

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere und Behandlung

Alle Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit den Vorschriften zur Behandlung von Labortieren des NIH. Die Tiere wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen bei 22 bis 24°C, einem 12 stündigen Tag- und Nachtrhythmus sowie bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40-60% im Tierstall des NIH gehalten. Die Anästhesie der Tiere erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von 10 µl/g Körpergewicht einer 1:2 Mischung aus Ketamin und Xylazin. Diese Art der Anästhesie bedeutet minimalen Stress für die Tiere und vermindert das Ausmaß der Stimulation des RAAS während der operativen Prozeduren [135].

##### 3.1.1 Versuchstiere für die Etablierung der COX-2-Immunfluoreszenz

Für die Etablierung der COX-2-Immunfluoreszenz an der Maus wurden verschiedene Antikörper an nativem und an perfusionsfixiertem Gewebe getestet. Als Versuchstiere wurden Wildtypmäuse mit einem gemischten 129-C57/BL6 Hintergrund als Positiv- und COX-2-defiziente Mäuse aus dem gleichen Wurf als Negativkontrollen verwendet.

##### 3.1.2 Versuchstiere für die Untersuchung des Effektes von Bumetanid auf die Expression von COX-2 in der Maus

Für die Bumetanidstudie wurden 2 Wochen alte Mäuse mit einem gemischten genetischen Hintergrund (129-C57/BL6) verwendet. Das Diuretikum wurde für 3 Tage mittels osmotischer Minipumpe verabreicht (1003D, ALZET, Cupertino, Kanada) [136]. Diese Methode hat den Vorteil, dass eine definierte Menge eines Medikaments über einen längeren Zeitraum kontinuierlich verabreicht und dadurch eine gleichmäßige Blockade des NKCC2 erreicht werden kann. Damit kann der Stress vermieden werden, dem die Tiere durch eine wiederholte intraperitoneale Injektion der Substanz ausgesetzt gewesen wären. Die Minipumpen wurden zunächst durch ein 10 minütiges Bad in steriler 0,9% Kochsalzlösung vorbereitet. Das Bumetanid wurde entsprechend einer Dosis von 1,6mg/d in PEG gelöst und mittels der dafür vorgesehenen Kanüle in die vorbereiteten osmotischen Minipumpen gefüllt. Nach Anästhesie, Entfernung des Nackenfells und Desinfektion des Operationsgebietes wurde die Haut mit einem transversalen Schnitt eröffnet. Durch Aufdehnung mit einem Nadelhalter wurde eine subkutane

Tasche geschaffen und die Mikropumpe implantiert. Der Verschluss der Tasche erfolgte durch eine Einzelknopfnah mit geflochtenem, nichtresorbierbarem Nahtmaterial (Ethibond, ETHICON, INC. Somerville, USA). Die Tiere hatten freien Zugang zu einer Standardnahrung für Labormäuse. Eine Volumendepletion infolge einer Salzverarmung wurde durch Gabe einer halbnormale Kochsalzlösung anstelle des Trinkwassers verhindert. Nach drei Tagen wurden die Tiere wieder mit der entsprechenden Menge einer 1:2 Mischung aus Ketamin und Xylazin anästhesiert und, wie weiter unten beschrieben, perfusionsfixiert. Die Messung der COX-2-IR erfolgte mittels Immunfluoreszenz entsprechend dem weiter unten beschriebenen Protokoll.

### *3.1.3 Versuchstiere für die Studien an COX-2-defizienten Mäusen (COX-2<sup>-/-</sup>)*

Für die Untersuchungen zum Effekt von COX-2 auf die Expression der JGA Parameter wurden weibliche COX-2-defiziente Mäuse und die entsprechenden Wildtypmäuse aus der Kolonie des NIH verwendet (ursprüngliche Herkunft Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA). Die Mutation wurde in einen gemischten C57/129 genetischen Hintergrund eingekreuzt. Homozygote Tiere wurden durch Inzuchtpaarung von heterozygoten Geschwisterpaaren gewonnen. Die Mäuse hatten freien Zugang zu standardisiertem Mäusefutter und Leitungswasser. Die Genotypisierung erfolgte wie beschrieben [97]. Im Alter von 3 und 12 Monaten wurden die Tiere anästhesiert und dann ebenfalls, wie weiter unten beschrieben perfusionsfixiert.

### *3.1.4 Versuchstiere für die Studien an NOS1-defizienten Mäusen (NOS1<sup>-/-</sup>)*

Die Untersuchung des Effektes von NOS1 auf die Expression von COX-2 und Renin erfolgte an NOS1-defizienten Mäusen aus der Kolonie des NIH. Diese Tiere wurden ursprünglich von Huang et al generiert [137]. Die Mutation wurde in einen gemischten 129-C57/BL6 Hintergrund eingekreuzt und durch Paarung homozygoter Tiere weitergegeben. Drei bis sechs Monate alte Tiere unterschiedlichen Geschlechtes wurden für das Experiment verwendet. NOS1-defiziente Mäuse und die entsprechenden Kontrolltiere wurden in jeweils drei Gruppen eingeteilt und einem experimentellen Protokoll entsprechend Tabelle 4 unterzogen. Die mit der kochsalzreichen Diät behandelten Tiere erhielten außerdem anstelle des Trinkwassers eine physiologische Kochsalzlösung. Die mit der salzarmen Diät behandelten Tiere erhielten zu Beginn der Studie eine

