

## **2 MATERIAL UND METHODEN:**

### **2.1 Tierversuch:**

Der Tierversuch und die mit ihm verbundenen Experimente wurden von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin geprüft und genehmigt (Tierversuchsantrag Nr. G-0198/94). Alle Eingriffe an lebenden Tieren wurden unter Beachtung des §9 Abs. 1 und 2 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Der Doktorand arbeitete mit Ausnahmegenehmigung und unter Aufsicht des Betreuers Dr. med. Markus Ketteler, qualifiziert für Eingriffe an lebenden Tieren gemäß §9 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes<sup>60</sup>.

Die anfallenden toten Tiere und Tierkörperteile wurden gemäß §8 Abs. 1 und 2 des Tierkörperbeseitigungsgesetzes<sup>61</sup> vorschriftsmäßig entsorgt.

Der Versuch wurde durch eine Sachbeihilfe von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG-Nr. KE 523/3-2) finanziell unterstützt.

#### **2.1.1 Tiermodell:**

Wie bereits oben angedeutet, arbeiteten wir mit dem Tiermodell der Anti-Thy1-Glomerulonephritis, welches durch die intravenöse Injektion eines monoklonalen Antikörpers gegen das Thy1-Antigen ausgelöst wird. Der Antikörper ruft eine komplement-abhängige selektive Lyse von glomerulären Mesangialzellen hervor. Diese selektive Zerstörung kommt dadurch zustande, daß ausschließlich Mesangialzellen das Thy1-Antigen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die entstehende glomeruläre Reaktion gilt als Tiermodell für eine mesangial-proliferative Glomerulonephritis, die in verschiedenen Phasen abläuft<sup>62,63,64</sup>:

1. komplementabhängige Lyse der Mesangialzellen und Makrophagen-Infiltration (maximale Ausprägung 10-48h nach Antikörper-Injektion)
2. Proliferation der Mesangialzellen (nach 3-10 Tagen)
3. Glomerulosklerose und Mikroaneurysmen der glomerulären Kapillaren (ab dem 5. Tag)
4. Regression der glomerulären Veränderungen; dies geschieht in verschiedenen Rattenspezies unterschiedlich ausgeprägt (s. 2.1.2).

Für die Injektion wurden die Tiere gewogen und in eine Äthernarkose versetzt. Der Antikörper (monoklonaler Anti-Thy1-Antikörper; ER4-Hybridom) wurde in *Phosphate-buffered saline* (PBS) gelöst (für die Zusammensetzung aller benutzten Puffer, Lösungen und Chemikalien siehe Anhang I) und bei einer Konzentration von 1mg/1,5ml in einer Dosierung von 1mg pro kg Körpergewicht mit Hilfe einer handelsüblichen Kanüle zur subcutanen Injektion in eine der Schwanzvenen der Tiere injiziert.

### **2.1.2 Tiere:**

Als Versuchstiere wurden 80 männliche, 6-8 Wochen alte Lewis-Ratten zwischen 180g und 260g Körpergewicht benutzt. Dieser Ratten-Stamm ist ein Inzucht-Stamm, der ursprünglich aus dem Scripps-Institut in La Jolla, Kalifornien, hervorgeht. Dieser Ausgangsstamm wurde dann in verschiedenen europäischen Laboratorien weiter gezüchtet. Die von uns verwendeten Lewis-Ratten (LEW/Maa) stammten aus dem Tierstall der Universität Limburg in Maastricht, Holland. Bei Versuchen mit dem Thy-1-Antikörper im Labor von Prof. Emile de Heer, Universität Leiden, Holland, war, wie bereits oben angedeutet, aufgefallen, daß dieser Rattenstamm schon nach einmaliger Injektion im Gegensatz zu den meisten anderen Rattenstämmen (Sprague-Dawley, Fischer 344, Munich-Wistar) nicht mit einer Ausheilung der glomerulären Veränderungen, sondern mit einer chronisch-persistierenden Glomerulosklerose reagiert.

In Vorversuchen in Berlin war außerdem der oben erwähnte Rattenstamm des Møllegaard Breeding Centers identifiziert worden (LEW/Moe), welcher besonders schnell eine komplette Ausheilung der glomerulären Läsionen zeigt<sup>65,66</sup>.

Der LEW/Maa-Stamm diente als Stamm für unsere Untersuchungen, da seine chronisch-persistierende Entzündungsreaktion den humanen Verlauf der Glomerulonephritis besser imitiert als dies bei anderen Stämmen der Fall ist.

### **2.1.3 Versuchstierhaltung:**

Es wurden jeweils zwei Tiere pro Käfig bei einem 12h-Tag-/Nacht-Rhythmus und einer Raumtemperatur von 21°C gehalten.

#### **2.1.4 Kontrolle des Injektionserfolges:**

Zur Kontrolle des Injektionserfolges wurde 7 Tage nach der Injektion, also zu einem Zeitpunkt, zu dem nach dem bekannten Verlauf der experimentellen Erkrankung eine deutliche Albuminurie zu erwarten war, der Urin der Tiere gesammelt. Dazu wurden die Ratten für jeweils 24 Stunden einzeln in sogenannten metabolischen Käfigen der Firma Tecniplast gehalten.

In diesen Käfigen waren Futter und Wasser jeweils getrennt voneinander für die Tiere erreichbar; die Ratten saßen auf einem Gitter, durch das Futter, Kot und Urin nach unten fallen bzw. fließen konnten. Durch die Konstruktion der Käfige wurden feste und flüssige Bestandteile voneinander getrennt und zwei verschiedenen Sammelbehältern zugeleitet. Auf diese Weise gelangten idealerweise Kot und Futterreste getrennt vom Urin der Tiere in die Behälter. Dem Urinbehälter wurden vor dem Einsetzen der Tiere in die Käfige 100µl Penicillin-Streptomycin-Lösung zugesetzt, um bakterielles Wachstum im Urin der Tiere zu verhindern. Das Urinvolumen konnte nach der Sammlung bestimmt und der Urin anschließend bei -20°C tiefgefroren werden, um ihn später für weitere Untersuchungen zu verwenden. Aus der Bestimmung des Albumingehaltes des Urins (s. 2.2.1) konnte geschlossen werden, ob die Glomerulonephritis erfolgreich durch den Antikörper induziert worden war oder ob beispielsweise eine Fehlinjektion vorlag.

#### **2.1.5 Studienprotokoll:**

In einer ersten Versuchsphase wurden die Tiere zunächst an pelletierte Nahrung gewöhnt, indem sie für zwei Wochen die C<sub>1000</sub>-Diät der Firma Altromin mit normalem Arginin- und Protein-Gehalt (17% Protein und 9,7g Arginin/kg Futter) und Wasser *ad libitum* erhielten. Danach wurde der Anti-Thy1-Antikörper injiziert.

Es wurden 14 Tage nach der Induktion der Krankheit, also zu einem Zeitpunkt, an dem nach dem bekannten Krankheitsverlauf die akuten entzündlichen Veränderungen in der Niere bereits abgelaufen und die Krankheit somit in die Regressionsphase eingetreten war, jeweils vier Tiere zu einer Gruppe zusammengefaßt. Jede Gruppe wurde einer von 5 Diäten und einem von 4 Zeitpunkten zugeordnet.

Für die Diäten wurde pelletierte Nahrung der Firma Altromin eingesetzt, die sich in ihrem Gehalt an Arginin und Protein unterschied (Für eine detaillierte Aufstellung aller Inhaltsstoffe der Nahrung siehe Anhang II).

Die folgenden Diäten wurden verabreicht:

<b>Diät- gruppe</b>	<b>Proteingehalt (%)</b>	<b>Argininhalt (g/kg Futter)</b>
<b>+P+A</b>	23	18,8
<b>+P++A*</b>	23	18,8
<b>+P-A</b>	23	3,8
<b>-P+A</b>	6	18,8
<b>-P-A</b>	6	3,8

\*bei dieser Gruppe wurde zusätzlich das Trinkwasser mit 1% Arginin-Hydrochlorid versetzt.

