

4. METHODEN

4.1 Experimente in vivo

4.1.1 Versuchstiere

Die Anzahl der Versuchstiere war durch vier zur Verfügung stehenden Respirationenkammern bestimmt. Insgesamt bestand die Versuchsgruppe aus acht unverwandten Jungbullen der Rasse Schwarzbuntes Milchrind in einem Alter von 300 Tagen und mit einer Lebendmasse von 295 ± 15 kg.

4.1.2 Haltung

Die Tiere wurden im Experimentierstall des FBN-Forschungsbereiches Ernährungsphysiologie „Oskar Kellner“ in Rostock gehalten. Sie standen in Anbindehaltung auf einem mit Gummimatten ausgelegten Stand. Wasser bezogen die Probanden über eine Selbsttränke.

4.1.3 Adaptationsphase

Diese Zeit betrug nach dem Tag der Einstallung vier Wochen. In ihr wurden die Tiere an das Futter, den Umgang mit den Selbsttränken sowie an das Pflegepersonal gewöhnt. Wöchentlich wurden Versuchstiere für einen Tag in einer Außenanlage gehalten. In dieser Zeit wurden die Stände gründlich gereinigt und desinfiziert. In der Adaptationsphase wurde 1,5-fach des Energieerhaltungsbedarfes gefüttert. Die Anpassung der Futtermenge erfolgte entsprechend den Ergebnissen wöchentlicher Wägungen. Weiterhin wurden die Tiere in dieser Zeit probeweise in die Respirationenkammer geführt, wo tageweise Probemessungen durchgeführt wurden, damit die Bullen sich an die Umgebung in der Kammer gewöhnen konnten. Es wurde auch zur Adaptation zeitweise der Messgurt für die Herzfrequenzmessung angelegt.

Am Ende der Adaptationsphase wurden die Jungbullen in zwei Gruppen zu je vier Tieren aufgeteilt. Die Aufteilung erfolgte derart, dass die mittlere Lebendmasse der Gruppen sich nicht deutlich unterschied.

4.1.4 Fütterung

Die Versuchstiere erhielten eine wiederkäuergemäße Ration. Die Fütterung erfolgte zweimal pro Tag, zwischen 8.00 und 8.30 Uhr und zwischen 13.30 und 14.00 Uhr. Die Futterrations bestand aus 80% Trockengrün sowie 20% Gerstenschrot. Die Futtermenge wurde entsprechend einem Bedarf an umsetzbarer Energie für die Erhaltung (metabolizable energy for maintenance, MEm) von $450 \text{ kJ/kg}^{0,75}\text{d}$ bemessen (Hoffmann & Jentsch 1994). In der Tabelle 6 sind die Mittelwert \pm Standardabweichungen für die Gruppen ausgewiesen. Das Futter enthielt 14,5% Rohprotein, 24% Rohfaser und eine umsetzbare Energie von 10,05 MJ/kg Trockensubstanz. Zur Gewöhnung an die Diät wurde die entsprechende Futtermenge den Tieren eine Woche vor den Respirationskammerversuchen verabreicht.

Tabelle 6: Verabreichte tägliche Futtermengen

Futtermittel	Ernährungsintensität	
	1,5-MEm (n=4)	2,0-MEm (n=4)
Trockengrün, g	2227 \pm 21	3151 \pm 90
Gerstenschrot, g	563 \pm 5	787 \pm 28