einmalige intraperitoneale Applikation von 1,2mg Furosemid (Sigma-Aldrich, Katalognummer 54-31-9). Nach einer Behandlungsdauer von 8 Tagen erfolgte die Perfusionsfixierung

	n	Genotyp	Behandlung
Gruppe 1	5	NOS1+/+	Diät mit 0,3% NaCl und 1x Furosemid, Leitungswasser
Gruppe 2	6	NOS1-/-	Diät mit 0,3% NaCl und 1x Furosemid, Leitungswasser
Gruppe 3	4	NOS1+/+	Standardfutter und Leitungswasser
Gruppe 4	5	NOS1-/-	Standardfutter und Leitungswasser
Gruppe 5	4	NOS1+/+	Diät mit 4% NaCl und 0,9% NaCl als Trinkwasser
Gruppe 6	6	NOS1-/-	Diät mit 4% NaCl und 0,9% NaCl als Trinkwasser

**Tabelle 2:** Aufteilung der NOS1-/- und der entsprechenden Kontrolltiere in insgesamt 6 Gruppen mit je 4-6 Tieren. Alle Tiere wurden unter vergleichbaren Bedingungen gehalten und je nach Zordnung zu den verschiedenen Gruppen mit der entsprechenden Futtermischung und Leitungswasser mit oder ohne Kochsalzzusatz gefüttert. Die Tiere in den Gruppen mit niedriger Salzaufnahme erhielten außerdem direkt zu Beginn der Studie eine intraperitoneale Injektion von 1,2 mg Furosemid.

### 3.1.5 Versuchstiere für die Untersuchung der Effekte von Apocynin in SHR und WKY

Alle tierexperimentellen Studien wurden am NIDDK/NIH in Bethesda, MD in den USA durchgeführt. Für die Apocynin-Studie wurden sechs Wochen alte männliche SHR und Wistar Kyoto Ratten (WKY) verwendet. (Charles River Laboratories) Jeweils 10 der Tiere wurden in den Tierstall des NIH überführt und nach einer Eingewöhnungsphase von einer Woche in 4 Gruppen mit je 5 Tieren aufgeteilt. Die Tiere hatten freien Zugang zu einer standardisierten Futtermischung für Laborratten. Die Applikation von Apocynin (Sigma, Saint Louis, MI) erfolgte über das Trinkwasser. Die Tiere erhielten, wie in Tabelle 3 angegeben, entweder Leitungswasser oder eine 2.5mM Lösung von Apocynin in Leitungswasser.

		Experimentelle Bedingungen/Trinkwasser
WKY Kontrolle	n=5	Leitungswasser

WKY Apocynin	n=5	2.5mM Apocynin in Leitungswasser
SHR Kontrolle	n=5	Leitungswasser
SHR Apocynin	n=5	2.5mM Apocynin in Leitungswasser

**Tabelle 3:** Aufteilung der Tiere in 4 Gruppen mit je 5 Tieren. Alle Tiere wurden unter vergleichbaren Bedingungen gehalten und je nach Zordnung zur Verum- oder Placebogruppe mit Apocynin in Leitungswasser oder mit reinem Leitungswasser gefüttert.

Die Menge wurde entsprechend den in der Literatur gemachten Angaben gewählt und basiert auf in vivo Studien in denen eine tägliche Dosierung von 4 bis 100 mg/kg Körpergewicht zu einer Inhibition der NADPH Oxidaseaktivität führte [138, 139, 140, 141, 142]. In Vorversuchen wurde für die Tiere eine mittlere tägliche Trinkwasseraufnahme von 25 ml ermittelt, so dass die gewählte Apocyninkonzentration im Trinkwasser in einer täglichen Aufnahme von ca. 40mg/kg und Tag resultieren sollte. Nach einer Behandlungsdauer von drei Wochen wurden verschiedene Messungen durchgeführt. Zum einen wurden die Tiere für 24 Stunden in metabolische Käfige transferiert um die Flüssigkeitsaufnahme zu bestimmen und um eine 24 h Urinprobe zu gewinnen. Danach wurde eine Blutdruckmessung vorgenommen. Diese erfolgte am wachen Tier mittels Schwanzplethysmographie (Visitech BP2000 Blood Pressure Analysis System (Apex, NC) [143]. Um einer Verfälschung der Messergebnisse durch Stress und Bewegungsartefakte vorzubeugen, wurden die Tiere zunächst an drei aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils 2 Stunden an die Messungen gewöhnt. Die eigentlichen Messungen erfolgten in den letzten 30 Minuten des dritten Tages. Pro Tier wurden mindestens 30 Messungen vorgenommen. Die einzelnen Messungen wurden dabei visuell auf die Gleichmäßigkeit der Pulskurve und die Stetigkeit der Abnahme der Pulsamplitude hin untersucht. Messungen mit eindeutigen Bewegungsartefakten wurden verworfen. Danach erfolgte die im Anschluss beschriebene Perfusionsfixierung.

