

4 Eigene Untersuchungen

4.1 Materialien

Alle verwendeten Materialien, Chemikalien und Zellkulturmedien und –zusätze wurden, wenn nicht anders erwähnt, von der SigmaAldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

4.2 Tierversuch

Die Tierversuche und die damit verbundenen Eingriffe wurden von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin geprüft und unter der Tierversuchsnummer Reg 0229/01 genehmigt. Alle Eingriffe an lebenden Tieren wurden unter Beachtung des § 9 Abs. 1 und 2 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Doktorandin hatte in diesem Versuchsvorhaben die stellvertretende Leitung.

Die anfallenden toten Tiere und Tierkörper Teile wurden gemäß § 8 Abs. 1 und 2 des Tierkörperbeseitigungsgesetzes vorschriftsmäßig entsorgt.

4.2.1 Tiere und Tierhaltung

Insgesamt wurden 56 männliche Wistar-Ratten mit einem Anfangsgewicht von 150-180 g für die Versuche verwendet. Die Tiere wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Tierhaltung erfolgte in der Zentralen Versuchstierhaltung in der Tucholsky Straße, 10117 Berlin, paarweise in Käfigen mit freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser in vollklimatisierten Räumen bei einem zirkadianen Tag-/ Nachtrhythmus. Die Tiere wurden täglich visitiert und der Verbrauch von Futter und Trinkwasser regelmäßig kontrolliert.

4.3 Herstellung des Antikörpers OX-7

4.3.1 Zellkultur

Falls nicht anders vermerkt, wurden alle Produkte für die Herstellung des Zellkulturmediums von der Fa. Biochrom KG (Berlin, Deutschland) bezogen.

Für die Herstellung des Antikörpers OX-7 wurden monoklonale Maus-Hybridoma-Zellen der OX-7-Stammsammlung (Center of Applied Microbiology & Research, Salisbury, England) in Kultur gebracht. Dazu wurden die bei -70°C gelagerten Zellen schnell unter fließend warmen Wasser aufgetaut und unter sterilen Bedingungen in folgendes Kulturmedium überführt:

RPMI-Medium 1640 wurde mit 9% 10x fetalem Kälberserum und 1,6% G-50 Glukoselösung versetzt. Pro Liter dieses Ansatzes wurden jeweils 60.000 IU Penicillin und 60.000 μg

Streptomycin hinzugefügt. Um die aufgetauten Zellen von Gefriermedium zu befreien, mussten sie gewaschen werden. Dazu wurde den Zellen das Medium zur Equilibrierung zunächst tröpfchenweise beigemischt und schließlich auf ein Endvolumen von 20 ml aufgefüllt. Nun wurde für 3 min bei 2500 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das erhaltene Pellet in 15 ml frischem Medium resuspendiert. Dieser Ansatz wurde in eine Kulturflasche (Nunclon™ Surface, Nunc Brand Products, Dänemark) überführt und bei 37°C unter 5% CO₂-Spannung inkubiert. Die Kultur wurde in 48 stündigem Abstand mikroskopisch mittels Vitalfärbung mit Tryptan Blue kontrolliert, welche eine Differenzierung von vitalen und avitalen Zellen ermöglicht. Ebenfalls wurde in gleichem Abstand der pH-Wert (ph meter ph 526, WTW, Weilheim, Deutschland) des Kulturmediums ermittelt. Alle zwei Tage wurden die Zellen passagiert und derartig vermehrt und separiert, daß nach einem Zeitraum von 14 Tagen 16 Kulturflaschen mit einem Fassungsvermögen von jeweils 100 ml vorlagen. Der Inhalt dieser Flaschen wurde in ein miniPerm-Zellkulturgefäß (Heraeus Instruments GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) überführt. Dieses besteht aus einem Kultur- und einem Versorgungsmodul. In das Kulturmodul wurden 35 ml der Zellsuspension mit einer Inseminationsdichte von 0,5 x 10 Mill. Zellen gegeben. Für die Beschickung des Versorgungsmodules wurde das oben zubereitete Nährmedium noch zusätzlich mit 0,3% HEPES-Puffer supplementiert. Das Modul wurde wie oben beschrieben kultiviert und zur besseren Sauerstoffversorgung der Zellen auf eine sich im Brutschrank befindliche Drehvorrichtung gelegt. Als die Zellen im Kulturmodul eine Dichte von 8 Mill./ ml erreicht haben, wurde der Inhalt des Kulturmodules auf insgesamt 4 miniPerm-Kulturgefäße aufgeteilt. Der Mediumwechsel des Versorgungsmodules erfolgte in Abhängigkeit des zellulären Wachstums (Kontrolle durch pH-Bestimmung) nach 24 bzw. 48 h. Das Abernten der antikörperhaltigen Zellsuspension erfolgte bei einer Dichte von 11,5 Mill. Zellen/ ml. Hierzu wurden jeweils 17 ml aus dem Kulturmodul entnommen. Das entnommene Volumen wurde mit Kulturmedium wieder auf ein Gesamtvolumen 35 ml aufgefüllt.

Das erhaltene Gesamtvolumen an OX-7-haltigem Kulturüberstand betrug 327 ml.

4.3.2 Aufreinigung des Kulturüberstandes

Der Zellkulturüberstand musste affinitätschromatographisch aufgereinigt werden, um die Immunglobuline in ihrer reinen Form zu isolieren. Dazu wurde der Überstand mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/ min über eine HiTrap-Protein G-Säule (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) geschickt. Die Immunglobuline wurden mittels eines 20 mM Natriumphosphat Bindungs-Puffers (pH 7) an die Säule gebunden, dann mit einem 0,1 M Glyzin-HCl Elutions-Puffer (pH 2,7) ausgewaschen und aufgefangen. Die Säule

wurde zur Wiederverwendung mit einer 1 M Tris-HCl-Lösung (pH 9) rekonstituiert. Die Immunglobulinkonzentration des Eluats wurde spektrometrisch (Quantikine Analyzer, Amersham Biosciences UK Limited, Rainham, England) bestimmt und anschließend derartig mit PBS eingestellt, dass eine Zielkonzentration von 1 mg/ ml vorlag. Das Eluatendvolumen betrug 130 ml und wurde anschließend für 24 h in PBS dialysiert (Slide-A-Lyzer, Pierce Chemical Company, Rockford IL, U.S.A.). Nach dem Aliquotieren wurde das Eluat bei -70°C eingefroren.

