für 60 Minuten bei 100 Volt durchgeführt. Die vervielfältigte DNA zeigte sich unter UV-Licht nun als diskrete Bande einer bestimmten Größe.

Die PCR-Optimierung ist ein Vorgang, mit der man die optimalen Konzentrationsverhältnisse der zur PCR verwendeten Substanzen für einen bestimmten Primer bestimmen kann. Dazu wurden in dieser Arbeit vier Mastermix-Proben angesetzt, die sich in der MgCl₂-, Primer-, dNTP- und H₂O-Menge unterschieden. Das Volumen einer Mastermix-Probe wurde dann auf 13 PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt, so daß man 52 Proben erhielt, und die restlichen Substanzen wurden entsprechend der Tabelle 4 hinzugefügt. Dann

wurde die DNA der einzelnen Proben analog zum oben beschriebenen Vorgang mit dem Cyclor vervielfältigt und mittels Gelelektrophorese unter UV-Licht analysiert. Die Probe mit der optimalen Zusammensetzung sollte nur eine Bande bei der gewünschten Fragmentgröße zeigen. Um die Expression dieser singulären Bande weiter zu verstärken und Artefakte auszulöschen, wurde nun für diese Probenzusammensetzung das optimale Temperaturprofil der Primer im Cyclor eruiert. Dies geschah durch Änderungen der Renaturierungs-(annealing) temperatur. Für die Primer, die in der vorliegenden Arbeit benutzt wurden, lag diese, je nach Primerpaar, zwischen 55°C und 61°C.

2.1.5 DNA-Isolation

Zur Isolation des zu klonierenden DNA-Fragments benötigte man ein sogenanntes Low-Melting Agarosegel (1%-ig). Dieses besteht aus einer Agarose mit einer niedrigeren Schmelztemperatur als die zur konventionellen Gelelektrophorese verwendete Agarose. Das zuvor aus der PCR gewonnene Produkt wurde nun zur Gelelektrophorese bei einer Spannung von 60 Volt für 100 Minuten auf dem Low-Melting Gel aufgetragen. Anschließend wurde das Gelstück, welches die Bande enthielt, mit einem sterilisierten Skalpell ausgeschnitten. Dieses Gelstück wurde anschließend in ein RNase- und DNase-freies Reaktionsgefäß (New England Biolabs) überführt und 2-mal für je 30 Minuten mit 2-fachem Volumen des Gelstücks mit Agarase I-Puffer auf Eis gewaschen. Das Gel wurde nun bei 65°C für 10 Minuten geschmolzen. Dann mußte die geschmolzene Agarose innerhalb von 10 Minuten auf 40°C abgekühlt werden. Anschließend wurde 1 Unit β -Agarase pro 200 μ l Agarose hinzugegeben und 1 Stunde inkubiert. Danach wurde diese Probe mit 5 M NaCl-Lösung auf eine 0,5 M NaCl-Konzentration eingestellt. Die gleiche Menge Isopropanol mußte nun hinzugegeben und für 15 Minuten auf Eis gelagert werden. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 15000 g. Der Überstand wurde zur Weiterverarbeitung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun fügte man ein 2-Faches der überführten Menge an Isopropanol hinzu. Diese Gemisch wurde für 30 Minuten auf Eis gelagert und anschließend 15 Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Danach konnte der Überstand verworfen und das entstandene Sediment getrocknet werden. Nach der Resuspendierung des Sedimentes in 20 μ l sterilem H₂O wurde die DNA mittels des Photometers vermessen. Das Fragment aus der isolierten DNA war jetzt zur anschließenden Ligation vorbereitet.

2.1.6 Klonierung

Die Klonierung, d.h. die selektive Vermehrung eines gewünschten DNA-Fragments, besteht aus der Verbindung eines gewünschten DNA-Fragments mit unabhängig replizierenden DNA-Sequenzen (Ligation) und der Übertragung der hybriden DNA-Fragmente in geeignete Wirtszellen (Transformation), in denen sie selektiv vervielfältigt werden können (Vermehrung).