### **3.2 Perfusionsfixierung und Gewebepräparation**

In Vorversuchen wurde für die Maus-Experimente ein für den Gewebeerhalt und die immunologischen, histochemischen und mRNA-basierten Darstellungsverfahren optimiertes Protokoll entwickelt. Um eine Auskühlung der Tiere zu vermeiden, erfolgte die Präparation auf einem beheizbaren Präparationstisch unter einem stereotaktischen Mikroskop. Nach Eröffnung des Abdomens durch eine mediane Laparotomie erfolgte die vorsichtige Trennung der

Aorta abdominalis von der V. cava inferior distal des Abganges beider Aa. renales. Die Aorta wurde an dieser Stelle mit zwei dünnen Fäden angeschlungen. Anschließend wurde die Aorta unmittelbar proximal der Bifurkation vollständig präpariert und mit einem handelsüblichen Zwirnsfaden verschlossen. Dann wurde die Aorta abdominalis direkt proximal des Abganges des Truncus coeliacus präpariert und angeschlungen. Zur Punktion wurde der Blutfluß in der Aorta durch Anspannen der proximalen Anschlingung gestoppt, die Aorta wurde mit einer Mikroschere angeschnitten und mittels eines über dem Bunsenbrenner ausgezogenen und mit Vorspüllösung gefüllten Teflonschlauchs punktiert. Nach Fixierung des Schlauches im Gefäß mit den 2 vorher platzierten Fäden wurde der Blutfluss wieder freigegeben. Im Experiment mit den NOS1-defizienten Mäusen wurden vor Beginn der Perfusionsfixierung 200 µl Blut aus der V. cava inferior entnommen. Die Blutprobe wurde mit einer handelsüblichen 23 Gauge Kanüle und einer mit EDTA bedeckten Spritze gewonnen. Anschließend wurde die proximale Ligatur zur Optimierung des renalen Flusses des Fixans verschlossen und mit der Perfusion entsprechend dem in Tabelle 6 angegebenen Protokoll begonnen. Erst dann wurde die V. cava inferior zum Druckausgleich eröffnet.

Die Perfusionsfixierung der Ratten im SHR-Apocyninversuch wurde nach der im Labor von S. Bachmann entwickelten Methode vorgenommen [13, 81]. Nach Eröffnung des Abdomens erfolgte auch hier die Präparation der Aorta abdominalis direkt proximal der Bifurkation. Nach der Präparation wurde die Aorta mit einer Klemme verschlossen. Im Anschluss wurde die Aorta proximal des Abgangs der Aa. renales präpariert, ebenfalls mit einer Klemme abgeklemmt und mit zwei Fäden angeschlungen. Dann erfolgte die Kanalisierung der Aorta ca. 0,5 cm unterhalb der proximalen Klemme. Zu diesem Zweck wurde mit einer Mikroschere eine ca. 1 mm lange transversale Öffnung geschaffen und mit einem mit Heparin-Natrium gefüllten dünnen Teflonschlauch punktiert. Nach Fixierung des Katheters mit den beiden Fäden wurde die proximale Klemme wieder gelöst. Vor Beginn der Perfusion wurde allen Tieren aus der V. cava inferior mit einer 23 Gauge Kanüle 200 µl Blut entnommen und, wie weiter unten beschrieben, weiterverarbeitet. Im Anschluss an die Blutabnahme wurde auch hier die V. cava inf. zum Druckausgleich eröffnet und gleichzeitig mit der Perfusion begonnen.

	Lösung	PH	Osmol.	Flussrate	Zeit
Vorspülung	Sucrose/PBS	7,35	330 mOsm	0,5ml/s	45 s
Fixierung	3% PFA in Sucrose/PBS	7,35	330 mOsm	0,5ml/s	5 min
Entnahme beider Nieren und Entfernung der beiden Polkappen					
Nachbehandlung zum Schutz vor Gefrierartefakten	Sucrose/PBS	7,35	800 mOsm	Immersion über Nacht	
Nachfixierung für Parafineinbettung	3% PFA in Sucrose/PBS	7,35	330 mOsm	Immersion über Nacht	
die Parafineinbettung erfolgte durch einen kommerziellen Anbieter entsprechend eines Standardprotokolls (HistoServ, Rockville, MD, USA)					
Einfrieren des restlichen Gewebes auf Styroporplättchen in stickstoffgekühltem Isopentan (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland ), Lagerung bei -80°C					

**Tabelle 4:** tabellarische Darstellung des Protokolls für die Perfusionsfixierung der Mäuseexperimente

### 3.3 Bestimmung der Plasmaaktivität von Renin

Die Blutprobe wurde zur Abtrennung der zellulären Bestandteile für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, sofort auf Trockeneis gelegt und dann bis zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die PRA wurde indirekt als Menge von gebildetem Angiotensin I pro Zeiteinheit mittels Radio-Immunoassay (PerkinElmer Life Science, Boston MA) bestimmt. Die Technik war im Labor von J. Schnermann und J. Briggs am NIH etabliert und beruht auf der von Lykkegaard und Poulsen beschriebenen Methode [144].