4.4 Induktion der Glomerulonephritis

Das in 1.3.7 (S. 30) der Literaturübersicht beschriebene Tiermodell der Anti-Thy1-induzierten chronisch-progressiven Glomerulosklerose der Ratte wurde von unserer Arbeitsgruppe erstmalig und bisher einmalig in Deutschland etabliert. In Japan gibt es eine Arbeitsgruppe von den Herren Kawachi und Shimizu, die ungefähr zeitgleich ein vergleichbares Modell etabliert haben. Unsere Arbeitsgruppe steht in engen Kontakt zu dieser und hatte initial den Anti-Thy1-Antikörper von dieser erhalten, den ich für dieses Projekt dann allerdings selbst hergestellt habe. Gemeinsam mit Herrn Sebastian Martini wurden die Vorarbeiten für das Tiermodell geleistet. In Vorversuchen konnten wir die geeignete Dosierung des Antikörpers in Abhängigkeit zum Gewicht der Tiere zum Injektionszeitpunkt finden, sowie den Zeitpunkt der Proteinuriemessung mit hohem prädiktiven Wert für den Verlauf der Glomerulosklerose erfassen. Weiterhin wurde die der Antikörper-Injektion vorangestellte linksseitige Uninephrektomie der Tiere von mir chirurgisch optimiert, um so eine Reduktion der Operationsdauer und Verringerung der Invasivität des Eingriffes zu erzielen. Die Tiere wurden mittels Ketamin (0,1 mg/ 200 g KGW) (Ketamin 10%, WDT, Garbsen, Deutschland)-Xylazinnarkose (0,01 mg/ 200 g KGW) (Rompun 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen; Deutschland) narkotisiert und nach Wirkungseintritt auf eine Wärmeplatte (Spezialanfertigung durch die Forschungswerkstatt, Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, Deutschland) verbracht. Nach Vorbereitung des Operationsfeldes (Rasur, Reinigung mit Alkohol und Desinfektion mit Braunoderm) wurde die linksseitige Uni-Nephrektomie derart durchgeführt, dass der Zugriff durch einen ca. 1 cm vertikalen Schnitt durch Haut und Muskulatur kurz hinter dem Rippenbogen in Höhe der linken Niere gewählt wurde (zuvor von der Medianen). Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde die linke Niere mit Hilfe eines kleinen Wundspreizers mit abgerundeten Kanten vorsichtig vorgelagert und die Nierenarterie, -vene und Harnleiter mit einer kleinen Arterienklemme kurz unterhalb des Gefäßpoles der Niere geklemmt. Unterhalb der Klemme wurde eine Ligatur mit chirurgischem Knoten aus nichtresorbierbarem Faden angelegt und die Niere mittels Scherenschlag abgesetzt. Die Muskulatur wurde mit einer Sultanschen Diagonalnaht, die

Haut mit 2 – 3 Einzelheften verschlossen.

Zur Induktion der chronischen Glomerulonephritis erhielten die den Versuchsgruppen entsprechenden Tiere (s.Tab.2.2, S. 35) den wie oben beschrieben generierten OX-7-Antikörper. Nach einer leichten Isofluran-Narkose wurde den Tieren eine Injektion in die laterale Schwanzvene nach Desinfektion des Injektionsfeldes mit 70%igem Alkohol verabreicht. Die gegebene Dosis der in PBS gelösten Antikörper entsprach 1 mg/ kg KGW. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten eine reine PBS-Injektion gleichen Volumens.

Das Prinzip der Induktion der chronischen Glomerulonephritis wurde in der Einleitung ausführlich beschrieben.

4.4.1 Futter und Trinkwasser

Alle Tiere erhielten Futter des Typs Zuchtdiät für Ratten und Mäuse #1311 der Firma Altromin (Lage, Deutschland) und hatten ständig freien Zugang zu Futter und Wasser.

Zuchtdiät für Ratten und Mäuse # 1311	
Gehalt an Inhaltsstoffen:	
<i>Rohprotein</i>	22,50%
<i>Lysin</i>	1,20%
<i>Rohfett</i>	5,00%
<i>Rohfaser</i>	4,50%
<i>Rohasche</i>	6,50%
<i>Kalzium</i>	0,90%
<i>Phosphor</i>	0,70%
Zusatzstoffe:	
<i>Vitamin A</i>	15000 IE
<i>Vitamin D³</i>	600 IE
<i>Vitamin E</i>	75 mg
<i>Kupfer</i>	5 mg

Tab. 2.1: Inhalts- und Zusatzstoffe des an alle Tiere verabreichten Zuchtfutters.

Dem Futter der therapierten Tiere wurde der jeweilige Wirkstoff (Enalapril bzw. MMF) in Abhängigkeit des Körpergewichtes beigemischt. Dazu wurden in jeweils 1 kg Futtermehl die entsprechende Menge an Wirkstoff gegeben und anschließend für eine Dauer von ca. 5 min mittels elektrischem Handrührgerät gleichmäßig in diesem verteilt. Dann wurden der Mischung langsam und unter stetigem Rühren 600 ml Wasser hinzugefügt und durchmischt, bis ein homogener Teig entstanden war. Dieser wurde ca. 1 cm stark ausgewalzt und mit Hilfe von handelsüblichen Plätzchenformen ausgestochen. Die Plätzchen wurden zum Trocknen auf einen Rost gegeben und mit Hilfe eines Warmluftventilators, der einen gleichmäßigen Luftstrom von 38°C ausströmt, für eine Dauer von 24 h getrocknet.

Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn erhielten alle Tiere die Plätzchen ohne Wirkstoff, um sich an die Futterzubereitung gewöhnen zu können. Vorversuche haben ergeben, dass der durchschnittliche Futterverbrauch der Tiere bei 25 g/ d lag. Die verabreichte Wirkstoffmenge basiert auf diesem Verbrauch. Um zu gewährleisten, dass die kalkulierte Wirkstoffmenge tatsächlich aufgenommen wurde, fand eine tägliche Kontrolle des Futterverbrauches statt.

Alle Tiere hatten ständig freien Zugang zum Trinkwasser. In Vorversuchen wurde der durchschnittliche tägliche Trinkwasserverbrauch ermittelt. Im Mittel tranken die Tiere ca. 60 ml/ d. Entsprechend den Therapiegruppen wurde den Tieren der Wirkstoff über das Trinkwasser zugeführt. Um eine eventuelle Beeinträchtigung des Wirkstoffes durch Lichteinwirkung zu verhindern, wurden die Trinkflaschen lichtdicht mit Aluminiumfolie umwickelt. Der Wirkstoff wurde in einer Stammlösung in einer Konzentration von 1 g/ l angesetzt und bei 4°C in lichtundurchlässigen Flaschen aufbewahrt. Die Gebrauchslösung wurde aus der Stammlösung in 10facher Verdünnung mit frischem Leitungswasser zubereitet. Die Trinkmengen wurden täglich kontrolliert.

4.5 Wirkstoffe

4.5.1 Mykophenolat Mofetil

MMF wurde in oben beschriebener Weise in das Futter eingearbeitet. Die Tiere akzeptierten die Futtermischung, so dass die angestrebten Dosen von 20 mg/ kg KGW den tatsächlich mit dem Futter aufgenommenen Wirkstoffmengen entsprachen. Die Wirkweise von MMF wurde bereits ausführlich in der Einleitung abgehandelt.

4.5.2 Enalapril

Enalapril wurde den Tieren über das Trinkwasser verabreicht. Es verhält sich in Wasser gelöst geschmacksneutral und wurde von den Tieren gut akzeptiert. Die angestrebten

durchschnittlichen Dosen von 12 mg/ kg KGW wurden erzielt. Die Wirkweise von Enalapril wurde ebenfalls bereits ausführlich in der Einleitung beschrieben.

4.6 Studienprotokoll

Der Versuch umfasste sechs Tiergruppen. Diese unterschieden sich hinsichtlich Therapie und im Vorhandensein bzw. Fehlen einer chronischen Glomerulosklerose, sowie der Nephrektomie.