Tabelle 2-1: Zusammensetzung der Diäten

Ziel dieser Zusammensetzung der Diäten war es, beim evtl. Auftreten von Unterschieden im Krankheitsverlauf der unterschiedlichen Gruppen differenzieren zu können, ob diese auf eine Modifikation des Arginin- und/oder des Proteingehaltes der Nahrung zurückzuführen sind. Auf einen kompletten Arginin-Entzug wurde dabei bewußt verzichtet, da dieser wegen des ubiquitären Vorhandenseins von Arginin in Nahrungsprotein nicht modellhaft für die humane Situation stehen könnte. Stattdessen wurde die niedrige Argininzufuhr entsprechend dem relativen Argininanteil der eiweißarmen Diät festgelegt.

Der Einfluß dieser Diäten auf den Verlauf der späten Regressionsphase der Erkrankung sollte untersucht werden. Dazu wurden nach jeweils 1, 2 bzw. 4 Monaten (1M, 2M, 4M) nach der Injektion von jeweils 4 Tieren einer jeden Diätgruppe (nach 1 Monat z.B. „+P+A 1M“) erneut die Urine mit Hilfe der metabolischen Käfige gesammelt, die betreffenden Tiere am direkt darauf folgenden Tag operiert und die Proben für die weiteren Untersuchungen gewonnen (siehe 2.1.7 und 2.1.8). Zusätzlich wurden 5 Vierergruppen von Kontrolltieren gebildet (Co), die zwar die unterschiedlichen Diäten erhielten, bei denen aber kein Antikörper injiziert wurde. Die Sammlung des Urins und Operation dieser Tiere erfolgten ebenfalls nach 4 Monaten.

Die Gruppengröße von nur 4 Tieren wurde aus logistischen Gründen so festgelegt, da bei der gleichzeitigen Operation von mehr als 4 Tieren der zeitliche Ablauf für die Probengewinnung (siehe 2.1.7 und 2.1.8) zu lang geworden wäre, um sicher qualitativ gute RNA für die Analyse und intakte Glomeruli für die Kulturen zu gewinnen.

Der zeitliche Ablauf des Experimentes, die entsprechenden Diäten erst 14 Tage nach Krankheitsinduktion zu verabreichen, sollte neben der Fokussierung auf die Frage nach dem Einfluß der Diäten in der Regressionsphase der Erkrankung auch im experimentellen Rahmen die humane, „therapeutische“ Situation simulieren, in der eine entsprechende Diät erst nach Diagnose einer bereits bestehenden Erkrankung initiiert würde. Wie bereits oben erwähnt, wurden in einem parallelen Versuch unserer Arbeitsgruppe, der hier nicht beschrieben wird, die Tiere zunächst 7 Tage mit gleichartigen Diäten „aufgesättigt“, bevor die Thy1-Glomerulonephritis induziert wurde, um zu prüfen, ob dies die frühe Akutphase der Erkrankung beeinflusst („Präventionsstudie“).

### **2.1.6 Meßparameter:**

Zur Beurteilung des glomerulären Schadens im Krankheitsverlauf wurde als funktioneller Parameter die Albuminurie bestimmt und zur morphologischen Beurteilung eine Histologie mit Perjodsäure-Schiff-Reagenz (PAS) angefertigt, deren Fibrosierungsgrad mit Hilfe eines semiquantitativen Scores ausgewertet wurde. Aus den gewonnenen Nieren wurden die Glomeruli isoliert, diese kultiviert und ihre Nitrat- und Nitrit-Produktion *in vitro* gemessen. Ferner wurde die glomeruläre RNA isoliert und von dieser semiquantitative RT-PCR-Assays zur Messung der glomerulären bNOS- und Renin-mRNA-Expression angefertigt, um die Aktivitäten sowohl des L-Arginin-/NO- als auch des Renin-Angiotensin-Systems sowie evtl. Interaktionen zwischen beiden Systemen beurteilen zu können.

Zur Messung der Aktivität der alternativen Stoffwechselwege von L-Arginin wurden die Arginase-Aktivität isolierter Glomeruli *in vitro* und die Aktivität der Ornithindecarboxylase (ODC) aus Nierenkortexhomogenaten der Tiere bestimmt. Die Serumkonzentrationen der Aminosäure Arginin sowie ihrer Metaboliten Ornithin, Citrullin und Prolin wurden gemessen, um die Frage zu beantworten, ob die

verschiedenen Diäten deren Serumspiegel modulieren.

Zu ausführlichen Erläuterungen siehe unter 2.2: „Darstellung der Meßmethoden“.

### **2.1.7 Nierenperfusion und Probengewinnung:**

Zu den unter 2.1.5 angegebenen Untersuchungszeitpunkten wurden jeweils die Tiere aller 5 Diätgruppen operiert. Es wurden nur sterilisierte bzw. RNase-freie Instrumente, Behälter und Lösungen oder sterile Einmalartikel benutzt.

Für die Operation wurden die Ratten in einer Ätherglocke einer tiefen Äthernarkose unterzogen. Während der Operation ließen wir die Tiere weiterhin Äther inhalieren, um die Narkose aufrechtzuerhalten. Äther als Narkotikum wurde gewählt, da mit anderen Narkotika (Barbituraten, Halothan) Interaktionen mit dem NO-System zu befürchten waren. Eine CO<sub>2</sub>-Narkose konnte auch nicht erfolgen, da die Entnahme der Nieren der Tiere bei intaktem Kreislauf erfolgen mußte.

Bei den narkotisierten Tieren wurde die Bauchdecke mit Alkohol desinfiziert und mit einer Schere eine mediane abdominelle Schnittinzision vorgenommen, der Darm wurde am Mesenterium nach rechts gedrängt und die Aortenbifurkation mittels einer spitzen Pinzette freipräpariert.

Die Aortenbifurkation wurde mit einer 27-Gauge-Butterfly-Kanüle punktiert und es wurden mit einer aufgesetzten 10ml-Spritze bei jedem Tier etwa 5-6ml Blut entnommen.

Das so gewonnene Blut wurde in ein Standard-Heparin-Röhrchen gegeben und bei 1500rpm für 10min bei 4°C zentrifugiert, das überstehende Plasma in Eppendorf-Gefäße überführt und sofort tiefgefroren. Aus dem Heparin-Plasma wurde später der Gehalt an den Aminosäuren Arginin, Ornithin, Citrullin und Prolin bestimmt (s. 2.2.9).

Nach der Blutentnahme wurde die Kanüle in der Aortenbifurkation belassen. Die Aorta und die V. cava inferior wurden oberhalb der Nierengefäße subdiaphragmal mit einer Klemme unterbunden und die linke V. renalis mit einer Schere vorsichtig perforiert. Eine 20ml-Spritze mit eiskalter steriler PBS-Lösung wurde auf die Kanüle aufgesetzt und die Aorta retrograd perfundiert. Dadurch wurden die Nieren beider Seiten anterograd durchspült und das Blut herausgewaschen, so daß es aus der perforierten V. renalis austrat. Die perfundierten Nieren beider Seiten wurden entnommen und die Nierenkapseln entfernt.

Die erste Niere wurde direkt in PBS auf Eis gelagert. Von der zweiten Niere wurden beide Pole mit einem Skalpell abgetrennt, ein Pol wurde in 10ml 10% Formalin für die spätere histologische Aufarbeitung fixiert (s. 2.2.2), der zweite Pol wurde mit dem Skalpell zerkleinert, in 2ml ODC-Puffer fixiert und bei -20°C tiefgefroren, um später für die Messung der ODC-Aktivität verwendet zu werden (s. 2.2.8). Der Rest der zweiten Niere wurde zu der ersten in das PBS gegeben.