### 3.4 Bestimmung der Urinausscheidung von 8-Iso-Prostan F2 $\alpha$

Isoprostane entstehen während der Reaktion von ROS mit Arachidonsäure und gelten als Biomarker für oxidativen Stress [118]. In Analogie zur Studie von Schnackenberg und Kollegen wurde die Ausscheidung von 8-Isoprostan F2 $\alpha$ , dem Hauptmetaboliten von F2-Isoprostan im Urin bestimmt. Die Messung erfolgte mittels ELISA entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Cayman Chemicals, Katalognummer 516351). Alle Proben wurden als Duplikate gemessen und die Messwerte gemittelt. Um Verfälschungen der Messwerte durch unterschiedliche Urinmengen zu vermeiden wurde die Gesamtausscheidung in 24 Stunden

gemessen.

### 3.5 Morphometrische Untersuchungen an COX-2-/- Mäusen

Die morphometrischen Untersuchungen an den COX-2-defizienten Mäusen wurden mit einem Olympus Mikroskop durchgeführt (Olympus US, Melville, NY), und die photographische Dokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera (COOL SNAP PRO) und dem Morphometriemodul der ImagePRO Software (Kamera und Software von Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD). Zur Abschätzung der Größe der Glomeruli wurde der renale Kortex in eine superfizielle und eine juxtamedulläre Hälfte eingeteilt. Alle Glomeruli auf 2 verschiedenen Schnitten wurden photographiert, und die Flächen der glomerulären Tufts wurde gemessen. Pro Tier wurden mindestens 100 Glomeruli ausgewertet. Das Ausmaß glomerulosklerotischer Veränderungen in den COX-2-defizienten Mäusen wurde mit einem in der Literatur beschriebenen Verfahren quantifiziert und mit Kontrollmäusen gleichen Alters verglichen [145]. Dazu wurden alle Glomeruli eines standardisierten Schnittes untersucht und entsprechend des Ausmaßes der glomerulären Schäden, wie in Tabelle 7 angegeben, in 4 Gruppen aufgeteilt.

Gruppe	Faktor	
Gruppe 1	0	Normale Morphologie
Gruppe 2	1	Mesangiale Matrixvermehrung
Gruppe 3	2	Tip lesions, Halbmondbildung
Gruppe 4	3	Globale Sklerose /Verödung

**Tabelle 5:** Stratifizierung glomerulärer Veränderungen nach morphologischen Kriterien (adaptiert nach [146]).

Die Anzahl der Glomeruli je Schadensgruppe wurde nun mit dem entsprechenden Faktor multipliziert und die entstehenden Punktzahlen addiert. Durch Normalisierung der so gewonnenen Rohwerte mit der Gesamtzahl der beurteilten Glomeruli wurde dann ein repräsentativer Punktwert gebildet.

### 3.6 Diaphorasereaktion

Die Evaluation der Aktivität der NO Synthase in der Macula densa erfolgte

zunächst mittels Diaphorasereaktion. Grundlage dieser Technik ist ein Elektronentransfer von NADPH zu Nitroblau-tetrazoliumchlorid, wodurch dieses zu einem unlöslichen blauen Farbstoff umgesetzt wird. Die Reaktion wird auf dem Gewebeschnitt durch NO Synthase katalysiert. Die Präzipitation des Farbstoffes erfolgt dabei am Ort der NOS-Aktivität, und Unterschiede in der Intensität der Diaphorasereaktion geben Hinweise auf unterschiedliche Aktivitäten der NO - Synthesen [13]. Für die Diaphorasereaktion wurden bei - 24°C Cryostat Schnitte von 6 µm Dicke angefertigt (Leica CM 3000), auf silanisierten Objektträgern festgefroren und für 1 h bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Die Silanisierung erfolgte nach einem Standardprotokoll durch Inkubation der Objektträger in 1% Aminopropyltriethoxysilan in Wasser (Sigma-Aldrich). Die einzelnen Schnitte wurden mit PAP-Stift (EMS, Hatfield, PA) voneinander getrennt und die Objektträger zur Inkubation in 0,1 M Phosphatpuffer überführt (23 ml 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 77 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 400 ml H<sub>2</sub>O). Danach wurden die Schnitte mit je 100 µl Entwicklungslösung bedeckt und bei 37 °C inkubiert (0,5 mg Nitroblautetrazoliumchlorid, 5 mg NADPH, 15 µl Triton X-100 in 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer). Das Fortschreiten der Farbentwicklung wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Die Reaktion wurde bei Vorliegen eines klar erkennbaren Macula densa Signals und Fehlens einer unspezifischen Hintergrundfärbung gestoppt. Dazu wurden die Schnitte in PBS überführt und 2 x für je 15 Minuten gewaschen. Die Schnitte aller Versuchstiere wurden im gleichen Experiment prozessiert, und die Reaktionszeit wurde für alle Gewebe konstant gehalten. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte wieder mit Hilfe des Olympus Mikroskop und die photographische Dokumentation mit der Digitalkamera. Zur Quantifizierung der Macula densa-assoziierten Diaphoraseaktivität wurden alle klar als Macula densa identifizierbaren Zellen mit deutlichem Diaphorasesignal gezählt und die Gesamtzahl der positiven Zellen zur Gesamtzahl der Glomeruli des entsprechenden Schnittes ins Verhältnis gesetzt.

