

Kapitel 3. Materialien und Methoden

3.1 Zucht und Auswahl der Fat-1-Mäuse

3.1.1 Zucht der Fat-1-Mäuse

Die transgene Fat-1-Maus wurde im Labor von Jing X. Kang in Boston, Massachusetts, USA, entwickelt. Fat-1-Mäuse tragen das Fat-1-Gen des Rundwurmes *Caenorhabditis elegans*, wodurch sie eine Desaturase exprimieren, mit der es ihnen möglich ist, Omega-3-Fettsäuren aus den korrespondierenden Omega-6-Fettsäuren herzustellen [54].

Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Tiere wurden gewonnen, indem die ursprünglichen transgenen Mäuse zunächst mehrfach mit C57BL/6-Mäusen rückgekreuzt wurden. Aus diesen rückgekreuzten Mäusen wurden anschließend die für die hier vorgelegte Studie genutzten Tiere gezüchtet. In unseren Versuchen wurden ausschließlich heterozygote Fat-1-Mäuse und Wildtyp-Mäuse aus denselben Würfen genutzt.

Alle Tiere erhielten die gleiche Spezialdiät mit 10 % Distelöl. Diese Diät zeichnete sich durch einen hohen Anteil an Omega-6-Fettsäuren und einen niedrigen Anteil an Omega-3-Fettsäuren aus. Für die Versuche wurden ausschließlich männliche Tiere mit einem Alter von 7-10 Wochen und einem Gewicht von 23-30 g verwendet.

Alle Tiere erhielten die Pflege entsprechend der geltenden Richtlinien des Institutes. Die vorliegenden Versuche wurden durch die zuständige Kommission für Tierversuche des Massachusetts General Hospitals, Massachusetts, USA, geprüft. Die Erlaubnis zu Tierversuchen erhielt Jing X. Kang in Verbindung mit einer Förderung der American Cancer Society, dokumentiert unter der Nummer RSG-03-140-01-CNE.

3.1.2 Auswahl der Fat-1-Mäuse

Alle Tiere eines Wurfes wurden in der vierten Woche nach ihrer Geburt mit Hilfe der Gaschromatographie phenotypisiert. Auf diese Weise konnten Wildtyp-Tiere und transgene Fat-1-Tiere voneinander unterschieden werden [54].

Die Phenotypisierung der Tiere wurde anhand einer Gewebeprobe eines Ohres der Tiere durchgeführt. Dazu wurde ein kleiner Teil des äußeren Ohres bei jedem Tier abgetrennt und

mittels gas-chromatographischer Analyse das Verhältnis von Arachidonsäure (20:4 n-6) zu Eicosapentaensäure (22:5 n-3) bestimmt. Für die hier dargestellten Versuche wurden ausschließlich Tiere mit einem AA/EPA-Verhältnis von ca. 1 genutzt (Tabelle 1). Im Folgenden dieser Arbeit bezieht sich die Bezeichnung Fat-1 auf die derart phänotypisierte Gruppe.

Fettsäure	AA 20:4 n-6	EPA 20:5 n-3	DHA 22:6 n-3	AA/EPA	AA/(EPA+DHA)
	% an den gesamten Fettsäuren				
Wildtyp-Mäuse	4.842 ± 1.087	n.d.	1.289 ± 0.2347	4.842 ± 1.087*	3.809 ± 0.447
Fat-1-Mäuse	1.825 ± 0.747	1.973 ± 0.680	3.614 ± 1.935	0.872 ± 0.057	0.351 ± 0.022

Tabelle 1 Ergebnisse der gas-chromatographischer Analyse des Außenohres zur Phänotypisierung. Während bei Wildtyp-Mäusen kein EPA (20:5 n-3) nachweisbar war, zeigten Fat-1-Mäuse einen erhöhten Anteil, *AA/EPA entspricht bei Wildtyp-Mäusen dem prozentualen Anteil von AA, da EPA bei diesen Tieren nicht detektierbar (n.d.) war.