4.1.5 Respirationskammer

Für die Erfassung der Stoffwechselintensität unter thermoneutralen Bedingungen standen die Versuchstiere in klimatisierten Respirationskammern für 3 Tage (Montag bis Mittwoch). Diese Stoffwechsellmesskammern, welche nach dem Prinzip der indirekten Kalorimetrie nach Pettenkoffer betrieben werden, ermöglichen eine getrennte Sammlung von Kot und Harn sowie eine kontinuierliche Gaswechsellmessung mit automatischer Analyse von Sauerstoffverbrauch, Kohlendioxid und Methan. In den Kammern installiert sind Bewegungssensoren, die Bewegungsaktivitäten der Tiere registrieren, um aktivitätskorrigierte, basale Gaswechseldaten zu erhalten. Die Auswertung der Gaswechseldaten und der Bewegungsaktivität erfolgt über ein rechnergestütztes statistisches Programm. Die Gaswechseldaten wurden in einem Abstand von 10 min erhoben. Der Respirationsquotient (RQ) wurde wie folgt berechnet: $\text{RQ} = V^\circ \text{CO}_2 / V^\circ \text{O}_2$, wobei V° die Volumenänderung darstellt. $V^\circ \text{CO}_2$ repräsentiert in dieser Gleichung die Produktion von CO_2 nach Korrektur auf fermentativ erzeugtes CO_2 (Chwalibog et al.

1996). Nach Normalisierung der Gasmessungen (760 Torr, 0°C, $p_{\text{H}_2\text{O}} = 0$) wurde die Wärmeproduktion (WP) nach Brouwer (1965) berechnet: $\text{WP (kJ/kg}^{0,75}\text{d)} = 16,19 \text{ L O}_2 + 5,06 \text{ L CO}_2 - 2,17 \text{ L CH}_4 - 5,94\text{g Harn-N}$. Der Harnstickstoffgehalt wurde über eine Harnstoffanalyse im Sammelharn der Nüchterungs- bzw. Fütterungsperioden (16.00-07.00, 07.00-14.00, 14.00-16.00 Uhr) erfasst.

4.1.6 Herzfrequenzmessung

Die Reaktion der Herzfrequenz auf die unterschiedlichen Diäten wurde biotachometrisch gemessen. Den Tieren wurde bei Einnistung in die Respirationkammer ein Messgurt der Firma Polar-Intersport angelegt. Die Herzfrequenzdaten wurden über die gesamte Versuchsdauer im Minutentakt erfasst. Am Gurt befanden sich zwei Elektroden, die bei Anlegen des Gurtes an der linken Thoraxseite befestigt wurden. Zur Gewährleistung des Kontakts wurde auf der linken Seite auf Höhe des Herzens sowie eine handbreit unter der Wirbelsäule jeweils eine ca. 8x8cm große Stelle rasiert, in diesem Bereich wurden die selbstklebenden Elektroden angebracht. Die im Gurt befindliche Uhr speicherte über 24 Stunden kontinuierlich die Daten.

4.1.7 Blutflussmessung

Der Tierversuch mit dem invasiven Eingriff zum Ziel der direkten Blutflussmessung wurde am 29.03.1999 unter dem Aktenzeichen VI 522a-72221.31-1-026/98 vom Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Forsten und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt.

Für die venöse Blutflussmessung wurde das Gerät Cliniflow II, Model 701 D der Firma Carolina Medical Electronics, Inc. sowie die chronischen Blutflußmeßsonden, Model SF 418 RC, ebenfalls der Firma Carolina Medical Electronics, verwendet (Abb. 1).

