

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tiere und Tierhaltung**

Die Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes wurden bei allen Tierversuchen beachtet und eingehalten und zuvor ein entsprechender Antrag beim LaGeTSi eingereicht. Für die Experimente nutzten wir männliche SHR- und SHRSP - Ratten aus der Züchtung des Universitätsklinikums Benjamin Franklin. Alle Tiere wurden unter klimatisierten Bedingungen bei einer konstanten Raumtemperatur von  $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , einer konstanten relativen Luftfeuchtigkeit von 60% und bei einem kontrollierten Hell-Dunkel-Zyklus von 12 Stunden mit jeweils 10 Minuten Dämmerungsphase (6:01Uhr-18:00Uhr Tagphase und 18:01Uhr-6:00Uhr Nachtphase) gehalten. Die einströmende Luft wurde mittels Staubfilter gereinigt und 20 Mal in der Stunde gewechselt. Bei den Käfigen handelte es sich um Typ 4-Käfige mit einer Grundfläche von  $1800\text{ cm}^2$ , wo maximal 4 Tiere auf Granulat von geraspelttem Weichholz zusammenlebten. Im Alter von 6 Wochen wurden die SHR- und SHRSP-Tiere randomisiert je einer von 2 Gruppen zugeteilt (à 8 Tiere). SHR und SHRSP wurden entweder:

1. einer Scheinoperation unterzogen und hinterher mit einer Normaldiät (0,2% NaCl) gefüttert  
⇒ SHR/Sham und SHRSP/Sham
2. einer einseitigen Nephrektomie unterzogen und hinterher mit einer Salzdiät (4%) gefüttert  
⇒ SHR/NX/NaCl und SHRSP /NX/NaCl

Die Tiere erhielten steriles Leitungswasser *ad libitum*. Als Salzdiätfutter diente ein keimarmes 4% Kochsalz enthaltendes Spezialfutter der Firma Ssniff (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) sowie als Normalfutter ein ebenfalls pasteurisiertes, aber nur 0,2% NaCl enthaltendes Futter derselben Firma.

Für die Scheinoperation oder die einseitige Nephrektomie im Alter von 6 Wochen wurde jedes Tier mit einer Ethernarkose anästhesiert. Für die linksseitige Nephrektomie wurde eine retroperitoneale Inzision als Operationszugang gewählt. Bei der Scheinoperation wurde ebenfalls eine retroperitoneale Inzision, jedoch ohne Nephrektomie durchgeführt, um soweit wie möglich eine Gleichbehandlung zwischen den Gruppen zu gewährleisten und etwaige Effekte der

Narkose und des operativen Eingriffes auszuschließen. Danach wurde bei der Hälfte der Gruppen mit der 4%igen Salzdiät begonnen.

Im Alter von 12 Wochen, also 6 Wochen nach der Operation und Beginn der Salzbelastung, wurde der Blutdruck bestimmt und danach Blutproben entnommen. 24-Stunden-Urin wurde bei dem 48-stündigen (24 h zur Eingewöhnung und 24 h zum eigentlichen Urinsammeln) Aufenthalt im metabolischen Käfig gesammelt. Danach wurden die Tiere unter Ethernarkose getötet. Die Niere wurde sofort herausgenommen, in 0,9% NaCl-Lösung gespült, trockengetupft und gewogen. Vom unteren Pol der rechten Niere wurde für histologische Studien ein Teil für 24 Stunden in Dubosq-Brasil-Lösung fixiert, in Ethanol (80%) dehydriert und in Paraffin eingebettet. Das übrige Nierengewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff tief gefroren und für die nachfolgenden Analysen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## **2.2 Blutdruckmessung**

Der systolische Blutdruck wurde an den 12 Wochen alten wachen Ratten durch eine oszillometrische Messung des Schwanzarterienblutdrucks durch eine Schwanzblutdruckmanschette gemessen, auf einen Drucküberträger weitergeleitet und von dort auf einen computergesteuerten Druckempfänger übertragen und in ein digitales Signal gewandelt. Die Auswertung wurde von einem speziellen Diagrammaufzeichnungssystem (TSE Biosystems GmbH) vorgenommen.

## **2.3 Urin- und biochemische Analysen**

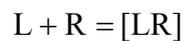
Nach Beendigung der Blutdruckmessungen wurden die Tiere für 24 Stunden zur Gewöhnung in einen metabolischen Käfig gesetzt. Nach dieser Eingewöhnungszeit wurde dann der Urin über 24 h kontinuierlich gesammelt. Aus dem Urin wurden die Protein-, Albumin-, ET-1- und Natriumexkretion sowie die Kreatininclearance bestimmt. Die Albuminexkretion wurde mittels einer ELISA-Methode<sup>65</sup> mit einem spezifischen Rattenantikörper (ICN Biomedicals) gemessen. Die Proteinexkretion wurde anhand der Bradford-Methode<sup>66</sup> ermittelt. Die Messung der ET-1-Konzentration wurde mit einem kommerziell erhältlichen Immunoassay (Immundiagnostik GmbH), der die direkte Bestimmung der ET-1-Konzentration in Urinproben möglich macht, durchgeführt. Die Kreatinin- und Natriumkonzentrationsdaten wurden in einem Standardroutinelabor der Klinischen Chemie erhoben.

## 2.4 Scatchard-Bindungsstudien

### 2.4.1 Theoretische Grundlagen für die Durchführung von Scatchard-Analysen

Unter der Annahme, dass die Bindung des Liganden ET-1 nach der Gleichung  $L + R = [LR]$  verläuft und keine weiteren Reaktionsprodukte entstehen, liefert die Scatchard-Analyse aus den Messpunkten der Sättigungsstudie eine Lineare („scatchard plot“)<sup>67</sup>, die zum einen über die Affinität eines Liganden zum Rezeptor (Dissoziationskonstante,  $K_d$ ) und zum anderen über die Rezeptordichte ( $B_{max}$ ) Auskunft gibt. Mit Hilfe dieser Linearen wird die Analyse der Daten erleichtert.

Es gilt:



L	=	Ligand
R	=	unbesetzte Rezeptoren
[LR]	=	Ligand-Rezeptor-Komplex
$R_t$	=	totale Rezeptorzahl

Wenn

$$\frac{d[(LR)]}{dt} = 0 \quad (a)$$

das heißt, wenn die Bildungsgeschwindigkeit von [LR] der Zerfallsgeschwindigkeit entspricht, also das Gleichgewicht der Reaktion erreicht ist, folgt für die Dissoziations- oder Gleichgewichtskonstante  $K_d$  der Reaktion (a):

$$K_d = L \frac{R}{[LR]} \quad (b) \quad R_t = R + [LR] \quad (c)$$

Aus (b) und (c) kann eine lineare Beziehung abgeleitet werden, die zum Scatchard-Plot führt:

$$\frac{[LR]}{L} = \frac{R}{K_d} = \frac{R_t - [LR]}{K_d} = \frac{-[LR]}{K_d} + \frac{R_t}{K_d} \quad (d)$$

[LR] wird nun als „Gebunden“ („Bound“=B),  $R_t$  als  $B_{max}$  und L als „Frei“ („Free“=F)

bezeichnet:

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_d} B + \frac{B_{max}}{K_d} \quad (e)$$