3.2 Versuchsgruppen und Durchführung der Induktion der akuten Hepatitis durch D-Galaktosamin/Lipopolysaccharid

3.2.1 Versuchsgruppen

Um die Wirkung von Omega-3-Fettsäuren auf die akute Hepatitis untersuchen zu können, wurde das D-GaIN/LPS-Modell zur Induktion der Leberentzündung genutzt.

Gruppe	Behandlung	Anzahl
1. Fat-1-Hepatitis	D-GaIN/LPS	N = 5
2. Wildtyp-Hepatitis	D-GaIN/LPS	N = 5
3. Fat-1 gesund	PBS	N = 3
4. Wildtyp gesund	PBS	N = 3

Tabelle 2 Aufteilung der Tiere in Versuchsgruppen mit der entsprechenden Behandlung und Anzahl der Individuen einer Gruppe

Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen unterteilt (Tabelle 1), wobei die erste Gruppe die Fat-1-Hepatitis Prüfgruppe darstellt, bei der die Auswirkung von Omega-3-Fettsäuren auf den Verlauf der akuten Hepatitis untersucht wurde. Die zweite Gruppe diente als Hepatitiskontrollgruppe und bestand aus Wildtyp-Mäusen.

Für die dritte und vierte Gruppe wurden Fat-1- bzw. Wildtyp-Mäuse genutzt, die die gesunden Kontrollgruppen widerspiegeln und zur Generierung physiologischer Daten dienen, um die Auswirkungen der Entwicklung einer akuten Hepatitis durch Vergleich mit den Daten der Versuchsgruppe 1 und 2 zu erkennen.

3.2.2 Durchführung der Induktion der akuten Hepatitis durch D-Galaktosamin/ Lipopolysaccharid

In den Versuchsgruppen 1 und 2 erhielten die Tiere jeweils 700 mg/kg D-Galaktosamin Hydrochlorid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) zusammen mit 2 µg/kg des Lipopolysaccharids von *Salmonella abortus equi* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Die Reagenzien wurden vorher in steriler Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gelöst und zusammen in einem Totalvolumen von 200 µl in das Peritoneum injiziert.

Tieren der gesunden Kontrollgruppen wurde 200 µl steriles PBS intraperitoneal verabreicht. Allen Tieren wurde nach der Injektion der Zugang zu Nahrung verweigert, sie hatten jedoch Zugang zu Wasser.

Sechs Stunden nach der Injektion von D-GaIN/LPS bzw. PBS wurden die Versuchstiere durch die Inhalation von Isoflouran anästhesiert. Anschließend wurde durch einen etwa 2 cm langen Schnitt in der Medioklavicularlinie der Thorax eröffnet und das Herz punktiert. Durch das mittels Kanüle und Spritze abgezogene Blutvolumen kam es zum Eintritt des Todes bei den Versuchstieren.

3.3 Bestimmung der Leberfettzusammensetzung mittels Gas-Chromatographie

Die Gas-Chromatographie ist eine schnelle und einfache Methode zur Analyse der Fettstruktur in verschiedenen Geweben.

Da in diesem Versuch die Wirkung von Omega-3-Fettsäuren auf die Entzündungsmechanismen in der Leber untersucht werden sollte, musste ihre Fettsäurezusammensetzung in Wildtyp- und Fat-1-Mäusen analysiert und verglichen werden. Dazu wurde den Versuchstieren 6 Stunden nach der D-GaIN/LPS-Injektion eine Gewebeprobe der Leber entnommen und in einem Gas-Chromatographen analysiert.

3.3.1 Aufbau und Funktion des Gas-Chromatographen

Das Funktionsprinzip der Gas-Chromatographie besteht darin, dass ein Stoffgemisch aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkung mit der stationären Phase des Gas-Chromatographen und unterschiedlichen Siedetemperaturen der einzelnen Bestandteile dieses Gemisches getrennt wird.