CLINIFLOW II

Modell 701 D

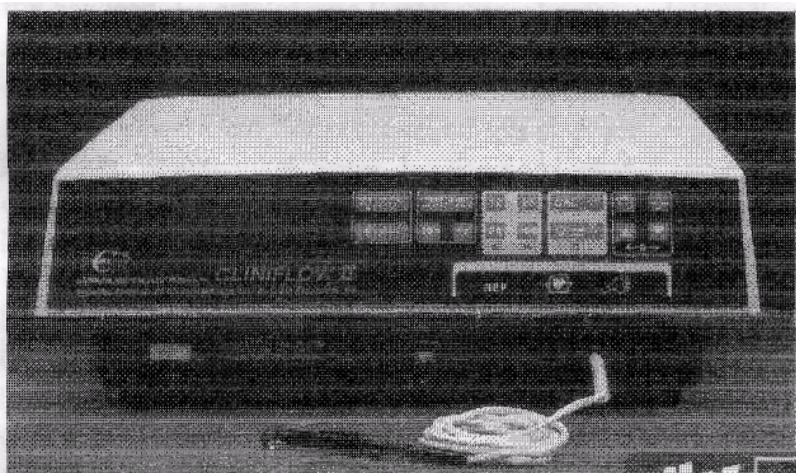


Abb. 1 Apparatur, die zur Blutflussmessung verwendet wurde

Das Cliniflow II-Gerät wurde konstruiert für die invasive Messung des Blutflusses in Gefäßen. Das Gerät ist ein elektromagnetischer Blutdurchflussmesser. Es sendet einen elektrischen Rechteckstrom durch einen im Sondenmesskopf eingebauten Elektromagneten. Dadurch entsteht senkrecht zum Blutgefäß ein starkes elektromagnetisches Feld. Der Blutstrom durch dieses Feld erzeugt in einem Winkel von 90° zu dem Gefäß und dem Feld ein kleines elektrisches Potential, wobei sich die Amplitude und Polarität dieses Potentials sich proportional zu der Blutdurchflussmenge verhält. Das elektrische Signal der Blutgeschwindigkeit wird als mittlerer Fluss direkt in ml/min oder l/min auf dem Bildschirm des Gerätes angezeigt.

Die Blutflussmessung erfolgte jeweils an den Tagen zwei und drei der Respirationskammerperiode. Das zu operierende Tier wurde am Nachmittag vor dem OP-Tag letztmalig gefüttert. Wasser wurde dem Bullen bis zum Operationszeitpunkt angeboten.

Für die Verlegung der chronischen Blutflussmesssonde vom Typ 18c mit einem inneren Durchmesser von 6 mm wurde die Vena saphena gewählt, weil dieses Gefäß ohne ernsthafte Beeinträchtigung der Gesundheit des Probanden operativ zugänglich ist. Bei der 1,5-MEM Diät

wurde die V.saphena des linken und für die 2.0-MEm Diät die V.saphena des rechten Hinterbeines verwendet. Für die Fixation während der Operation sind Halfter und Unterbauchgurte verwendet worden, um die Versuchstiere am Niederlegen zu hindern. Das OP-Feld an dem jeweiligen Hinterbein ist unter Zuhilfenahme von Seifenwasser, Nassrasierer sowie Alkohol und Jod großzügig gereinigt und desinfiziert worden. Die lokale Anästhesie erfolgte mittels 20ml Lidocain 2%.

Bei der Palpation des OP- Feldes ist auf der caudalen Seite der Hintergliedmaße auf Höhe des Kniegelenkes ca. 2-4cm der Medianen der Hintergliedmaße eine deutliche Grube in der Muskulatur zu fühlen. Es ist dies die Trennung zwischen dem Musculus semitendinosus und dem caudalen Ast des Musculus glutaebiceps. Über dieser Vertiefung wird ein ca. 10cm Hautschnitt angebracht. Die Haut wird dann ca. 1-2cm lateral und medial von der Unterhaut stumpf freipräpariert, um einen besseren Einblick in das OP- Feld zu haben. Danach wurde die Faszie über dem M.semitendinosus und dem caudalen Ast des M.glutaebiceps mit der Schere und einer Pinzette auf einer Länge von ca. 6 cm eröffnet, und es wurde stumpf der intermuskuläre Bereich bis in eine Tiefe von 5-6cm freipräpariert. Die V. saphena befindet sich in dieser Tiefe. Nach dem Auffinden des Gefäßes wird es aus dem umliegenden Fett- und Bindegewebe herausgelöst und mittels eines stumpfen Fadenführers nach Deschamp nach außen vorverlagert. Durch den Zug am Gefäß entleert es sich, der Blutfluss stoppt, und die Vene wird zu einem dünnem schmalen Strang. Jetzt wurde die Vene durch den Schlitz im Messkopf der Blutflussmesssonde geschoben, und das Gefäß ist samt dem Messsondenkopf langsam in die Tiefe zurückgeführt worden. Das Sondenkabel mit dem Verbindungsstecker blieben nach außen frei hängend. Es erfolgte eine Funktionsprobe der verlegten Sonde. Die Unterhaut wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial und einer fortlaufenden Naht verschlossen. Im oberen Wundwinkel lag das Sondenkabel, welches in die Verschlussnaht nicht mit einbezogen wurde. Die äußere Haut ist mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial mittels einer unterbrochenen Matratzennaht verschlossen worden. Oberhalb des Operationsfeldes wurde mittels nicht resorbierbarem Nahtmaterial eine kleine Tasche aus festem, strapazierfähigen Material angenäht, in welcher das Sondenkabel mit dem Verbindungsstecker gelegt wurde. Die Sonde wurde am Nachmittag des zweiten Messtages wieder auf chirurgischem Weg entnommen. Der Wundverschluss erfolgte dabei wie bei der 1. OP. Post-operativ ist das Tier mit Procain-Benzylpenicillin (Dosis 9000- 30000 I.E./kg) über zwei Tage versorgt worden. Akut entzündliche Reaktionen wurden durch tägliche rektale Messungen der Körpertemperatur kontrolliert. Die Daten der Blutflussmessung sind in einem Abstand von 30 sec mittels eines Computers außerhalb der Respirationskammer aufgezeichnet worden. Die Datenerfassung erfolgte an den zwei Versuchstagen jeweils in der Zeit von 8:00-15:30.