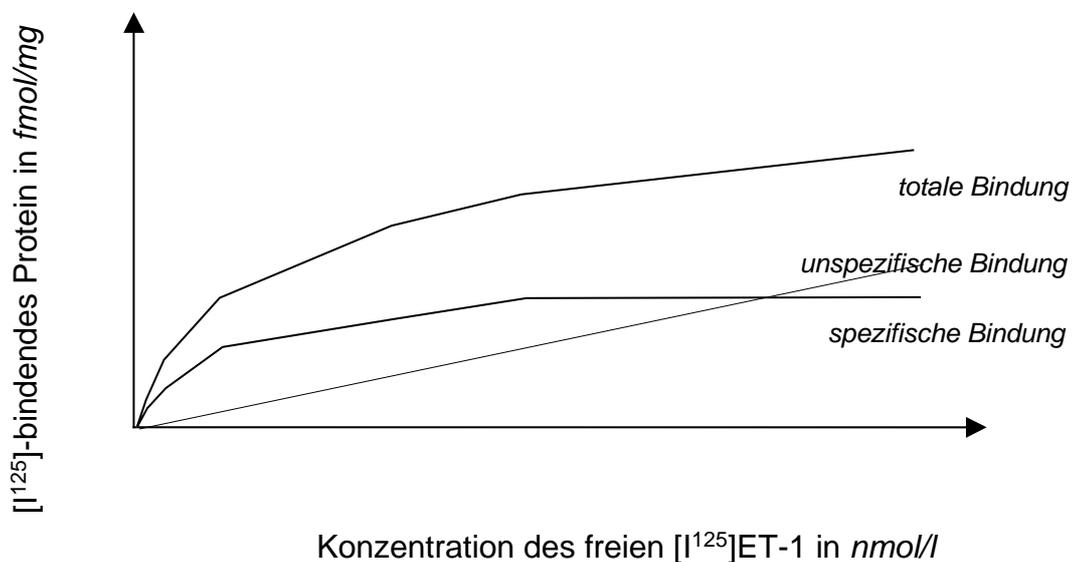
Diese Gleichung (e) ist somit eine lineare Funktion der Form  $y = -mx + n$ .

Um B, F und B/F zu berechnen, muss für jeden Ansatz der Sättigungsstudie die Gesamtmenge an ET-1 (markiert und unmarkiert) in mol bestimmt werden. Der Anteil der insgesamt eingesetzten Radioaktivität, der spezifisch an die Rezeptoren gebunden hat, wird als Faktor ausgedrückt.

B ergibt sich nun aus der mit dem Faktor multiplizierten Gesamtmenge an Hormon. F dagegen aus der Subtraktion von B von der Gesamtmenge an Hormon.

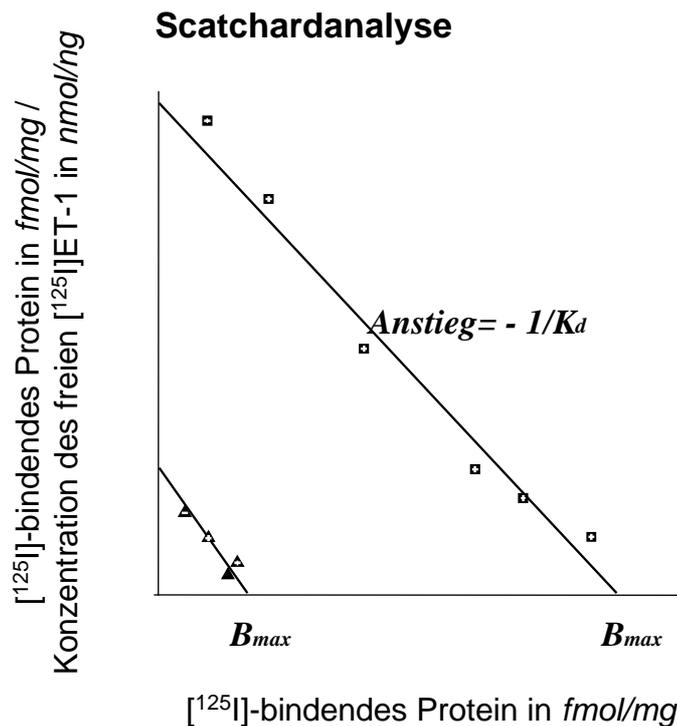
Abbildung 2.1 stellt exemplarisch Bindungskurven dar: man erkennt die spezifische, die unspezifische und die totale Bindung. Je mehr ET-1 zu den Rezeptoren gegeben wird, desto mehr kann, je nach Dichte der bindenden Rezeptoren, auch gebunden werden. Jedoch ist dieser Zusammenhang bei der spezifischen Bindung logarithmisch, das heißt er nähert sich einem Endpunkt, erreicht ihn jedoch nie.<sup>68</sup>

Nun kann der Scatchard-Plot als B/F zu B erstellt und  $K_d$  sowie  $B_{max}$  daraus bestimmt werden (siehe Abbildung 2.2).  $B_{max}$  ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse und  $K_d$  wird aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse und nachfolgende Umstellung der Gleichung nach  $K_d$  ermittelt.



**Abbildung 2.1: Bindungskurve**

Hier wird der typische Verlauf von spezifischen, unspezifischen sowie der gesamten, totalen Bindung schematisch dargestellt



**Abbildung 2.2: Scatchard-Plot**

Man erkennt den Verlauf zweier typischer Sättigungsstudien, woraus nun  $B_{\text{max}}$  direkt und  $K_d$  durch Umrechnung bestimmt werden kann

## 2.4.2 Material

### Substanzen

Folgende Substanzen wurden für die Bindungsstudien verwendet:

- $\text{NaHCO}_3$  (Reinsubstanz; Fa. Merck, Darmstadt) (als 20 mM Lösung)
- Kit zur Konzentrationsbestimmung der aufgearbeiteten Plasmamembranen: Bio-Rad D<sub>C</sub> Protein-Assay (Fa. Bio-Rad laboratories; CA/USA)
- TRIS (Reinsubstanz; Fa. Merck, Darmstadt)
- $\text{MgCl}_2$  (Reinsubstanz; Fa. Merck, Darmstadt)
- S-Carboxymethyl-Albumin (Reinsubstanz; Fa. SIGMA-Aldrich; St. Louis MO, USA)
- BQ123 ( $\text{ET}_A$ -Rezeptorantagonist) und BQ3020 ( $\text{ET}_B$ -Rezeptorantagonist) (Reinsubstanz; Fa. Calbiochem; San Diego CA, USA) werden je in PBS auf 1g/ml verdünnt
- Endothelin-1 (Reinsubstanz; Fa. NOVABIOCHEM, Schweiz)
- $[^{125}\text{I}]$ -ET-1 (spez. Aktivität 185kBq/100 $\mu\text{l}$ ; Fa. NEN, Boston, USA)
- Bacitracin (Proteaseninhibitor) (Reinsubstanz; Fa. SIGMA-Aldrich; St. Louis MO, USA)

### ***Organe***

Es wurden Plasmamembranen aus Gesamtnierengewebe folgender Tiergruppen extrahiert:

- SHR
- SHR/NX/NaCl
- SHRSP
- SHRSP/NX/NaCl

### ***Herstellung des Bindungspuffers***

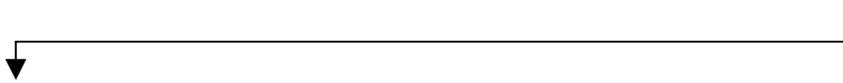
Es wurde ein Bindungspuffer ohne Albumin (zur Verdünnung der Proteinproben), und ein Bindungspuffer mit Albumin (Albumin ist in der Lage, unspezifische Bindungen abzufangen) für die eigentlichen Bindungsstudien benötigt.