Gruppeneinteilung:			
Gruppe	Glomerulosklerose ja/ nein	Therapie	Tierzahl
<i>Gruppe 1 (k.GS, 2-N)</i>	keine Glomerulosklerose, 2 Nieren	keine	12
<i>Gruppe 2 (k.GS, 1-N)</i>	keine Glomerulosklerose, 1 Niere	keine	8
<i>Gruppe 3 (cGS)</i>	Glomerulosklerose	keine	12
<i>Gruppe 4 (cGS+MMF)</i>	Glomerulosklerose	MMF	8
<i>Gruppe 5 (cGS+ENA)</i>	Glomerulosklerose	Enalapril	8
<i>Gruppe 6 (cGS+MMF+ENA)</i>	Glomerulosklerose	MMF+ Enalapril	8

Tab. 2.2: Gruppeneinteilung.

Die Gruppeneinteilung der Gruppen 3-6 erfolgte am Tag 5 nach Induktion der Glomerulosklerose. An diesem Tage begann für diese Gruppen ebenfalls die Therapie und wurde für einen Zeitraum von 15 Wochen bis zur Tötung der Tiere aufrecht erhalten. Die Tieraufteilung für die Gruppen 5 und 6 erfolgte zum Zeitpunkt der Nephrektomie, also drei Tage vor Antikörperinjektion.

4.7 Methoden

4.7.1 Blutdruckmessung

Die Messung des systolischen Blutdruckes erfolgte plethysmographisch (Life Science Instruments Ltd., Woodland Hills, Californien, U.S.A.) an der Schwanzvene. Die Tiere liefen dazu im Wachzustand in ein Acrylglasrohr das zur Fixierung diente und abgedunkelt wurde. Dieses Rohr wurde in eine temperierte Kammer, die sog. Ambient Chamber (Life Science Instruments Ltd., Woodland Hills, Californien, U.S.A), eingestellt, welche den Tieren höchstmöglichen Komfort geben sollte. Nach einer Dauer von 5 min Akklimatisationszeit wurde den Tieren eine Manschette mit integriertem Sensor bis ca. 1 cm vor die

Schwanzwurzel um den Schwanz gelegt und jeweils drei Messungen gemacht, deren Werte gemittelt wurden. Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn wurden die Tiere an die Prozedur gewöhnt, um stressbedingte falsch hohe Werte zu vermeiden. Vor der Nephrektomie wurden die Basalwerte ermittelt. Dann erfolgten die Messungen im Abstand von zwei Wochen.

4.7.2 Urinsammlung

Zur Urinsammlung wurden die Tiere für eine Dauer von 24 h in metabolische Käfige gesetzt (Metabolic Cage–3701M081, Tecniplast, Bagaggiato, Italien). Durch ein spezielles Trichtersystem war es möglich den Urin getrennt von Kot und Futterresten in einem graduierten Auffangröhrchen zu gewinnen. Zur Vermeidung eines übermäßigen bakteriellen Wachstums und einer damit verbundenen Beeinflussung der nachzuweisenden Parameter, wurde in die Urinauffangröhrchen vor Benutzung 100 µl Penicillin/ Streptomycin (10.000 IU/ 10.000 µg/ ml) (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) pipettiert. Während der Dauer des Aufenthaltes in den metabolischen Käfigen hatten die Tiere ebenfalls freien Zugang zu Futter und Trinkwasser. Die Tiere der therapierten Gruppen erhielten entsprechendes Futter bzw. Trinkwasser. Nach Ablauf der 24 h wurde die Urinmenge registriert und der gewonnene Urin für 5 min bei 5.000 U/ min zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und für anschließende Messungen bei –20°C eingefroren und aufbewahrt.

4.8 Gewebeentnahme und –aufarbeitung

4.8.1 Blut- und Nierenentnahme

Am Versuchsende wurden die Tiere in eine tiefe Ketamin (0,1 mg/ 200 g KGW) (Ketamin 10%, WDT, Garbsen, Deutschland)-Xylazinnarkose (0,01 mg/ 200 g KGW) (Rompun 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen; Deutschland) gelegt, um Blut und Nieren zu entnehmen. Anschließend wurden die Tiere intraoperativ durch eine Überdosierung der Narkotika getötet. Zunächst wurden die Tiere in Rückenlage positioniert und fixiert. Dann wurde die Bauchdecke gründlich mit Sterilium desinfiziert und die Bauchhöhle anschließend mit einem U-förmigen Schnitt, beginnend nahe des Präputiums und jeweils an beiden Rippenbögen endend, eröffnet. Der Hautlappen wurde kopfwärts gezogen und das Darmkonvolut nach rechts aus der Bauchhöhle ausgelagert. Zur Präparation der großen Körperschlagader und der unteren Hohlvene wurde das rückenseitige Bauchfell mittels zweier Pinzetten in einem Zuge beginnend an der Aortenendaufzweigung kopfwärts bis zum Abgang der Nierenarterien eröffnet. Die große Körperschlagader wurde an ihrer Endaufzweigung mit einer 27-Gauge-Butterfly-Kanüle punktiert. Dann wurde gerade so viel Blut entnommen (ca. 7-8 ml), bis der Herzstillstand eintrat. Anschließend wurde eiskaltes steriles PBS bis zum Wiedereinsetzen der Herzaktion injiziert. Unterhalb der Leber wurden die große Körperschlagader und die untere Hohlvene mit einer Klemme abgeklemmt und dann mittels Scherenschnitt die untere

Hohlvene perforiert. Mit einem Volumen von ca. 35 ml wurden die Nieren dann mit mäßigem Druck mit eiskaltem sterilen PBS perfundiert. Die blutleeren Nieren wurden dann mittels Scherenschlag von ihren Gefäßen und vom Harnleiter getrennt und in ein 50 ml Röhrchen mit eiskaltem sterilen PBS eingebracht. Die Nieren wurden so bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis aufbewahrt.

Das entnommene Blut wurde in EDTA-beschichtete Monovetten (Multifly Set, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) aufgenommen. Zur Serumgewinnung wurde das Blut bei 5.000 U/min für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Ca. 3 ml des Serums wurden in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

4.8.2 Blutuntersuchung

Die Blutanalyse des EDTA- und Differentialblutbildes wurde unter Anwendung eines Fluoreszenzdurchflußzytometrie-Gerätes (XE-2100, Sysmex, Norderstedt, Deutschland) durchgeführt.

Die Bestimmungen der Kreatinin und Harnstoffgehalte in Serum und Urin erfolgten unter Verwendung eines automatisierten klinisch-chemischen Analysegerätes (Modular, Roche/Hitachi, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Alle Untersuchungen erfolgten im Institut für Labordiagnostik, Charité Campus Mitte, Leit.: Prof. Köttgen, Berlin.