Dazu wird die Probe in einen so genannten Injektor gegeben, dessen Temperatur 200-250 °C beträgt, damit die Probe vollständig verdampft. Anschließend passiert die verdampfte Probe mit Hilfe eines Trägergases (in diesem Fall Helium) eine Trennsäule (in diesem Versuch wurde eine Kapillarsäule benutzt). Diese Trennsäule trägt an ihrer Innenseite eine dünne Schicht, welche die stationäre Phase darstellt. Ein die Säule umgebender Ofen heizt diese kontinuierlich auf, um auf diese Weise eine Trennung des darin befindlichen Stoffgemisches aufgrund unterschiedlicher Siedetemperaturen herbei zu führen. Am Ende der Trennsäule befindet sich ein Detektor, der die einzelnen Fraktionen nachweist. Ein vom Detektor erkanntes Probensignal wird als Peak auf einem Computer angezeigt.

Zur Identifikation der Fraktion wird die Retentionszeit herangezogen. Dabei handelt es sich um die für einen Stoff charakteristische Zeit, die er vom Einspritzen in den Injektor bis zur Erkennung im Detektor benötigt. Das Integral der Fläche des angezeigten Peaks ist proportional zur Konzentration des erkannten Stoffes in der injizierten Probe.

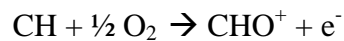
3.3.2 Probenmessung und Datenauswertung

Für die Untersuchung wurden die Lebergewebeproben nach einem von J. X. Kang entwickelten Standardprotokoll aufgearbeitet und die Fettsäurestruktur im Gas-Chromatographen bestimmt [62].

Frisches Lebergewebe wurde in flüssigem Stickstoff zu Puder zerkleinert. Im nächsten Schritt wurden die Fette aus dem Lebergewebe gelöst und zu Fettsäuremethylestern (FAME) derivatisiert. Dazu sind die Proben für 60 Minuten bei 100 °C in 14 % Borontrifluorid (BF₃)-Methanollösung und Hexan inkubiert worden. Diese Reaktion wird durch Borontrifluorid katalysiert und die Fettsäurereste binden an die Methylgruppe des Methanols. Die so entstandenen FAME liegen anschließend gelöst in Hexan vor. Um die FAME vor einer vorzeitigen Oxidation zu schützen, wird das Gemisch im Reagenzglas mit Stickstoff

überschichtet. Nach einer anschließenden Zentrifugation konnten die FAME im Gas-Chromatographen analysiert werden.

In dieser Studie wurde ein vollautomatischer Gas-Chromatograph vom Typ HP 5890 (Hewlett-Packard INC., Palo Alto, CA, USA) mit einem Flammenionisationsdetektor genutzt. Bei einem Flammenionisationsdetektor werden neben dem Trägergas Helium zusätzlich Wasserstoff als Brenngas und Luft am Detektor dazugegeben. Durch die in der Wasserstoffflamme verbrennenden C-C- und C-H-Verbindungen kommt es zur Ionen- und Elektronenbildung. Entstehende Elektronen werden an einer positiven Sammelelektrode aufgefangen und liefern einen Signalstrom.



Die Peaks der gelösten Fettsäuren wurden durch den Vergleich mit Fettsäure-Standards (Nuchek-Prep, Elysian, MN, USA) identifiziert. Mit Hilfe der Perkin-Elmer-M1-Integrator-Software wurde die prozentuale Fläche aller Peaks analysiert.

3.4 Bestimmung der Leberschädigung mittels colorimetrischer Messung der Alanin-Aminotransferase (ALT) im Serum

Die Alaninaminotransferase (ALT) ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung des Ausmaßes der Leberentzündung. Dieses Enzym befindet sich in sehr hohen Konzentrationen im Zytoplasma der Hepatozyten sowie in geringen Mengen in anderen Geweben. Bei einer Schädigung der Zellen kann die ALT in den Blutkreislauf übertreten, wo sie sich anreichert und ihre Aktivität gemessen werden kann. Da das D-GaIN/LPS-Modell spezifisch hepatotoxisch ist und andere Organe nicht betroffen sind, beruhen erhöhte ALT-Werte im Blutsystem auf einer Schädigung der Hepatozyten [58].