Zuerst wurde ein gemeinsamer Ausgangspuffer hergestellt, der sich aus 60,655 g TRIS (100 mM) und 5,0825g MgCl<sub>2</sub> (5 mM) zusammensetzte. Beide Substanzen wurden auf ein Gesamtvolumen von 5 l mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt, wobei der pH-Wert mit 1 M HCl-Lösung auf pH 7,4 eingestellt wurde. Das MgCl<sub>2</sub> fügte man erst ab einem pH-Wert von <10 hinzu, da es sonst ausfallen könnte. Jetzt liegt der fertige Bindungspuffer ohne Albumin (BP ohne Albumin) vor, wovon 1 l aufbewahrt wird. Den restlichen 4 l wurden 4 g S-Carboxymethylalbumin zugesetzt, so dass Albumin in einer Konzentration von 0,1% vorlag (BP mit Albumin). Beide Puffer wurden bei -20°C aufbewahrt.

### ***Herstellung der Endothelin-Verdünnungsreihe***

Um eine Anfangskonzentration von 400 µM des ET-1 herzustellen, wurde 1 g ET-1 in 1003,1 µl BP mit Albumin gelöst. 1000 µl dieser Ausgangsverdünnung wurden mit 39 ml BP + Albumin verdünnt, wodurch man eine Konzentration von 10 µM erhielt. Von dieser Verdünnungsstufe wurden wiederum 500 µl (die übrig gebliebenen 39,5 ml wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt) entnommen und mit 110,6 ml BP mit Albumin weiter verdünnt, so dass man eine Konzentration von 45 nM erhielt und so weiter (siehe Aufstellung, die folgt).

<b>verwendeter Anteil der vorherigen Verdünnung</b>	<b>hinzugefügter BP mit Albumin</b>	<b>entstehende Verdünnung</b>
<i>Volumen (Konzentration)</i>	<i>Volumen</i>	<i>Volumen (Konzentration)</i>
1 ml(400 $\mu$ M)	+ 39 ml	= 40 ml (10 $\mu$ M)



0,5 ml( 10 $\mu$ M)	+ 110,6 ml	= 111,1 ml (45 nM)
60 ml( 45 nM)	+ 60 ml	= 120 ml (22,5 nM)
70 ml( 22,5 nM)	+ 35 ml	= 105 ml (15 nM)
40 ml( 15 nM)	+ 80 ml	= 120 ml ( 5 nM)
30 ml( 5 nM)	+ 60 ml	= 90 ml ( 1,66 nM)
30 ml( 1,66 nM)	+ 60 ml	= 90 ml ( 0,55 nM)

### ***Geräte und Materialien***

- Glaspistill (Fa. BRAUN KG; Melsungen) und dazu passende L-Pistille und Teflonstäbe
- Potter S<sup>®</sup> (Fa. B. BRAUN KG; Melsungen)
- Zentrifugen: Sorvall<sup>®</sup> Superspeed RC2-B  
Beckmann<sup>®</sup> L-70 Ultrazentrifuge  
Eppendorf<sup>®</sup> 5417R-Kühlzentrifuge
- Microplate-Reader<sup>®</sup> 550 mit passenden Mikrotiterplatten
- Vortexgerät<sup>®</sup>
- Pipetten (10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l)(Eppendorf<sup>®</sup>)
- $\gamma$ -Counter (WALLAC1470 WIZARD Automatic<sup>®</sup>)
- Multipipette mit 50 $\mu$ l-Aufsätzen
  
- 12 ml-Greiner<sup>®</sup>-Röhrchen
- 6 ml- Greiner<sup>®</sup>-Röhrchen
- Ultrazentrifugationsröhrchen
- verschließbare 2 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf<sup>®</sup>)
- verschließbare 1,5 ml- Reaktionsgefäße (Eppendorf<sup>®</sup>)

### 2.4.3 Methoden

#### *Extraktion der Plasmamembranfraktionen*

Alle Arbeitsschritte der Membranaufarbeitung wurden auf Eis durchgeführt. Es wurde jeweils ein Organstück von ca. 400 mg abgewogen. Dieses wurde mit einem Skalpell grob zerkleinert und anschließend in ein Glaspistillgefäß überführt, wo bereits 8 ml 20 mM NaHCO<sub>3</sub> vorgelegt wurden. Nun zerkleinerte man das Organstück mit einem Teflon-Homogenisierer bei 1000 U/min am Potter S durch 10-faches Senken des Teflonstabes. Eine noch feinere Dispersion wurde danach durch 15-maliges Absenken eines Glaspistills erreicht. Das Homogenisat wurde 15 min bei 4°C und 3000 U/min zentrifugiert, um Membranfraktion und übrige Zellbestandteile voneinander zu trennen. Der Überstand, in dem sich die Membranfraktionen befinden, wurde wiederum 30 min bei 4°C und 18250 U/min in Ultrazentrifugationsröhrchen zentrifugiert. Das Pellet wird in 1,5 ml BP ohne Albumin resuspendiert und der Überstand verworfen. Ungefähr 60 µl wurden für die anschließende Proteinkonzentrationsmessung aliquotiert, der Rest bei –20°C eingefroren.

#### *Proteinkonzentrationsbestimmung*

Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Plasmamembranfraktionen wird entsprechend des im Kit mitgelieferten Protokolls vorgenommen. Der beiliegende Proteinstandard wird aufgelöst und anschließend mit diesem eine Eichreihe erstellt, die möglichst die erwartete Proteinkonzentration mit einschließt (9 mg ml<sup>-1</sup> ± 5 mg ml<sup>-1</sup>).

Als Lösungsmittel für die Proteinstandards wird – genauso, wie für die zu bestimmenden Proteinproben – BP ohne Albumin verwendet. Es wurden Dreifach-Bestimmungen vorgenommen, um die Variabilität der Messungen zu kompensieren.

Entsprechend der gemessenen Konzentration werden die Proben auf eine einheitliche Konzentration von 1,6 mg/ml (Nierenmembranen) verdünnt.

#### *Scatchard-Bindungsstudien*

Die Proben werden ansteigenden Konzentrationen des Liganden (siehe Abbildung 2.1: Bindungskurve sowie dazugehörigen Text) ausgesetzt, wodurch Messpunkte für die unter Abschnitt 2.4.1 erläuterte Scatchard-Analyse gewonnen werden. Diese Punkte kann man durch die so genannte „heiße“ oder „kalte“ Sättigung bestimmen:

Bei der „heißen“ Sättigung wird die Konzentration des radioaktiv markierten Liganden gesteigert. Von der gesamten Bindung jedes Messpunktes wird die unspezifische Bindung abgezogen, die man durch Ansätze mit überschüssigem unmarkiertem Liganden bestimmt.

Die „kalte“ Sättigung erfolgt durch Zugabe einer konstant geringen Konzentration des Radioliganden, der mit ansteigenden Mengen des unmarkierten ET-1 um die Bindung konkurriert. Wir verwendeten die „kalte“ Sättigung, um unnötig hohe Mengen an Radioaktivität zu vermeiden. Die spezifische Bindung erhält man durch die Subtraktion der cpm-Zahl des Ansatzes für die unspezifische Bindung (der Ligand ist 100-1000fach im Überschuss) von der cpm-Zahl (*Counts per minute*: Zerfälle pro Minute) des jeweiligen Messpunktes.