Ligation des Fragmentes in den pGem-T Vektor

Da das durch die DNA-Isolation aufgereinigte Fragment keinen eigenen Replikationsursprung hat, wurde das Prinzip der Ligation angewandt. Dies ist die Koppelung eines gewünschten DNA-Fragmentes (Insert) mit einem sogenannten Replikon, von dem die Replikation ihren Ursprung nimmt. Diese zur Klonierung verwendeten Replikons bezeichnet man auch als Vektoren.

Die Ligation wurde in einem RNase- und DNase-freiem Reaktionsgefäß (0,5 ml) durchgeführt. Die zuzuführende DNA-Menge aus der vorangegangenen PCR war abhängig von der Länge des gesuchten Fragments, in diesem Falle 634 bp. Entsprechend der Anleitung des Herstellers des Ligationkits (pGem-T Vektor der Firma Promega, 50 ng DNA/3000 bp) ergab dies eine zuzuführende DNA-Menge von 10,5 ng. Es wurden 5 µl eines 2-fach konzentrierten Rapid Ligations Puffers, 1 µl pGem-T Vektor, 1 µl T4-DNA-Ligase und zum Erreichen des Endvolumens von 10 µl steriles H₂O hinzugefügt.

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch zur Inkubation über Nacht im Kühlschrank bei +4°C gelagert, um eine effiziente Ligation zu erreichen.

Transformation

Der mit dem DNA-Fragment ligierte Vektor konnte nun in kompetente Zellen, den Wirtszellen, transformiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden hierzu *Escherichia coli* (Stratagene) benutzt. Die ligierten Vektoren wurden in die

Plasmide der Bakterien eingefügt, um sich mit diesen zu replizieren. Hierzu wurden 2 µl des ligierten Produktes in ein 1,5 ml steriles Reaktionsgefäß gegeben. Die kompetenten Zellen mußten nun von -70°C auf Eis aufgetaut werden. Anschließend wurden 50 µl dieser kompetenten Zellen auf den ligierten Vektor in das Gefäß pipettiert. Nach leichtem Umrühren wurden die Reaktionsgefäße für 20 Minuten auf Eis gelegt. Dieses Gemisch wurde dann exakt bei 42°C für 45 sec inkubiert und anschließend direkt wieder auf Eis gestellt. Jetzt wurden 950 µl SOC-Medium hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 1,5 Stunden bei 150 Umdrehungen/min und einer Temperatur von 37°C in einem Inkubationsschüttler (Inkubator Heidolph Unimax 1010). Danach wurden 100 ml dieses Mixes auf LB/Ampicillin/X-Gal/IPTG-Agarplatten ausplattiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation dieser Platten bei 37°C über Nacht.

Um die zuvor genannten LB/Ampicillin/X-Gal/IPTG-Agarplatten zu erzeugen, wurden zu Beginn zu 1 l LB-Medium 12 g Agar hinzugefügt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde sterifiltriertes Ampicillin (50 µg/ml) hinzugegeben. Die Platten konnten nun in Petrischalen (6,5 cm Durchmesser) gegossen und nach Aushärten bei 4°C gelagert werden. Vor dem Gebrauch mußten die Agarplatten mit 100 µl Isopropyl-β-thiogalaktopyranosidase (IPTG, 100 mM) und 20 µl 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal, 50 mg/ml) eingerieben werden. Anschließend wurden diese bei 37°C für 45 Minuten bei leicht geöffneten Platten zum Antrocknen gelagert.