### **2.1.8 Isolation der Glomeruli:**

Die Gewinnung der Glomeruli erfolgte durch eine sequentielle Siebetechnik entsprechend publizierter Methoden<sup>67</sup>. Alle Nieren der 4 Tiere einer Gruppe wurden auf die unter 2.1.7 beschriebene Weise entnommen, in eisgekühltem PBS gepoolt und anschließend wie nachfolgend ausgeführt prozessiert. Der gesamte Vorgang wurde unter sterilen Bedingungen auf Eis durchgeführt.

Für die Isolation wurde mit einer kleinen gebogenen Schere das Nierenmark sorgfältig entfernt und das restliche Nierengewebe mit dem Skalpell auf einer eisgekühlten Glasplatte zerkleinert. Dabei wurde stets darauf geachtet, daß das Gewebe immer befeuchtet war. Das zerkleinerte Nierengewebe wurde auf zwei übereinander angeordnete Kunststoffnetze aus *Polypropylen Monofil* der Firma Neolab mit 150µm bzw. 105µm großen Poren gegeben, die auf handelsübliche Kunststoff-Stickrahmen aufgespannt waren. Das Gewebe wurde mit einem sterilen Titanspatel durch die Poren beider Netze gepreßt und mit PBS aus einer Spritzflasche hindurchgespült. Durch dieses Vorgehen erfolgte eine Trennung der Glomeruli von den groben tubulären und bindegewebigen Nierenanteilen. Die Flüssigkeit mit dem Gewebe wurde in einem darunter befindlichen Gefäß aufgefangen, dessen Inhalt anschließend auf ein drittes Netz mit 70µm großen Poren gegeben wurde. Das verbliebene Gewebe wurde erneut mit PBS durch die Poren in das Gefäß gespült und die Unterseite des Netzes mit einem sterilen Tupfer abgewischt. Anschließend wurde das Netz umgedreht, auf ein weiteres Sammelgefäß gesetzt und mit 100ml PBS in dieses Gefäß gespült. Diese Lösung wurde auf drei 50ml-Röhrchen verteilt: 2 Röhrchen mit je 40ml für die RNA-Gewinnung und die restlichen 20ml für die Zellkultur. Die Röhrchen wurden für 5min bei 2500rpm zentrifugiert und die Flüssigkeit über den entstandenen Pellets

dekantiert.

Für die RNA-Proben wurde je eine 2ml-Spritze mit 4M Guanidinthiocyanat (GITC)/1%  $\beta$ -Mercaptoethanol gefüllt und das Pellet mehrmals durch eine 25-G-Kanüle gesogen, bis es im GITC gelöst und durch die Scherbewegungen annähernd homogenisiert war. Diese Proben wurden sofort auf Trockeneis eingefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, um aus ihnen später die glomeruläre RNA zu isolieren (s. 2.2.3).

Die Pellets für die Zellkultur wurden je nach Größe in 4-6ml *Dubecco's modified Eagle medium* (DMEM) resuspendiert und die Zahl der Glomeruli bestimmt (s. 2.2.5). Aus den Kulturüberständen wurden später die Nitrat- und Nitrit-Konzentrationen (s. 2.2.6) und die Arginase-Aktivität (s. 2.2.7) bestimmt.

## **2.2 Darstellung der Meßmethoden:**

### **2.2.1 Messung der Albuminurie (Albumin-ELISA):**

Da die Trennung der Bestandteile in den oben beschriebenen metabolischen Käfigen (s. 2.1.4) nicht ganz sauber erfolgte, war die Gefahr von Meßfehlern durch die Kontamination des Urins mit aus den Käfigen herabgefallener protein-, v.a. kaseinhaltiger Nahrung relativ groß. Eine alleinige Bestimmung des Proteingehaltes im Urin war für unsere Zwecke deshalb nicht ausreichend spezifisch, da wir erstens das Ausmaß der Albuminurie als Parameter für den Injektionserfolg des Thy1-Antikörpers benutzten und andererseits die Albuminurie bekanntermaßen ein entscheidender funktioneller Parameter für den erwarteten glomerulären Schaden ist. Deshalb war eine spezifische Bestimmung der Albuminurie für unseren Versuch von entscheidender Bedeutung.

Der Albumingehalt des gesammelten Urins wurde mit Hilfe eines modifizierten kompetitiven *Enzyme-Linked Immunosorbent-Assays* (ELISA) bestimmt, wie er u.a. von Magnotti et al.<sup>68</sup> beschrieben wurde. Der Vorteil des Prinzips eines kompetitiven ELISAs liegt in der Tatsache, daß nur ein Antikörper und damit nur ein Inkubationsschritt für die Durchführung der Messung benötigt wird.

Zunächst erfolgte die Vorbereitung der Mikrotiterplatten (*F96 Maxisorb* der Firma Nunc), indem die Meßgruben mit Ratten-Serum-Albumin (RSA) beschichtet wurden.



Hierzu wurde jede Meßgrube mit 100µl *Coating*-Lösung (0,2mg RSA/l 0,1M NaHCO<sub>3</sub>) gefüllt und die Platten für 3h bei 37°C und anschließend für 12h bei 4°C inkubiert.

Danach wurden die Platten gestürzt und damit die Meßgruben entleert. Anschließend wurden die Platten dreimal gewaschen, indem in jede Meßgrube 100µl *AlbELISA-Puffer* pipettiert wurde und die Platten für je 5min mit dem *Minishaker* der Firma IKA Labortechnik mit einer Frequenz von 800/min geschüttelt wurden.

Als Standardreihe diente RSA in den Konzentrationen 0mg/l, 0,03mg/l, 0,05mg/l, 0,07mg/l, 0,1mg/l, 0,2mg/l, 0,3mg/l, 0,4mg/l, 0,5mg/l und 0,6mg/l in Verdünnung mit *AlbELISA-Puffer*.

Die zu den Meßzeitpunkten gewonnenen Urinproben (s. 2.1.5) wurden ihrerseits mit *AlbELISA-Puffer* in den Stufen 1:50; 1:500, 1:5000 und 1:20000 verdünnt. Der lineare Bereich der sigmoiden Standardkurve war sehr eng und die Albuminkonzentration zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Krankheit sehr unterschiedlich, so daß mit Hilfe dieser Verdünnungen für alle Proben Konzentrationen erreicht wurden, die in dem für die Messung relevanten Abschnitt der Kurve lagen. Vor jedem Verdünnungsschritt wurden die Proben etwa 10s lang kräftig gemischt und dann erst die Probe aus dem 1,5ml-Reagiergefäß entnommen, um ein Anhaften von Albumin an die Gefäßwand und damit fehlerhafte Konzentrationen zu vermeiden.

Alle Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. In jede Meßgrube der beschichteten Platten wurden 50µl Hintergrund, Standard bzw. verdünnte Proben pipettiert und jeweils 50µl *Conjugate*-Lösung (Peroxydase-konjugierter Anti-RSA-Antikörper in 1:10000 Verdünnung) hinzugefügt, die Platten mit handelsüblicher atmungsaktiver Frischhaltefolie abgedeckt und bei 37°C für 1h inkubiert.

Anschließend wurden die Platten wie oben beschrieben erneut entleert und mit 100µl *AlbELISA-Puffer* viermal für je 5min gewaschen. Durch diesen Schritt wurden ungebundene Antikörper entfernt. Anschließend erfolgten die Zugabe von 200µl Substratlösung in alle Meßgruben und die 15minütige Inkubation auf einem Schüttler (*Minishaker*, 800/Min).