Im Einzelnen geht man folgendermaßen vor:

Es werden für jede Probe 8 verschließbare 1,5 ml-Reaktionsgefäße für eine Messreihe mit dem spezifischen ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten BQ 123 (die ET<sub>A</sub>-Rezeptoren werden blockiert, wodurch eine Aussage über die ET<sub>B</sub>-Rezeptoren möglich ist) und 8 für den spezifischen ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonisten BQ 3020 (Untersuchung der ET<sub>A</sub>-Rezeptoren durch Blockade der ET<sub>B</sub>-Rezeptoren) benötigt. In jedes der 8 Gefäße werden je 50µl der zuvor hergestellten ET-1-Verdünnungen (0,55 nM, 1,66 nM, 5 nM, 15 nM, 22,5 nM, 45 nM und 10 µM) vorgelegt, so dass sich eine aufsteigende Reihe der Konzentrationen ergibt. In das erste Gefäß kommen statt einer Verdünnung 50 µl BP mit Albumin. Da in diesem Gefäß nur das radioaktiv markierte [<sup>125</sup>I]-ET-1 binden kann und kein unmarkiertes zugegeben wird, erhält man einen Messwert für die Gesamtbindung.

Dann wird in jedes Probenröhrchen ein Ansatz von 50 µl folgender Mischung pipettiert:

- [<sup>125</sup>I]-ET-1                      ⇨                      c=9,5 fmol/50 µl,
- Bacitracin (ein Proteasenhemmstoff) ⇨ c=1 mg/ml,
- Antagonist BQ 123 bzw. 3020    ⇨                      c=55,5 µg/ml

in BP mit HA gelöst und auf ein Volumen von 50 µl gebracht

Der cpm-Wert eines Ansatzes sollte vor Beginn überprüft werden und zwischen 30000 und 40000/50  $\mu$ l Volumen liegen. Ist er niedriger, muss entsprechend mehr [ $^{125}$ I]-ET-1 je Probenröhrchen zugesetzt werden.

Zum Start der Reaktion werden in jedes Reaktionsgefäß je 50  $\mu$ l des zu untersuchenden Proteins mit einer Konzentration von  $c=1,6$  mg/ml pipettiert. Nach Zugabe der Proteine werden die Reaktionsgefäße genau zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2 h hat sich ein Gleichgewicht zwischen der Rezeptor-ET-1-Komplex-Bildung und dem Komplexzerfall eingestellt. Das heißt der Anteil an gebundenem oder freiem radioaktiv markiertem ET-1 und unmarkiertem ET-1 ändert sich nicht mehr. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 ml eiskaltem BP mit Albumin gestoppt. Dann werden die Proben 10 min bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert und der Überstand danach verworfen. Der Anteil an unspezifischen Bindungen an anderen Stellen (außer den Rezeptoren) wird durch zweimaliges Waschen des entstandenen Pellets mit je 1 ml eiskaltem BP mit Albumin reduziert. Die Proben werden nach Zugabe des 1 ml BP mit Albumin gut gemischt und wieder 10 min bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und die Pellets dann noch einmal auf diese Weise gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird der Überstand wiederum verworfen, und die Pellets können bei Raumtemperatur trocknen. Der Anteil des fest an Rezeptoren gebundenen sowie der trotz der Waschschriffe unvermeidliche Anteil des unspezifisch an andere Membranteile gebundenen [ $^{125}$ I]-ET-1 wird im  $\gamma$ -Counter gemessen. Die Radioaktivität nimmt mit steigender Konzentration an unmarkiertem ET-1 ab und ist bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M am geringsten. Dieser Wert wird als Maß für die unspezifische Bindung angenommen, da in diesem Ansatz unmarkiertes ET-1 in solch einem Überschuss vorliegt, dass fast nur das unmarkierte ET-1 spezifisch an die Rezeptoren bindet. Das heißt: die gemessene cpm-Zahl kann fast nur die unspezifische Bindung widerspiegeln. Diese kann nun von allen anderen Messwerten der Konzentrationsreihe abgezogen werden, so dass man ein ziemlich genaues Maß der spezifischen Bindungen erhält.

Die Auswertung und Berechnung der Daten erfolgt Computer-gestützt, so dass die Werte letztendlich als Bindungskurve aufgetragen werden sowie in das Scatchard-Analysediagramm überführt werden können, woraus dann rein graphisch die Werte  $B_{\max}$  und  $K_d$  ermittelt werden können.

## 2.5 Northern Blot

### 2.5.1 Theoretische Grundlagen zur Northern Blot-Analyse

Diese Methode wird zur Detektierung und quantitativen Erfassung bestimmter transkribierter Ribonukleinsäuren (RNA) genutzt<sup>69</sup>. Dazu wird zuerst die Gesamt-RNA aus einem bestimmten Gewebe, welches untersucht werden soll, extrahiert. Diese wird dann in einem Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Diese RNA wird durch Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran übertragen, wo sie hängen bleibt. Fixiert wird sie dort durch UV-Bestrahlung. Jetzt kann man über diese Nylonmembran verschiedene, radioaktiv markierte DNA-Sonden laufen lassen und dadurch feststellen, ob die RNA, die komplementär an die entsprechende DNA bindet, exprimiert wird (Hybridisierung). Ob und in welchem Umfang der DNA-Abschnitt auf der Membran gebunden hat, kann man durch das Auflegen auf eine Phosphoimager<sup>®</sup>-Platte, anschließendes Einscannen und eine computergesteuerte Auswertung bestimmen. Einmal muss pro Membran ein sog. *housekeeping-gene*, was in jeder Körperzelle in gleichem Umfang vorhanden ist (z.B. GAPDH) hybridisiert worden sein. Dieses wird in jeder Zelle des gleichen Organs in gleichem Maße exprimiert und kann daher als Grundwert für die aufgetragene RNA-Menge fungieren. Nach anderen Hybridisierungen wird dann immer ein Quotient aus dem Messwert (Pixel/mm<sup>2</sup>) und dem Messwert bei der GAPDH-Hybridisierung gebildet, so dass man letztendlich keine absoluten, sondern nur relative Werte erhält und so auf unterschiedliche oder gleich starke RNA-Mengen in unterschiedlichen Organen eines Organismus oder den gleichen Organen bei verschiedenen Organismen schließen kann.<sup>70</sup>

### 2.5.2 Material und Methoden für die RNA-Extraktion

#### *Substanzen für die RNA-Extraktion*

Für die vorher durchzuführende RNA-Extraktion aus Gewebe werden benötigt:

- Trizol<sup>®</sup> (Fa. Gibco life technologies)
- Chloroform (Fa. SIGMA-Aldrich; St. Louis MO, USA)
- DEPC (Fa. SIGMA-Aldrich; St. Louis MO, USA)
- Isopropanol (Fa. SIGMA-Aldrich; St. Louis MO, USA)
- 80% Ethanol (abs. Ethanol; Fa. J.T.Baker, VA Deventer/ Holland) (wird mit DEPC behandeltem MilliQ<sup>®</sup>-Wasser hergestellt, um die Aktivität von RNAsen zu unterbinden)
- Agarose *for routine use* (#A9539; Fa. SIGMA-Aldrich; St. Louis MO, USA)

- 20x TAE-Puffer:
  - TRIS (Fa. Merck; Darmstadt)
  - Natriumacetat (Fa. Merck; Darmstadt)
  - EDTA (Fa. Merck; Darmstadt)
 ad ca. 1,8L  $\Rightarrow$  mit Essigsäure auf pH 7,8 titrieren  $\Rightarrow$  auf 2L Gesamtvolumen auffüllen
- Ethidiumbromid (1% Lösung in H<sub>2</sub>O für die Elektrophorese) (Fa. Merck, Darmstadt)
- Laufpuffer:
  - 10 mM Natriumphosphat (pH 7,0)
  - 0,25% Bromphenol blau
  - 0,25% Xylene cyanol FF
  - 50% Glycerol