In diesem Versuch wurde die Konzentration der ALT im Serum gemessen. Das dazu notwendige Blut konnte 6 Stunden nach der Hepatitisinduktion durch D-GaIN/LPS, durch eine Herzpunktion, gewonnen werden. Das Blut wurde zur Gerinnung für 15 min in einem Kühlraum bei +5 °C gelagert und im Anschluss 15 Minuten bei 1000 x g im selben Kühlraum zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde in einem Gefrierschrank bei -80 °C bis zur ALT-Quantifizierung gelagert.

3.4.1 Aufbau und Funktion des colorimetrischen Tests

Die Alaninaminotransferase gehört zu der Enzymgruppe der Aminotransaminasen und ist wichtiger Bestandteil des Aminosäurestoffwechsels. Sie katalysiert den Austausch der Aminogruppe von Alanin gegen die alpha-Ketogruppe von alpha-Ketoglutarat. Dabei entstehen Pyruvat und Glutamat als Reaktionsendprodukte. In den vorliegenden Versuchen wurde zur Bestimmung der ALT-Aktivität im Serum ein kommerzielles Testsystem benutzt (Biotron Diagnosis INC., Hemet, CA, USA). Die Durchführung des Tests erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Das in diesem Messsystem verwendete Prinzip beruht auf einer Modifikation der von Reitman und Frankel entwickelten Methode zur colorimetrischen ALT-Aktivitätsbestimmung [63]. Hierbei reagiert Dinitrophenylhydrazin in der Gegenwart des Transaminase-Reaktionsproduktes Pyruvat unter Bildung eines Hydrazonkomplexes. Lässt man anschließend den Hydrazonkomplex mit einer alkalischen Natriumhydroxidlösung reagieren, entsteht ein farbiger Komplex, der sich mit einem Spektralphotometer bei der Wellenlänge von 540 nm quantifizieren lässt.

3.4.2 Probenmessungen und Datenauswertung

Die photometrische Quantifizierung der ALT-Aktivität im Serum erfolgte mit Hilfe eines Shimadzu UV160U (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA) Spektralphotometers.

Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Die Berechnung der ALT-Aktivität im Serum erfolgte nach der vom Hersteller angegebenen Formel:

$$\text{ALT-Aktivität (Probe)} = \frac{\text{Absorption der Serumprobe} \times \text{mittlere Testaktivität des Kontrollserums}}{\text{Absorption des Kontrollserums}}$$

Das Kontrollserum wurde vom oben genannten Assayhersteller unter Angabe der mittleren Testaktivität in U/l geliefert. Alle Proben wurden in einer Dreifach-Bestimmung quantifiziert. Der Mittelwert aus den drei erhaltenen Messwerten ging in die weitere Auswertung ein.

Zur Normalisierung der ALT-Aktivität in allen Versuchstieren wurde die gemessene Aktivität der ALT im Serum ins Verhältnis zur Serumproteinkonzentration gesetzt. Die Ermittlung der Serumproteinkonzentration wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Comassie-Plus-Protein-Assay (PIERCE, Rockford, IL, USA) vorgenommen. Dieser Assay basiert auf der Bradford-Methode [64], wobei sich Coomassie Brilliant Blue an das Protein anlagert und der entstandene Komplex spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden kann. Absorption bei 595 nm und Proteinkonzentration verhalten sich proportional zueinander.