Mit dem Platten-Photometer *MRX-5000* und dem Software-Programm *BioLinx 2.10* (Firma Dynatech, Denkendorf) wurden die Extinktionen der Proben bzw. des Standards bei 630nm Wellenlänge bestimmt. Aufgrund des Prinzips des kompetitiven

ELISA zeigte der Leerwert die höchste Extinktion und Proben mit hohen Albuminkonzentrationen eine entsprechend niedrigere. Die Meßwerte wurden um den Leerwert bereinigt, und die Extinktionen logarithmiert, um eine lineare Standardkurve zu erzeugen, mit deren Hilfe die Meßwerte interpoliert wurden. Es resultierten die Albuminkonzentrationen der Proben in mg/ml bzw. durch Multiplikation mit dem während der 24stündigen Urinsammlung gemessenen Urinvolumens die ausgeschiedene Albuminmenge in mg/24h.

### **2.2.2 PAS-Färbung/Bestimmung der glomerulären Matrixexpansion:**

Nach Fixierung des Nierengewebes mit 10%igem Formalin (s. 2.1.7) erfolgte die Einbettung des Materials im Routinelabor des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin, mittels Histokinette in aufsteigender Alkoholreihe (70, 80, 96 und 100% Ethanol), Xylol und Paraffin. Dazu wurden die Gewebe jeweils 5min in der jeweiligen Lösung belassen und ihnen so das Wasser entzogen, um das Eindringen des Paraffins zu ermöglichen. Anschließend wurden die Gewebe mit Paraffin in Blöcke gegossen und nach Erkalten mit einem Schlittenmikrotom *HN 40* der Firma Reichert-Jung in eine Schichtdicke von 1-2µm geschnitten. Die Schnitte wurden in einem Wasserbad (46°C) mit destilliertem Wasser aufgefangen und gestreckt, auf handelsübliche unbehandelte Objektträger aufgezogen und anschließend im Wärmeschrank bei 37°C für 24h getrocknet.

Anschließend wurden die Präparate zweimal für 10min in eine Küvette gestellt und mit Xylol überschichtet, um die Objektträger zu entparaffinieren. Daraufhin folgte die Überführung in wässriges Millieu mittels einer absteigenden Alkoholreihe (siehe oben, in umgekehrter Reihenfolge), um die anschließende PAS-Färbung zu ermöglichen,

Für die PAS-Färbung wurden die Schnitte direkt aus dem 70% Alkohol für 5min in eine 1% Perjodsäurelösung eingestellt, anschließend gut mit destilliertem Wasser gespült und für weitere 5min in Schiff'sches Reagenz gebracht. Danach wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser für 10min gewässert und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Die Gegenfärbung erfolgte durch 3minütiges Einstellen der Objektträger in Hämatoxylin-Lösung. Anschließend wurden die

Präparate unter fließendem Leitungswasser für 10min gebläut.

Die Präparate wurden erneut über eine aufsteigende Alkoholreihe (siehe oben) in Xylol überführt und anschließend mit Histokitt eingedeckt.

Die Auswertung der fibrotischen Umwandlung der Glomeruli erfolgte unter einem Lichtmikroskop mit Hilfe eines semiquantitativen Scores entsprechend publizierter Methoden<sup>69</sup>. Dabei wurde bei 30 Glomeruli pro Ratte der Anteil der Matrix pro Glomerulum bestimmt und in vier Ausweisungsgrade kategorisiert:

<b>Anteil der Matrix am Glomerulum</b>	<b>Score</b>
0-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Tabelle 2-2: Histologie-Score

Die Auswertung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher, die über die Gruppenzugehörigkeit der Schnitte nicht informiert waren.

Die Werte wurden gemittelt und als absoluter Score gewertet. Parallel dazu wurde der prozentuale Anteil der untersuchten Glomeruli pro Tier und Gruppe bestimmt, deren ermittelter Score  $\geq 2,5$ , also signifikant sklerotisch, war.

### **2.2.3 Isolation der glomerulären RNA:**

Die Isolation der RNA wurde mittels Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation leicht modifiziert gemäß der Anleitung in Sambrook et al.<sup>70</sup> durchgeführt. Es wurden nur sterilisierte bzw. RNase-freie Instrumente, Behälter und Lösungen oder sterile Einmalartikel benutzt.

#### **2.2.3.1 Beladen der Ultrazentrifuge:**

Die beim Tierversuch (s. 2.1.8) gewonnenen und in 2ml 4M GITC und 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen glomerulären Pellets wurden im Eisbad aufgetaut und mit dem Homogenisator *Ultra Thurrax T25* von IKA Labortechnik mit

6.000rpm für etwa 15s homogenisiert. Die Proben wurden anschließend mit 100µl 10% Sarcosin versetzt und die so entstandene 0,5%ige Sarcosin-Lösung bei 4°C 10min mit 4000rpm zentrifugiert.

Pro Probe wurde ein 5ml-Ultrazentrifugenröhrchen *Ultra Pure* der Firma Beckmann mit 2ml 5,7M Cäsiumchlorid gefüllt und der Flüssigkeitsspiegel außen am Röhrchen markiert. Es wurde die Nummer der Probe am jeweils oberen und unteren Rand des Röhrchens vermerkt. Der gesamte Überstand der zentrifugierten Probe wurde auf die CsCl-Phase pipettiert. Die drei Rotorarme des Beckmann-Schwingrotors SW-65 wurden mit den Proben bestückt. Jeder einzelne Arm wurde mit einer Feinanalysenwaage ausgewogen und eventuelle Gewichtsunterschiede bis auf 0,1g Genauigkeit mit 4M GITC ausgeglichen, um Imbalancen zu vermeiden. Die Beckmann-Ultrazentrifuge L-70 wurde mit dem Rotor beladen und die Proben bei 20°C für 20h mit 38.000rpm zentrifugiert.

#### **2.2.3.2 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation:**

Nach der Zentrifugation wurde der Inhalt der Röhrchen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe mit aufgesetzter Pasteurpipette bis zu der Markierung des CsCl-Niveaus abgesaugt. Eine frische Pipette wurde aufgesetzt und das Röhrchen unter Absaugung gekippt und auf den Kopf gedreht, bis es entleert war.

Ein Skalpell wurde über einem Bunsenbrenner bis zum Aufglühen erhitzt und der nach oben zeigende Boden des Röhrchens abgeschnitten. Dieser wurde invertiert auf Zellstofftüchern abgelegt und der Rest der Röhrchen verworfen. Der Boden des Röhrchens wurde dann mit 70%igem sterilen Ethanol gewaschen. Dazu wurden 50µl Ethanol seitlich ohne Berührung auf den Rand des Röhrchens pipettiert und das Röhrchen mehrmals geschwenkt. Durch dieses Vorgehen wurde das verbliebene CsCl aus dem Röhrchen gewaschen, um die spätere Lösung der RNA in mit Diethylpyrocarbonat vorbehandeltem Wasser (DEPC-Wasser) zu erleichtern. Das Röhrchen wurde ca.10min zum Trocknen invertiert auf Zellstoff abgestellt.

Während dieser Zeit wurden pro Probe zwei 1,5ml-Reagiergefäße mit 200µl Phenol-Chloroform gefüllt. Beim Pipettieren war zu beachten, daß die Phenol-Chloroform-Lösung unterhalb der auf der kommerziell erworbenen Lösung schwimmenden Alkoholphase aufgenommen werden mußte.

100µl 0,1% DEPC-Wasser wurden nun auf das nicht sichtbare RNA-Pellet aufgetragen, langsam etwa 60mal auf- und abpipettiert und die RNA auf diese Weise gelöst. Die Lösung wurde dann auf die Phenol-Chloroform-Phase in den vorbereiteten Reagiergefäßen pipettiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt, so daß die RNA in 200µl DEPC-Wasser gelöst vorlag.