### ***Geräte und Materialien für die RNA-Extraktion***

- Ultraturrax<sup>®</sup>-Gerät mit Stab
- kleine Gelkammer mit passendem Schlitten und Kamm entsprechend der Probenanzahl
- 1,5 ml- Reaktionsgefäße(Eppendorf<sup>®</sup>)
- 10 ml Greiner<sup>®</sup>-Röhrchen

### ***Organe***

Für die RNA-Extraktion wurde das Nierengewebe von folgenden 4 Gruppen genutzt:

- SHR
- SHR/NX/NaCl
- SHRSP
- SHRSP/NX/NaCl

### ***Extraktion der totalen RNA***

Es werden ca. 100 mg Gewebe abgewogen und grob zerkleinert. Das Gewebestück wird gekühlt im Greiner<sup>®</sup>-Röhrchen 2 x 30 s mit dem Turrax<sup>®</sup>-Stab in 1 ml Trizol<sup>®</sup> (auf höchster Stufe) homogenisiert. Das Gewebe-Homogenisat wird in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß 10 min bei 5000 U/min und 4°C zentrifugiert um Zellüberreste abzuscheiden. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die RNA von der DNA und den Proteinen zu trennen, gibt man jetzt 200 µl Chloroform pro ml Trizol<sup>®</sup> hinzu und schüttelt alles 15 s. Danach werden die Reaktionsgefäße wieder 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 11000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der farblose

Überstand (die Phase darunter ist die DNA-Phase und die unterste die Proteinphase- diese können nach dem Trizol<sup>®</sup>-Protokoll auf Wunsch weiterverarbeitet werden), der sich durch die Zentrifugation ausgebildet hat, wird jetzt vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation werden nun 500 µl Isopropanol zugesetzt, alles durch mehrfaches Schwenken gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jetzt wird 30 min bei 11000 U/min 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend abgegossen. Das entstandene Pellet wird nun mit 1ml 80% Ethanol gewaschen (im Schüttelrührgerät, Vortex<sup>®</sup>) und anschließend 10 min bei 11000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Ethanol wird abgegossen, und das Pellet an der Luft getrocknet, bis es anfängt, transparent bis bräunlich zu werden. Es darf nicht völlig austrocknen. Nun nimmt man das Pellet in 50 µl DEPC-behandeltem MilliQ<sup>®</sup>-Wasser auf.

Um die Konzentration der extrahierten RNA bestimmen zu können, misst man dreifach die optische Dichte (OD) von 1 µl der Probe, welche 1:100 mit DEPC-behandeltem MilliQ-Wasser verdünnt wird, bei einer Wellenlänge von 260nm (A1) und 280nm (A2). Als Gradmesser der Reinheit sollte der A1/A2-Quotient über 1,6 liegen. Teilweise mit Eiweiß oder Phenolresten kontaminierte RNA-Proben haben einen Quotienten unter 1,6.

Entsprechend dem Lambert-Beer-Gesetz

$$E = d * \epsilon * c$$

E=Extinktion (Messwert bei 260nm)

d=Schichtdicke der Messküvette (1cm)

$\epsilon$ =Extinktionskoeffizient

c=Konzentration

berechnet man nach der Messung die Konzentration wie folgt:

$$c = \frac{E}{d * \epsilon}$$

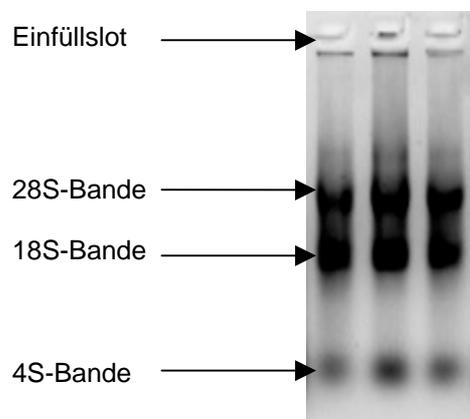
Am Photometer (Fa. SHIMADZU) wurde eine standardisierte Quarz-Küvette verwendet, wobei eine OD-Einheit einer Konzentration von 40 ng/µl bei der RNA-Messung entsprach.

Nach der Konzentrationsbestimmung wird die Qualität der gewonnenen RNA untersucht. Dazu wird ein homologes 1% Agarose-Gel gegossen: 1 g Agarose/100ml einfachen TAE-Puffers wird solange gekocht, bis die Agarose völlig aufgelöst ist und die Flüssigkeit klar erscheint. Man lässt die Lösung jetzt unter Schwenken auf ca. 60°C abkühlen, um Inhomogenitäten durch ungleichmäßige Abkühlung zu vermeiden. Während des Abkühlungsvorganges wird der Lösung

Ethidiumbromid zugegeben. (Ethidiumbromid interkaliert mit DNA/RNA und fluoresziert unter UV-Licht.) Die abgekühlte Agarose-Lösung wird dann in einen geeigneten Schlitten, der mit einem Kamm besteckt wird, luftblasenfrei gegossen. Der Kamm wird dabei in die Nähe eines der freien Ränder des Schlittens angebracht. Man lässt es mindestens 30 min abkühlen und polymerisieren. Nun wird das Gel in eine Elektrophorese-Kammer gelegt und diese so hoch mit einfachem TAE-Puffer gefüllt, dass das Gel 1-2mm mit Puffer bedeckt ist und beide Reservoirs der Kammer gefüllt sind. Es ist darauf zu achten, dass die Kamm-Seite zur Anode hin platziert wird. Der Kamm wird vorsichtig entfernt. Die entstehenden Aussparungen (Slots) dienen der Befüllung mit der RNA-Probe.

Die aufzutrennenden Proben werden folgendermaßen vorbereitet: es werden 0,5 µg RNA entsprechend der Konzentrationsbestimmung von jeder Probe entnommen. Jeder Probe wird dann 1 µl Laufpuffer zugesetzt. Das Ganze wird jetzt mit DEPC-behandeltem MilliQ<sup>®</sup>-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt (weil sich das größere Volumen besser in die Slots des Gels einbringen lässt). Die Proben werden jetzt aufgetragen und bei einer Spannung von 50 V zwischen Kathode und Anode elektrophoretisch aufgetrennt. Die für die RNA-Auftrennung typische 18S- und 28S-Banden liegen zwischen den beiden blauen Farbbändern des Laufpuffers. Man kann die aufgetrennten RNA-Banden nun unter UV-Licht sichtbar machen und fotografieren. Damit wurde nachgewiesen, dass die RNA-Isolation erfolgreich war und keine Degradation stattgefunden hat.