### **3.7 Immunchemische Darstellungsverfahren**

#### **3.7.1 Immunfluoreszenz**

Für den Proteinnachweis von NOS1, COX-2 und Renin wurden verschiedene Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies verwendet (Tabelle 8). Bis auf



den für die Mäuse verwendeten monoklonalen aufgereinigten Antikörper gegen COX-2 waren alle Antikörper bereits in vorhergehenden Arbeiten charakterisiert worden [13, 40, 81, 87]. Die entsprechenden Sekundärantikörper sind in Tabelle 9 angegeben.

Antikörper gegen	Spezies	Verd.	Herkunft
NOS1	rb, polyklonal	1:400	B. Mayer, Universität Graz, Österreich
NOS1	rb, polyklonal	1:150	Santa Cruz, USA
Renin (Maus)	rb, polyklonal	1:5000	T. Inagami, Vanderbilt University USA
COX-2 (Ratte)	gt, polyklonal	1:500	Santa Cruz, USA

**Tabelle 6:** Auflistung der in den immunologischen Darstellungsverfahren verwendeten Primärantikörper

Für die Immunfluoreszenz wurden 5 µm dicke Cryostatschnitte hergestellt, bei Raumluft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Vor der Färbung wurden die Schnitte zunächst mit einem PAP Stift voneinander getrennt und dann für 5 Minuten in PBS rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte vorsichtig mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit 100µl einer 5% Trockenmilchpulverlösung in PBS überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 2h wurden die Schnitte wieder für 3x5 Minuten in PBS gewaschen und dann mit der Primärantikörperlösung in 5% Trockenmilch in PBS überschichtet. Die Konzentrationen für die jeweiligen Antikörper sind in Tabelle 8 angegeben. Die Schnitte wurden nun zunächst für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler und dann bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach erfolgten erneut 3 Waschschrte in PBS. Anschließend wurden die Schnitte mit 50 µl Trockenmilch-PBS-Lösung und dem entsprechenden Sekundärantikörper mit der in Tabelle 9 angegebenen Verdünnung überschichtet und für 2 Stunden auf dem Schüttler bei Raumtemperatur in einer dunklen Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit einem Tropfen einer 1:1 Lösung von Glycerin (Merck) und PBS überschichtet und mit einem Deckgläschen bedeckt. Um ein Verblässen der Fluoreszenz zu vermeiden, wurden die Schnitte bei 4°C in Dunkelheit gelagert und innerhalb von 3 Tagen ausgewertet.

Sekundärantikörper	Verd.	Hersteller
--------------------	-------	------------

Anti rb, CY3 konjugiert	1:250	Dianova, Deutschland
Anti gt, Peroxidase konjugiert	1:20	DAKO, Dänemark
Anti Maus CY3 konjugiert	1:250	Jackson Lab, USA
Anti Maus CY2 konjugiert	1:100	Jackson Lab, USA
Anti gt, FITC konjugiert	1:50	Santa Cruz, USA

**Tabelle 7:** Auflistung der in den immunologischen Darstellungsverfahren verwendeten Sekundärantikörper

### 3.7.2 COX-2-Immunfluoreszenz an murinem Gewebe

Für die COX-2-Immunfluoreszenzfärbung an murinem Gewebe wurden zunächst mehrere unterschiedliche Primärantikörper (Tabelle 10) und verschiedene Modifikationen vom weiter oben beschriebenen Protokoll getestet und systematisch optimiert. Nach dem modifizierten Protokoll wurden die Schnitte vor der Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen für 10 Minuten in einer 0,1 molaren Lösung von Natriumzitat (Sigma-Aldrich) in PBS gekocht. Die Applikation des Primärantikörpers erfolgte in einer jeweils 1% Lösung von Trockenmilch und BSA in TBST [147]. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte durch Inkubation der Schnitte mit einem CY2 Fluochrom markierten Sekundärantikörper gegen Kaninchen Immunglobuline.

Antikörper	Spez.	Zielpeptid
Santa Cruz M19	gt	Carboxyterminales Ende, Ratte
Santa Cruz N20	gt	Aminotermiales Ende, Ratte
Santa Cruz H62	rb	AS 50-111, humane COX-2
Cayman	rb	AS 584-598, murine COX-2
Cayman	rb	AS 584-598, murine COX-2 (affinitätsgereinigt)

**Tabelle 8:** Auflistung aller getesteten Antikörper gegen COX-2 mit den entsprechenden Zielpeptiden. gt steht für Ziege (goat), rb für Kaninchen (rabbit).