4.8.3 Nierenaufarbeitung

Für sich anschließende histologische Untersuchungen und Zellkultur musste das Nierengewebe aufgearbeitet werden. Die Nieren wurden dem PBS entnommen und von Fett und Kapsel befreit. An einem Nierenpol wurde etwa ein Fünftel der Gesamtniere abgetrennt. Dieses Gewebestück wurde dann nochmals halbiert. Diese Hälften wurden jeweils in Histosetten (Shandon, Pittsburgh PA, U.S.A.) in 10%iges Formalin getaucht bzw. vollständig mit Cryomatrix (Shandon, Pittsburgh PA, U.S.A.) in Cryoschälchen bedeckt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um dann bei -70°C aufbewahrt zu werden.

Das verbliebene Nierengewebe wurde ebenfalls der Länge nach halbiert. Das Nierenbecken wurde mit einer kleinen gebogenen Schere herausgeschnitten und die verbliebenen Hälften wurden dann mit einem Tropfen PBS auf eine auf Eis gelagerte Glasplatte gegeben. Mittels einer Klinge (Apollo Ever Sharp Blade, Apollo, Solingen, Deutschland) wurde das Gewebe solange zerkleinert, bis eine homogene zähflüssige Masse entstanden ist. Von dieser Masse wurde eine ca. erbsengroße Menge für die „kortikale“ Zellkultur entnommen. Der Begriff „kortikal“ repräsentiert dabei das Gesamtnierengewebe abzüglich der Kapsel und des Nierenbeckens und reflektiert hierbei vor allem tubuläres Gewebe. Für die glomeruläre Zellkultur mussten die Glomeruli mittels eines Siebverfahrens isoliert werden. Dazu wurden graduierte, ineinanderstapelbare Metallsiebe (ISO 3310-1 Prüfsiebe, Merck, Darmstadt,

Deutschland) verwendet. Auf das oberste Sieb mit der Maschenweite von 160 µm wurde der Gewebebrei übertragen und mittels Glasspatel und mit PBS aus einer Spritzflasche durch die Maschen gedrückt. Das sich auf dem darunter liegenden Sieb mit der Maschenweite von 125 µm ansammelnde Gewebe wurde nur mittels PBS aus der Spritzflasche zusammengetrieben und mehrmals direkt und kräftig durchgespült. Auf dem untersten Sieb mit der Maschenweite von 71 µm sammelten sich die Glomeruli. Diese wurden ebenfalls vorsichtig zusammengetrieben und indirekt mit ca. 300 ml PBS gewaschen. Die so isolierten und gereinigten Glomeruli wurden dann in ein 50 ml fassendes Nunc-Röhrchen überführt und für 10 min bei 15.000 U/ min bei 4°C zentrifugiert.

Die verwendeten Utensilien, bestehend aus Glas und Metall, wurden vor Benutzung im Ofen bei 120°C für 4 h sterilisiert. Kunststoffe und PBS wurde autoklaviert. Danach wurde alles auf eine Temperatur von 4°C gebracht.

4.8.4 Zellkultur

Aus jeder entnommenen Niere wurden jeweils zwei unterschiedliche Zellkulturen angesetzt. Für die kortikale Zellkultur wurde eine, wie oben beschrieben, entsprechende Menge an Gewebematerial entnommen, auf ein Petrischälchen aufgebracht und gewogen. Die Ermittlung der Einwaage dient der Vergleichbarkeit der Aktivität in den ELISA-Verfahren der verschiedenen Proben. Das Homogenisat wurde dann mit Kulturmedium versetzt und für 48 h bei 37°C und 5% CO₂-Spannung bebrütet. Für die kortikale und die glomeruläre Zellkultur wurde folgendes Medium verwendet: Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, ohne Indikator) wurden mit 0,1 IU/ ml Insulin, 100 IU/ ml Penicillin, 100 µg/ ml Streptomycin und 25 mM HEPES-Buffer versetzt. Vor Einbringen der Glomeruli in das Kulturmedium wurde zunächst die isolierte Glomerulanzahl ermittelt. Dazu wurden dem 50 ml Nunc-Röhrchen 10 µl entnommen und auf dem Deckel einer Petrischale in Form eines Striches ausgezogen. Die in diesen 10 µl enthaltenen Glomeruli wurden mikroskopisch ausgezählt, wobei gleichzeitig der Reinheitsgrad des Isolats festgestellt werden konnte. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde der Inhalt der Kortexproben und der gesiebten glomerulären Proben jeweils gleichmäßig auf drei 2 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt. Diese wurden für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der zellfreie Überstand wurde abpipetiert und bei -20°C eingefroren.

4.9 Krankheitsparameter

Bei der Bestimmung der Krankheitsparameter war es notwendig, eine Analyseform zu wählen, welche den Grad der Ausprägung der Glomerulonephritis im Tiermodell in vivo darlegt und gleichzeitig als Verlaufskontrolle dienen konnte. Dazu wurde eine Proteinbestimmung aus dem gesammelten Urin gemacht. Weiterhin sollten sich postmortale

Untersuchungen anschließen, die Aussagen zur Morphologie des Nierengewebes liefern konnten. Hierfür wurden als histologische Färbung die Periodic Acid Schiff (PAS)-Färbung für den tubulointerstitiellen und glomerulären Matrix-Score angefertigt. Ebenso wurden mittels immunhistologischer Technik Lymphozyten sowie Makrophagen im Gewebe dargestellt. Kortikale und glomeruläre Zellkulturen und sich anschließende ELISA-(Enzymatic Linked Sorbent Assay) Untersuchungsverfahren sollten die am Krankheitsgeschehen involvierten Zytokine TGF- β und PAI-1 und das Protein Fibronectin erfassen und quantitativ bestimmt werden.

4.9.1 Proteinbestimmung

Die im Folgenden beschriebene Methode der Proteinbestimmung wurde von mir modifiziert. Das verwendete Reagenz wird für Großautomaten hergestellt. In Vorversuchen habe ich nach geeigneten Volumina von Probe und Reagenz gesucht, die einen Einsatz auf Mikrotiterplatten mit anschließender photometrischer Bestimmung im ELISA-Plate Reader möglich machten. Der Gesamteiweißgehalt im Urin wurde mit der Pyrogallol Rot-Methode (Fluitest USP, Biocon Diagnostik, Vöhl-Marienhagen, Deutschland) in einer kolorimetrischen Endpunktbestimmung ermittelt.

Prinzip: Der verwendete Pyrogallol-Rot-Molybdän-Komplex hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 470 nm. Dieser Komplex ist in der Lage an basische Aminosäuren von Proteinen zu binden und dabei einen purpurfarbenen Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum von 583 nm zu formieren. Die Farbintensität ist dabei der Totalproteinkonzentration direkt proportional.

Die Probenkonzentration in g/l konnte man durch Hilfe einer Standardkurve ablesen. Zunächst wurde dazu eine Standardverdünnungsreihe, bestehend aus sechs Verdünnungen in 1 g/l-Schritten mit Eiweißkonzentrationen von 0 bis 5 g/l erstellt. Dann wurden auf einer Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) jeweils 10 μ l Standard bzw. Probe vorgelegt. Weiterhin wurde ein Leerwert (nur NaCl und Reagenz) und eine Kontrolle mitgeführt, deren Gesamteiweißkonzentration zuvor im Zentrallabor der Charité mit gleicher Methode ermittelt wurde. Nun wurden jeweils 350 μ l gebrauchsfertiges Reagenz dazu pipettiert. Standardverdünnungen, Proben, Kontrolle und Leerwert wurden in einer Doppelbestimmung gemessen. Nach einer Reaktionszeit von 10 min war die Farbreaktion abgeschlossen und das entstandene Farbprodukt wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch am Plattenphotometer (MRX-5000, Dynex Technolitics, Chanilly, U.S.A.) gemessen.