Vermehrung des DNA-Fragments

Nach erfolgreicher Inkubation konnten die Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen werden. Diese wurden anschließend in ein mit 5 ml gefülltes LB-Ampicillin-Medium Falcon-Tube (15 ml) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation diese Tubes bei 37°C und 225 rpm über Nacht in dem Inkubator Heidolph Unimax 1010. Am nächsten Tag wurde eine DNA-Mini-

Präparation mit Hilfe des WizardTM Plus Minipres DNA-Purifikation-Systems (Promega, Mannheim) durchgeführt. Zunächst wurden die über Nacht inkubierten Zellen für 10 Minuten bei 10000 g pelletiert, deren Medium anschließend entfernt wurde. Dann fügte man 300 µl Zell-Lysis-Puffer zur Auflösung der Zellwände hinzu. Dieses Gemisch wurde innerhalb 5 Minuten mehrfach über Kopf gekippt. Es wurden 300 µl Neutralisationspuffer hinzugegeben, das daraufhin erneut mehrmals über Kopf gekippt wurde. Das Lysat konnte jetzt für 5 Minuten bei 10000 g zentrifugiert werden. Eine 2 ml Luer-Lock-Spritze wurde ohne Stempel auf die Wizard-Minicolumn aufgesetzt und 1 ml des Wizard Miniprep DNA-Purifikation-Harzes in die Spritze hereinpipettiert. Der Überstand des Zellysats, welche die replizierten Plasmide mit den ligierten Vektoren enthielt, konnte nun in die Spritze mit dem DNA-Harz hinzugefügt werden. Der Stempel wurde aufgesetzt und das Gemisch DNA-Resin/Lysat langsam durch den Filter gepresst. Die Spritze konnte abgenommen und erneut stempellos aufgesetzt werden. Anschließend füllte man 2 ml der Waschlösung in die Spritze und presste diese durch den Filter. Um den Filter zu trocknen, wurde dieser in ein neues 1,5 ml steriles Reaktionsgefäß gesetzt und bei 10000 g für 2 Minuten getrocknet. Zuletzt legte man diesen Filter in ein neues steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß und fügte 50 µl steriles H₂O hinzu, das nach 1 Minute Inkubationszeit erneut bei 10000 g für 20 sec zentrifugiert wurde. Die zuvor in dem Filter befindliche DNA war nun in dem Ausgewaschenen enthalten und konnte bei -20°C aufbewahrt werden.

2.1.7 Sequenzierung

Um das klonierte DNA-Fragment im folgenden zu sequenzieren, mußte zuvor eine PCR mit anschließender DNA-Fällung durchgeführt werden. Hierzu wurde ein Gemisch mit einem Gesamtvolumen von 20 µl für die PCR angesetzt. 500 ng DNA wurde mit 10 pmol Forward Primer und 4 µl Sequenziermix, bestehend aus Taq-Polymerase, 10-fach konzentriertem Puffer und dNTPs, versetzt. Das Gemisch wurde mit sterilem H₂O auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Das Temperaturprofil der PCR war dem der PCR-Optimierung ähnlich: Anheizzeit (120 Sekunden) bei 96°C, Annealing und Extension (4 Minuten) bei 60°C (+1 s / cycle), Denaturierung (30 Sekunden) bei 96°C. Annealing, Extension und Denaturierung wurden 30 mal durchgeführt. Nach erfolgter PCR wurde eine DNA-Fällung durchgeführt, indem dieser PCR-Probe 2 µl Na-Acetat (3 M, pH 4,6) und anschließend 50 µl Ethanol (95%) hinzugegeben wurde. Dieses Gemisch wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 30 Minuten bei 14000 g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Sediment musste zuletzt mit 300 µl EtOH (70%) gewaschen werden.

Jetzt konnte das klonierte DNA-Fragment der Sequenzierung unterzogen werden, welches durch das Institut für Physiologische Chemie, Ruhr-Universität Bochum, mittels eines ABI 377-DNA-Sequenzers durchgeführt wurde.