Die Proben wurden anschließend etwa 30s lang gemischt und daraufhin bei 14000rpm für 2min zentrifugiert. Die obere RNA-haltige Phase wurde abgehoben und in das zweite Eppendorf-Gefäß auf die 200µl Phenol-Chloroform-Lösung gegeben. Dieses Gefäß wurde wieder 30s gemischt und wie das erste zentrifugiert. Durch diesen Schritt wurden evtl. noch vorhandene Proteinreste aus den Proben entfernt, um die RNA in möglichst reiner Form zu erhalten. Erneut wurde die obere Phase abgehoben und in ein weiteres leeres Reagiergefäß überführt. Den Proben wurden dann 20µl 3M Natriumacetat trihydrat und 500µl eiskaltes 100%iges Ethanol dazugegeben und diese Lösung mindestens eine Stunde bei -80°C inkubiert. Während dieser Zeit präzipitierte die RNA, so daß sie anschließend von der restlichen Lösung abgetrennt werden konnte.

Die Proben wurden anschließend mit 14000rpm für 10min zentrifugiert und danach die Flüssigkeit rasch dekantiert. Am Boden des Gefäßes war jetzt ein trüb-weißliches RNA-Pellet zu sehen. Die Gefäße wurden invertiert und etwa 10min auf Zellstoff zum Trocknen abgestellt. Anschließend wurde das Pellet in 25µl DEPC-Wasser gelöst und diese Lösung bei -80°C gelagert.

### **2.2.3.3 Bestimmung von RNA-Gehalt und -Qualität:**

Zur Qualitätskontrolle wurde 1µl dieser Lösung zusammen mit 10µl DEPC-Wasser und 10µl *BPB-Loading Buffer* auf ein ethidiumbromidgefärbtes 1%-Agarosegel aufgetragen und für ca. 10min bei 97mV in der *Biomax*-Gelkammer der Firma Sigma elektrophoretisch aufgetrennt. Die Intaktheit der RNA wurde anhand der Banden der ribosomalen RNA beurteilt.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit der RNA wurde 1µl der RNA-Probe in 99µl DEPC-Wasser verdünnt und mit dem Photometer *UV-1202* von Shimadzu gemessen. Dabei dienten 100µl DEPC-Puffer als Leerwert zur Eichung des Photometers. Bei 260nm Wellenlänge wurde die Extinktion für Nukleinsäuren

und bei 280nm die Extinktion für Proteine bestimmt und aus diesen auf die Konzentration der Komponenten geschlossen. Der Quotient aus Nukleinsäuren- und Proteinextinktion (OD-Quotient) ist ein Maß für die Reinheit der RNA, eine Probe mit einem OD-Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 wurde als qualitativ gut und rein bewertet. Aus der ermittelten Extinktion bei 260nm wurde außerdem nach der Formel

$$\frac{E \times f \times 40}{1000} = C_{\text{RNA}},$$

wobei

E = Extinktion der Probe bei 260nm

f = Verdünnungsfaktor

$C_{\text{RNA}}$  = Konzentration der RNA in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ,

die Konzentration der RNA in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  berechnet. Diese Werte wurden für die weitere Verarbeitung im Rahmen der RT-PCR (s. unten) zugrunde gelegt.

#### **2.2.4 RT-PCR:**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine gängige Methode zur Genanalyse. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, auch kleine Mengen von DNA zu untersuchen, indem von dem zu untersuchenden Genabschnitt eine so hohe Anzahl von Kopien hergestellt wird, daß das entstehende Amplifikat sicht- und analysierbar wird.

Der prinzipielle Ablauf der Reaktion beruht auf drei Schritten: Beim ersten Schritt wird die zu analysierende DNA so stark erhitzt, daß sich die DNA-Stränge trennen und somit als Einzelstränge vorliegen (*Denaturierung*). In einem zweiten Schritt wird die Temperatur soweit abgesenkt (*annealing temperature*), daß sich die für jeden zu untersuchenden Genabschnitt individuellen Primerpaare vor bzw. hinter dem Gensegment anlagern. In einem dritten Schritt wird schließlich die Temperatur auf den optimalen Arbeitsbereich für die zugesetzte DNA-Polymerase gebracht, die eine komplementäre Kopie des zwischen den Primern liegenden DNA-Bereiches synthetisiert. Anschließend wird die DNA wieder denaturiert und der Zyklus beginnt von neuem. Durch dieses Vorgehen wird bei jedem Zyklus die Menge des zu untersuchenden Genabschnitts verdoppelt.

Die RT-PCR ist eine gängige Abwandlung dieser Methode, um RNA-Expression mit Hilfe der PCR bestimmen zu können. Dazu muß zunächst die isolierte RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, da die RNA selbst für eine PCR nicht thermostabil genug ist.

Da wir ausschließlich glomeruläre RNA verwendeten und somit die Menge zur Verfügung stehender RNA erheblich limitiert war, sodaß die RNA-Analyse mit anderen Methoden, z.B. mittels Northern-Blot-Hybridisierung, wenig erfolgversprechend erschien, war in diesem Fall die RT-PCR die Methode der Wahl. Wir verwendeten die RT-PCR zur Bestimmung der glomerulären RNA-Expression von Renin, bNOS und zusätzlich von  $\beta$ -Aktin als sogenanntes *Housekeeping Gene*. Eine Semiquantifizierung wurde mit Hilfe des sogenannten *limiting dilution assays* durchgeführt (s. 2.2.4.3). Diese Methode ist von Harren et al.<sup>71</sup> validiert worden.

#### **2.2.4.1 DNase-Verdau:**

Mit diesem Schritt wurde die potentiell in den RNA-Proben noch vorhandene DNA enzymatisch gespalten, um Interferenzen mit der RNA-Analyse zu vermeiden. Es wurden ein Kit und ein Protokoll der Firma Gibco BRL verwendet (s. Anhang I).

Die RNA-Proben wurden im Eisbad aufgetaut. Aus den bei der RNA-Isolation bestimmten RNA-Konzentrationen wurden die Volumina berechnet, in denen jeweils 10 $\mu$ g RNA enthalten waren. Die entsprechende Menge RNA wurde entnommen, in ein 0,2ml-Reagiergefäß pipettiert, mit 10 $\mu$ l *DNase-Puffer* und 2000U *DNase I* versetzt und das Gemisch mit 0,1% DEPC-Wasser auf 100 $\mu$ l aufgefüllt. Die Proben wurden für 15min bei 25°C inkubiert und anschließend 10 $\mu$ l 25mmol EDTA (pH 8,0) zugegeben, um das im Puffer enthaltene Mg<sup>2+</sup> zu komplexieren und das Enzym damit zu inaktivieren. Anschließend wurden die Proben für 10min bei 65°C inkubiert und gleich danach wieder in das Eisbad überführt.

#### **2.2.4.2 Reverse Transkription:**

Bei diesem Schritt wurde durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) cDNA aus der isolierten RNA erzeugt. Es wurde das *RT-Set* der Firma Gibco BRL benutzt.

Jede der 100 $\mu$ l-Proben aus dem DNase-Verdau wurden auf zwei Ansätze aufgeteilt;

in einem Ansatz fand die erwünschte Reaktion statt, der andere diente als Negativ-Kontrolle.

Es wurden 90 $\mu$ l der Proben für die RT verwendet; dazu wurde das Material entsprechend dem Gibco-BRL-Protokoll zusammen mit 36 $\mu$ l 5fach-RT-Puffer, 9 $\mu$ l 100pM Random Hexamers, 9 $\mu$ l 10mM dNTPs, 4,5 $\mu$ l 0,1M DTT, 180U RNAsin, 18 $\mu$ l 0,1% DEPC-Wasser und 1800U Reverser Transkriptase in ein PCR-Gefäß gegeben, so daß eine 180 $\mu$ l-Probe resultierte.

Die restlichen 10 $\mu$ l der Proben wurden für die Negativ-Kontrollen verwendet; dazu wurde das Material zusammen mit 4 $\mu$ l 5fach-Puffer, 1 $\mu$ l 100pM *Random Hexamers*, 1 $\mu$ l 10mM dNTPs, 0,5 $\mu$ l 0,1M DTT, 20U RNAsin und 3 $\mu$ l 0,1% DEPC-Wasser zu einer 20 $\mu$ l-Probe vermischt; diesen Kontrollen wurde keine Reverse Transkriptase zugesetzt.