4.1.8 Infusionen

Zum Nachweis des Einflusses der K_{ATP}-Kanäle auf die Gefäßspannung und somit auf den Blutfluss wurde der Agonist Levcromakalim in einer Dosierung von 80 nMol/kg (240 nMol/kg in einem Experiment, das zusätzlich zur Ermittlung der Dosisabhängigkeit zu den beschriebenen Experimenten unter Einhaltung derselben experimentellen Bedingungen durchgeführt wurde) intravenös infundiert. Levcromakalim lag kristallin vor. Unmittelbar vor der Infusion wurde Levcromakalim (SmithKline Becham) in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, die konzentrierte Lösung tropfenweise in 70% Ethanol – 10mM NaHCO₃ pipettiert und dieses Gemisch dann in 50mM NaHCO₃ (37°C) tropfenweise aufgenommen. Um annähernd physiologische Bedingungen einzuhalten, wurde 1Volumen dieser Lösung mit 1Volumen Gelafundin vor Verwendung gemischt. Auf diese Weise konnte das Infusionsvolumen ≤ 20 ml gehalten werden. Die Endkonzentrationen an Levcromakalim und der organischen Phase lagen bei 7,6 mM und 6% Ethanol bzw. 0,5% DMSO. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auf den peripheren Blutfluss ausschließen zu können, wurde es am Tag 1 der Blutflußmessung intravenös über den Dauerkatheter in einer Zeit von 10 min vor der 1. Fütterung infundiert. Levcromakalim wurde am Tag 2 der Blutflussmessung ebenfalls durch den Dauerkatheter über 10 min vor der 1. Fütterung eingegeben. Durch eine vorhergehende Infusion von Glibenclamid, einem Inhibitor der Aktivität von K_{ATP}-Kanälen, wurde die Spezifität der Levcromakalimwirkung geprüft. Glibenclamid wurde in einer Dosis von 480 nMol/kg innerhalb von 10 min verabreicht. Nach 10 min wurde dann Levcromakalim infundiert.

4.1.9 Blutproben

In der Respirationskammerperiode wurden von den Tieren kontinuierlich Blutproben gewonnen. Dazu wurde am Beginn des Versuches ein Dauerkatheter verlegt. Die V. jugularis ext. der rechten Halsseite diente dabei als Gefäß. Nach Rasur und Desinfektion der betreffenden Stelle ist eine Lokalanästhesie mit 8 ml Lidocain 2% durchgeführt worden. Die Katheterisierung erfolgte mit dem Besteck für die Katheterisierung von Hohlvenen nach der Seldinger-Methode (Certofix Mono, Braun). Der Katheter wurde mit 4 Hautheften sowie einem Leukoplastverband am Tier befestigt. Es sind pro Versuchstag jeweils 4 Proben (1 Stunde vor und 1 Stunde nach der Fütterung) entnommen worden mit einem Volumen von 10 ml und zweimal 5 ml. Die Blutprobenanalysen wurden zur tiergesundheitlichen Kontrolle und zur Überprüfung der Beeinflussung von Blutinhaltsstoffen durch die Diät und die Infusionen herangezogen. Heparinblut (10 ml) diente zur Leukozytenpräparation und zur Plasmagewinnung (5 ml). Serum wurde aus 5 ml

