

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Zur Beantwortung der in 1.4 formulierten Fragestellungen wurde eine tierexperimentelle Studie an Ratten durchgeführt. Im Vergleich standen normoglykämische, diabetische sowie diabetische mit dem eNOS-Enhancer AVE3085 behandelten Sprague Dawley Ratten. Nach einem Beobachtungszeitraum von 48 Tagen wurde *in vivo* die arterielle Gefäßfunktion der Widerstandsgefäße der Vergleichsgruppen mit dem Modell des autoperfundierten Hinterbeines der Ratte gemessen. Anschließend wurde der M. quadriceps des nicht-perfundierten anderen Beines zu molekularbiologischen Analysen der Proteinexpression von eNOS und der mRNA-Expression des Zytokins TNF α und der Adhäsionsmoleküle ICAM-I und VCAM-I entnommen.

2.2 Versuchstierhaltung und Genehmigung

In der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Freien Universität Berlin (FEM) fand die Versuchstierhaltung statt. Die Ratten hatten freien Zugang zu dem Standardfutter Altromin C1000 (Fa. Altromin, Deutschland) und Wasser. Der Tierstall ist klimatisiert und hat einen automatisierten 12-Stunden-Tages- und Nachtzyklus. Das Tierexperiment wurde mit dem Aktenzeichen G0163/47 am 07.07.2004 genehmigt.

2.3 Versuchsaufbau

2.3.1 Vergleichsgruppen der Studie

An Versuchstieren standen 8 Wochen alte, 300 g schwere, männliche Sprague Dawley Ratten, Firma Charles River, Sulzfeld, Deutschland, zur Verfügung. Die Studie beinhaltet folgende Tiergruppen:

- 1) SD (normoglykämische Ratten als Kontrollen)
- 2) STZ (diabetische, unbehandelte Ratten)
- 3) STZ/eNOS (diabetische, mit AVE3085 behandelte Ratten, Dosierung 10mg/kg KG)

Jede Tiergruppe bestand aus 8 Tieren (n=8). Der Beobachtungszeitraum betrug 48 Tage. Der Diabetes wurde bei den jeweiligen Versuchstieren mit Streptozotocin (STZ; einmalige intraperitoneale Injektion, 70 mg/kg KG; Sigma Aldrich, Deutschland) induziert. Das STZ-Modell und die Applikationsform werden im Folgenden näher erläutert. Die pharmakologisch behandelten Tiergruppen erhielten ab dem 5. Tag post

STZ-Injektion die Substanz AVE3085 (10 mg/kg/Tag; per os) bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes.

2.3.2 Die Substanz AVE3085

Die Substanz AVE3085 ist ein eNOS-Transkriptionsverstärker und wurde von der Firma Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (Industriepark Höchst, Frankfurt, Deutschland) entwickelt. Sie ist eine vollsynthetische Entwicklungssubstanz, die aus einem Screening-Verfahren gewonnen worden ist (aus patentrechtlichen Gründen ist keine Struktur- und Summenformel dieser Substanz aufgeführt). AVE3085 wurde in vorangegangenen *in vitro*-Studien von Aventis Pharma auf seine Fähigkeit die eNOS-Expression zu steigern überprüft. Über eine Erhöhung der Luciferase-Expression konnte eine eNOS-Expressionssteigerung nach Behandlung mit AVE3085 indirekt in einem Zelltest mit transfizierten Zellen, bei denen das Enzym Luciferase an das eNOS-Promotoren gekoppelt war, nachgewiesen werden ($EC_{50} = 0,409 \mu\text{M/l}$). In einem weiteren Zelltest mit humanen Nabelschnurzellen („*human umbilical endothelial cells*“, HUVECs) ist eine Steigerung der eNOS-Expression durch die Transkriptionsaktivierung nach Behandlung mit dieser Substanz nachgewiesen worden. Dabei wurden HUVECs mit AVE3085 inkubiert und mittels eines spezifischen Western Blot eine erhöhte eNOS-Proteinexpression nachgewiesen ($EC_{50} = 0,3\text{-}1\mu\text{M/l}$). Eine andere Studie zeigte, dass der eNOS-Transkriptionsverstärker die zelluläre Transkription in der humanen Endothelzelllinie EA.hy 926 aktiviert und zu einer erhöhten NO-Produktion in humanen Endothelzellen führt (Wohlfart et al., Manuskript eingereicht). Die Behandlung von knochenmarkständigen mononuklearen Zellen mit einem Strukturderivat dieser Substanz konnte bereits *ex vivo* über eine Erhöhung der eNOS die Funktionalität dieser Zellen steigern [135]. Dagegen zeigte die Behandlung einer stabilen Zelllinie ohne Endothel mit AVE3085 keine erhöhte eNOS-Expression. Dieses Ergebnis zeigt, dass der eNOS-Transkriptionsverstärker selektiv zu einer Steigerung der endothelialen NO-Synthese führt, ohne dabei die induzierbare NOS- oder die neuronale NOS-Expression zu erhöhen (Wohlfart et al., Manuskript eingereicht).

AVE3085 wurde in einer Dosis von 10 mg/kg/Tag verabreicht, da im Rahmen einer Pilotstudie am gleichen Rattenstamm gezeigt werden konnte, dass diese Dosis den arteriellen Blutdruck bei gesunden Ratten nicht beeinflusst.

2.3.3 Die Induktion des Diabetes mellitus durch Streptozotozin

2.3.3.1 Die Wirkung des Streptozotozin

Streptozotozin (STZ) wurde 1967 als eine antibiotische Substanz entdeckt, die aus dem Bakterium *Streptomyces griseus* synthetisiert wird und inhibierend auf grampositive und gramnegative Bakterien und zytotoxisch auf Zellen *in vivo* wirkt [136]. Es ist ein Zellgift, das selektiv die β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas schnell und irreversibel nekrotisiert und so einen Diabetes mellitus Typ-1 induziert [137]. Heutzutage weiss man, dass der diabetogene Effekt von STZ darin liegt, dass es als ein N-Acetylglucosamin-Kinase (GlcNAC) -Analogon das Enzym O-GlcNACase in den β -Zellen des Pankreas inhibiert und so zu einem β -Zelltod führt. Die β -Zellen sind selektiv sensibel für STZ, weil sie im Gegensatz zu den anderen Zellen des Pankreas ein hohes Level der GlcNACase-Transferase exprimieren, die die GlcNACase zu Proteinen zur O-Glycosylierung transferiert [138]. Ausserdem wirkt STZ kanzerogen [139]. Die diabetogene Toxizität von STZ liegt zwischen 25-100 mg/kg KG. Während bei der niedrigen Dosierung die Möglichkeit einer Spontanheilung besteht, ist auf die hohe Dosierung mit einer hohen Mortalitätsrate wegen metabolischer Komplikationen, wie Ketonurie, zu rechnen [137, 140, 141]. Die Letaldosis 50 (LD 50) liegt bei 140 mg/kg KG [142]. Um eine sichere Induktion des Diabetes mellitus mit einer möglichst geringen Sterberate zu gewährleisten, wurde in dieser vorliegenden Arbeit eine Dosis von 70 mg/kg KG i.p. gewählt. STZ verursacht in der hier verwendeten Dosis einen schweren Diabetes mit Symptomen, die auch beim Menschen mit Diabetes mellitus Typ-1 auftreten. Nach sechs Wochen kommt es zu einer Verminderung des Körpergewichtes, zu Hyperglykämie, Polydipsie, Glukosurie und Polyurie [143].