Es wurde für jeweils alle Positiv- und Negativ-Proben die insgesamt benötigte Menge der o.a. Substanzen errechnet, ein jeweils gemeinsamer *Positiv- und Negativ-Mastermix* mit jeweils allen Reagenzien angesetzt und dieses Gemisch den einzelnen Proben hinzugefügt. Auf diese Weise sollten Konzentrationsschwankungen der Komponenten in den einzelnen Proben minimiert werden.

Alle Proben wurden gemeinsam für 10min bei 22°C, für 45min bei 40°C und für 5min bei 95°C inkubiert und so die cDNA für die anschließende PCR erzeugt.

Von allen Proben wurde eine Nativ- $\beta$ -Aktin-PCR durchgeführt (s. 2.2.5.3); die Reverse Transkription wurde als erfolgreich gewertet, wenn die PCR in den Positiv-Proben erfolgreich und in den Kontroll-Proben negativ verlaufen war.

#### **2.2.4.3 Semiquantitative PCR:**

Für die PCR wurde die bei der RT erzeugte cDNA verwendet. Es wurde die relative Menge an cDNA der Gene für bNOS und Renin bestimmt, die eine Aussage darüber erlaubte, wieviel mRNA für das jeweilige Gen in der RNA-Probe enthalten war. Es wurde zusätzlich eine semiquantitative Analyse von  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Dieses Gen, das zu einem cytoskelettalen Protein translatiert wird, gehört zu den sogenannten *Housekeeping Genes*, wird also definitionsgemäß konstitutiv in immer gleicher Menge exprimiert. Damit stellte seine Menge an cDNA ein gutes Maß dafür



dar, wie erfolgreich die RT verlaufen und wieviel cDNA in den einzelnen Proben jeweils vorhanden war. Die gemessenen Ergebnisse bezüglich der bNOS- und Renin-RNA mußten auf die Menge des jeweiligen  $\beta$ -Aktin-Amplifikats bezogen werden.

Für die  $\beta$ -Aktin-PCR wurden das *Amplimer-Set* und das Protokoll der Firma Clontech benutzt<sup>72</sup>. Die Protokolle und Primer der Renin-PCR wurden in unserer Arbeitsgruppe und die der bNOS-PCR von Herrn Gilbert Schönfelder, Institut für klinische Pharmakologie der Freien Universität Berlin, etabliert und optimiert. In beiden Fällen erfolgte ein Nachweis der Spezifität des Genprodukts mit Hilfe einer Spaltung durch Restriktionsenzyme und einer direkten Gensequenzierung.

	<b><math>\beta</math>-Aktin</b>	<b>bNOS</b>	<b>Renin</b>
<b>10fach-Puffer</b>	5,0 $\mu$ l	5,0 $\mu$ l	5,0 $\mu$ l
<b>50mM MgCl</b>	1,5 $\mu$ l	2,0 $\mu$ l	3,0 $\mu$ l
<b>25mM dNTP</b>	0,4 $\mu$ l	0,2 $\mu$ l	0,4 $\mu$ l
<b>Primer-Konz.</b>	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M
<b>Primer-Volumen</b>	1,0 $\mu$ l	1,0 $\mu$ l	1,0 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O</b>	38,6 $\mu$ l	39,3 $\mu$ l	37,5 $\mu$ l
<b>Taq-Polymerase</b>	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,1 $\mu$ l
<b>Temperatur-Profil</b>	95°C für 5:00min  35 Zyklen: 94°C für 0:45min 65°C für 0:45min 72°C für 2:00min  72°C für 6:00min 4°C für 10:00min	95°C für 5:00min  35 Cyclen: 94°C für 0:30min 61°C für 0:45min 72°C für 2:00min  72°C für 10:00min 4°C für 10:00min	94°C für 3:00min  28 Zyklen: 94°C für 0:45min 64°C für 0:45min 72°C für 1:00min  72°C für 10:00min 4°C für 10:00min
<b>Sequenz Primer 1</b> 5'→3', upstream	TTGTAACCAACTG GGACGATATGG	CCCTTCAGTGGC TGGTACAT	TGGATCAGGGAA GGTCAAAG
<b>Sequenz Primer 2</b> 5'→3', downstream	GATCTTGATCTTC ATGGTGCTAGG	TGCCTGTCTCTGT GGCATAG	AAGGAGATGTCC GGGAGG
<b>Amplifikatlänge</b>	764bp	1140bp	555bp

Tabelle 2-3: PCR-Protokolle

Das Prinzip der semiquantitativen PCR war für alle 3 untersuchten Gene gleich, es wird deshalb nur einmal erläutert. Lediglich die Konzentrationen der einzelnen

Substanzen im PCR-Ansatz, die Temperaturprofile und Anzahl der Zyklen unterschieden sich für die jeweiligen Gene (siehe Tabelle 2-3).

Für den Ansatz der PCR wurde zunächst die erforderliche Menge Wasser und anschließend 2µl der nativen bzw. verdünnten cDNA in die Röhrchen pipettiert.

Die restlichen Reagenzien (siehe Tabelle 2-3) wurden, analog dem Vorgehen bei der RT, pro PCR-Ansatz für alle Proben in einem *Mastermix* gemischt und die Röhrchen aus diesem Gemisch gefüllt. Das Endvolumen der Einzelproben lag bei 50µl.

Für die semiquantitative Analyse wurde zunächst der lineare Amplifikationsbereich mittels „Zyklentest“ ermittelt, d.h., es wurden von jeder Probe mehrere PCRs mit unverdünnter cDNA angesetzt und mit ansteigender Zyklenzahl durchgeführt. So konnte sichtbar gemacht werden, ab welcher Zyklenzahl die PCR schon im gesättigten und damit nicht im ideal semiquantifizierbaren Bereich lag. Auf diese Weise wurde die Zyklenzahl für den anschließenden *limiting dilution assay* festgelegt.

Für diesen wurden von jeder Probe 2µl cDNA entnommen und Verdünnungsreihen mit 6 Schritten in absteigender Konzentration (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32) hergestellt.

Die Proben durchliefen die PCR-Zyklen gemäß dem angegebenen Protokoll, dazu wurde der programmierbare Thermocycler *PTC-200* der Firma MJ Research benutzt. Nach der abgelaufenen PCR wurde den Proben 10µl BPB-Puffer hinzugefügt und je 20µl des Gemisches auf ein 2% ethidiumbromidgefärbtes Agarose-Gel aufgetragen. Die DNA wurde für ca. 10min bei 97mV in der *Biomax*-Gelkammer der Firma Sigma elektrophoretisch aufgetrennt. Als Stromquelle wurde das *Mini Power Pack P20* von Biometra benutzt. Die Gele wurden unter eine UV-Lampe gelegt, um die DNA-Banden sichtbar zu machen, die Bilder mit den Verdünnungsreihen einer jeden Probe mit einem Polaroid-Dokumentationsgerät fotografiert, auf einem Datenträger (siehe Abb. 2-1) gespeichert und die Dichte der DNA-Banden mit dem Programm *TINA 2.09g* von raytest Isotopenmeßgeräte GmbH bestimmt.



Abb.2-1: Beispiel einer Verdünnungsreihe (Renin, Gruppe: +P+A 1M)

Nach der Formel

$$I = \frac{c}{c_0} \times (1+E)^n,$$

wobei

- I: Intensität des Bandensignals
- c: Konzentration der Verdünnung
- c<sub>0</sub>: Konzentration vor Verdünnung
- E: Effizienz der Amplifikation
- n: Zyklenzahl,

ergibt sich unter der Annahme, daß E und n konstant (K) sind (Proben in einem Ansatz verarbeitet), die lineare Beziehung zwischen I und c:

$$I = \frac{K}{c_0} \times c,$$

deren Steigung ein Maß für die vor der PCR im Ansatz enthaltenen spezifischen cDNA ist.