2.2 Physiologie

2.2.1 Präparation zur Isolierung der Rattenniere

Für alle Versuche wurden männliche 3-6 Monate alte Wistar-Kyoto Ratten mit einem Gewicht von 250-350 g verwandt. Zunächst wurden die Tiere mit einer intraperitoneal gegebenen Überdosis von Urethan (1,4 g/kg KG) getötet. Anschließend wurde die Bauchhöhle mit einem Unterbauch-Medianschnitt eröffnet und die Bauchdecke dann Y-förmig zur rechten und linken Seite bis unter die Rippenbögen aufgeschnitten. Die Bauchaorta und die linke Nierenarterie wurden vorsichtig vom umliegenden Binde- und Fettgewebe isoliert. Dann wurden Ligaturen an der infrarenalen Bauchaorta und der linken Nierenarterie platziert. Zwischen Nierenarterienabgang und Aortenligatur wurde nun die Aorta mit einer Klemme verschlossen. Die distal gelegene Aorta wurde dann mit einer kleinen Schere eröffnet und ein Katheter (5,1 cm lang, 1,1 mm Außendurchmesser, 0,75 mm Innendurchmesser, Firma Baxter) vorsichtig eingeführt. Danach wurde die Aortenligatur geschlossen, die proximal gelegene Gefäßklemme gelöst, und durch den Katheter wurden 500 i.E. Heparin injiziert, um das Rattenblut gerinnungsunfähig zu machen, damit sich keine Thromben in der Niere bilden. Der Katheter wurde dann langsam mit geringem Druck in die linke Nierenarterie vorgeschoben und die zweite Ligatur geschlossen. Sofort wurde die Niere herausgetrennt und an das Perfusionssystem angeschlossen, damit die Niere mit auf 37°C erwärmter und oxygenierter Tyrodelösung perfundiert werden konnte.

Die Nummer zur Genehmigung bzgl. tierexperimenteller Versuche vom 09.1.1991 lautet 26.0834(9/91).

2.2.2 Aufbau und Testung der Funktion des Perfusionssystems

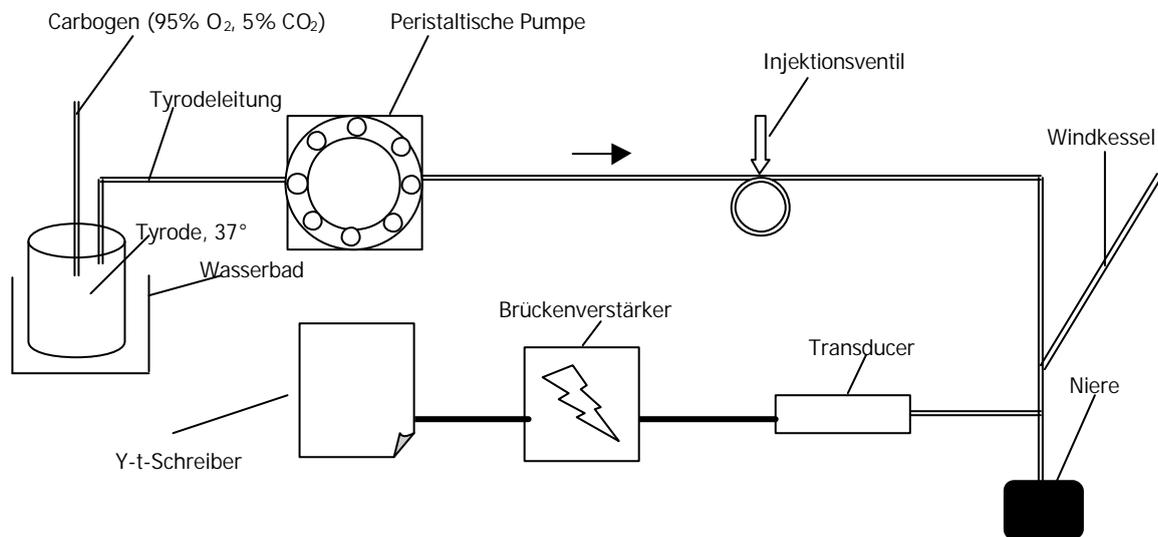


Abbildung 1: Schematische Darstellung der isolierten perfundierten Rattenniere;