Abbildung 2.3 zeigt beispielhaft eine Fotografie der RNA-Auftrennung auf einem 1%-Agarosegel (die weiter nach vorn gelaufene Bande ist die kleinere 18S-Fraktion - die weiter zum Slot hin liegende Bande ist die 28S-Bande- am weitesten unten erkennt man die 4S-Bande oder t-RNA):



**Abbildung 2.3: Elektrophoretische Auftrennung von RNA**

### 2.5.3 Material und Methoden für die Northern blot-Analyse

#### *Substanzen für die Northern blot-Analyse*

- mit DEPC behandeltes MilliQ<sup>®</sup>-Wasser
- 3M Na-Acetat pH5,2: 24,6g Na-Acetat /100ml *ad aqua* werden aufgelöst, der pH-Wert auf 5,2 eingestellt und die Lösung autoklaviert
- 70% Ethanol (DEPC-behandelt)
- Ionenaustauscherharz (AG<sup>®</sup> 501-X8(D) Resin; Fa.BioRad Laboratories, CA/ USA)
- Formamid (Fa. Roth)(deionisiert):
  - 20ml Formamid werden mit ca. 1 g Ionenaustauscherharz versetzt und 1 h bei Raumtemperatur über Kopf drehend gemischt (ein Teil der Harzkügelchen muss auch nach 30 min noch grün sein, sonst muss noch Harz zugesetzt und weiter gedreht werden), der klare Überstand wird durch einen Papierfilter gefiltert und kann verwendet werden
- 37% Formaldehyd (Fa. Roth)
- Ethidiumbromid (Fa. Gibco life technologies)
- Laufpuffer:
  - 1mM EDTA, pH 8,0
  - 0,25% Bromphenol blau
  - 0,25% Xylene cyanol FF
  - 50% Glycerol
- Agarose (Fa. SIGMA-Aldrich; St. Louis MO, USA)
- RNase-away<sup>®</sup> (Fa. Roth)
- SDS
- 10x MOPS:
  - 0,2M MOPS (Fa. SIGMA-Aldrich; St. Louis MO, USA)
  - 50mM Na-Acetat (Fa. Merck)
  - 10mM EDTA (Fa. Merck)

Zu 800 ml DEPC-behandeltem Wasser werden 41,8 g MOPS gegeben, aufgelöst und der pH-Wert auf 7 eingestellt. Jetzt kommen 26,6 ml DEPC-behandeltes 3 M Na-Acetat und 20 ml DEPC-behandeltes 0,5 M EDTA hinzu. Dann wird mit DEPC-Wasser auf 1 l aufgefüllt. Der Puffer kann 3 Monate dunkel bei Raumtemperatur gelagert werden.
- 20x SSC:
  - 3 M NaCl (Fa. Merck; Darmstadt)
  - 0,3 M Na<sub>3</sub>-citrat x 2H<sub>2</sub>O (Fa. Merck; Darmstadt)

Zu 800 ml MilliQ-Wasser werden 175,3 g NaCl und 88,2 g Na<sub>3</sub>-Citrat x 2H<sub>2</sub>O gegeben und aufgelöst. Der pH-Wert wird auf 7 eingestellt. Die Lösung wird auf 1 l aufgefüllt und papierfiltriert. Dann wird 1 ml DEPC dazugegeben, die Lösung mehrfach geschüttelt und anschließend autoklaviert. Daraus werden noch verschiedene Verdünnungsstufen hergestellt:

<i>Verdünnungsstufe</i>	<i>Volumen an 20x SSC</i>	<i>Volumen ad aqua bidest</i>	<i>Volumen an 10%SDS</i>
6 x SSC	300 ml	700 ml	—
2 x SSC	100 ml	900 ml	—
2 x SSC/0,1%SDS in Lsg.	100 ml	900 ml	10 ml
1 x SSC/0,1%SDS in Lsg.	50 ml	950 ml	10 ml
0,1x SSC/0,1%SDS in Lsg.	5 ml	995 ml	10 ml

- QuickHyb<sup>®</sup>Hybridization Solution (Fa. Stratagene; La Jolla; CA/USA)
- <sup>32</sup>P dCTP (Fa. Amersham)
- Salmon Sperm DNA-Solution (Fa. Gibco)
- Rediprime<sup>®</sup>-Kit (Fa. Amersham)
- Primer für GAPDH-DNA-Sonde: 3541bp
  - Primer sense: 5`TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT
  - antisense: 5`CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC
- Primer für ET-1- DNA-Sonde: 1385bp
  - Primer sense: 5`TTC TCT CTG TTT GTG G
  - antisense: 5`CTG AGT TCT TTT CCT GCT TGG C
- Primer für ECE-DNA-Sonden: 454bp
  - Primer sense: 5` AAC TAC ATG GTC CAG CTG GG
  - antisense: 5` AAC TTC CAG CGA GGA AGA CA

#### ***Geräte und Materialien für die Northern blot-Analyse***

- große Gelkammer mit passendem Schlitten und Kamm entsprechend der Probenanzahl
- Plastikwanne

- 2 mittelgroße Glasplatten
- Gewicht (750 g)
- UV-Stratalinker<sup>®</sup>
- Plastikpipette
- Einwegpinzette
- Hybond<sup>®</sup> N-Nylonmembran (Fa. Amersham)
- Whatman<sup>®</sup> 3MM-Papier
- Zellstoff
- Parafilm
- Sephadex<sup>®</sup>-G50-Säule (Fa.Boehringer; Mannheim)
- 2ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf<sup>®</sup>)

### ***RNA-Fällung***

Zuerst wird, falls die RNA-Konzentration niedrig (unter 1,67µg/µl) sein sollte (in der Regel werden 10µg Gesamt-RNA eingesetzt) eine RNA-Fällung durchgeführt. Man nimmt das 10 µg RNA enthaltende RNA-Lösungsvolumen und füllt es mit DEPC-behandeltem MilliQ<sup>®</sup>-Wasser auf 50 µl auf. Dazu kommen 5 µl 3M Na-Acetat pH 5,2 und 50 µl Isopropanol. Das Gemisch wird gevortext und entweder über Nacht bei –20°C oder für 1 h bei –80°C eingefroren. Danach zentrifugiert man 10 min bei 14000 U/min und 4°C, wodurch sich ein Pellet ausbildet. Der Überstand wird abgossen. Das Pellet wird nun mit 80% Ethanol (der mit DEPC-Wasser hergestellt werden sollte) gewaschen und unter denselben Bedingungen wie vorher zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum abgossen und das Pellet luftgetrocknet (aber auf keinem Fall zu lange, weil sich die RNA sonst nur sehr schwer wieder auflöst). Das Pellet wird in 6 µl DEPC-behandeltem MilliQ-Wasser aufgenommen.

### ***Denaturierung der RNA durch Gelelektrophorese***

Die RNA wird jetzt denaturiert, d.h. RNA-RNA-Doppelstränge werden zu Einzelsträngen aufgebrochen, indem man je Probe 12,5 µl deionisiertes Formamid, 2,5 µl 10x MOPS-Puffer, 4 µl Formaldehyd (37%) und 0,1 µl Ethidiumbromid hinzu gibt, alles gut mischt, 10 min bei 65°C inkubiert und die Proben danach sofort auf Eis stellt. Danach können die Proben bei Raumtemperatur weiterverarbeitet werden. Man pipettiert zu jeder Probe 2,5 µl Bromphenolblau in Glycerol, mischt die Proben, zentrifugiert die ganze Mischung im Reaktionsgefäß kurz herunter und sollte die Proben jetzt unverzüglich auf das schon vorbereitete Gel auftragen.