Deshalb wurden die Meßwerte für die Bandendichte mit *Microsoft Excel 97* gegen die relative Konzentration in einem Koordinatensystem aufgetragen, eine Ausgleichsgerade erzeugt und deren Steigung bestimmt (siehe Abb 2-2). Die Steigung der Geraden war danach ein Maß für die relative Menge des PCR-Produkts.

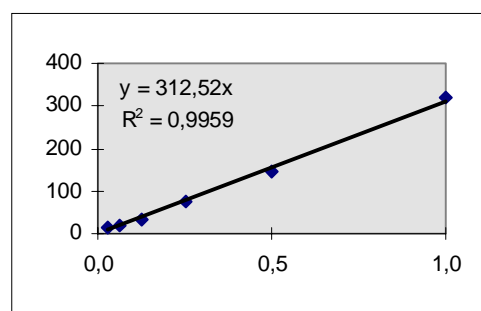


Abb.2-2: Ermittlung des Steigungswertes (Renin, Gruppe: +P+A 1M)

Die Steigungswerte der Renin- und bNOS-PCR wurden auf die Werte der  $\beta$ -Aktin-PCR bezogen, um evtl. cDNA-Mengenunterschiede in den unterschiedlichen Proben auszugleichen.

Mit den daraus resultierenden Quotienten war es möglich, relative Mengen für die cDNA des jeweiligen Gens im Verhältnis zu den anderen Proben anzugeben und aus diesen auf den relativen mRNA-Gehalt der Proben rückzuschließen.

### **2.2.5 Zellkultur:**

Das zusätzliche in 20ml PBS gelöste glomeruläre Pellet (s. 2.1.8) wurde nach Dekantierung des Überstandes je nach Größe in 4-6ml DMEM resuspendiert. Das DMEM war mit L-Glutamin- und Penicillin-Streptomycin supplementiert und enthielt 0,5% fetales bovines Serum. Aus Gründen der Interaktion mit dem Griess-Assay (s. 2.2.7) wurde ein Medium ohne Phenolrot-Indikator verwendet. Aus der Suspension wurden 3 mal je 10µl entnommen und die Glomeruli unter dem Mikroskop ausgezählt. Aus diesen 3 Zählungen wurde ein Mittelwert gebildet und die Anzahl auf das Gesamtvolumen umgerechnet. Das Volumen wurde so mit DMEM angepaßt, daß die Konzentration bei 3000 Glomeruli/ml DMEM lag. Je 1ml dieser Lösung wurde auf je eine Vertiefung einer 12-Well-Kulturschale verteilt. Drei Vertiefungen wurden ohne weiteren Zusatz kultiviert und zu zwei Vertiefungen wurden 0,1Ci [<sup>14</sup>C]-Arginin hinzugefügt. Die Platten wurden 48h bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend die Überstände abgehoben. Die nativen Proben wurden für 5min bei 4000rpm zentrifugiert und die Überstände bei -20°C tiefgefroren, um sie später für die Nitrat- und Nitrit-Messung zu verwenden (s. 2.2.6).

Die [<sup>14</sup>C]-Arginin-versetzten Proben wurden in 1,5ml-Reagiergefäße pipettiert und ebenfalls bei -20°C tiefgefroren, um sie später für die Messung der Arginase-Aktivität zu verwenden (s. 2.2.7).

### **2.2.6 Nitrat- und Nitrit-Messung (Griess-Assay):**

Der Ablauf der Griess-Reaktion wurde mit leichten Modifikationen entsprechend der Angaben von u.a. Green et al.<sup>73</sup> durchgeführt.

Mit dieser Methode wird Nitrit gemessen. Da NO in die stabilen Endprodukte Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) umgewandelt wird, erhöht sich die Sensitivität der Griess-Reaktion, wenn Nitrat vor der Messung zu Nitrit reduziert wird. Da NO selbst ein instabiles gasförmiges Radikal ist, welches einer direkten Messung nur über EPR-

bzw. Sondentechniken zugänglich ist, welche uns nicht zur Verfügung standen, wurde die Messung mittels Griess-Assay durchgeführt.

Von den für die Messung der Nitritkonzentration (s. 2.2.6) eingefrorenen Zellkultur-Überständen wurden je 250µl in 1,5ml-Reagiergefäße pipettiert.

Eine Standardreihe mit kommerziell erworbener Natriumnitrat-Lösung (0µM, 3,125µM, 6,25µM, 12,5µM, 25µM, und 50µM) wurde hergestellt und auch von jedem dieser Verdünnungsschritte jeweils 250µl in Reagiergefäße gegeben.

In die Proben bzw. Standards wurden je 0,05U Nitratreduktase und 1,5µg *NADPH* als Cofaktor zugegeben und die Gefäße für 45min bei 37°C inkubiert.

Bei der in dieser Zeit ablaufenden Reaktion wurde das vorhandene  $\text{NO}_3^-$  zu  $\text{NO}_2^-$  reduziert, da nur letzteres durch die Griess-Reaktion nachweisbar ist.

Für die Messung wurden die *Griess-Reagentien I* und *II* zu gleichen Teilen vermischt und von dem Gemisch jeweils 100µl in Doppelbestimmungen in die Mulden einer *Corning-96-Well-Platte* pipettiert, je 100µl der mit Nitratreduktase vorbehandelten Standards bzw. Proben hinzugefügt und die Platte für 5min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Das in den Proben vorhandene Nitrit reagierte jetzt mit den gemischten *Griess-Reagenzien* zu einem rosafarbenen Azo-Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 546nm.

Mit dem Platten-Photometer *MRX-5000* und dem Programm *BioLinx 2.10* wurde die Extinktion der Proben bzw. Standards bei 550nm Wellenlänge bestimmt, analog dem Vorgehen unter 2.2.1, eine Standardkurve erzeugt und aus dieser und den Extinktionswerten der Proben deren jeweilige Nitritkonzentration in µmol/l errechnet.

### **2.2.7 Messung der Arginase-Aktivität (Arginase-Assay):**

Die Bestimmung der Arginase-Aktivität aus Kulturüberständen erfolgte entsprechend der Beschreibung von Rüegg und Russell<sup>74</sup> und Modifikationen gemäß weiterer Publikationen<sup>51,75</sup>.

Es wurden bewußt nur die Aktivitäten bei den Gruppen der 1-Monats- und Kontrolltiere bestimmt, da Veränderungen zu späteren Zeitpunkten nicht mehr zu erwarten waren.

Die für die Arginase-Messung gesammelten Proben (s. 2.2.6) wurden für 10min bei

3000rpm zentrifugiert und 150µl des Überstandes zusammen mit 800µl *Arginasepuffer* und 300µl *Dowex* in 1,5ml-Reagiergefäße pipettiert. Dieser Ansatz wurde 1min lang kräftig geschüttelt, wodurch das im Kulturüberstand noch vorhandene [<sup>14</sup>C]-Arginin und das durch die Arginase-Reaktion entstandene Ornithin an das *Dowex* gebunden und anschließend bei 1000rpm für 10min abzentrifugiert wurden.

Es wurden 500µl dieses Überstandes, in dem jetzt nur noch [<sup>14</sup>C]-Harnstoff vorhanden sein sollte, in ein mit 10ml Szintillationsflüssigkeit gefülltes 50ml-Szintillationsgefäß gegeben.

Parallel wurden 150µl von nicht mit *Dowex* vorbehandeltem Kulturüberstand in ein gleichartiges Gefäß gegeben, um dessen gesamte, von der Arginase-Reaktion unabhängige, [<sup>14</sup>C]-Aktivität zu bestimmen.

Die Messung der Aktivität erfolgte im Beckmann-β-Counter *LS-1701* für eine Minute pro Probe.