Die mit Carbogen begaste und in einem Wasserbad erhitzte Tyrode wurde durch eine peristaltische Pumpe an einem Injektionsventil vorbei in die isolierte perfundierte Rattenniere gepumpt. Das Injektionsventil konnte so umgeschaltet werden, daß man Substanzen in Bolusform in die Niere applizieren konnte. Ein parallel geschalteter Windkessel bewirkte eine relativ konstante Perfusion der Niere. Ebenfalls parallel geschaltet wurde die Leitung zum Transducer, der die Druckänderungen in der Niere in elektrische Signale umwandelte. Diese Signale wurden durch einen Brückenverstärker verstärkt und mit einem Y-t-Schreiber aufgezeichnet.

Abbildung 1 zeigt einen schematischen Aufbau der isolierten perfundierten Rattennierenapparatur. Tyrodelösung (siehe Tabelle 5) wurde so erhitzt, daß die in der isolierten Rattenniere ankommende Lösung eine Temperatur von 37°C aufwies. Die Tyrodelösung wurde mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begast. Anschließend wurde die Lösung durch eine peristaltische Pumpe zur isolierten Niere mit einer konstanten

Flußrate von 8 ml/Minute gepumpt. Zwischen Peristaltikpumpe und isolierter perfundierter Rattenniere wurde ein Injektionsventil eingefügt, um Testsubstanzen applizieren zu können (100 µl). Außerdem wurde an einem Seitenarm zwischen Injektionsventil und isolierter perfundierter Rattenniere ein Gould-Transducer (Statham-Element P23Gb, Firma Siemens) eingefügt, der die Änderung des Perfusionsdrucks (mm Hg) im Nierenperfusionssystem messen konnte. Die Signale des Statham-Elements wurden mit Hilfe eines Brückenverstärkers (Firma Hugo Sachs) verarbeitet und auf einem Y-t-Schreiber (Polygraph der Firma Rikadenki) aufgezeichnet.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung (pH 7,4)

Komponente	Konzentration (mM)
NaCl	137
KCl	2,7
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	1,1
NaHCO ₃	12
NaH ₂ PO ₂	0,42
Glukose	5,6

Nach dem Anschluß der Niere an das Perfusionssystem wurde zunächst 30 Minuten gewartet, bis die Niere einen konstanten Perfusionsdruck aufgebaut hatte. Danach wurden die vasoaktiven Agonisten α, β -meATP (10^{-7} mol), Angiotensin II (10^{-8} mol), Ap₆A (10^{-7} mol) und Ap₆G (10^{-7} mol) (Testkaskade) als Bolusinjektionen (100 µl) appliziert, um die Reaktion der Niere auf vasoaktive Substanzen zu überprüfen. In Bolusform applizierte Tyrode löste keine Reaktion aus.

2.2.3 Durchführung der Nierenversuche

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Dauerperfusionen mit Suramin, einem unspezifischen P₂-Rezeptorantagonisten, Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS), einem spezifischen P_{2X}-Rezeptorantagonisten und 8,8-Carbonylbis(imino-3,1-phenylencarbonylimino)bis(1,3,5-naphtalentrisulfonsäure) (NF023), einem Suramin-Analagon, welches in der Lage ist, die Wirkung von ATP an dem P_{2X₁}-Rezeptor in einer 10-fach niedrigeren Konzentration zu antagonisieren als den P_{2X₃}-Rezeptor (Soto et al., 1999), durchgeführt. Diese Antagonisten-Versuche wurden als sogenannte Schild-Plots durchgeführt. Dies sind Dosis-Wirkungs-Versuche, bei denen die Dauerperfusionskonzentrationen des Antagonisten stufenweise gesteigert werden (siehe Abbildung 2). Vor und nach jedem Schild-Plot, sowie während jeder einzelnen Konzentration des Antagonisten, wurden in die Agonisten α,β -meATP (10^{-7} mol), Angiotensin II (10^{-8} mol), Ap₆A (10^{-7} mol) und Ap₆G (10^{-7} mol) (Testkaskade) in Bolusform (100 μ l) appliziert. Die verwendeten Konzentrationsbereiche unterschieden sich bei den einzelnen Antagonisten (siehe Abbildung 2). Jede Dauerperfusion dauerte mindestens 20 Minuten, und vor jeder Testkaskade wurde die Niere mit der jeweiligen Antagonistenkonzentration mindestens 5 Minuten perfundiert. Aufgrund der Desensitisierung von P_{2X}-Rezeptoren durch α,β -meATP, Ap₆A und Ap₆G mußten zwischen den Bolusapplikationen dieser Substanzen mindestens 10 Minuten liegen.