2.3.3.2 Methodenwahl

Das Modell der STZ-Injektion induziert einen dem Menschen möglichst ähnlichen Diabetes mellitus Typ-1 in einem kurzen überschaubaren Beobachtungszeitraum. Es erlaubt realitätsnah kardiovaskuläre Komplikationen zu untersuchen [111, 144-146]. Dieses Tiermodell bietet Vorteile im Vergleich zu Tiermodellen, die auf eine andere Art diabetische Bedingungen schaffen. Durch die β -Zell-selektive Wirkung des STZ bleibt die Restfunktion der anderen Pankreaszellen erhalten [137]. Nicht alle β -Zellen nekrotisieren unter STZ, d.h. eine residuale Insulinsekretion verbleibt und eine zusätzliche Insulinsubstitution ist wegen des kurzen Beobachtungszeitraums nicht nötig. Weiterhin bietet das STZ-Modell auch praktische Vorteile. Mittels der intraperitonealen

STZ-Injektion ist es möglich bei vielen Ratten den Diabetes mellitus zu induzieren. Bei einer Dosierung von 70 mg/kg KG gibt es eine hohe Erfolgsquote, die Mortalitätsrate bleibt sehr gering. Demhingegen wird zum Beispiel bei einer Pankreatoektomie ein Diabetes mellitus Typ-1 herbeigeführt, aber gleichzeitig alle weiteren wichtigen Funktionen des Pankreas entfernt. Die verloren gegangenen endokrinen und exokrinen Produkte, wie Verdauungsenzyme, Insulin, Glucagon müssten substituiert werden.

2.3.3.3 Durchführung der STZ-Injektion zur Diabetes mellitus-Induktion

Am 5. Tag des Beobachtungszeitraumes wurden den diabetischen Tiergruppen einmalig STZ injiziert (70mg/kg KG, i.p.). Zur besseren intraperitonealen Resorption wurde den Tieren 24 Stunden vor Injektion das Futter bei weiter bestehendem Wasserangebot weggenommen und direkt nach Injektion wieder zugeführt [140, 147]. Das pulverförmige STZ wurde in 0,1 Mol Zitratpuffer bei einer Dosierung von 0,2 ml pro Tier gelöst und dann appliziert [147]. Wegen der niedrigen Halbwertszeit von 10 min und hohen Photo- und Thermoinstabilität musste das STZ rasch verabreicht werden. Die jeweiligen Rattengruppen erhielten randomisiert 70 mg/kg KG STZ. Die Kontrollen wurden mit einem Vehikel ohne Streptozotozin behandelt. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes wurden bei den STZ-injizierten Ratten das Körpergewicht und der Blutglukosespiegel alle 7 Tage kontrolliert. Der Spiegel der Blutglukose wurde mit einem Blutzuckermessgerät der Firma Acutrend Sensor, Fa. Roche, Deutschland, an einem Blutstropfen aus den Rattenschwanzvenen gemessen.