Mit Hilfe einer Standardkurve konnte von der gemessenen Absorption der Serumprobe auf die enthaltene Proteinkonzentration geschlossen werden. Die Serumproteinkonzentration wurde in allen Versuchstieren in Doppelbestimmung quantifiziert und aus den zwei Messwerten ein Mittelwert gebildet. Für die Standardisierung der ALT-Aktivität in Bezug auf die Serumproteinkonzentration wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Adjustierte ALT-Aktivität} = \frac{\text{ALT-Aktivität der Probe} \times \text{mittlere Proteinkonzentration aller Versuchstiere}}{\text{Proteinkonzentration der Probe}}$$

Für die statistische Analyse der ALT-Aktivität in den verschiedenen Versuchsgruppen wurde ausschließlich die adjustierte (standardisierte) ALT-Aktivität verwendet.

3.5 Nachweis morphologischer Veränderungen des Lebergewebes nach der D-GaIN/LPS-Injektion mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Neben den enzymhistochemischen Untersuchungen zum Ausmaß der Leberentzündung ist es sinnvoll, die morphologischen Veränderungen im Lebergewebe lichtmikroskopisch zu evaluieren. Dies gilt als Bestätigung dafür, dass die gemessene erhöhte ALT-Aktivität wirklich auf eine Schädigung in der Leber zurückzuführen ist und die typischen morphologischen Veränderungen sichtbar sind.

Neben einer Hematoxylin/Eosin (HE)-Färbung zur Beurteilung der Lebermorphologie wurde auch eine Fluoreszenzfärbung des Zellkerns mit Hilfe von 4',6-Diamino-2-Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) angefertigt. DAPI bindet selektiv an die DNA und führt zu stark fluoreszierenden Zellkernen, die bei der Anregung mit UV-Licht blau zu sehen sind. So ist die

typische Kondensation des Chromatins während der Apoptose durch eine DAPI-Färbung besonders gut sichtbar. Durch den Einsatz dieser Technik werden die Apoptosen gut beurteilbar.

Dazu wurde 6 Stunden nach der Hepatitisinduktion jedem Tier eine Lebergewebeprobe entnommen und umgehend in 10 %iger Formalinlösung fixiert. Nach mindestens 24 Stunden konnten die gewonnenen Gewebeproben in Paraffin gegossen und nach der Aushärtung in 5 µm dünne Scheiben geschnitten werden. Anschließend erfolgte die Deparaffinisierung mittels Ethanol und die Färbung der Probe durch HE bzw. DAPI. Die Proben wurden zur Fluoreszenzfärbung in einer wässrigen DAPI-Lösung mit einer Verdünnung von 1:10000 für 5 - 10 min inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.5.1 Quantifizierung der HE-Färbungen durch Anwendung des HAI-Scores

Die Auswertung der morphologischen Veränderungen im Lebergewebe wurde in einer verblindeten Weise von Prof. Hartmut Lobeck (Institut für Pathologie, Klinikum Ernst von Bergmann, Potsdam) durchgeführt. Zur Quantifizierung der Leberentzündung nutzte Prof. Lobeck für die vorliegende Arbeit den modifizierten Hepatitis-Aktivitäts-Index (HAI) nach Ishak und Knodell [65,66]. Dabei handelt es sich um einen kombinierten Index, der folgende Veränderungen bewertet:

- A) Periportale bzw. periseptale Leberzellnekrosen (0 = keine; 1 = mild; 2 = mild bis moderat; 3 = moderat; 4 = schwer)
- B) Konfluierende Nekrosen (0 = keine; 1 = fokal; 2 = Zone 3 Nekrosen in einigen Gebieten; 3 = Zone 3 Nekrosen in den meisten Gebieten; 4 = Zone 3 Nekrosen + vereinzelt portal-zentral-Brücken (P-C); 5 = Zone 3 Nekrosen + multiple P-Z Brücken; 6 = Pan-azinar oder Multiazinarnekrose)
- C) Fokale lytische Nekrosen, Apoptosen, fokale Entzündung (intra-lobulär) (0 = keine; 1 = eine oder weniger pro Blickfeld bei 10x Objektiv; 2 = 2 bis 4 Foki pro Blickfeld bei 10x Objektiv; 3 = 5 bis 10 Foki pro Blickfeld bei 10x Objektiv; 4 = mehr als 10 Foki pro Blickfeld im 10x Objektiv)
- D) Portale Entzündungszellzahl (0 = keine; 1 = mild; 2 = moderat; 3 = moderat/ markiert; 4 = markiert)