### 3.7.3 Renin-Immunhistochemie

Als Detektionssystem zur Darstellung des gebundenen anti-Renin-Antikörpers wurde ein kommerziell erhältliches Peroxidase-Anti-Peroxidase-System eingesetzt (Vector ABC, Vector labs, Burlingame, CA 94010). Hierzu wurden jeweils zwei 6 µm dicke Paraffinschnitte pro Versuchstier auf einem

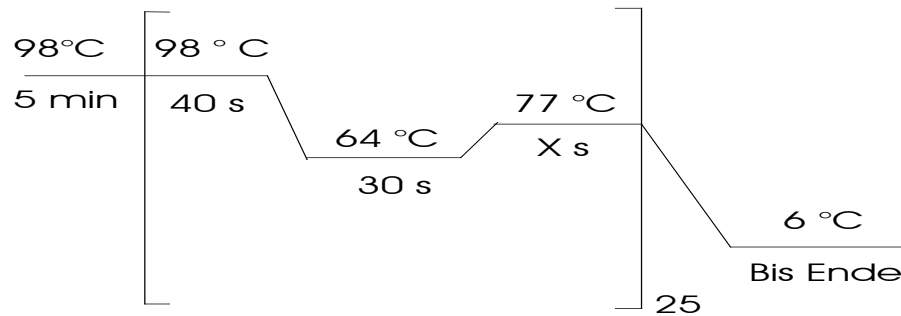
Rotationsmikrotom angefertigt und entparaffiniert. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Schnitte für 30 min mit Blockingmedium bei Raumtemperatur inkubiert. Endogene Peroxidasen wurden durch eine 12 minütige Exposition der Schnitte mit einer 10% Lösung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) in 100% Methanol (J.T.Baker, Griesheim) zerstört. Der Primärantikörper wurde in einer 1:5000 Verdünnung in Blockingmedium aufgetragen. Die Inkubation erfolgte zunächst für 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4°C. Die Detektion des gebundenen Antikörpers einschließlich der Signalamplifizierung mittels Streptavidin/Biotin erfolgte entsprechend dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll. Der Fortgang der Farbreaktion wurde unter dem Mikroskop verfolgt und auf dem ersten verarbeiteten Schnitt durch Waschen in PBS gestoppt, als ein klares Signal erkennbar war. Alle weiteren Schnitte wurden dann für die gleiche Zeit inkubiert. Die Auswertung der Versuche erfolgte unter Verwendung des Olympus Mikroskops und der Digitalkamera.

### **3.8 Renin-mRNA In situ-Hybridisierung**

Alle ISH Experimente wurden im Labor von S. Bachmann in Berlin durchgeführt. Die Technik ist in diesem Labor etabliert [40, 81].

#### *3.8.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)*

Die in den beschriebenen Experimenten verwendete cDNA für Renin lag als 330 Basenpaare langes, Sac 1 Pst 1 Fragment des Maus-Reningens (Ren-2d, K. Gross, Buffalo, USA), subkloniert in den pBS II SK-Vektor und flankiert durch die Promotorstellen für Sp6 und T7 RNA Polymerase vor. Die in vitro-Vervielfältigung der DNA erfolgte mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR). Dafür wurden 1 ng Vektor mit Insert, je 2 µl Oligonukleotid T3 und T7 und 10 µl Nukleotidpuffer (alles Boehringer Mannheim) mit doppelt destilliertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet und in einer PCR Maschine (PerkinElmer LAS Germany GmbH, 63110 Rodgau - Jügesheim, Deutschland) auf 98 °C erhitzt. Nach Erreichen der Zieltemperatur wurden 1µl einer in 20µl Verdünnungspuffer gelösten Vent DNA Polymeraselösung unter das Öl pipettiert und das PCR Programm gestartet.



**Abbildung 6:** graphische Darstellung des Temperaturverlaufes eines PCR Zyklus. Nach Aufschmelzen der DNA Stränge und Zufuhr der DNA Polymerase wurde das eigentliche Amplifizierungsprogramm gestartet. Dafür wurde der Reaktionsansatz auf 64°C abgekühlt, um eine Anlagerung des Enzymes zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz auf 77°C erwärmt und für 30s inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Amplifikation der DNA. Nach den 30s wurden die entstandenen DNA Doppelstränge durch Erhitzen auf 98°C getrennt und ein neuer Zyklus wurde begonnen. Nach 25 Zyklen wurde die Reaktion gestoppt und der Ansatz auf 6°C gekühlt.

Nach Ablauf des Programms wurde der Reaktionsansatz mit einer Pipette vom Öl getrennt und dann mittels Phenol/Chloroformextraktion gereinigt. Dazu wurde die DNA Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt, für 2 min intensiv gemischt und dann für 5 min bei 13000 UpM zentrifugiert. Die untere Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 1/10 Volumen 4 M Natriumacetat und der 2,5 fachen Menge -20 °C kaltem Ethanol. Nach 2 h bei 4 °C wurde die gefällte DNA bei 13000 rpm und Raumtemperatur für 30 min zentrifugiert. Der überstehende Alkohol wurde entfernt und das Pellet mit 200 µl 80 % Ethanol gewaschen und dann erneut für 5 Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 20 µl 1/10 TE Puffer resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Größe und Integrität des PCR Produktes wurden mit Agarosegelelektrophorese und anschließender Visualisierung mit Ethidiumbromid gesichert und die DNA Konzentration mittels Photometrie bestimmt (GenQuant2, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland).