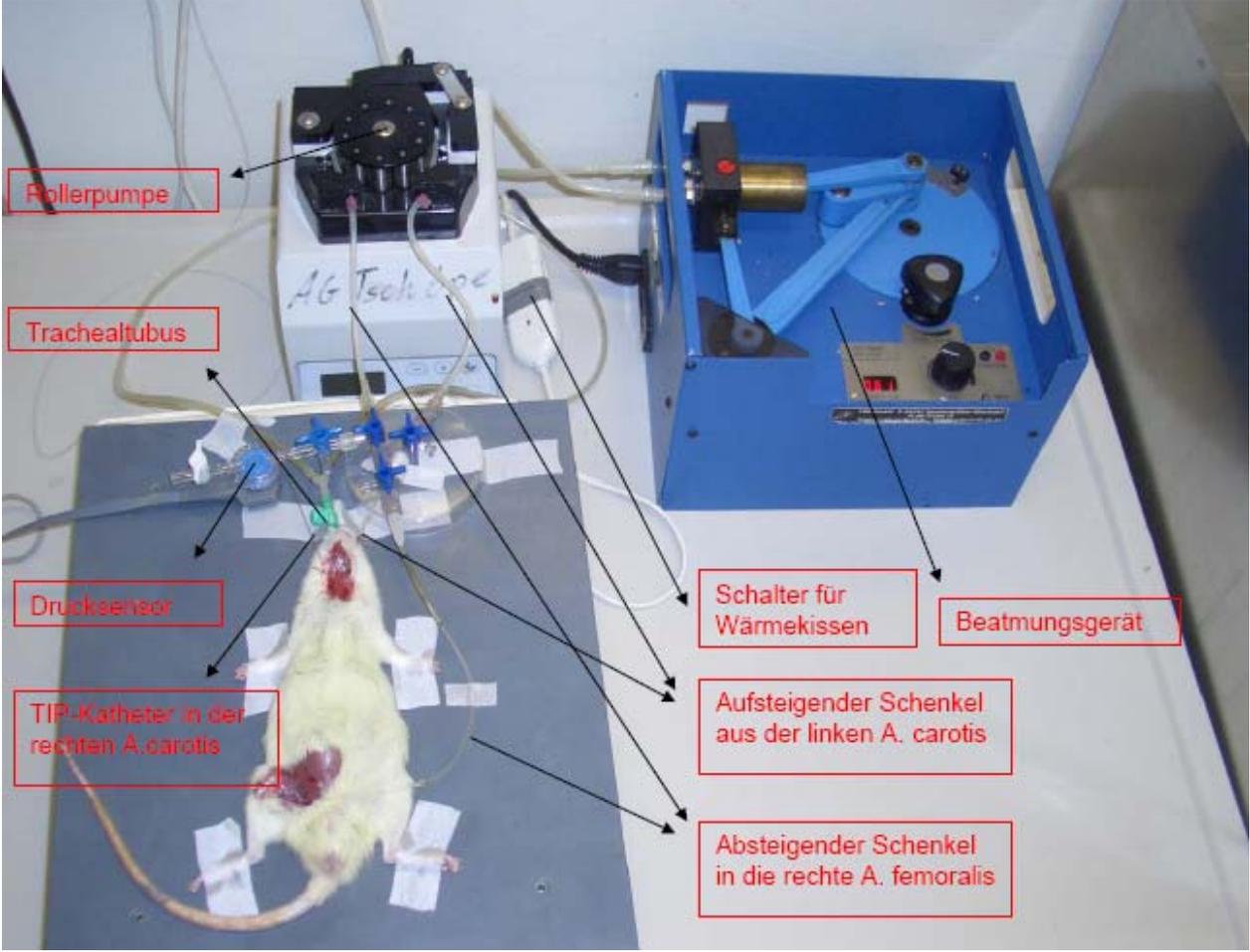
2.3.4 Untersuchung der Gefäßfunktion

2.3.4.1 Die Methode des Modells des autoperfundierten Hinterbeines der Ratte

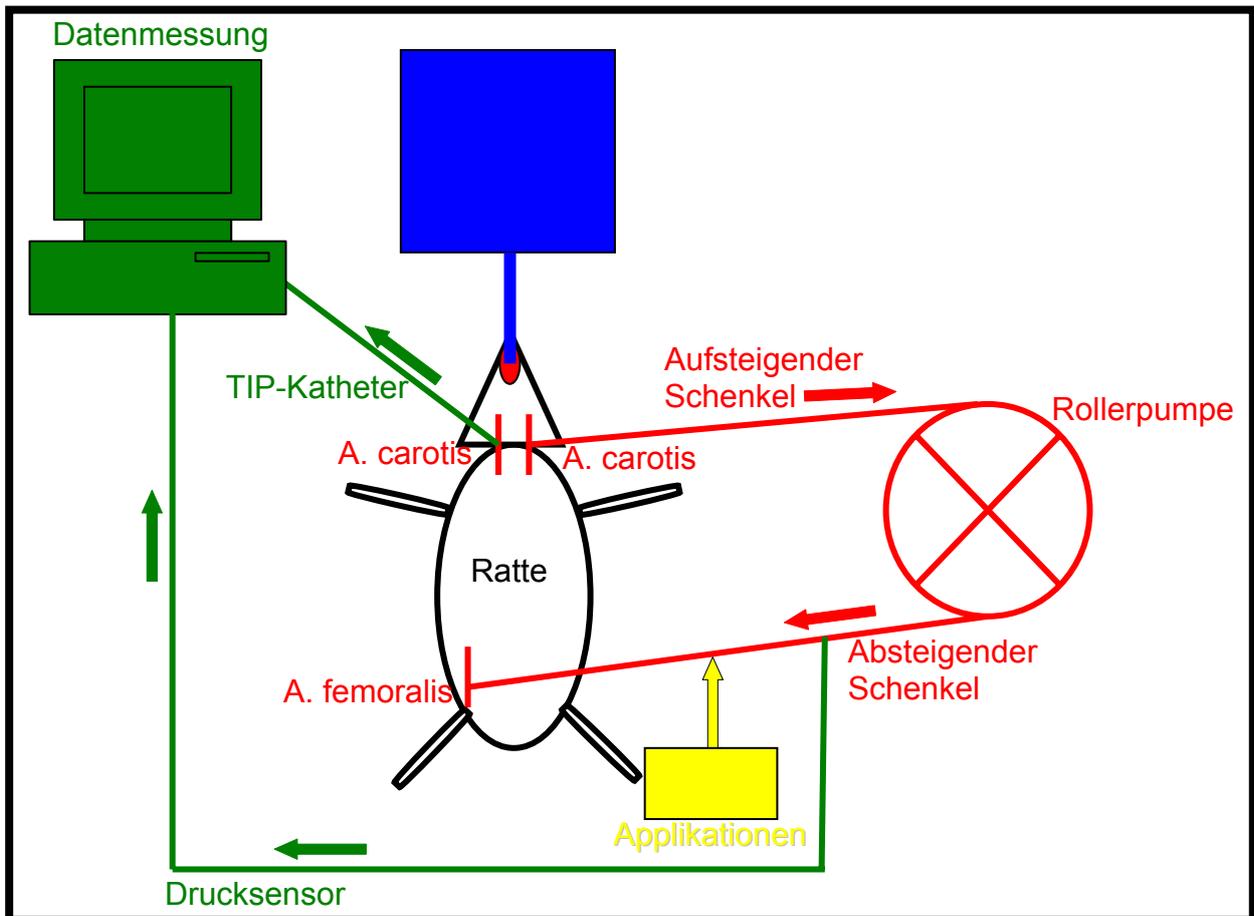
Bei dem Modell des autoperfundierten Hinterbeines der Ratte wird ein extrakorporaler Kreislauf von der linken A. carotis über eine Rollerpumpe (ABIMED, Deutschland) zur rechten A. femoralis gelegt. Der Kreislauf besteht aus Kunststoffkathetern und wird in einen aufsteigenden (von der A. carotis zur Rollerpumpe) und in einen absteigenden (von der Rollerpumpe zur A. femoralis) Schenkel unterteilt (siehe Figur 1A, 1B, 2). Die Rollerpumpe sorgt für einen laminaren und gleichmäßigen Fluß (2ml/kg/min) von der A. carotis zur A. femoralis, hält den Druck in diesem Kreislauf auf einem konstanten Niveau, verhindert systemische Druckschwankungen während der Systole oder Diastole und erlaubt Applikationen verschiedener Lösungen. Durch diese Autoperfusion

baut sich ein weitgehend konstanter Druck im absteigenden Schenkel des Kathetersystems auf.

Figur 1A: Das Modell des autoperfundierten Hinterbeines der Ratte

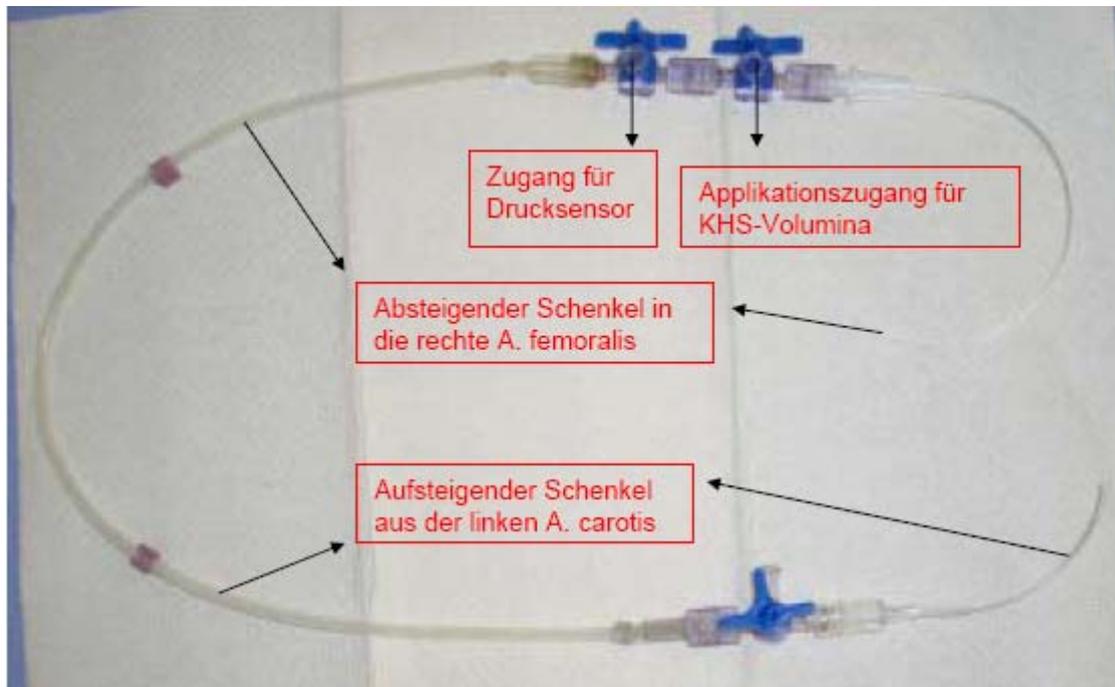


Figur 1B: Schema des Modells des autoperfundierten Hinterbeines der Ratte



Das Kathetersystem ist im absteigenden Schenkel mit einem Drucksensor (ABIMED, Deutschland) verbunden, der dort den Druck misst (siehe Figur 1A, B). Der Druck resultiert aus dem Gesamtwiderstand der A. femoralis und ihrem Endstromgebiet des Hinterbeines. Bei einer Dilatation der Gefäße in diesem Bereich kommt es bei einem konstanten Fluss zu einer Verringerung des Gesamtwiderstandes. Es resultiert ein Druckabfall im absteigenden Schenkel des Kathetersystems. Eine Erniedrigung des Druckes ist unter diesen Bedingungen nur möglich, wenn sich der Durchmesser der A. femoralis und/oder der Arterien in ihrem Gefäßbett vergrößert. Über einen in den absteigenden Schenkel des Kathetersystem integrierten Drei-Wege-Hahn können unterschiedliche Volumina (80, 200, 600 $\mu\text{l}/\text{kg}$ KG) Krebs-Henseleit-Lösung (KHS) appliziert werden (siehe Figur 2) und so durch eine Erhöhung der Schubspannung eine endothel-abhängige Vasodilatation induzieren [147]. Eine endothelunabhängige Dilatation wurde durch die Applikation des NO-Donator Nitroprussid-Natrium (NN) (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) induziert.