Die unter A) bis D) ermittelten Ziffern werden im Anschluss addiert und ergeben den endgültigen HAI-Score für das jeweilige Versuchstier. Aufgrund der kurzen Zeitperiode von der

Induktion der Hepatitis bis zum Versuchende entwickelten die Tiere keine sichtbaren Fibrosezeichen. Deshalb ging der Fibrosegrad in dieser Arbeit nicht in den HAI-Score mit ein.

3.5.2 Quantifizierung der Apoptosen in den Versuchsgruppen mit Hilfe von DAPI und der Fluoreszenzmikroskopie

Von jeder Versuchsgruppe wurden die Leberproben dreier Versuchstiere mittels DAPI-Färbung untersucht. Anschließend erfolgte die Auswertung unter einem Fluoreszenzmikroskop in einer verblindeten Form durch zwei unabhängige Personen. Zur Untersuchung der Apoptosen wurden charakteristische Zeichen wie die Kondensation des Chromatins und die Auflösung des Zellkerns beurteilt. Pro Probe wurden jeweils 300 zufällig ausgewählte Kerne bewertet und die Anzahl der sichtbaren Apoptosen in diesen Kernen gezählt. Aus den ermittelten Werten wurde im Anschluss ein Mittelwert gebildet, welcher in die statistische Auswertung einging.

3.6 Bestimmung des TNF- α -Gehaltes im Plasma während der akuten Hepatitis mittels ELISA

Um den Gehalt des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α während der D-GaIN/LPS-induzierten Hepatitis zu analysieren, wurde in dieser Arbeit ein ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) genutzt.

Die Bestimmung der TNF- α -Konzentration erfolgte im Blutplasma 90 Minuten nach der Induktion der akuten Leberentzündung. Dazu wurde den Versuchstieren aus der Schwanzvene Blut entnommen, welches in ein mit Heparin benetztes Eppendorfgefäß tropfte, um es vor der Gerinnung zu schützen. Anschließend wurde das gewonnene Blut in einem Kühlraum mit einer Temperatur von +5 °C bei 1000 x g für 15 Minuten zentrifugiert.

Das die obere Schicht bildende Blutplasma wurde abpipettiert und bis zur seiner Verwendung bei -80 °C gefroren.

3.6.1 Aufbau und Funktion des ELISAs

Das Funktionsprinzip eines ELISAs besteht darin, mit Hilfe einer Antigen-Antikörperreaktion und einer anschließenden enzymatisch katalysierten Reaktion eine bestimmte Substanz spektralphotometrisch zu quantifizieren.

In diesem Versuch wurde das OptEIA Mouse TNF ELISA Kit II (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) benutzt. Alle Anwendungen wurden exakt nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Der OptEIA Mouse TNF ELISA ist ein Sandwich ELISA, welcher am Boden einer 96-Loch-Platte monoklonale Maus TNF-Antikörper gebunden hat.

Das in den Proben vorhandene TNF- α bindet sich an den an der Platte haftenden monoklonalen TNF-Antikörper und kann beim anschließenden Auswaschen der Platte nicht mehr gelöst werden. Im nächsten Schritt binden polyklonale TNF-Antikörper am TNF- α und ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht.

Die Platte wird ein weiteres Mal gewaschen und danach TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) als Substratlösung dazu gegeben. Diese Substratlösung entwickelt eine blaue Farbe, deren Intensität proportional zum TNF-Gehalt in der Probe ist. Mit Hilfe einer Stopperlösung (1 M Phosphorsäure) wandelt sich die blaue in eine gelbe Lösung um und kann bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels Spektralphotometer quantifiziert werden.