### 3.8.2 Transkription

Je 300 ng des so hergestellten PCR-Produktes wurden für die Transkription verwendet. Dafür wurde ein Ansatz aus 2 µl Transkriptionspuffer, der DNA und 2 µl mit Digoxigenin markiertem Nukleotidmix hergestellt und mit DEPC Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde dann mit 2 µl -20 °C kalte RNA Polymerase

(alles Boehringer Mannheim) versetzt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 135 min wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 2 µl 0,2 Mol EDTA, 2,5 µl Lithiumchlorid und 75 µl -20°C kaltem absolutem Ethanol gestoppt und die RNA für 16 Stunden bei -20°C gefällt. Die gefällte RNA wurde durch Zentrifugation vom Überstand getrennt, in 80% Ethanol gewaschen und dann in 50-100 µl DEPC Wasser aufgenommen. Die Qualität der mRNA Proben wurde wiederum durch Agarosegelelektrophorese sichergestellt und die Konzentration der enthaltenen RNA photometrisch bestimmt (GenQuant2, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland).

### 3.8.3 Hybridisierung

Für die In situ Hybridisierung wurden 7 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt und auf silanisierte Objektträger aufgebracht (1% Aminopropyltriethoxysilan in Wasser, Sigma). Die Schnitte wurden für 20 Minuten in eisgekühltem 4% PFA (pH 7,4) nachfixiert und 3x5 Minuten in PBS, 2x5 Minuten in zweifach destilliertem Wasser und dann erneut 2x5 Minuten bei Raumtemperatur in PBS gewaschen. Zur Denaturierung von Proteinen, welche die Hybridisierung der Sonden behindern könnten, wurden die Schnitte für 10 Minuten in 0,1 M Salzsäure inkubiert und dann mit 0,25% Essigsäure (J.T. Baker) in 0,1 M Triethanolamin (Sigma) bei einem pH von 7,4 für 20 Minuten acetyliert. Nach erneuten Waschschritten in PBS wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 96%) für jeweils 5 Minuten dehydriert und dann bei Raumtemperatur auf einem autoklavierten und mit reinem Alkohol gesäuberten Ständer getrocknet. Die Hybridisierung wurde durch eine zweistündige Inkubation mit Prähybridmix in einer 40°C feuchtwarmen Inkubationskammer vorbereitet. Der Prähybridmix bestand aus 50% deionisiertem Formamid (Merck), 50% DEPC Wasser mit 2,5x Denhardt's (50x=0,5 g Ficoll 400, 0,5 g Polyvinylpyrrolidon, 0,5 g bovines Serumalbumin (alles Boehringer) ad 50 ml DEPC-H<sub>2</sub>O), 25 mMol EDTA (Roth) mit einem pH von 8,0, 40 mMol Tris-HCl (Trometamol (Merck)/HCl (J.T. Baker) mit einem pH von 7,4), 0,25 mg/ml t-RNA (Boehringer) und 20mM NaCl (Merck). Während dieser 2 Stunden wurde der Hybridmix aus 50% deionisiertem Formamid, 40% DEPC- Wasser mit 10x Denhardt's, 1mM EDTA (pH 8), 200mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mg/ml t-RNA , 330 mMol NaCl, 1mg/ml Heringssperma-DNA (Boehringer), 0,2 M Dithiothreitol (Biomol, Hamburg), 10% Dextransulfat (Sigma)

und 10 pg Digoxigenin-gelabelter Riboprobe hergestellt. Nach Absaugen des überschüssigen Prähybridmix wurden die Schnitte mit 20 µl Hybridmix überschichtet und zum Schutz vor dem Austrocknen mit einem silanisierten Deckgläschen (Sigmacoat, Sigma) bedeckt und bei 43°C inkubiert. Die optimale Konzentration und Inkubationstemperatur für die Sonde wurden in Vorläuferexperimenten bestimmt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden RNase-freie Reagenzien und zweifach destilliertes, autoklaviertes Wasser verwendet. Die Inkubationsschritte erfolgten in einer autoklavierten und mit reinem Alkohol gereinigten feuchten Kammer. Die Spezifität des Renin-Signals wurde durch die typische Lokalisation in der afferenten Arteriole sichergestellt.

#### 3.8.4 Waschen der Gewebsschnitte zur Entfernung nicht hybridisierter mRNA-Proben

Nach einer Hybridisierungszeit von 16 Stunden wurden zunächst die Deckgläschen durch Schwenken der Objektträger in einer 40 ° warmen Lösung aus 2xSSC ohne Formamid entfernt. Dann erfolgten Waschschrte (von 1-7) in verschiedenen Lösungen entsprechend Tabelle 11.

	Waschlösung	Temp.	Zeit
1	2 x SSC	40°C	30 min
2	1 x SSC mit 50% deionisiertem Formamid	40°C	60 min
3	0,375 x SSC mit 50% deionisiertem Formamid	40°C	60 min
4	0,2 x SSC mit 50% deionisiertem Formamid	40°C	30 min
5	0,5 x SSC	RT	10 min
6	0,5 x SSC	RT	10 min
7	0,2 x SSC	RT	10 min

**Tabelle 9:** tabellarische Darstellung des Protokolls für die Waschschrte mit den entsprechenden Lösungen, Temperaturen und Zeitangaben. SSC steht für „*standard saline citrate*“ bestehend aus 15% Natriumcitrat (Merck) und 18% NaCl in Wasser.