Figur 2: Das Kathetersystem der Autoperfusion ist in einen auf- und absteigenden Schenkel unterteilt



2.3.4.2 Methodenwahl

Mit dem Modell des autoperfundierten Hinterbeines der Ratte kann man die Endothelfunktion von Widerstandsgefäßen im Endstromgebiet der Arteria femoralis untersuchen [111, 147]. Da diese Technik *in vivo* erfolgt, können auch neurohumorale Einflüsse auf das Zielorgan und den Gesamtkreislauf beobachtet und miteinbezogen werden. Dieses Modell wurde in unserem Labor etabliert [147]. Das Modell des autoperfundierten Hinterbeines der Ratte ermöglicht die Messung der endothelunabhängigen und endothelabhängigen Vasodilatation. Bei der Erfassung der endothelabhängigen Vasodilatation macht man sich der Wandschubspannung („*viscous drag*“, „*shear stress*“) zu nutze, die der physiologische Reiz für die Vasodilatation ist. Diese wird durch das strömende Blut an der luminalen Seite der Endothelzelloberfläche erzeugt. Auf diesen mechanischen Einfluss reagiert das Endothel mit einer verstärkten basalen NO-Freisetzung, die zu einer schubspannungsabhängigen Vasodilatation führt. Die physiologische Bedeutung liegt darin, dass sich dem Gewebe vorgeschaltete Gefäße auf einen erhöhten Durchblutungsbedarf anpassen, die nicht von zirkulierenden metabolischen Vasodilatoren erreicht werden können. In dem autoperfundierten Hinterpfotenmodell wird der sogenannte „*shear stress*“ durch Injektion verschiedener

KHS-Volumina stimuliert [148]. KHS-Lösung ist seit Jahrzehnten in der Perfusionsphysiologie etabliert und daher hier anwendbar. Zur Stimulierung des „*shear stress*“ werden drei verschiedene Volumina gewählt, um unterschiedliche Endothelaktivitäten vergleichen zu können. Die endothelunabhängige Vasodilatation wird durch die Applikation des NO-Donators Nitroprussidnatrium induziert. Das Gefäßbett reagiert durch exogen zugeführtes NO mit einer Vasodilatation. Das Maß der Vasodilatation ist das Integral und die Amplitude des Punctum Maximum der Dilatation. Um ein vergleichbares Aktivitätsniveau der Gefäße der zu vergleichenden Tiergruppen zu gewährleisten, werden nur die Tiere einbezogen, deren Basalniveau des Gefäßdruckes bei $\pm 15\%$ 120 mmHg liegt. So kann das Miteinbeziehen von Störfaktoren verhindert werden, wie zum Beispiel auftretende Vasospasmen oder verschiedene Basalniveaus, denn ein konstringiertes Gefäß reagiert auf „*shear stress*“ mit einer verschieden starken Vasodilatation als ein schon nahezu dilatiertes Gefäß. Eine in die Autoperfusion eingeschaltete Rollerpumpe sorgt für einen laminaren und konstanten Blutfluss und verhindert so systemische Druckschwankungen während der Systole bzw. Diastole.

2.3.4.3 Der operative Eingriff

2.3.4.3.1 Die Narkose

Durch eine intraperitoneale Injektion wurde das Narkotikum injiziert. Als Narkotikum wurde Chloralhydrat mit einer Dosierung von 400 mg/kg KG gewählt.

2.3.4.3.2 Die Intubation und Beatmung

Die Ratte wurde auf dem Rücken liegend an allen vier Extremitäten fixiert und der Kopf überstreckt. Mit einer Mosquitoklemme wurde der Unterkiefer nach ventral und die Zunge manuell zur Seite geschoben. Unter der freien Sicht konnte der Tubus durch die Stimmritze in die Trachea geschoben werden. Anschliessend wurde der Tubus mit dem Beatmungsgerät verbunden (siehe Figur 1A, 1B). Gleichmäßige und respiratorabhängige Thoraxbewegungen bewiesen die erfolgreiche Intubation und schlossen eine Fehlintubation in den Ösophagus aus. Die Ratte wurde mit Raumluft und einem Hubvolumen von 6,5 ml/kg KG bei einer Beatmungsfrequenz von 60/min ventilert.

2.3.4.3.3 Der extrakorporale Kreislauf wird an die Gefäße der Ratte angeschlossen

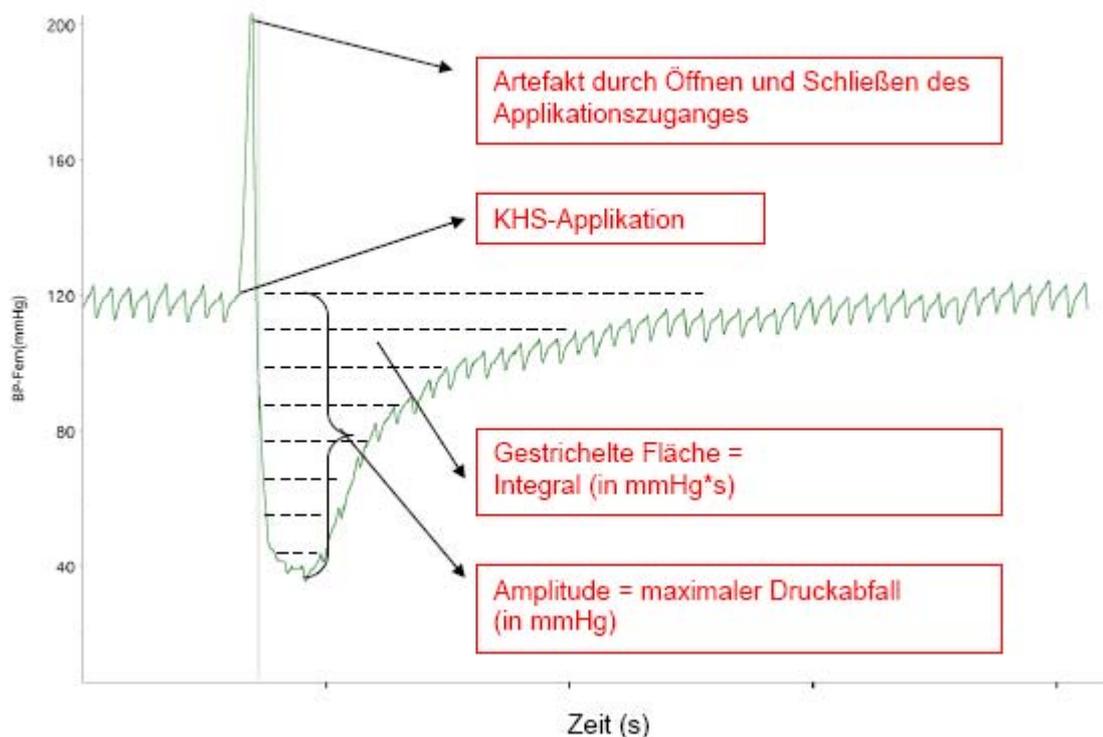
Ausgehend von der Fossa jugularis des Manubrium sterni wurde von kaudal nach kranial ein ca. 2 cm langer, medianer Hautschnitt bis zu dem Mandibulabogen des überstreckten Rattenkopfes durchgeführt. Die unter der Haut liegenden bilateralen Speicheldrüsen, deren Lobi durch Bindegewebe leicht verwachsen sind, wurden getrennt. Nach Spaltung der darunterliegenden Halsmuskelfaszie und Darstellung der Mm. sternocleidomastoidei wurden über einen medialen submuskulären Zugang die Aa. carotis beidseits dargestellt. Die rechte A. carotis wurde proximal durch eine Ligatur gesperrt. In diese wurde distal der Ligatur über eine Mikroöffnung ein 2,0 french TIP-Katheter eingeführt. Eine weitere Ligatur, die die A. carotis samt Katheter einschliesst, verhindert durch Kompression das Herausrutschen des Katheters und einen Blutverlust durch die Mikroöffnung. Der Katheter wurde bis vor die Aortenklappe geschoben. In die linke A. carotis wurde in gleicher Technik ein 0,8 mm Polyethylenkatheter eingeführt, der den Anfang des aufsteigenden Schenkel des extrakorporalen Kreislaufs darstellt (siehe Figur 1A, 1B, 2). Zur Anlage des absteigenden Schenkels des extrakorporalen Kreislaufes in die rechte A. femoralis muss zuerst ein horizontaler Hautschnitt auf Höhe des Daches der Vesica urinaria bis zum rechten Knie durchgeführt werden. Nach Darstellung der A. femoralis durch Spaltung der subcutanen Muskelfaszie wurde eine proximale Ligatur gelegt. Über eine Mikroöffnung der A. femoralis distal der Ligatur wurde das Ende des absteigenden Schenkels des Katheterkreislaufes (0,61 mm Endstück) eingeführt und durch eine zweite Ligatur gesichert. Beide Gefäße waren nun an die Autoperfusion angeschlossen. Die zwei 3-Wege-Hähne (siehe Figur 2), die den Fluß durch das Kathetersystem gewährleisten, konnten geöffnet und die Rollerpumpe in Betrieb genommen werden. Das Blut konnte so mit einem konstanten Fluss von 2,2 ml/kg/min aus der linken A. carotis in die rechte A. femoralis befördert werden. Der Drucksensor wurde nun mit dem Kathetersystem verbunden (siehe Figur 1A, 1B, 2) und zeichnete die Druckkurven auf (siehe Figur 3). Nach Stabilisierung der Druckkurve konnte die Messung begonnen werden.