4.9.2 Histologie

Die entnommenen Gewebeproben für die Histologie wurden zum einen für Cryotom-Schnitte und zum anderen für Paraffinschnitte vorbereitet.

Zur Anfertigung der Gefrierschnitte wurde das Gewebe 24 h vor Bearbeitung in -20°C überführt, um den Temperaturunterschied während des Schneidens möglichst gering zu halten. Die Schnitte wurden dann bei -20°C im Gefriermikrotom (Frigocut 2700, Leica, Wetzlar, Deutschland) mit einer Dicke von $5\ \mu\text{m}$ angefertigt, dann für 24h bei RT luftgetrocknet, anschließend für 10 min in eiskaltem Aceton fixiert, erneut für 10 min getrocknet und bis zur endgültigen immunhistologischen Färbung bei -20°C verwahrt.

Für die Paraffinschnitte musste das Gewebe für 12 h in Formalin (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, B.V., Deventer, Holland) fixiert werden. Es wurde dann mittels eines Einbettautomatens (Shandon, Pittsburgh PA, U.S.A.) nach anfänglicher Entwässerung in Paraffin überführt. Das Paraffin-durchtränkte Gewebe wurde in Blöckchen gegossen. Nach Aushärtung wurden am Mikrotom (Microm HM 310, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) $3\ \mu\text{m}$ dünne Schnitte angefertigt. Für die PAS Färbung wurden unbeschichtete Objektträger (Superfrost, Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Für die Immunhistologie wurden die Schnitte auf oberflächlich positiv geladene Objektträger (Superfrost plus, Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen, welche die Gewebeadhäsion an das Glas verstärken. Alle Schnitte wurden anschließend für 24 h bei 37°C im Wärmeofen getrocknet und wärmefixiert.

Vor dem Färbevorgang wurden die Schnitte entparaffiniert. Für die PAS-Färbung wurden die Schnitte zweimal für 5 min in Xylol (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, B.V., Deventer, Holland) eingebracht und anschließend für jeweils 2 min in die absteigende Alkoholreihe überführt (2 x 100% Ethanol, 2 x 96% Ethanol, 1 x 80 % Ethanol, 1 x 50% Ethanol, 1 x a. dest.). Für die immunhistologischen Färbungen wurden die Schnitte für jeweils 10 min zweimal in frisches Xylol und ebenfalls jeweils für 10 min in die absteigende Alkoholreihe überführt. Die Küvetten wurden außerdem auf einen Rüttler (IKA Vibrax VXR, Janke&Kunkel GmbH und KO KG, Staufen, Deutschland) gestellt, um eine bessere Verteilung zu gewährleisten. Anschließend wurden die entparaffinierten Schnitte für die immunhistologischen Färbungen für die Dauer von 10 min in einem handelsüblichen Schnellkochtopf bei 96°C in Zitrat-Puffer (10 mM, pH 6) gekocht und nach Abkühlung in a.dest. bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Die Schnitte für die PAS-Färbung wurden nach dem Färben in die aufsteigende Alkoholreihe überführt (kurz in a.dest., 50% Ethanol, 80% Ethanol spülen, dann jeweils 1 min in 2 x 96 % Ethanol, 2 x 100% Ethanol und 2 x Xylol). Bis zum Eindecken mit Corbitbalsam verblieben die Schnitte in Xylol. Für die Immunhistologie wurden die Schnitte über a.dest mit ImmuMount (Shandon, Pittsburgh PA, U.S.A.) eingedeckt.

4.9.2.1 PAS-Färbung

Für diese Färbung wurden zunächst folgende Färbelösungen angesetzt:

A) Alkoholische Perjodsäurelösung:

1 g Perjodsäure wurde in 30 ml a.dem. gelöst. Dann wurden 70 ml 100% Ethanol hinzugemischt.

B) Alkoholische Disulfidlösung (SO₂-Wasser):

0.5 g Kaliumdisulfid wurden in 30 ml a.dem. gelöst, dann wurden 70 ml 100% Ethanol hinzugefügt.

C) Schiffssches Reagenz:

Kommerzielle Mischung (Merck, Darmstadt, Deutschland));

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte für 10 min in 1% Perjodsäure eingestellt. Dann wurde für 5 min in Leitungswasser und anschließend kurz in SO₂-Wasser gespült. Vor Benutzung wurde das Schiffssche Reagenz auf 40°C erwärmt, in dem die Schnitte dann für 20 min eingebracht und im Wärmeofen bei 40°C inkubiert wurden. Nun wurde erneut kurz in SO₂-Wasser und dann für 10 min in Leitungswasser gespült. Es folgte die Gegenfärbung in Mayer's Hämatoxillin für 10 min mit anschließendem Bläuen in fließendem Leitungswasser (10 min). Dann wurden die Schnitte in die aufsteigende Alkoholreihe überführt und über Xylol mit Corbitbalsam (37°C) eingedeckt.

<u>Färbeergebnis:</u>	Bindegewebe	<i>blau</i>
	Zytoplasma	<i>rosa</i>
	Kerne	<i>blau-schwarz</i>
	Saure Mukopolysaccharide	<i>leuchtend magenta</i>

4.9.2.2 Immunhistologische Färbung

Zur immunhistologischen Darstellung von ED1, CD4 und CD8 (Serotec GmbH, Düsseldorf, Deutschland) wurde eine modifizierte APAAP (Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase)-Färbetechnik verwendet. Hierzu wurde zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers ein mit einem Polymer konjugierter Sekundärantikörper benutzt, an welches das für die sichtbare Farbreaktion notwendige Enzym Alkalische Phosphatase mehrfach gekoppelt wurde. Auf diese Weise kann eine Verstärkung des Farbsignales erzielt werden und Antigene, die nur schwach ausgeprägt sind deutlicher dargestellt werden.

4.9.2.3 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung erfolgte mittels des von Raji et al. (1984) publizierten semiquantitativen Verfahrens mittels Lichtmikroskopie. Für die histologische Auswertung der PAS-gefärbten Schnitte wurde ein Fibrose-Score für das tubulointerstitielle Gewebe und für die Glomeruli erstellt. Das relative Ausmass der tubulointerstitiellen fibrotischen Läsionen, wie Matrix-Gehalt, tubuläre Atrophie und Dilatation, wurde in 15 zufällig ausgewählten kortikalen Regionen pro Tier bei 200facher Vergrößerung ermittelt. Der Auswertung wurde folgender Score zugrunde gelegt: 0=normal, 1=Läsionen, die weniger als 10% der kortikalen Region erfassen, 2=Läsionen, die 11-30% der kortikalen Region erfassen, 3=Läsionen, die 31-50% der kortikalen Region erfassen und 4=Läsionen, die mehr als 50% der kortikalen Region erfassen. Zur Erfassung des glomerulären Fibrose-Scores wurden 15 Glomeruli pro Schnitt hinsichtlich ihres Matrixanteils untersucht und mit einem Score versehen.