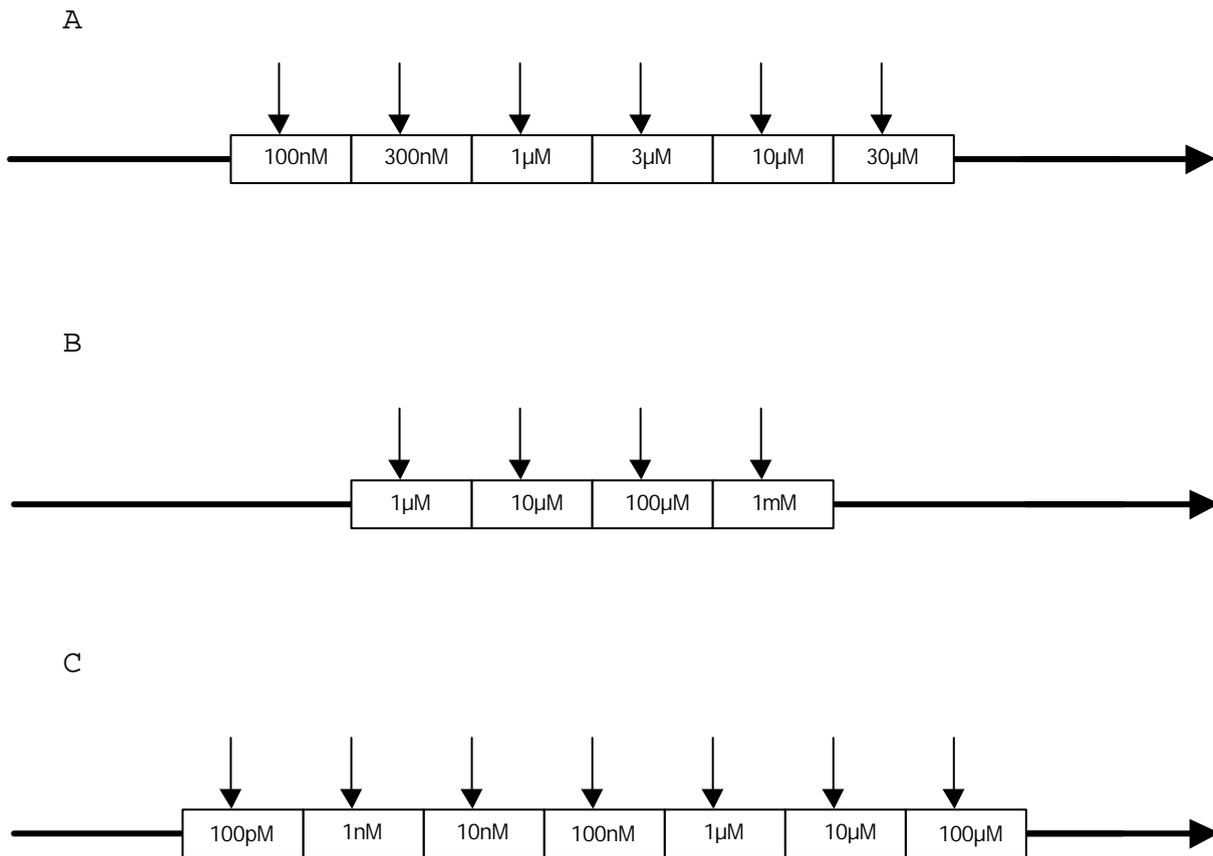


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Dauerperfusionsen mit den Purinrezeptorantagonisten (A: NF023; B: Suramin; C: PPADS) in aufsteigenden Konzentrationen (Schild-Plot)