2.3.4.3.4 Die Messung der Gefäßfunktion

Über den distalen 3-Wege-Hahn des absteigenden Schenkels des extrakorporalen Kreislaufs wurden 3 verschiedene KHS-Volumina (80, 200, 600 µl/kg) nacheinander

nach der jeweils wieder erreichten Baseline appliziert und die jeweiligen endothelabhängigen Vasodilatationen induziert und aufgezeichnet. Die endothelabhängige Gefäßdilatation wurde durch eine temporäre Erhöhung der Schubspannung (S) induziert [148]. Die resultierende Vasodilatation konnte in einer Pilotstudie zu 90 % durch eine vorherige Gabe des NO-Synthase-Inhibitors N-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) (Sigma Aldrich, Deutschland) unterbunden werden. L-NAME ist ein Argininanalogon und inhibiert die NO-Synthase in Endothelien. Die Applikation des NO-Donator NN (40 µg/kg KG) induzierte die endothelunabhängige Dilatation. Es wurde das Integral (I in mmHg*s) und die maximale Amplitude des Druckabfalls während der Gefäßdilatation gemessen. So werden das Maximum und die Dauer der Dilatation berücksichtigt (siehe Figur 3). Die Amplitude ist das Delta des Punctum maximum und Punctum minimum bei Gabe eines Volumens. Der maximale Punkt ist in diesem Fall die Baseline, während der minimale Punkt der tiefste Punkt der Vasodilatation ausgehend von der Baseline ist. Das Integral ist die durch den jeweiligen Druckabfall entstandene Fläche über der Kurve (Figur 3).

Figur. 3: Druckverlauf während der KHS-Applikation



2.3.5 Die molekularbiologische Untersuchungen

2.3.5.1 Gewebeaufarbeitung für molekularbiologische Untersuchungen

Nach Beendigung der *in vivo* Messung der Gefäßfunktion wurde der linke nicht-perfundierte M. quadrizeps am noch lebenden, narkotisierten Tier nach Eröffnung der Muskelfaszien mit Sehnenursprung – und ansatz herauspräpariert und auf Eis gelagert. Es wurde ein ca. 3 mm breiter Querschnitt aus der Mitte des Muskels mit einem Skalpell herausgeschnitten. Das Gewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Der M. quadriceps wurde ausgewählt, da er als Träger von arteriellen Gefäßen das Endstromgebiet der A. femoralis repräsentiert. Die *in vivo* Ergebnisse und die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen können so am gleichen Areal untersucht werden.

2.3.5.2 Bestimmung der eNOS-Proteinexpression mittels Western Blot

2.3.5.2.1 Das Prinzip des Western Blot

Ein Western Blot (syn: Immunoblot) ist eine Methode der Biochemie, um in einer Probe bestimmte Proteine mit jeweils spezifischen Antigenen nachzuweisen, sie gibt auch Informationen über die Molekülgröße wieder. Mit Hilfe dessen lassen sich Proteine mit einer bestimmten Aminosäure-Sequenz aufspüren. Das Grundprinzip des Blottings liegt in der Elektrophorese. Hierbei diffundiert das zu untersuchende Protein innerhalb eines sich auf einer Glasplatte befindenden halbfesten Trägermaterials (je nach Größe Agarose- oder Polyacrylamidgel) entlang einer angelegten Gleichspannung. Da sich die Molekülgröße innerhalb des Untersuchungsmaterials unterscheidet, geschieht diese Diffusion mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, so daß sich die Probe nach ihrer Beschaffenheit auftrennt. Nach Abschluß der Elektrophorese muß das Ergebnis sichtbar gemacht werden. Hierfür legt man auf das Gel einen Nitrozellulose-Filter auf und überträgt die aufgetrennten Proteine mittels einer Pufferlösung auf den Filter. In der sich anschließenden Hybridisierung werden die Moleküle mittels einer Substanz markiert. Mit der durch die Zerfallsprozesse des Markers verursachten Strahlung belichtet man schließlich einen Röntgenfilm und macht das ursprüngliche Diffusionsergebnis sichtbar.

2.3.5.2.2 Durchführung der eNOS-Proteinexpressions-Bestimmung

2.3.5.2.2.1 Proteinextrakt-Herstellung

Das Gewebestück des nicht-perfundierten M. quadriceps wurde mit einem eisgekühlten Lysepuffer, bestehend aus 1× PBS, 100 µg/mL PMSF, 1 % Nonidet® P40, 0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat), 1mM Natrium orthovanadate, and 1 µg/mL Aprotinin, homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend mit 10 000 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand bei -80 °C eingefroren. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mittels des BCA protein assay (Pierce/KMF, St. Augustin, Germany) bestimmt. Die gleiche Menge an Protein wurde als Größenmarker auf das 10 %-SDS-Polyacrylamid-Gel (PAG) der Elektrophorese-Aparatur geladen.