3.6.2 Probenmessung und Datenauswertung

Das Auslesen der 96-Loch-ELISA-Platten erfolgte mit einem Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer Life And Analytical Sciences, Inc., Wellesley, MA, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Zur Auswertung der Ergebnisse und Berechnung der Konzentration wurde die Wallace 1420 Manager (Perkin Elmer Life And Analytical Sciences, Inc., Wellesley, MA, USA) Software genutzt.

Für die Erstellung der Standardkurve wurde rekombinantes Maus TNF- α aus dem ELISA Kit genutzt. Die Messung erfolgte für jede Probe in einer Doppelbestimmung. Zur Berechnung der TNF-Konzentration wurde der Mittelwert aus den beiden Bestimmungen genutzt.

Die TNF-Konzentrationen im Plasma konnten mit Hilfe des oben beschriebenen Coomassie-Plus-Assay ermittelt werden, wozu der Plasmaproteingehalt jeder Probe in Doppelbestimmung gemessen wurde. Die erhaltene Proteinkonzentration der jeweiligen Probe und die durchschnittliche Proteinkonzentration aller Proben wurde in Beziehung zur TNF- α -Konzentration der jeweiligen Probe gesetzt, um die proteinadjustierte TNF-Konzentration zu erhalten.

$$\text{Adj. TNF-Konzentration} = \frac{\text{TNF-Konzentration der Probe} \times \text{mittlere Proteinkonzentration aller Versuchstiere}}{\text{Proteinkonzentration der Probe}}$$

Für die weitere statistische Auswertung der Messergebnisse wurde die proteinadjustierte TNF-Konzentration genutzt.

3.7 Bestimmung der intrahepatischen mRNA-Konzentrationen von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ mittels Echtzeit RT-PCR

Die Echtzeit RT-PCR ist eine etablierte und zuverlässige Methode, um die Menge einer spezifischen mRNA in einem Gewebe zu quantifizieren.

Zur Bestimmung der mRNA-Expression verschiedener Zytokine im Lebergewebe wurde 6 Stunden nach der D-GaIN/LPS-Injektion ein Teil der Leber entnommen und sofort bei -80 °C schockgefroren.

3.7.1 Funktionsweise der Echtzeit RT-PCR

Bei der Echtzeit RT-PCR werden die Reverse Transkription (RT) und folgende Polymerasekettenreaktion kombiniert, wobei die entstehende DNA-Menge durch einen fluoreszierenden DNA-Farbstoff (in diesem Versuch SYBR-Green) mittels Laser erkannt wird.

Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die DNA oder lagert sich an den DNA-Doppelstrang an. Geht man von einer 100 %igen Effizienz der PCR aus, verdoppelt sich pro Zyklus die DNA-Menge und mit ihr das Fluoreszenzsignal.

Die DNA-Quantifizierung erfolgt durch Bestimmung des Crossing Point (CP)-Wertes. Der CP-Wert entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen, die notwendig sind, um die als Startmenge eingesetzte cDNA bis zu einem konstant definierten Fluoreszenzniveau zu vervielfältigen. Der CP-Wert wird so gewählt, dass er am Anfang der exponentiellen Phase der PCR liegt. Im Crossing Point liegt in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Konzentration an DNA vor.

Durch die sofortige Datenauswertung und die geringe Kontaminationsgefahr ist eine Gelelektrophorese zur Auftrennung der Fragmente im Anschluss an die PCR nicht mehr notwendig.