Vollblut gewonnen, um die Indikatoren komplementreaktives Protein (CRP) und die Komplementkomponente C3c für akut-entzündliche Prozesse nephelometrisch (Behring-Nephelometer) zu bestimmen. Im Plasma wurden Hormone (T₃, T₄, Insulin und Kortisol) sowie unveresterte Fettsäuren (enzymatischer Farbttest, Roche), β-Hydroxybutyrat, Harnstoff und Glukose (Sigmakits) bestimmt. Da die Analysendaten erst teilweise vorliegen, wurden sie in dem Ergebnisabschnitt nicht dargestellt.

4.2 Experimente in vitro

4.2.1 Gewebeproben

Eine Woche nach Abschluss der Respirationskammerversuche wurden die Versuchsbullen im institutseigenen Schlachthaus geschlachtet. Getötet wurden die Tiere durch Bolzenschuss und anschließendem Entbluten.

Während der regulären Aufbereitung des Schlachtkörpers erfolgte die Entnahme von Gewebeproben mittels steriler Schere, Pinzette und Skalpell. Entnommen wurden Proben aus dem rechten Ventrikel des Herzens, A. mesenterica cran., V. portae, V. saphena, A. carotis communis sowie dem Pankreas und M. semitendinosus.

Nach der Entnahme der Probenstücke wurden diese sofort in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Bei den Blutgefäßen wurde, sofort nach Entnahme aus dem Schlachtkörper, das Bindegewebe und das Endothel entfernt. Gelagert wurde das Probenmaterial in einem Tiefst kühl schrank bei -70°C.

4.2.2 Zellpräparation

Ein Gewebeteilstück von 0,5g wurde mit einer sterilen Schere in einem kleinen Becherglas zerkleinert. Einzelzellen wurden durch Verdauung der Gewebematrix mit 5ml einer 0,2% Kollagenaselösung erhalten. Diese Lösung bestand aus folgenden Bestandteilen:

- 1 Vol RPMI 1640-Zellkulturmedium
- 1 Vol HBS (14mM Hepes + 150 mM NaCl , pH 7,3)
- 2 mg Kollagenase (TypVIII, Sigma) /ml.

Für die Zellpräparation aus Gefäßgewebe wurde ein Magnetrührer (300U/min, 10sec in Intervallen von 30sec) eingesetzt. Die kollagenasekatalysierte Hydrolyse der extrazellulären Matrixproteine wurde bei 37°C über 30 min durchgeführt. Dann wurden die Einzelzellen von unverdaulichem Gewebe durch einen Zellfilter mit einer Porenweite von 100µm (Falconer) abgetrennt. Für die Entfernung der Kollagenaselösung sowie zur Konzentrierung der Zellen wurde die Zellsuspensionen in einer Kühlzentrifuge bei 4°C, 100g und 10min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand sorgfältig abpipettiert, und die Zellen wurden in einem Hepes- gepufferten Medium, das auch zur Analyse der Ligandenbindung an Sulfonylharnstoffrezeptoren diente, resuspendiert. Dieser Resuspensionspuffer setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- 2 Vol 20mM Hepes-gepuffertes-RPMI-Medium (pH 7,3)
- 1 Vol HBS
- 0,1% NaN₃
- 2 mM EDTA.

Mit dem Zellzählgerät der Firma „Mölab“ wurde die Zellzahl in der Suspension bestimmt, und es wurde Puffer solange zugeführt, bis eine Zellzahl von $2 \pm 0,5 \times 10^7$ Zellen/ml Medium vorhanden war. Diese Zellen sind dann in 100µl Aliquoten auf eine 96-er Mikrotiterplatte verteilt worden.