2.3.5.2.2.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Proteintransfer

Das Natriumdodecylsulfat (SDS) -Polyacrylamid-Gel bestand aus einem 10 %-Trenngel, über das eine niedrige Schicht 5 %-Sammelgel pipettiert wurde. Es wurde in eine Trennkammer einer Elektrophorese-Aparatur eingespannt. Um Taschen zum Einfüllen der Proben zu erhalten, wurde ein spezieller Kamm (1 mm) eingesteckt, der nach 20 min nach abgeschlossener Auspolymerisation des Gels entfernt wurde. Bei der Probenvorbereitung wurde SDS im Überschuss zu den Proteinen hinzugegeben und die Probe anschließend auf 95 °C erhitzt um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken und das Strecken der Moleküle aufzubrechen. Für jede Probe wurden gleiche Mengen von Protein (40 µl) mit 2x SDS- Ladungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM Dithiothreitol, 2 % SDS, 0,1 % Bromophenolblau, 10 % Glycerol) in 10 µl des Überstandes gemischt. Zur Sichtbarmachung diente der negativ geladene Farbstoff Bromophenolblau. Die dem Probenpuffer zugesetzte reduzierte Thiolverbindung Dithiothreitol kann Disulfidbrücken durch Reduktion spalten. Anschließend wurde die erhitzte Probenmischung auf Eis heruntergekühlt. Zur Auftrennung wurden die denaturierten Proteine (20 µl) in die ausgesparten Taschen auf das SD-PA-Gel geladen. Weiterhin wurde das Gel mit Rainbow-Markern beladen. Diese bestehen aus Proteinen mit bekannter Größe und ermöglichen dadurch die Abschätzung der Größe von Proteinen in den eigentlichen Proben. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur und einer Spannung von 50-100 V pro Stunde. Die elektrische Spannung bewirkt eine Migration der negativ geladenen Proben durch das

Gel. Das Gel wirkt dabei wie ein Sieb. Kleine Proteine wandern relativ leicht durch die Maschen des Gels, während große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer durch das Gel wandern. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einem Transferpuffer für 10 min bei Raumtemperatur ausgeglichen. Eine Transferkassette wurde mit dem Gel und einer Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran assembliert. In dieser Apparatur (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell von Bio-Rad) erfolgte der Transfer der Proteine elektrophoretisch von dem Gel auf die PVDF-Membran in einem vorgekühltem Transferpuffer bei 4 °C mit 250 mA für eine Stunde. Der Erfolg des Transfers wurde mittels einer Färbung der Membran mit Ponceau S Rot bestätigt.

2.3.5.2.2.3 Western Blot

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran mussten zuerst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da sich sonst die Antikörper an diese Bindungsstellen heften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen würde. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgte mit einer Tween-tris-gepufferten Kochsalzlösung und 5 % fettloser Milch (TBST: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1 % Tween-20). Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit einer verdünnten Antikörper-Lösung (anti-eNOS, 5 % fettlose Milch, TBST) behandelt, wobei der Antikörper spezifisch gegen das Protein auf der Membran gerichtet ist. Dabei wurde ein Primärantikörper gegen eNOS (BD Bioscience; 1:2000) verwendet. Drei Waschschriffe mit TBST entfernten schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran. Eine zweite Antikörperlösung mit Horseradish-Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundär-Antikörpern, ist spezifisch gegen bestimmte Bereiche des ersten Antikörpers gerichtet und bindet an diese. Mit dieser Lösung wurde die Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach weiteren drei TBST-Waschschriffen erfolgte durch die Chemilumineszenzreaktion, die durch das Enzym bei den Enzym-Antikörper-Konjugaten katalysiert wird, die Visualisierung. Die HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann. Dafür wurde in ein ECL-System eine 40:1 Lösung Luminolreagenz-oxidiertes Reagenz für 5 min gegeben und auf die Membran angewandt (0,125 ml der Chemilumineszenzreagenz pro cm² Membran). Der Überfluss des Reagenz wurde abgeflossen. Die Membran wurde dann in einem Plastikbehälter plaziert und von 30 sec bis 5 min dem ECL Film ausgesetzt. Eine optimale Belastung entsprach der entsprechenden Qualität des Films. Die optische Dichte der entwickelten

ECL-Banden wurde mittels Computersoftware (NIH Image 1.63) detektiert und quantifiziert. Danach wurde das Protein auf der Membran angefärbt (Ponceau S) und die Dichte von mindestens 3 Proteinbanden wurde mittels der oben genannten Computersoftware detektiert. Die Densität der Proteinbanden unterschied sich nicht zwischen den einzelnen Proben, was auf eine gleiche Gesamtproteinkonzentration der einzelnen Proben sicherstellt.

2.3.5.3 Bestimmung der mRNA-Expression von ICAM-1, VCAM-1 und TNF α mittels Real-Time-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

2.3.5.3.1 Das Prinzip der Real-Time-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) wurde 1987 von K. B. Mullis entwickelt. Sie ermöglicht enzymatisch von bestimmten Nukleotidsequenzen in vitro millionenfach Kopien herzustellen. Dieser als Amplifikation bezeichnete Vorgang macht eine Analyse von DNA schnell zugänglich. Die Vorgänge bei der Vervielfältigung einer Nucleinsäure mittels PCR ähneln dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase ausgehend von Startermolekülen einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nucleinsäure-Matrize, der Template-DNA. Bei der PCR werden als Startermoleküle synthetische DNA-Oligonucleotide (Primer) verwendet, die an die Template-DNA hybridisieren. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert eine hitzebeständige Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufigen Primerpaares kann gezielt die Sequenz zwischen beiden Primern vervielfältigt werden. Durch das Prinzip der zyklischen Wiederholung der PCR kann die Matrize exponentiell vervielfältigt werden. Aus der Grundidee der PCR hat sich ein breites Repertoire an Techniken entwickelt, die in den verschiedensten naturwissenschaftlichen Bereichen Anwendungen finden. Um aus der Menge an amplifizierten PCR-Produkten auf die Menge an eingesetztem DNA- bzw. RNA-Template zu schließen, setzt man die quantitative PCR ein. Die quantitative PCR kann als Endpunktbestimmung durch die Real-time-PCR durchgeführt werden. Dieses Verfahren wird durch Thermocycler ermöglicht, in denen die PCR-Produkte direkt während ihrer Bildung in Echtzeit erfasst werden können. Man verwendet dafür sequenzspezifisch markierte Sondenmoleküle. Bei dieser Variante der quantitativen

Real-time reverse transcriptase PCR (RT-RT-PCR) binden während des Annealing-Schrittes neben den sequenzspezifischen Primern auch die sequenzspezifisch markierten Sondenmoleküle an die denaturierte Zielsequenz. Während der Synthese des Zweitstranges wird auch das Sondenmolekül hydrolytisch durch die Polymerase gespalten, dadurch wird die Emission der Sonde durch eine messtechnisch erfasste Wellenlänge messbar. Die während der Synthese gemessene Intensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Stränge und damit proportional der zur Menge der Ausgangs-DNA. Die mRNA-Expression von ICAM-I und VCAM-I wurde mittels quantitativer Real-time reverse transcriptase (RT)-PCR (ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System software version 1.0., Perkin Elmer) durchgeführt.

2.3.5.3.2 Durchführung der mRNA-Expressions-Bestimmung von ICAM-I, VCAM-I, TNF α

Die mRNA-Genexpression wurde mittels quantitativer TaqMan Realtime RT-PCR und dem Detektionssystem PRISM 7700 Sequence Detection System untersucht. Aus jedem M. quadriceps Präparat der zu untersuchenden Tiergruppen wurde RNA isoliert. 1 μ g der synthetisierten cDNA wurde für die Untersuchungen benutzt.