#### 3.8.5 Detektion der hybridisierten mRNA-Proben

Zur Detektion der hybridisierten mRNA-Proben wurde ein immunhistochemisches Verfahren verwendet, das auf einer durch alkalische Phosphatase katalysierten Farbreaktion basiert. Dazu wurden die Schnitte für 10 Minuten in Puffer 1 inkubiert. Dieser bestand aus 100 mMol Tris-HCl und 150 mMol NaCl in Wasser. Der pH wurde durch Titration mit NaOH auf 7,5 eingestellt. Unspezifische

Proteinbindungsstellen wurden durch eine 30 Minuten-Inkubation mit jeweils 100 µl modifiziertem Blockingmedium abgesättigt. Das Blockingmedium bestand aus 1% Boehringer Blockingreagenz und 0,5% bovinem Serumalbumin in Puffer 1. Im Anschluss daran wurden die Schnitte mit 50 µl einer Lösung eines Sekundärantikörpers inkubiert (mit alkalischer Phosphatase gekoppeltes Antidigoxigenin-FAB-Fragment 1:500 in modifiziertem Blockingmedium). Die Objektträger wurden für 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden überschüssige Antikörper durch 2 Waschschrte in Puffer 1 bei Raumtemperatur entfernt. Dann wurden die Schnitte für mindestens 2 Minuten in Puffer 3 equilibriert (100mM Tris-HCl, 100 mMol NaCl, 50 mMol MgCl<sub>2</sub> in Wasser, pH 9,5). Zur Generierung eines Signals wurden die Schnitte mit 100 µl Entwicklungspuffer überschichtet. Dieser setzte sich aus 4,5 µl/ml Nitroblau-Tetrazolium (75 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid, Boehringer), 3,5µl/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (50mg/ml in 100% Dimethylformamid) und Levamisole (Sigma) in Puffer 3 zusammen und wurde direkt vor Beginn der Entwicklung hergestellt. Die Entwicklung des Farbsignals erfolgte zunächst für 2 Stunden bei Raumtemperatur und dann bei 4°C in einer abgedunkelten, feuchten Kammer. Das Fortschreiten der Signalentwicklung wurde in regelmäßigen Abständen unter dem Mikroskop kontrolliert, und die Reaktion nach ca. 12h beendet, bevor eine zu starke Hintergrundfärbung zu verzeichnen war. Beim Abstoppen der Farbreaktion wurde darauf geachtet, dass die Inkubationszeit für alle Schnitte konstant gehalten wurde. Alle Waschschrte erfolgten bei Raumtemperatur. Zur Terminierung der Signalentwicklung wurden die Schnitte 2x für 15 Minuten in Puffer 4 (100mM Tris-HCl, 1mM EDTA in Wasser, pH 8,0) und anschließend für 2x15 Minuten in PBS inkubiert. Die Schnitte wurden mit 50% Glycerin in PBS überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Auswertung aller ISH Experimente erfolgte mit einem Leica DMRB- Mikroskop mit Verwendung des Interferenzkontrastes. Die Photos wurden mit der angeschlossenen SPOT3 Digitalkamera aufgenommen.

### **3.9 Quantifizierung der Signale**

Zur Quantifizierung der Macula densa-assoziierten Immunfluoreszenz und Diaphoraseaktivität wurden alle Macula densa-Zellen mit klarem Signal und erkennbarem zugehörigen Glomerulum gezählt und addiert. Die dadurch gewonnene Summe wurde durch die Gesamtzahl der Glomeruli auf dem Schnitt

dividiert und auf 100 Glomeruli normalisiert. Für jedes Tier wurden 2 Schnitte mit 50-100 Glomeruli ausgewertet. Diese Methode der Quantifizierung ist etabliert und beruht auf der Beobachtung, dass eine Stimulation der Expression von NOS1 oder COX-2 mit einer Rekrutierung von Macula densa-Zellen einhergeht, welche die entsprechenden Enzyme exprimieren [13, 81]. Die Quantifizierung der IR erfolgte mit dem Fluoreszenzaufsatz des Olympus Mikroskop und die Photodokumentation mit der angeschlossenen Digitalkamera.

Da die hier verwendete Methode keine Differenzierung einzelner granulärer Zellen in der afferenten Arteriole zulässt, erfolgte die Quantifizierung der Renin-IR und mRNA Expression durch Zählung aller JGA mit deutlich erkennbarem Signal und angeschnittenem Glomerulum. Die gewonnene Summe wurde dann zur Normalisierung durch die Gesamtzahl der Glomeruli auf dem Schnitt dividiert. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass eine Stimulation der Expression von Renin auch zu einer Rekrutierung von neuen Muskelzellen im Verlauf der afferenten Arteriole führt. Die damit verbundene Steigerung der Anzahl gefärbter Zellen erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass auf einem Schnitt JGA mit Renin-Signal angetroffen werden [12, 13, 81]. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass eine Steigerung der Renin-Expression einzelner Zellen, wie sie zum Beispiel durch einen gesteigerten Sympathikotonus hervorgerufen wird, nicht erfasst werden kann [148].

### **3.10 Präsentation der Daten und statistische Bearbeitung**

Alle Messwerte wurden als Mittelwert $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test, und die Nullhypothese wurde bei einem  $p < 0,05$  verworfen. In diesem Fall wurden die gefundenen Unterschiede als signifikant angesehen.