4.2.3 Glibenclamidbindungsanalysen

Sulfonylharnstoffrezeptoren wurden mit dem Sulfonylharnstoff Glibenclamid, das als fluoreszentes Konjugat (Glibenclamid-Bodipy, Molecular Probes) vorlag, analysiert. Durch Zugabe von 5µl/100µl Zellen einer Glibenclamid Bodipy Verdünnungsreihe wurden verschiedene Konzentrationen an Liganden für Sulfonylharnstoffrezeptoren erzeugt. Glibenclamid-Bodipy mit einer Stammkonzentration von 127,7µM (in DMSO) wurde mit 50mM NaHCO₃ verdünnt, so dass die Endkonzentration bei einer Pipettierung von 5µl zu 100µl Zellen 3, 6, 12, 24, 30, 35 und 40 nM betrug. Die Einstellung dieser Konzentration ist in der Tabelle 7 dargestellt:

Tabelle 7: Herstellung der Verdünnungsreihe für Glibenclamid- Bodipy zur Analyse der Bindungseigenschaften von Sulfonylharnstoffrezeptoren auf der Zelloberfläche intakter Zellen

	Glibenclamid-Bodipy- Aliquot µl	NaHCO ₃ (50mM) µl	Konzentration in der Verdünnung nM	End-Konzentration nM
A	3,3 (127,2µM)	500,0	837	40
B	280,0 A (Verdünnung)	40,0	735	35
C	2,5 (127,2µM)	500,0	630	30
D	2,0 (127,2µM)	500,0	504	24
E	200,0 D (Verdünnung)	200,0	252	12
F	200,0 E (Verdünnung)	200,0	126	6
G	200,0 F (Verdünnung)	200,0	63	3

Für die Herstellung eines Fließgleichgewichtes zwischen gebundenem Liganden und freien Liganden am Rezeptor wurde die Mikrotiterplatte bei 4- 6°C über Nacht auf Eis inkubiert. In Vorversuchen wurde über die Fluoreszenzmikroskopie abgeklärt, daß unter diesen Bedingungen (Eisbad und Anwesenheit von NaN₃) vorrangig Sulfonylharnstoffrezeptoren der Plasmamembran von dem fluoreszenten Liganden markiert werden. Parallel zu den Reaktionsansätzen mit Zellen wurde eine Verdünnungsreihe ohne Zellen inkubiert. Sie diente der Kontrolle und Kalibrierung der Fluoreszenzintensität des Zellüberstandes nach der Inkubation in Abhängigkeit von der bekannten Konzentration an Glibenclamid-Bodipy.

Die Fluoreszenz der Zellen wurde direkt über die Flusszytometrie (Coulter Epics XL) nach einer beschriebenen Methode (Löhrke et al. 1998) bestimmt. Die Flusszytometrie misst die Fluoreszenz von Partikeln, wobei die Fluoreszenz der Lösung vernachlässigbar gering ist. Die Methode gestattet eine Analyse von Partikeln, die nach Größe und Autofluoreszenz sortierbar sind, so dass die Bindungseigenschaften von Myozyten, weitgehend von anderen Zelltypen und Zellbruchstücken getrennt, erfasst werden können.

Für die Messung wurden die Zellen resuspendiert, ein Aliquot von 80µl mit 200µl HBS verdünnt und sofort gemessen. Die Fluoreszenz von Einzelzellen wurde mit einem Laser bei 488nm angeregt. Die Fluoreszenzemission wurde durch einen Fluoreszenzfilter mit 505-530 nm Bandbreite gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität pro Zelle ist dabei proportional zur Molekülmenge des vom Rezeptor gebundenen Liganden (Macho et al. 1996). Die flußzytometrische Analyse verlief nach folgendem Schema:

1. Erstellung eines Histogramms durch Auftragung der Vorwärtslichtstreuung (proportional zur Zellgröße) gegen 90° Lichtstreuung (proportional zur Granulierung)
2. Abgrenzung der Zellen mit einem Durchmesser von 7µm von kleineren Zellen und Zellbruchstücken (gating)
3. Messung der Fluoreszenz der Zellen über 7µm im Fluoreszenzhistogramm
4. Subtraktion der unspezifischen Fluoreszenz (Autofluoreszenz der Zellen) von der durch den Liganden hervorgerufenen Fluoreszenz.