Mit Hilfe dieser Meßwerte konnte wie folgt errechnet werden, welcher prozentuale Anteil des vorhandenen [<sup>14</sup>C]-Arginins von der Arginase in [<sup>14</sup>C]-Harnstoff und Ornithin gespalten wurde:

$$\text{Umsatz in \%} = \frac{\text{cpm in A} - \text{cpm in Leer}}{\text{cpm in B} \times 0,36} \times 100 ,$$

wobei

cpm: gemessene Aktivität der Probe in counts per minute

A: 500µl Kulturüberstand mit *Dowex*

B: 150µl Kulturüberstand ohne *Dowex*

Leer: 10ml Szintillationsflüssigkeit ohne Kulturüberstand

0,36: Faktor zum Ausgleich der unterschiedlichen Volumina

Der prozentuale Umsatz von Arginin diente damit als indirekter Hinweis auf die Höhe der Arginase-Aktivität in den jeweiligen Kulturüberständen.

## 2.2.8 Messung der ODC-Aktivität/ODC-Assay:

Der ODC-Assay wurde in Anlehnung an Pedersen et al.<sup>76</sup> und Ketteler et al.<sup>51,77</sup> mit leichten eigenen Modifikationen durchgeführt.

Da bekannt war, daß bei der Gewinnung der Glomeruli durch den Zeitgang der glomerulären Isolation bereits ein deutlicher Aktivitätsverlust der sehr instabilen ODC zu verzeichnen ist, wurde die Bestimmung dieses Enzyms aus schockgefrorenen Nierenpolen vorgenommen.

Die in 2ml ODC-Puffer fixierten Nierenstücke (s. 2.1.7) wurden im Eisbad aufgetaut. Es wurden zusätzlich 125µl 10mM Propylmethylsulfonylfluorid (PMSF) als Protease-Inhibitor dazugegeben, die Proben bei 6000rpm etwa 30s mit dem *Ultra Thurrax T25* (s. 2.2.4.1) homogenisiert und 15min bei 3000rpm zentrifugiert. Es wurden 2 x 500µl der Überstände abgehoben und in je ein 1,5ml-Reagiergefäß gegeben, um damit die ODC-Messung bzw. die Bestimmung des Proteingehaltes (s. unten) durchzuführen.

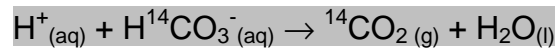
Für den ODC-Assay wurde eine Standardreihe mit kommerziell erhältlicher boviner ODC in Konzentrationen von 0µU, 5µU, 10µU und 20µU/µl in Verdünnung mit *ODC-Puffer* hergestellt.

Es wurden 0,25µCi [<sup>14</sup>C]-Ornithin ohne Berührung des Randes auf den Boden eines 15ml-Röhrchens pipettiert, darauf wurden je 200µl Standard- bzw. Probelösung gegeben. In die Deckel der Röhrchen wurde ein 1,4 x 1,4cm großes Stück Filterpapier eingelegt und dieses mit 40µl 2M NaOH eingeweicht. Der Deckel wurde mit dem Papier lose auf das Röhrchen aufgelegt und dieses in dem Wärmeblock *QBT2* der Firma Grant 45min bei 37°C inkubiert. Durch die ablaufende ODC-Reaktion (s. 1.2.3.5) wurde aus dem [<sup>14</sup>C]-Ornithin <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> freigesetzt, welches als Gas im Röhrchen aufstieg und mit dem Filterpapier aufgefangen wurde, indem aus NaOH und <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> das nicht flüchtige NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> gebildet wurde.

Der Wärmeblock wurde in einem Kühlraum mit 4°C aufgestellt, damit durch die Inkubation verdampfendes Wasser in dem Röhrchen frühzeitig wieder kondensierte und so Verunreinigungen des Filterpapiers vermieden wurden.

Nach dieser Inkubation wurde eine handelsübliche Insulinspritze durch die Röhrchenwand knapp oberhalb des Flüssigkeitsspiegels gestochen und 200µl 2M Zitronensäure injiziert, um das restliche, evtl. in der Flüssigkeit noch gelöste <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>

durch eine Absenkung des pH-Wertes gemäß der Reaktion



freizusetzen.

Die Proben wurden weitere 45min bei 37°C inkubiert, anschließend die Filterpapiere mit dem eingefangenen  ${}^{14}\text{CO}_2$  aus den Deckeln entfernt und in mit 5ml Szintillationsflüssigkeit gefüllte Szintillationsbehälter gegeben. Die Proben wurden jeweils 5min im Szintillationszähler Beckmann *LS-1701* belassen und die [ ${}^{14}\text{C}$ ]-Aktivität in cpm gemessen.

Die Aktivität der Standardproben wurde mit *Microsoft Excel 97* gegen die ODC-Konzentration in einem Koordinatensystem aufgetragen und eine Ausgleichsgerade mit deren Geradengleichung erzeugt.

Von den cpm der Proben ausgehend konnte nun auf die ODC-Menge der Proben in  $\mu\text{U}$  geschlossen werden.

Zur Messung des Proteingehaltes wurde die Bradford-Methode<sup>78</sup> angewendet. Dafür wurde zunächst eine Standardreihe mit bovinem Serum-Albumin hergestellt (0 $\mu\text{g}$ , 0,5 $\mu\text{g}$ , 1 $\mu\text{g}$ , 2 $\mu\text{g}$ , 5 $\mu\text{g}$ , 8 $\mu\text{g}$  und 10 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ) und die vorbereiteten Proben mit dem wie oben beschrieben gewonnenen Nieren-Homogenisat jeweils 1:100 und 1:200 verdünnt.

Von Standard und Proben wurden je 30 $\mu\text{l}$  in Doppelbestimmungen in die Mulden einer *Corning-96-Well-Platte* pipettiert, je 150 $\mu\text{l}$  *Bradford-Reagenz* zugegeben und die Platte 5min bei Raumtemperatur stehengelassen.

Die während dieser Zeit ablaufende Reaktion beruht auf der Anlagerung des im *Bradford-Reagenz* enthaltenen *Coomassie Blue* an die Peptidbindungen der Proteine, wobei sich sein Absorptionsmaximum von 465nm nach 595nm verschiebt.

Die Extinktionen von Standards bzw. Proben wurden bei 595nm gemessen (s. 2.2.1 und 2.2.6), eine Standardkurve erzeugt und aus dieser und den Extinktionswerten der Proben deren jeweilige Proteinkonzentration errechnet.

Die ODC-Konzentrationen wurden auf die gemessenen Proteinkonzentrationen bezogen und die Enzymaktivität in  $\mu\text{U}/\text{mg}$  Protein errechnet.



### **2.2.9 Messung der Serumkonzentrationen der Aminosäuren Arginin, Citrullin, Ornithin und Prolin:**

Die Messung der vier im Arginin-Stoffwechsel relevant erscheinenden Aminosäuren erfolgte automatisiert im Routinelabor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin des Virchow-Klinikums der Humboldt-Universität, Berlin (Leiter: Prof. Mönch), durch Herrn W. Kohlen mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC).

Es wurden 500µl der beim Tierversuch gewonnenen Heparin-Seren (s. 2.1.7) von uns mit 100µl Sulfosalicylsäure versetzt und für 20min bei 4°C inkubiert.

Während dieser Zeit wurden die im Serum vorhandenen Proteine durch die Säure ausgefällt und das Produkt anschließend für 10min bei 5000rpm abzentrifugiert.

Nun wurden 200µl des Überstandes mit 200µl *Verdünnungspuffer* und 50µl Norleucin-Lösung als *Internem Standard* für die HPLC versetzt und die Proben auf Eis in das oben genannte Labor transportiert.

#### **2.2.10 Statistische Auswertung:**

Die Auswertung der Daten erfolgte mit *SPSS Version 6* im Institut für Epidemiologie und Statistik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin.

Zur Ermittlung der Signifikanz von Unterschieden wurde wegen der kleinen Fallzahlen und fehlender Normalverteilung der Daten der Mann-Whitney-U-Test angewendet.