Das 1%ige Gel setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 3 g Agarose, 30 ml 10x MOPS-Puffer, 219 ml DEPC-behandeltes MilliQ<sup>®</sup>-Wasser werden zusammen aufgekocht, bis sich alle Agarosebestandteile aufgelöst haben. Dann lässt man die Agarose-Lösung unter Schütteln auf ca. 50°C abkühlen und gibt erst jetzt 51 ml Formaldehyd (37%) hinzu. Die Flüssigkeit wird jetzt in einen zuvor mit RNase-away<sup>®</sup> gereinigten Schlitten gegossen, ein passender (auch RNase-freier) Kamm gesteckt und mindestens 30min polymerisieren gelassen. 1x MOPS-Puffer wird so in die Gelkammer (auch diese muss vorher mit RNase-away<sup>®</sup> gereinigt werden) gegossen, dass das Gel ca. 1mm von Puffer bedeckt ist. Die Proben können jetzt in die Slots pipettiert werden. Die angelegte Spannung sollte 4-5V je cm Elektrodenabstand betragen und die Proben sollten solange laufen, bis die Bromphenolblau-Bande ungefähr 2/3 über das Gel gelaufen ist (ca. 3h). Danach wird das Gel ca. 15 min in DEPC-behandeltem MilliQ<sup>®</sup>-Wasser geschwenkt, um Formaldehydreste abzuwaschen. Nun kann es zur Kontrolle unter UV-Licht fotografiert werden.

### ***RNA-Blot***

Jetzt erfolgt die Übertragung der RNA vom Gel auf eine Nylonmembran (*blot*). Dazu schneidet man die Nylonmembran, sowie 6 Whatman 3MM- Filterpapiere genau auf die Größe des Gels zu. Auch eine ca. 10 cm hohe Lage Zellstoff wird entsprechend der Gel-Größe zugeschnitten. Ein Whatman-Papier wird 3x so lang, wie das Gel breit und etwas größer, als das Gel lang ist zugeschnitten. Anschließend wird das große sowie 3 der kleineren Whatman-Filterpapiere mit 20x SSC angefeuchtet und die Nylonmembran 5-10 min in 20x SSC eingeweicht. Jetzt wird eine RNase-freie Glasplatte so über eine Wanne gelegt, dass zwei Seiten frei bleiben. Die Wanne wird mit 20x SSC gefüllt. Das große Whatman-Filterpapier wird so über die Glasplatte gelegt, dass beide Enden ausreichend in den Puffer eintauchen. Jetzt wird das Gel mit der Oberseite nach unten auf das Filterpapier gelegt und Luftblasen unter dem Gel mit einer sterilen Glassaugpipette ausgerollt. Jetzt dichtet man die Seitenbereiche des Gels mit Parafilm<sup>®</sup>-Streifen ab, d.h. man legt die Streifen an allen Stellen um das Gel, um ein seitliches Abweichen der zu übertragenden RNA zu verhindern. Darüber wird die Nylonmembran positioniert (möglichst nur mit steriler Pinzette anfassen) und eventuelle Luftblasen wie vorher entfernt. Genau darüber kommen die drei kleinen angefeuchteten Filterpapiere, darüber die drei trockenen, die Zellstofflage, eine passende Glasplatte und ganz oben ein Gewicht von genau 750 g. Der Transfer ist nach ca. 12 h komplett (über Nacht). Der Abbau des Blots findet in umgekehrter Reihenfolge statt. Die Membran wird kurz in 2x SSC gewaschen und danach zur Kontrolle

fotografiert. Die Fixierung der RNA auf der Membran wird durch 30 s UV-Bestrahlung im UV-Stratalinker<sup>®</sup> erreicht. Jetzt kann die Membran mit verschiedenen Sonden hybridisiert werden.

### ***Markieren der Sonde***

Die an der Membran gebundene RNA wird mit einer korrespondierenden DNA-Sequenz hybridisiert – in diesem Fall mit für die einzelnen Gen-Transkripte spezifischen Sequenzen von cDNA. Um eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, wird die cDNA-Sonde radioaktiv mit <sup>32</sup>P dCTP markiert. Dazu wird die DNA folgendermaßen denaturiert: man füllt die Sonde (je 25 ng) mit MilliQ<sup>®</sup>-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 45 µl auf, stellt sie 5 min in ein kochendes Wasserbad und danach sofort auf Eis. Man gibt die denaturierte Sonde nun in das Rediprime<sup>®</sup>-Gefäß, wo die Reaktionsmischung zur radioaktiven Markierung der Sonde enthalten ist und mischt alles gut. Jetzt kommen 5 µl <sup>32</sup>P d-CTP hinzu, alles wird gut gemischt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um die markierte Sonde jetzt von übrig gebliebenen Nukleotiden und anderen Bestandteilen zu reinigen, lässt man das gesamte Material über eine Filter-Sephadex-G50-Säule laufen. Man zentrifugiert zuerst die Stabilisationsflüssigkeit aus der Säule heraus, füllt dann die gesamte Markierungsmischung mit der enthaltenen radioaktiv markierten Sonde in die Säule und zentrifugiert wiederum bei 2200 U/min. Die unverwertbaren Bestandteile verbleiben in den Gel-Kügelchen der Aufreinigungssäule, während die relativ große cDNA-Sonde ungehindert passieren kann. Die Aktivität der Sonde wird jetzt im Detektor für Radioaktivität (β-Counter) quantitativ gemessen und sollte bei 500 000 cpm/µl Sonde liegen.

### ***Hybridisierung***

Die Hybridisierung der Membran wird in Hybridisierungsflaschen mit QuickHyb<sup>®</sup>-Lösung durchgeführt. Der Hybridisierungsofen wird auf 68°C vorgeheizt und die Membran möglichst eng anliegend an die Flaschenwand angelegt, damit keine Aufwölbungen oder Lufteinschlüsse entstehen, die sonst eventuell nicht von der darüber laufenden Flüssigkeit erfasst werden. Dann wird die Membran 15 min bei 68°C mit 15 ml QuickHyb<sup>®</sup>-Lösung vorhybridisiert. In der Zwischenzeit denaturiert man die Sonde 5 min zusammen mit 100 µl *salmon sperm*-DNA (diese dient dazu, unspezifische Bindungen zu minimieren) im kochenden Wasserbad. Die denaturierte Sonde wird in 1 ml vorgewärmte QuickHyb<sup>®</sup>-Lösung pipettiert und alles gut gemischt. Das Gemisch wird in die Flasche mit der vorhybridisierten Membran gegeben und 1 h bei 68°C im Ofen unter kontinuierlichem Drehen hybridisiert.

Die hybridisierte Membran wird jetzt zur Reduzierung der unspezifischen Bindungen an anderen Stellen der Membran mehrfach mit abnehmenden Konzentrationen SSC (siehe Kapitel Substanzen: 20xSSC und dessen verschiedene Verdünnungsstufen) in einer Wanne, die auf einem Schüttler steht, gewaschen:

2x einige Sekunden in 6 x SSC

2x 15 min in 2 x SSC/0,1%SDS

1x 15 min in 1 x SSC/0,1%SDS

2x 15 min in 0,1xSSC/0,1%SDS bei 60°C

### ***Auswertung des Signals***

Die Membran wird jetzt durch Auflegen auf Filterpapier von überschüssiger Flüssigkeit befreit und luftblasenfrei in Saranfolie eingewickelt. Die Membran kann jetzt entweder mit der hybridisierten Seite bei Raumtemperatur auf eine Phosphoimager<sup>®</sup>-Platte oder bei -20°C auf einen Röntgenfilm aufgelegt werden. Das radioaktive Signal schwärzt die entsprechenden Stellen auf dem Röntgenfilm oder der Phosphorimager<sup>®</sup>-Platte, wobei bei letzterem das Signal durch die Dichte der Bildpunkte direkt quantifiziert und als Bilddatei abgespeichert werden kann. Durch Abzug des Hintergrundrauschens (trotz der Waschschritte eventuell noch vorhandene unspezifische Bindungen) und anschließendes Ins-Verhältnis-Setzen zum ebenfalls ermittelten GAPDH-Signal (siehe Kapitel 2.5.1.) erhält man einen relativen Signalwert, der wiederum mit der exprimierten mRNA-Menge korreliert.