Gemessen und ausgewertet wurde die Intensität der Fluoreszenz pro Zelle sowie die Menge fluoreszierender Zellen. Bei der Einzelzellanalyse über die Flusszytometrie wird direkt die Menge an fluoreszierendem Ligand/Zelle gemessen. Eine sättigbare Abhängigkeit dieser Bindung von der Ligandenkonzentration weist auf eine spezifische Bindung hin. Die sättigbare Fluoreszenzzunahme kann dann über eine nichtlineare Kurvenanpassung charakterisiert werden (Macho et al. 1996). Der Wendepunkt der angepaßten Funktion repräsentiert die unter Gleichgewichtsbedingungen erhaltene Dissoziationskonstante (K_D), die umgekehrt proportional zur Assoziationskonstanten ist und die Affinität des Liganden zum Rezeptor beschreibt. Die Asymptote der nichtlinearen Funktion entspricht der Kapazität der Bindungsstellen je Zelle. Für die Berechnung der SUR-Moleküle/Zelle wurde ein von der Kurvenanpassung weniger abhängiges Verfahren verwendet. Die Fluoreszenz/Zelle bei einer Glibenclamid-Bodipy-Konzentration von 2 K_D

wurde über Standardpartikel mit bekannter Zahl an fluoreszenten Molekülen geeicht. Aus der Fluoreszenzintensität wurde dann direkt die Anzahl Moleküle/Zelle berechnet (Macho et al. 1996).

4.2.4 Analyse von Transkripten

Transkripte, die Proteine des KATP-Kanals kodieren, wurden in Gewebeproben aus dem rechten Ventrikel analysiert. Hierfür wurde die Gesamt-RNA isoliert, ein mRNA-Abschnitt unter Verwendung spezifischer Primer über eine reverse Transkription (RT) in eine cDNA-Sequenz umgeschrieben und diese cDNA-Sequenz durch eine DNA-Polymerasenkettenreaktion (PCR) vervielfältigt.

4.2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Extraktion von Gesamt-RNA erfolgte durch Zermörserung von 40mg Gewebe unter Flüssig-Stickstoff. Das zerkleinerte Gewebe wurde in einem Extraktionspuffer (INVITEK-Gesamt-RNA- Extraktions- Kit) aufgenommen (1mg Gewebe/5 Volumen Puffer) und mit dem Ultraturrax homogenisiert (1min/maximale Geschwindigkeit). Anschließend wurde eine zweite Homogenisation über 20 Passagen durch eine Insulinspritze durchgeführt. Die nachfolgenden Schritte folgten den Angaben des Herstellers des RNA-Präparationskits. Mit diesem Verfahren wird die Gewebe-DNA von der RNA an einem Filter abgetrennt und die RNA an einen weiteren Filter gebunden. Die Elution der gebundenen RNA erfolgt durch RNase-freien Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5). Die RNA-Konzentration wurde durch die Lichtabsorption bestimmt. Dabei wurde ein Aliquot dieser Lösung in 10 mM TRIS- Puffer (pH 7,5) bei 260 und 280 nm gemessen. Wenn das Verhältnis der Absorption zwischen 260 und 280 nm größer als 1,8 ist, entspricht eine OD einer Konzentration von 40µg/ml RNA. Diese RNA ist nicht völlig frei von genomischer DNA, die unspezifische RT-PCR-Produkte lieferte. Deshalb wurde die RNA mit DNase I (Roche) in Anwesenheit eines RNAsen-Inhibitors (Ambion) behandelt. Die RNA wurde mit 25 Einheiten DNase I in DNase I-Puffer (Roche) und 5 Einheiten RNase-Inhibitor bei Raumtemperatur für 15min inkubiert und dann erneut den Filtrationsschritten unterzogen.