3.7.2 Probenmessung und Datenauswertung

Die Extraktion der gesamten mRNA aus dem Lebergewebe erfolgte unter der Verwendung der auf Guanidin-Isothiocyanit basierenden TRIzol-Lösung (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Dabei wurden alle Schritte streng nach dem Standardprotokoll des Herstellers ausgeführt. Dazu wurden etwa 80 mg Lebergewebe mit 1 ml TRIzol versetzt und homogenisiert. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurden 0,2 ml Chloroform in das Homogenat gegeben. Während des anschließenden 15 min dauernden Zentrifugierens bildeten sich drei Phasen. Die obere wässrige RNA-enhaltende Phase wurde nun abpipettiert und mit 0,5 ml Isopropylalkohol zur Präzipitation der RNA versetzt. In einem nachfolgenden Waschschrift erfolgte die Reinigung der RNA mittels 75 %igem Ethanol. Nach Entfernen des Ethanols konnte die nun fertig extrahierte RNA im Folgenden in RNase-freiem Wasser gelöst werden. Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA wurde anschließend spektralphotometrisch analysiert. Dies erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm in Bezug zur Absorption bei 280 nm.

Im weiteren Verlauf wurde mittels reverser Transkription cDNA aus der extrahierten RNA hergestellt. Dazu wurden 1 µg der isolierten RNA und nukleasefreies Wasser für 10 min bei 70 °C inkubiert. Oligoprimers und ein Mastermix, bestehend aus MgCl₂, Ribonukleasinhemmer, Pufferlösung und Nucleotiden, aus dem ImProm-II Reverse Transcription System von Promega (Madison, WI, USA) wurden anschließend zu dem Ansatz gegeben. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die reverse Transkription mit Hilfe eines PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA) und folgender Programmierung: 42 °C für 45 min anschließend 95 °C für 5 min. Die erhaltene cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Nach einem Standardprotokoll wurden 5 µl der entstandenen cDNA mit 1,8 µl Primer (sens), 1,8 µl Primer (antisens), 3,9 µl DNase freiem Wasser und 12,5 µl SYBR® Green Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) zusammen pipettiert, so dass sich 25 µl pro Reaktionsgefäß in der Echtzeit RT-PCR befanden. Mit Hilfe des ABI PRISM 7000 Light Cyclers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wurde die Echtzeit RT-PCR ausgeführt. Alle Proben wurden in Dreifach-Bestimmung gemessen und der Mittelwert von diesen Messergebnissen bestimmt. Zur Normalisierung der mRNA-Messwerte wurde die GAP-DH als Housekeeping Gen (HkG) verwendet.

Für die Amplifizierung in der Echtzeit RT-PCR wurden Primer der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) mit folgenden Sequenzen benutzt:

Maus GAPDH, 5'-ATGGACTGTGGTCATGAGCC-3' und 5'-ATTGTCAGCAATG
CATCCTG-3'; Maus IL-1 β , 5'-GCAACTGTTCCTGAACTCAACT-3' und
5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3'; Maus IL-6, 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
und 5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC-3'; Maus TNF- α , 5'-GCTACGACGTGGGCTACA-
3' und 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3'; Maus IFN- γ , 5'-
AGAAATAGTTGAGGAGACAGAAAT-3' und 5'-TTAGATGCATCA ACCAAAGAAGTA-
3'.

Die Berechnung des Expressionsergebnisses erfolgte durch die delta-delta CP-Methode. Hierbei wird zunächst der CP-Wert des HkGs vom CP-Wert des Zielgens subtrahiert ($\delta CP = CP_{\text{Zielgen}} - CP_{\text{HkG}}$). Im nächsten Schritt wird der relative Expressionsunterschied zwischen Kontrollgruppe und Versuchsgruppe hergestellt und dazu vom delta CP-Wert des Versuchstiers der (mittlere) delta CP-Wert der Kontrolltiere abgezogen ($\delta\delta CP = \delta CP_{\text{Versuch}} - \delta CP_{\text{Kontrolle}}$). Da der CP-Wert in der exponentiellen Phase der PCR liegt, ergibt sich für die Berechnung der Ratio die folgende Formel: $2^{-\delta\delta CP}$.