Anteil des Matrixgehaltes im Glomerulum	Matrix-Score
0 - 25 %	1
26 - 50 %	2
51 - 75 %	3
76 - 100 %	4

Tab. 2.3: Verhältnis glomerulärer Matrixgehalt zum Score.

Für die Auswertung der immunhistologischen Färbungen der Zellinfiltration wurden jeweils 15 zufällig ausgewählte kortikale Regionen und Glomeruli pro Tier erfasst und die Infiltration von ED1-, CD4- und CD8-positiven Zellen ermittelt.

Das Scoring erfolgte durch eine unabhängige Person, die über die Gruppenzugehörigkeit nicht informiert war. Auch aus den Beschriftungen der Objektträger war eine derartige Ableitung nicht möglich.

4.10 ELISA

Zum Nachweis der Zytokine TGF- β 1 und PAI-1 und dem Protein Fibronectin wurde die sehr sensible ELISA-Technik angewandt, mit der es möglich wurde auch geringe

Anitgenkonzentrationen nachzuweisen [128]. Hier wurde das kompetitive ELISA-Verfahren eingesetzt, bei dem das zu bestimmende Antigen zuvor Festphasen-adsorbiert wurde und mit dem Antigen aus der Probe um die Bindungsstellen des zugegebenen spezifischen Primärantikörpers konkurriert.

Der Aufbau der eingesetzten ELISA:

Eine Mikrotiterplatte wurde mit dem nachzuweisenden Antigen gecoated. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen erfolgte eine Inkubation mit bovinem Serum-Albumin. Es folgte die Zugabe von Probe und spezifischem Primärantikörper. Das Festphasen-adsorbierte Antigen und das Antigen der Probe konkurrierten um die Bindungsstellen des Primärantikörpers. In einem Waschschrift wurden nichtgebundene Anteile herausgewaschen. Zur quantitativen Detektion des spezifisch gebundenen Primärantikörpers an das Festphasen-Antigen wurde als Indikatorsystem ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper hinzugegeben. Dieser bindet an den Primärantikörper. Das Enzym war in der Lage ein Substrat in einer Farbreaktion umzusetzen, dabei war die entstehende Farbintensität der Menge des an das Festphasen-Antigen gebundenen Primärantikörpers proportional. Je mehr Antigen in der Probe vorhanden war, desto geringer war die Farbintensität und umgekehrt. Die Farbintensität wurde photometrisch mit dem Plattenphotometer MRX-5000 bestimmt. Mittels einer Standardkurve, über die man Extinktionen für bestimmte Konzentrationen an Antigen ermitteln kann und einem Softwareprogramm (BioLinx 2.10, Dynatech, Denkendorf, Deutschland), welches Verdünnungsfaktoren berücksichtigt, konnten die Konzentrationen der jeweiligen Antigene, bzw. der Zytokine und Proteine quantitativ bestimmt werden.

4.10.1 TGF- β 1-ELISA

Die TGF- β 1-Konzentrationen sollten in den Zellkulturüberständen bestimmt werden. Hierzu wurde ein kommerzielles Kit verwendet (Human TGF- β Immunoassay-Quantikine R, R&D Systems, Minneapolis MN, U.S.A.). Dieses Kit enthielt bereits mit rekombinantem humanem TGF- β vom Typ II gecoatete Mikrotiterplatten. Das in den Proben enthaltene TGF- β musste zunächst aktiviert werden. Dazu wurden jeweils 250 μ l Probe mit 50 μ l 1M HCl bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert und anschließend mit 400 U/ min zentrifugiert. Zur Probenrekonstitution wurden dem Ansatz 50 μ l 1,2 M NaOH/ 0,5 M HEPES-Puffer hinzugefügt. Das Kit enthielt eine Standardlösung von rekombinantem humanen TGF- β in einer Konzentration von 2000 pg/ ml, welche mit einer Lösung (RD 51, R&D Systems, Minneapolis MN, U.S.A.) derartig verdünnt wurde, daß sich Konzentrationen von 2000-0 pg/ ml ergaben. Nun wurden jeweils 200 μ l Standard bzw. der aktivierten Probe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und für 3 h in Dunkelheit bei Raumtemperatur

inkubiert. Dann wurde der Platteninhalt verworfen und die Platte gründlich mit einer im Kit enthaltenen Waschlösung gewaschen, die zuvor in der Gebrauchsverdünnung 1:25 angesetzt wurde. Das Kit enthielt einen Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen TGF- β in einer sogenannten Conjugate-Solution. Von dieser Lösung wurden jeweils 200 μ l in die Vertiefungen pipettiert und wiederum für 1,5 h bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Danach wurde der Platteninhalt erneut verworfen und die Platte gewaschen. Nun wurde das Substrat hinzugegeben. Dieses bestand aus zwei Komponenten, der Lösung A, Hydrogen Peroxyd, und der Lösung B, Tetramethylbenzidine, dem eigentlichen Farbkomplex. Kurz vor Gebrauch wurden beide Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und dann jeweils 200 μ l in die Vertiefungen pipettiert. Nach 20 min wurde die Farbreaktion durch die Zugabe von 50 μ l 1M H₂SO₄ gestoppt und die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die gemessenen Werte der Proben wurden gegen die Werte der Standardkurven mit bekannten Konzentrationen aufgetragen und berechnet.

4.10.2 Fibronectin-ELISA

Eine Mikrotiterplatte (F96 Maxisorb, Nunc Brand Products, Dänemark) wurde mit Fibronectin ge-coated. Dazu wurde Fibronectin mit einer Zielkonzentration von 200 μ g/ ml in einem Coating-Puffer, bestehend aus 0,2 g Na₂CO₃ und 0,3 g NaHCO₃ in 100 ml a.dest. bei pH 9,6 gelöst. Die Fibronectin-Lösung wurde dann in die Vertiefungen der Platte gegeben und für zwei Stunden inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 37°C mit zugedeckter Platte. Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde anschließend bovines Serum-Albumin (10 μ g/ ml PBST) hinzugefügt und für eine weitere Stunde inkubiert. Der Platteninhalt wurde verworfen und die Platte gewaschen. Das Waschen erfolgte je zweimal mit 400 μ l PBST/ well und je zweimal mit 200 μ l PBST/ well. In Abhängigkeit der zu erwartenden Fibronectin-Konzentrationen wurden die Proben zuvor 1:2 bzw. 1:4 mit DMEM verdünnt. Weiterhin wurden Standardverdünnungen angefertigt, wobei die Fibronectin-Konzentrationen bei 2667, 1334, 667, 333, 167, 83, 42, 21, 10, 5, 3 und 0 ng/ ml lagen. Dann wurden die Proben bzw. Standards auf einer anderen nicht absorbierenden Mikrotiterplatte mit 100 μ l des Primärantikörpers in einer Konzentration von 45 μ g/ ml vorinkubiert. Je 95 μ l der Proben bzw. Standards wurden dann in die vorbereitete Fibronectin-gecoatete Platte überführt und für 1 h inkubiert. Nach einem Waschschriff wurden 100 μ l eines Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers (Peroxidase-conjugated Affine Goat Anti Rabbit IgG, Dianova, BMA Biochemicals AG, Augst, Deutschland) in einer Konzentration von 0,3 μ g/ ml hinzugefügt und für eine weitere Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der OPD-Substratkomplex hinzugefügt. Die Substrat-Lösung wurde aus einer Gold- und einer Silbertablette mit 20 ml a.dest. angesetzt und vor Benutzung gefiltert (Filter). Das Substrat wurde für 30 min bei

Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Nun wurde die Farbintensität der Proben gegen die Standards photometrisch am MRX-5000 bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und die Konzentrationen berechnet. Die Standardkurve zeigte einen sigmoidalen Verlauf. Die Auftragung der Extinktionen und der Konzentrationen erfolgte linear.