4.2.4.2 RT-PCR-Reaktionsbedingungen und Produktanalyse

Bovine Gensequenzen für die im Herzmyocard hauptsächlich vorkommenden Transkripte der SUR2, Kir6.1 und Kir6.2-Gene sind bisher nicht veröffentlicht worden (Gendatenbank Heidelberg). Zur Primerkonstruktion wurden Gene von der Maus, Ratte und *c.porcillus* herangezogen. Hinsichtlich der SUR2-Transkripte waren die Meerschweinchensequenzen, für Kir6.1 und Kir6.2 die Maus- und Rattensequenzen geeignet, um bovine Transkripte zu erfassen. Die Synthese der Primer wurde kommerziell durchgeführt (TiB-Mol). Vorwärts- und reverse Primer hatten die Sequenz (SUR2) 5'-CAAATC GCTGCC TGGGGG TCT und 5'-GCGGTC TGCAA GCGGT CA; (Kir6.1) 5'-GGAGGA GGGAGT GTACTC TGTGGA und 5'-GTTGCT CCTCCT CATGGA GTTGTT; (Kir6.2) 5'-GCCATT CTCATT CTCATT GTGCAG und 5'-AATGAT CATGCT CTTTCG GAGGTC. Die SUR2-Primer wurden so konstruiert, dass SUR2A und SUR2B nachweisbar waren. Das Ziel war, dadurch das intern standardisierte Verhältnis zwischen beiden Transkripthäufigkeiten zu erfassen. Die RT-PCR wurde in einem Einschrittverfahren (Titankit, Roche) unter Verwendung eines Endvolumens von 9µl und einer Primerendkonzentration von 150nM durchgeführt. Als zusätzlicher interner Standard wurden β -Actin-Primer verwendet, die in dem Titankit enthalten waren. Die RT-Reaktion wurde bei 50°C für 30min durchgeführt. Die PCR schloss folgende Schritte ein:

1. Denaturierung bei 94°C - 2min,
2. 35 Zyklen mit 94°C – 40sec, 60°C – 30sec (annealing), 70°C – 30sec (Elongation) und zusätzlichen 5 sec in jedem Zyklus
3. Endelongation – 7 min.

RT-Kontrollen (Kontrolle auf Anwesenheit genomischer DNA) wurden erhalten durch Inaktivierung des RT-Enzyms bei 94°C (5min) sofort nach Komplettierung des Reaktionsansatzes auf Eis. Diese Kontrolle war insbesondere wichtig für Transkripte des intronlosen Kir6.2-Gens (Liss et al. 1999). Die Sequenzlänge der RT-PCR-Produkte wurde über eine Sequenzierungsgel (5% Acrylamid, 8,3M Harnstoff) nach Elektrophorese und Silberfärbung (Serva) durch eine rechnergestützte Densitometrie (Herolab) bestimmt. Die berechnete Produktgröße stimmte mit der gemessenen im Vergleich zu DNA- Fragment-Standards (IX, Roche) überein. Dadurch wurde ein Hinweis auf die Spezifität des Produktes erhalten. Darüber hinaus trat durch Einsatz unterschiedlicher Mengen an Gesamt-RNA eine Abhängigkeit der Produktmenge von der eingesetzten Gesamt-RNA-

Menge auf, was auf die Einhaltung stoichiometrischer Erfordernisse hinwies. Die cDNA-Produkte aus der RT-PCR wurden routinemäßig auf 1,5% Agarosegelen mit einer SYBR-Gold-Fluoreszenzfärbung nach Angaben des Herstellers (Molecular Probes) im Vergleich zu einem DNA-Fragment-Standard (Roth) dargestellt. Die Fluoreszenz wurde densitometrisch (Herolab) ausgewertet. Die Normalisierung beruhte auf den β -Actin-cDNA-Produkten. Hierzu wurde die Menge an RNA bestimmt, die notwendig ist, um vergleichbare Mengen an β -Actin-cDNA-Produkten zu erhalten. Diese Menge an Gesamt-RNA wurde dann für die Analyse der Transkripte der SUR2-, Kir6.1- und Kir6.2-Gene verwendet.