Gerade = Tyrode, Blöcke = Tyrode+Antagonist, senkrechte Pfeile = Testkaskade, bestehend aus α , β -meATP, Angiotensin II, $A_{P_6}A$ und $A_{P_6}G$. Nachdem die Niere an das Perfusionssystem angeschlossen wurde und ein Druckequilibrium eintrat, applizierte man in Bolusform eine Testkaskade zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Niere. Danach wurde die Perfusion mit Tyrode auf die Dauerperfusion mit Tyrode + Antagonist (niedrigste Konzentration, 1 nM, erster Block) umgestellt. Nun wurde mindestens 5 Minuten gewartet und eine Testkaskade appliziert. Ohne wieder auf Tyrode umzustellen, wurde die Dauerperfusion auf die nächst höhere Konzentration umgestellt. Die Konzentrationen der Dauerperfusionsen entnehme man dem Inhalt der Blöcke. Nach der letzten Dauerperfusion (10 μ M) wurde die Niere mit Tyrode ausgewaschen, und es wurde eine letzte Testkaskade appliziert. Jeder Block entspricht mindestens 20 Minuten

2.3 Materialien

Expressionsuntersuchungen

Alle zur RNA-Extraktion benötigten Materialien wurden von der Firma Roth, Karlsruhe bezogen. Trizol, Agarose und Low-Melting Agarose wurden von der Firma Life Technologies bezogen. Die Materialien zur reversen Transkription sowie das pGem-T-Vector-System-Kit zur Ligation wurden von der Firma Promega, Mannheim, bezogen. Das zur DNA-Vermehrung verwendete WizardTM Plus Minipres DNA Purifikation System wurde ebenfalls von der Firma Promega, Mannheim, bezogen. Bei Eurogentec, Seraing, Belgien, wurden die Materialien für die Polymerasekettenreaktionen erworben. Die zur Transformation benötigten kompetenten Zellen wurden von der Firma Stratagene, Heidelberg, bezogen. Das SOC-Medium und Ampicillin wurden von der Firma Sigma, Deisenhofen, X-Gal, IPTG und das LB-Medium von GIBCO, Eggenstein, bezogen. Die Sequenzierung des DNA-Fragments wurde durch das Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt.

Untersuchungen an der isolierten perfundierten Niere

Für die Dauerperfusionen wurden PPADS, NF023 und Suramin verwendet (10^{-9} - 10^{-5} M). PPADS und NF023 wurden von RBI, Deisenhofen, und Suramin von Alexis, Grünberg, bezogen. Die Substanzen für die Bolusinjektionen wurden als 100 μ l Boli in eine Sammelschleife (mit Injektionsventil) proximal der Niere injiziert. Alle verwendeten Substanzen wurden täglich frisch aus einer Stammlösung (10 mM, tiefgefrorene Konzentrate) in Tyrode hergestellt. Heparin, α,β -meATP und Angiotensin II wurden von Research Biochemicals, Deisenhofen, bezogen. Ap₆A und Ap₅A wurden von Sigma, Deisenhofen, bezogen. Vor Gebrauch von Ap₅A und Ap₆A wurden diese Substanzen wie durch Heidenreich et al. (1995) beschrieben von Schlüter und Mitarbeiter aufgereinigt.

2.4 Statistik

Die Effekte wurden als Perfusionsdruckänderungen (in mm Hg) registriert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm mittlere Standardabweichung (SEM = standard error mean) dargestellt. Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die unterschiedlichen Inhibitionspotenzen und Signifikanzen wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests berechnet.