### ***Wiederholung von Hybridisierungen***

Um anschließend diese Membran erneut mit einer anderen Sonde hybridisieren zu können, muss die spezifische Bindung der Sonde der vorherigen Hybridisierung durch Waschen mit kochendem 0,1% SDS gelöst werden (man lässt die Membran solange waschen, bis die SDS-Lösung auf Zimmertemperatur abgekühlt ist). Danach wird die Membran wieder in Saranfolie verpackt, da sie nicht mehr austrocknen darf. Zur Kontrolle der vollständigen Lösung der Bindungen zwischen RNA und DNA auf der Membran wird noch einmal eine Phosphoimager<sup>®</sup>-Platte aufgelegt.

## 2.6 Renale Morphologie

### 2.6.1 Bestimmung des Glomeruloskleroseindex

Die Nieren wurden in Dubosq-Brasil-Lösung für 24 h fixiert, in Alkohol (80%) dehydriert und in Paraffin eingebettet. Nach Aushärten des Paraffins erfolgte die Schnittführung einheitlich am unteren Pol der rechten Niere, um eventuelle Verzerrungen der Messergebnisse durch verschiedene Messgebiete zu vermeiden. Die Schnittdicke betrug 3 µm. Es wurde eine PAS-Färbung durchgeführt, sowie nachfolgend eine Hämatoxylin-Gegenfärbung für die Bewertung der Glomerulosclerose-Indices<sup>71</sup>. Wir bewerteten bei einer 250-fachen Vergrößerung pro Niere 40 Glomerula in der äußeren Rindenschicht. Das Bild wurde vom Mikroskop auf einen Bildschirm übertragen (Zeiss GmbH, Oberkochen/AVT-Horn GmbH, Aalen) Es erfolgte eine geblindete Analyse.

Als Parameter der Schädigung galten:

- Einlagerung von PAS-positivem Material in das Mesangium und um die Kapillarschlinge, segmental oder diffus, ohne, später mit Verlegung des extrakapillären Raumes (Größenverhältnis von Glomerulumknäuel zur Bowmanschen Kapsel)
- anfangs Zunahme des glomerulären Volumens, später narbige Schrumpfung
- Hyperzellularität
- Abnahme der Kapillarlichtungen

Ein semiquantitativer Bewertungsmaßstab mit einer Skala 0–4 kam zur Anwendung<sup>72</sup>:

0 = keine Veränderungen

0,5 = leichte mesangiale Proliferation

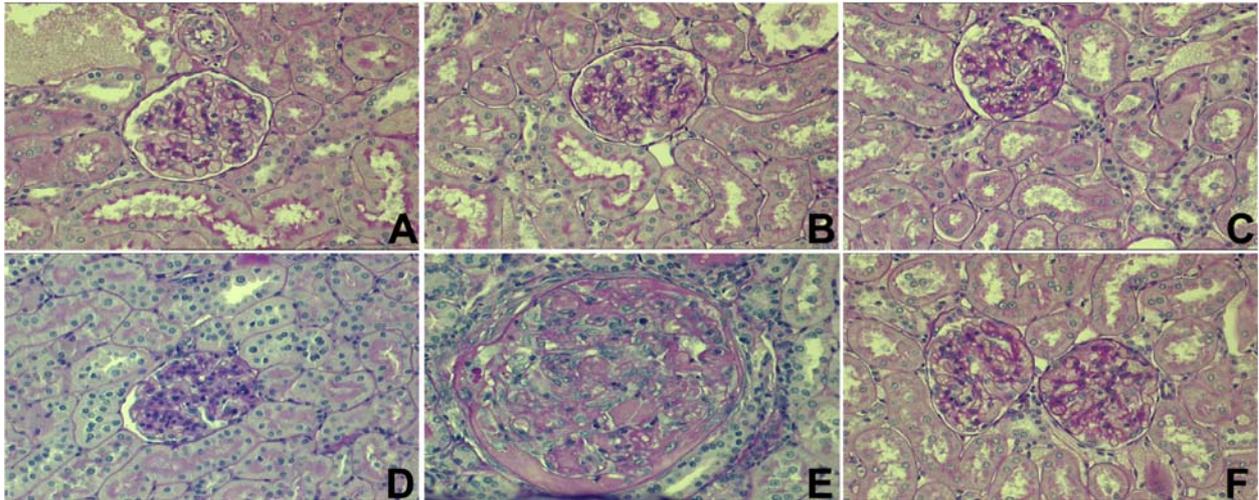
1 = Veränderungen, die weniger als 25 % des Cortex betreffen

2 = Veränderungen, die 25–50% betreffen

3 =Veränderungen, die 50–75% betreffen

4 = extensive Veränderungen mit mehr als 75% des Cortex

(siehe Abbildung 2.4)



**Abbildung 2.4: Glomerulosklerose**

Exemplarisch sind die verschiedenen Stadien dargestellt: A entspricht einem gesunden Glomerulum, B zeigt leichte mesangiale Proliferation, C schon häufigere Einlagerung PAS-positivem Materials, D zeigt die fast vollständige Verlegung des extrakapillären Raums, E beispielhaft die Hyperzellularität, Einlagerung von viel PAS-positivem Material sowie vollständige Verlegung des extrakapillären Raums, F zeigt die spätere narbige Schrumpfung

Der Glomerulosklerose-Index bildet sich aus den Mittelwerten aller gemessenen Bewertungsmaßstäbe. Die PAS-Färbung (Perjodsäure-Schiff-Reaktion) detektiert die Expansion der mesangialen Matrix. Sie beruht darauf, dass die Polysaccharide durch Perjodsäure oxidiert werden, wodurch freie Aldehydgruppen entstehen, die sich dann mit fuchsienschweifiger Säure (auch Leukofuchsin oder Schiff'sches Reagens) zu einem roten Farbstoff verbinden. Die PAS-Reaktion ist nicht spezifisch für Glykogen, auch Mukopolysaccharide und Glykoproteine, sowie Glykolipide und gewisse Phospholipide geben ein positives Resultat.<sup>72</sup>

### 2.6.2 Bestimmung des Fibroseindex

Die Schnitte wurden zunächst mit Hämatoxylin-Eosin und danach mit Sirius Red eingefärbt. Mit dieser Färbung kann spezifisch eine Kollagenvermehrung detektiert und damit eine Fibrose festgestellt werden. Ebenfalls in einer 250-fachen Vergrößerung wurde die Größe der Sirius-Red-gefärbten Bildbereiche bewertet.

Gefäße enthalten Kollagen III – im Interstitium ist vornehmlich Kollagen V und VI vorhanden.

## 2.7 Statistische Analyse

In allen Gruppen (SHR-Sham/NX-NaCl/Normalkost; SHRSP-Sham/NX- NaCl/Normalkost) befanden sich 6-8 Individuen.

Alle Daten wurden als Mittelwerte±Standardfehler vom Mittelwert (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse wurde durch die Analyse der Varianzen (ANOVA) im F-Test und anschließende Justierung nach Bonferroni und nach Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Als signifikant wurden die Unterschiede auf einem Niveau von  $p < 0,05$  betrachtet.