4.10.3 PAI-1-ELISA

Wie beim Fibronectin-ELISA wurde zunächst eine Mikrotiterplatte mit 100 µl PAI-1-Antigen (Rat PAI-1, American Diagnostica Inc., Greenwich CT, U.S.A.) in einer Konzentration von 100 mg/ ml Coating-Buffer (wie Fibronectin-ELISA) beschichtet und für 2,5 h inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 37°C. Die Platten wurden dazu mit einem Deckel verschlossen, um Konzentrationsänderungen zu vermeiden. Dann wurde der Platteninhalt verworfen und die Platte gewaschen. Als Waschpuffer diente PBST-Puffer, wobei erst jeweils zweimal mit 400 µl und dann zweimal mit 200 µl gewaschen wurde. Zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen wurde die Platte mit 200 µl bovinem Serum-Albumin gelöst in PBST mit einer Konzentration von 5 mg/ ml für 1 h inkubiert. Der Inhalt wurde erneut verworfen und die Platte wurde gewaschen. Die Proben wurden zunächst in Abhängigkeit der zu erwartenden Konzentration des PAI-1-Gehaltes mit DMEM im Verhältnis 1:2 bis 1:5 verdünnt. Die Verdünnungen für die Standardkurve wurden aus dem gleichen PAI-1 hergestellt, welches auch für das Coaten der Maxisorb-Platte verwendet wurde. Als Standards wurden PAI-1-Lösungen mit den Konzentrationen 741, 445, 267, 160, 96, 58, 35, 21, 12, 8, 5, 3, und 0 pg/ µl hergestellt. Dann wurden jeweils 100 µl Proben bzw. Standard auf einer zweiten, nicht absorbierenden Platte für die Dauer von 1 h mit 100 µl des Primärantikörpers in einer Konzentration von 1 µg/ ml vorinkubiert. Nun wurden jeweils 95 µl des Proben- bzw. Standard-Primärantikörpergemisches auf die gecoatete Platte übertragen und für 1 h inkubiert. Der Platteninhalt wurde verworfen und die Platte gewaschen. Jetzt wurden 100 µl des Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörpers (Peroxidase-conjugated Affine Goat Anti Rabbit IgG, Dianova, BMA Biochemicals AG, Augst, Deutschland) in einer Konzentration von 0,3 µg/ml hinzugegeben und für 1 h inkubiert. Der Inhalt wurde verworfen, die Platte gewaschen und jeweils 200 µl der OPD-Substratlösung, in die Wells pipettiert. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit wurde am Plattenphotometer MRX-5000 bei einer Wellenlänge von 450 nm alle 10 min gemessen, bis die größtmöglichen Extinktionen erreicht wurden. Die Probenkonzentration wurde mittels der Standardkurve ermittelt. Die Standardkurve zeigte einen sigmoidalen Verlauf. Die Auftragung der Extinktionen und der Konzentration erfolgte linear.

4.11 mRNS-Analyse

In den nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritten zur mRNS-Analyse wird mehrfach DEPC-(Diethyl Pyrocarbonat) Wasser eingesetzt. Dieses wurde vor Arbeitsbeginn nach folgendem Rezept hergestellt:

500 ml a.dest.

500 µl DEPC

Der Ansatz wurde für 12 h mittels Rüttler (KS 15 Edmund Bühler, Johann Otto GmbH, Hechingen, Deutschland) gemischt und anschließend autoklaviert. Danach wurden unter sterilen Bedingungen Aliquots von jeweils 2 ml erstellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

4.11.1 Probenaufarbeitung mit Trizol®

Für die Bestimmung von kortikalem TGF- β , Fibronectin und PAI-1 auf RNS-Ebene mittels PCR-Technik wurde nach der Gewebezerkleinerung mittels Rasierklinge eine ca. erbsengroße Menge entnommen. Der Gewebebrei wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Trizol® (Gibco, BRL, Gaithersburg MD, U.S.A.) versetzt. Der Ansatz wurde dann mittels einem Homogenisator (Ultrathorax, ART Labortechnik, Mühlheim, Deutschland) bei höchster Stufe für 1 min feinerzkleinert. Anschließend wurde das Homogenisat bis zur Analyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C aufbewahrt.

4.11.2 mRNS-Isolation

Nach dem Auftauen wurden dem Homogenisat 200 µl Chloroform hinzugefügt und für 5 min bei RT inkubiert. Zur Vermischung der entstandenen Schichten wurde vorgetext (Vortex Genie 2, Scientific Instruments Inc., Bohemia, N.Y., U.S.A.) und danach nochmals für 2 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde für 15 min bei 14.000 rpm bei 4°C in einer Epifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Die oberste Schicht wurde vorsichtig abpipettiert (ca. 400-500 µl) und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, der Rest wurde verworfen. Es wurden 500 µl Propanol hinzugefügt und für 10 min inkubiert. Dann wurde erneut für 10 min bei 14.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das verbliebene RNS-Pellet mit 1 ml Ethanol gewaschen und anschließend für 5 min bei 4°C bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Tube wurde mit der Öffnung nach unten auf Fließpapier gestellt und das Pellet so für 3 min unter sterilen Bedingungen getrocknet. Dann wurden 10 µl DEPC-Wasser hinzugefügt und für 10 min bei

60°C im Thermomixer (Trio Thermoblock, Biometra, Göttingen, Deutschland) inkubiert. Der Ansatz wurde nun für 30 sec an zentrifugiert und auf Eis gestellt. Alle Arbeitsschritte erfolgten, wenn nicht anders erwähnt bei Raumtemperatur unter der Laminar Flow (Laminar Flow Hera Safe, Heräus Instruments GmbH, Osterode am Harz, Deutschland).

Es schlossen sich zwei Untersuchungsverfahren zur Überprüfung der Reinheit des Isolates und zur Ermittlung des mRNS-Gehaltes an.

Die Reinheit des Isolates wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese ermittelt. Dazu wurde ein 0,8%iges Agarose-Gel hergestellt. Dem Isolat wurde 1 µl entnommen und mit 9 µl DEPC-Wasser verdünnt. Dann wurden 2 µl Bromphenolblau hinzugefügt und alles in die Slides des Geles (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) transferiert. Es wurde für ca. 1 h eine Spannung von 80 mA bei 80 mV (Pharmacia Biotech, Semko AB, Schweden) angelegt. Die entstandenen Banden wurden dann unter UV-Licht beurteilt.