2.3.5.3.2.1 Extraktionen der RNA

Das Präparat des nichtperfundierten M. quadriceps wurde vorsichtig von Adhäsionen und Bindegewebe gereinigt. Mit dem RNeasy Kit (Quiagen) konnte die RNA in toto isoliert werden. Das Gewebe wurde in einer Pufferlösung (RLT mit β -Mercaptoethanol (β -ME)) zerkleinert, homogenisiert und in einer Proteinkinase K-Lösung bei 55 °C für 10 min angedaut. Nach Zentrifugieren wurde der Überstand mit Ethanol vom Zentrifugat getrennt, in einer RNeasy Mini Spinsäule die RNA bei zentrifugieren für 15 sec bei 10 000 rpm auf eine Membran adsorbiert. Kontaminationen wurden in Waschsritten mit RW1- und RPE-Puffern beseitigt. Verunreinigungen mit DNA wurden durch DNase I-Zugabe eliminiert. Die qualitativ hochwertige RNA-Menge wurde in RNase-freier Lösung eluiert und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration an RNA der Probe wurde mittels eines DNA/RNA-Reader quantifiziert und mittels A260/A280 Absorbance Ratios qualifiziert. Die Größenverteilung der toalen RNA wurde mit der 1,5% Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophorese nach der Methode des RNeasy-Mini-Handbuchs evaluiert.

2.3.5.3.2.2 Die cDNA-Synthese

1 µg der totalen-RNA-Probe wurde in 20 µl Reaktionslösung aus 200 Einheiten MMLV Reverse Transkriptase, Puffer, 5 ng/µl Primer, 10 mM Dithiothreitol, 500 µM dNTP, 2 Einheiten pro ml Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor gegeben. Zur Kontrolle diente eine „no-RT“-Probe, die ohne reverser Transkriptase parallel mituntersucht wurde. Die Reaktion wurde für 10 min bei 25 °C, anschliessend für 50 min bei 37 °C durchgeführt. Als Reaktions-Stop wurde die Probe zum Inaktivieren der Enzyme für 15 min bei 70 °C erhitzt.

2.3.5.3.2.3 Die quantitative Real-Time-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Der synthetisierte kopierte DNA-Strang (cDNA) wurde zur Amplifizierung mittels PCR genutzt. Die Real-time-RT-PCR erfolgte unter Amplifizierung in ABI PRISM 7700 unter Benutzung spezifischer Primerpaare und einer TaqMan-Probe, die als TaqMan-Sonden den Reporter (FAM oder VIC) am 5'-Ende und den Quencher (TAMRA) am 3'-Ende beinhaltet. Während der nukleolytischen Aktivität der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase werden Reporter und Quencher voneinander gespalten. Durch die Trennung vom Quencher erhält der Reporter eine hohe Fluoreszenz. Bei Fortführung der Amplifikation werden immer mehr Marker in die DNA eingebaut. Die Detektion der Fluoreszenz am Ende der DNA-Synthese entsprach der Menge an amplifizierter DNA. Der Design der TaqMan-Probe und der für die RT-PCR nötigen Primer zur mRNA-Bestimmung von ICAM-I, VCAM-I und TNFα war durch vorherige Arbeiten meiner Arbeitsgruppe Tschöpe bekannt. Für ICAM-I wurden folgende "forward" (FOR) und "reverse" (REV) Primer benutzt: FOR: 5'-GTCTCATGCCCGTGAAATTATG-3' und REV: 5'-CATTTTCTCCCAGGCATTCTCT-3'. Für VCAM-I wurden folgende Primer benutzt: FOR: 5'-GGAGGTCTACTCATTCCCTGAAGA-3' und REV: 5'-ACCGTGCAGTTGACAGTGACA-3'. Die TaqMan universal PCR Master Mix Reagenzien sind optimal zur Detektion der cDNA-Sequenz der Probe bei darauf abgestimmten Primern. Durch beinhaltete Enzyme (AmpErase Uracil N-Glycosylase) wird die Möglichkeit einer Reamplifizierung verhindert. Die Durchführung der PCR erfolgte mit 12,5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (2x), Primer der jeweiligen zu untersuchenden mRNA (ICAM-I, VCAM-I, TNF-α), 2,5 µl TaqMan Probe (2,5 µM), 5 µl cDNA (10 ng total RNA), 25 µl steriles H₂O. Dieses Gemisch wurde bei 50 °C für 2 min inkubiert und anschliessend zur Aktivierung der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase bei

95 °C inkubiert. Es folgte weitere 40 Zyklen von 15 sec bei 95 °C und als letztes ein Zyklus mit 1 min bei 60 °C. Verschiedene Rechenmodelle werden für die Quantifizierung herangezogen, wobei hier ein Referenz-Gen (GAPDH) mitgemessen wurde, um einen relativen Menge-Vergleich durchzuführen (relative Quantifizierung). Als interne Kontrolle diente das Referenz-Gen, dessen Signal verwendet wurde, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Dieses wird als Normalisierung bezeichnet. Weil die Gesamtanalyse auf diesem Signal basiert, ist die Wahl der internen Kontrolle ein wichtiger Aspekt des Experiments. In der ersten Phase der Amplifikation einer PCR ist die Templatemenge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen, suboptimal, während in der dritten Phase der Amplifikation die Menge der Produkte (DNA, Pyrophosphat, Monophosphatnucleotide) derart ansteigt, dass es zur Hemmung durch diese kommt, häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren, die Substrate langsam verbraucht werden und letztlich die Polymerasen und Nucleotide durch die Hitze langsam zerstört werden. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet sich nur in der Phase dazwischen. Exponentiell bleibt eine PCR bei 12 bis 400 Ausgangskopien für ca. 30 Zyklen, bei 200 bis 3200 für 25 Zyklen und bei anfänglich 3200 bis 51200 für höchstens 20 Zyklen. Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird der C(t)-Wert (Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus") bzw. der Cp-Wert (Crossing Point) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Jedes Fluoreszenzsignal durch die Hybridisierung der TaqMan-Sonde wurde gegen die Zyklus-Nummer gezeichnet. Für jede Probe wurde der C(t)-Wert durch die GeneAmp software ermittelt. Die relative Quantifizierung des jeweiligen Ziel-Genes konnte so durch den C(t)-Wert kalkuliert werden. Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem C(t). Ist die Ausgangsmenge bekannt, kann eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den C(t) konstruiert werden. Durch die Geradengleichung $x = (C(t) - b)/m$ kann an der Standardkurve für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden. Alle Proben werden normalisiert, indem die errechnete Kopienzahl des Targetgens durch die Kopienzahl der internen Referenz geteilt wurde: $GEN(normalisiert) = \text{Kopienzahl Target} / \text{Kopienzahl Referenz}$. Die unterschiedliche Expression zweier Proben relativ zueinander lässt sich als Quotient darstellen und ergibt eine n-fache Expression:

GEN(normalisiert) (Gruppe A) / GEN(normalisiert) (Gruppe B) = n-Fache Expression Gruppe A zu Gruppe B.

2.4 Materialien

In der folgenden Tabelle sind alle Materialien aufgelistet, die zur Durchführung der Studie nötig waren.

Tabelle 1: Materialien, Bezeichnung, Bezug

Material	Bezug
β-Tubulin rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz, California, USA
3-Wege-Hahn Discofix-3	Braun, Deutschland
ABI primer express software	PE Applied Biosystems, Foster city, USA
Accutrend sensor glucometer	Boehringer, Mannheim, Germany
Acrylamide-Bis solution (29:1)	Serva, Heidelberg, Germany
Agarose	Gibco, Karlsruhe, Germany
Ammonium persulfate (APS)	Serva, Heidelberg Germany
APS , 10 %	Deutschland
AVE3085	Industriepark Höchst, Frankfurt, Deutschland
BCA protein assay	Pierce/KMF, St. Augustin, Germany
Bio Doc Analyzer	Biometra, Goettingen, Germany
Blotting paper, 3 mm	Whatman GmbH, Gottingen, Germany
Braunüle Adsyte Pro 388761	Becton Dickinson, Spanien
Centrifuge, 5415D, 5403	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Chloralhydrat K 318.1	Roth, Deutschland
Citratpuffer 0,1 M Na-Citrat in 1l H ₂ O	Sigma, Deutschland

dest.	
Complete protease inhibitor cocktail	Roche, Mannheim, Germany
Computer image analyzer Lucia G Version 3.52b	Nikon Deutschland GmbH, Düsseldorf, Germany
Computerized Densitometry	Biometra GmbH, Goettingen, Germany
Datenerfassungssystem MacLab 8s	Apple, USA
Dithiothreitol	Merck, Darmstadt, Germany
ECL films	Amersham, Buchinghamshire, UK
ECL plus Western blotting detecton system	Amersham, Buchinghamshire, UK
Einmalspritze Injekt-H 1ml	Braun, Deutschland
eNOS monoclonal mouse antibody	BD Biosciences, San Diego, USA
Ethidiumbromid, 1%	Fluka, Taufkirchen, Germany
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Merck, Darmstadt, Germany
Freezer, -80 °C	Thermo Forma, Marlotta, USA
Gavagesonde 18061-75	Fine Science Tools, Deutschland
Gefäßdilator 18153-11	Fine Science Tools, Deutschland
Gelatin	Merck, Darmstadt, Germany
Glycerol	Merck, Darmstadt, Germany
Glycin	Merck, Darmstadt, Germany
Goat anti-mouse HRP-IgG 1:2000	DAKO, Carpinteria, USA
HEC-Lösung 0,5 %	Sigma, Deisenhofen, Germany
Heparin-Natrium 250.000	Ratiopharm, Deutschland
Herzkatheter 2,0 french TIP Katheter	Millar Inst., USA
ICAM-I Primer	TIB MolBio (Berlin Germany)

FOR: 5'-GTCTCATGCCCGTGAAATTATG-3'	
ICAM-I Primer REV: 5'-CATTTTCTCCCAGGCATTCTCT-3'	TIB MolBio (Berlin Germany)
Kanüle Microlance 3	Becton Dickinson, Spanien
Katheterhalter 00574-11	Fine Science Tools, Deutschland
Krebs-Henseleit-Puffer S-04068	Sigma, Deutschland
Klingen 10050-00	Fine Science Tools, Deutschland
Kodak 5000 RA film processor	Eastman Kodak, New York, USA
MicroAmp optical 96-well reaction plates	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Mikroschere 15000-08	Fine Science Tools, Deutschland
Mini Trans-Blot transfer Cell	Bio-RAD, California, USA
Mini-Protean 3 Cell	Bio-RAD, California, USA
M-MLV reverse transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
N,N,N',N' - tetramethylethylene diamine (TEMED)	Bio-Rad Laboratories, USA
Nitroprussid Natrium Nipruss	Deutschland
PBS, pH 7.4, 10x	Merck, Darmstadt, Germany
Peroxidase-conjugated streptavidin	Vectastatin ABC Elite, Burlingame, USA
Pflaster	3M, Deutschland
Pinzette, chirurgisch 11028-15	Fine Science Tools, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Polyethylenkatheter 800/110/100 0,61 mm OD	Portex Limited, England
Polyethylenkatheter 800/110/120 1,09 mm OD	Portex Limited, England

Polyethylenkatheter 800/110/140 0,8 mm OD	Portex Limited, England
Polyethylenkatheter G 30402	IVAC, England
Polyethylenkatheter PE Perfusorleitung	Braun, Deutschland
Polypropylene tubes (15 ml und 50 ml)	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Germany
Ponceau S Rot	Sigma, Deisenhofen, Germany
Power supply	Biometra, Goettingen, Germany
Pressure transducer (Drucksensor)	Medex Inc, Carlsbad, USA
Protein loading Puffer	Merck, Darmstadt, Germany
PVDF Membran	Bio-Rad, Hercules, CA
Rainbow Marker	Amersham, Buchinghamshire, UK
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim, Germany
Respirator Nagerrespirator 7025	Ugo Basile, Italien
RNase (DNase frei)	QIAGEN, Hilden, Germany
RNeasy Kit	QIAGEN, California, USA
RNeasy mini Spinsäule	QIAGEN, California, USA
Rollerpumpe Minipuls 3	Gilson, Frankreich
Rotor-stator Homogenizer	Ultra Turrax, IKA Analysetechnik GmbH, Germany
RW1- und RPE-Puffern	QIAGEN, California, USA
Sammelgel (5%)	Merck, Darmstadt, Germany
Schere 14074-11	Fine Science Tools, Deutschland
SDS-PAGE running Puffer, pH 8,3, 10 %	Merck, Darmstadt, Germany
Sequence Detection system ABI Prism	Perkin Elmer, California, USA

7700	
Silikonschlauch F 1825113	Gilson, Frankreich
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma, Deisenhofen, Germany
Spectrophotometer DU 640i	Beckman Coulter, Krefeld, Germany
Streptozotizin SO-130	Sigma Deutschland
TaqMan universal PCR master mix	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan® Rodent GAPDH Control Reagents	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
TBS, pH 7,5	Merck, Darmstadt, Germany
Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
TINA 2.0 software	Raytest GmbH, Straubenhardt, Germany
TNF- α Primer REV:5'- CTCCGCTTGGTGGTTTGC -3'	TIB MolBio (Berlin Germany)
TNF- α Primer FOR: 5'AGACCCTCACACTCAGATCATCTTC -3'	TIB MolBio (Berlin Germany)
Trenngel (10%)	Merck, Darmstadt, Germany
Tris-Cl	Merck, Darmstadt, Germany
Tween 20	Sigma, Deisenhofen, Germany
VCAM-I Primer FOR: 5'-GGAGGTCTACTCATTCCCTGAAGA- 3'	TIB MolBio, Berlin Germany
VCAM-I Primer REV: 5'-ACCGTGACAGTTGACAGTGACA-3'	TIB MolBio, Berlin Germany

Vortexer	Beyer GmbH, Düsseldorf, Germany
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Germany

2.5 Statistische Auswertung

Für eine zufallskritische Absicherung der beobachteten Werte ist die Anwendung statistischer Testverfahren unerlässlich. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software SPSS Version 12.0 durchgeführt. Für die verwendeten Tests wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ als signifikantes Ergebnis gewertet. Eine statistische Auswertung der Gruppenunterschiede erfolgte mittels Kruskal Wallis Test. Nachdem diese Prozedur signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nachwies, wurde als Post-HOC Test der Mann Whitney U Test benutzt. Alle in dieser Arbeit erhobenen Werte werden als Mittelwert (MW) \pm des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die aus dem Post-HOC Test resultierende Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen wird mit $p < 0,05$ angegeben. Besteht kein signifikanter Unterschied, wird dies mit „n. s.“ (nicht signifikant) angegeben.