Der mRNS-Gehalt wurde spektrometrisch ermittelt. Dazu wurde dem Isolat ebenfalls 1 µl entnommen und mit 99 µl DEPC-Wasser (entspricht der Zielkonzentration von 1 µg/ml) versetzt. Die Nullwerteneinstellung des Spektrometers (Quantikine Analyzer, Amersham Biosciences UK Limited, Rainham, England) wurde mit DEPC-Wasser vorgenommen. Die Probe wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm gegen Null gemessen. Das Gerät ermittelte den mRNS-Gehalt. Mit Hilfe der Ratio-Geräteeinstellung konnte zusätzlich der Reinheitsgrad des Isolates ermittelt werden.

Der Rest des Isolates wurde dann bei -80°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

4.11.3 Umschreibung von mRNS in cDNS

Da die nachfolgend beschriebene PCR nur an cDNS und nicht an mRNS durchgeführt werden kann, ist es notwendig, die isolierte mRNS in cDNS umzuschreiben. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wird von der mRNS ein Einzelstrang DNS-Transkript erstellt, welches in der nachfolgenden PCR zu einem cDNS-Doppelstrang komplettiert wird.

Im ersten Schritt der Transkription lagern sich Primer (Random-Hexamere) an die mRNS an. Die dann aktiv werdende Reverse Transkriptase liest die RNS-Sequenzen ab und erstellt ein komplementäres DNS-Transkript aus den Desoxynucleotriphosphaten (dNTP) Adenin (dATP), Guanin (dGTP), Cytosin (dCTP) und Thymin (dTTP).

Die Umschreibung wurde mit Hilfe eines Kits (Core Kit, Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Es wurden für die jeweiligen Probenansätze jeweils 1 µl der zuvor eingestellten mRNS mit der Konzentration von 1 µg/µl eingesetzt. Der Ansatz wurde auf Eis in Eppendorf

Reaktionsgefäße (200 µl Fassungsvermögen) pipettiert, welche anschließend in einen Thermocycler eingestellt wurde.

Die Transkription lief bei folgenden Temperaturen ab:

10	Minuten	bei 25°C
45	Minuten	bei 42°C
5	Minuten	bei 95°C

Nach erfolgter Umschreibung wurden die Tubes bis zur nachfolgenden PCR zur Vervielfältigung des Transkripts bei -20°C aufbewahrt.

4.11.4 PCR-Protokolle

Die PCR (polymerase chain reaction) ist ein biotechnologisches Verfahren, mit dem DNS-Abschnitte, welche Informationen für bestimmte Proteine enthalten, vermehrt werden können. Hierbei werden zunächst die DNS-Doppelstränge thermisch voneinander getrennt. Es folgt eine Anlagerung eines sog. Primers, welcher die ausgewählten DNS-Abschnitte erkennt und mittels einer enzymatischen Reaktion durch die Taq-Polymerase werden die komplementären Nukleotide an beiden Strängen repliziert. Dieser Prozeß wird so oft wiederholt, bis eine nachweisbare Menge des zu untersuchenden DNS-Abschnitts generiert worden ist.

Das hier verwendete Light Cycler™ System (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) stellt eine verfeinerte PCR-Methode dar, mit der gleichzeitig ein quantitativer und qualitativer Nachweis erfolgen kann. Hierbei kommt der Farbstoff Sybr Green I zum Einsatz, der nach Bindung an Doppelstrang-DNS fluoresziert.

Der Beginn der exponentiellen Produktzunahme, der linearen logarithmischen Phase der PCR, wird durch die eintretende Fluoreszenzzunahme bestimmt und wird als „crossing point“ bezeichnet. Dieser entspricht der Anfangskonzentration des zu vermehrenden DNS-Abschnittes und kann so zur Quantifizierung der Transkripte verwendet werden.

Am Ende der letzten Replikationsphase der PCR schließt sich eine Schmelzkurvenanalyse an, die der Identifizierung des spezifischen Produktes dient, da jedes PCR-Produkt eine charakteristische Schmelztemperatur (T_M) aufweist. Die Schmelztemperatur wird durch den Gehalt an Guanin/ Cytosin-Basenpaaren bestimmt.

Für die Analyse wurde das Light Cycler Fast Start DNS Master Sybr Green1-Kit (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers eingesetzt. Der daraus erstellte Mastermix als Reaktionsansatz für die Proben setzte sich wie folgt zusammen:

MgCl ₂ (3mM)	1.6 µl
H ₂ O	11.4 µl
Primer (sense)	1.5 µl
Primer (antisense)	1.5 µl
Sybr Green Mix	2.0 µl

Das Gerät wurde dann mit speziellen Glaskapillaren (LightCycler Capillaries, Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) bestückt, in welche zuvor jeweils 18 µl Mastermix und 2 µl Probe (cDNS) pipettiert wurde. Als Negativ-Kontrolle wurde anstelle der Probe DEPC-Wasser eingesetzt.

Um auszuschließen, dass auftretende Primerdimere bei der Fluoreszenzmessung miterfasst werden, erfolgte die Messung bei einer Temperatur, die oberhalb des Schmelzpunktes der Primerdimere und unterhalb der TM der PCR-Produkte lag.

Größe der nachgewiesenen PCR-Produkte:

TGF-β1	698 Basenpaare
PAI-1	939 Basenpaare
FN	398 Basenpaare
GAPDH	440 Basenpaare

GAPDH (Glyceraldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase) wird bei jeder Messung als interner Standard mitgeführt, da dieser Parameter bei jedem Tier unabhängig vom Gesundheitszustand konstant exprimiert wird.

A)

	Primer sense	Primer antisense
	5' 3'	3' 5'
<i>TGF-β1</i>	GGT GGC AGG CGA GAG CGC TGA	GGC ATG GTA GCC CTT GGG CT
<i>PAI-1</i>	CAG GAC CTT GCC CAC AGC CT	TGT GCC GCT CTC GTT CA CCT CGA TCT
<i>Fibronectin</i>	GGTCCAAATCGGTCATGTTCCCA	CGTAATGGGAAACCTGTGTAAGGG
<i>GAPDH</i>	CCA TCT TCC AGG AGC GAG AT	GAT GAC CTT GCC CAC GCC T

B)

	Temperature °C	Temperature °C
	Annealing	Measuring
<i>TGF-β1</i>	64	86
<i>PAI-1</i>	69	84
<i>Fibronectin</i>	64	86
<i>GAPDH</i>	59	86

Tab. 2.11.4: A) Sequenzen der Primer für TGF-β1, PAI-1, Fibronectin und GAPDH und die dazugehörigen B) Annealing- und Measuring-Temperaturen der Primer für die Messung in der RT-PCR Technik.

4.12 Statistische Auswertung

Die Versuchsergebnisse wurden als Gruppenmittelwert±Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean = SEM) abgebildet, graphisch in den Diagrammen durch die „Fehlerbalken“ dargestellt. Die Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS für Microsoft®Windows®. Nach ANOVA (Analysis of Variance)-Prozedur und anschließendem Mann-Whitney U-Test wurde ein p-Wert von <0,05 als signifikant gewertet.