

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Tiermodell

Sämtliche Tiere gehen auf die SBH/y und SBN/y Kolonie vom Brazillai Medical Center an der Ben-Gurion University in Ashkelon, Israel zurück. Züchtung und Haltung erfolgte unter strenger Einhaltung der institutionellen Richtlinien und denen der American Physiological Society.

2.1.2 Haltung und Diät

Alle Tiere wurden gemäß der institutionellen Richtlinien bei einer konstanten Raumtemperatur von 22 C und einer Luftfeuchtigkeit von 60% untergebracht. Ein automatischer Lichtschalter simuliert einen 12-stündigen Tag- Nachtrhythmus. Jeweils vier Tiere werden gemeinsam in einem Standardkäfig Typ IV (40 x 60 x 25cm) mit Einstreu aus Weichholzgranulat gehalten. Sofern nicht anders beschrieben, hatten sie freien Zugang zu normalem Trinkwasser und Standardfutter für Ratten.

Die Sabra-Ratten wurden im Alter von acht Wochen in einer zufälligen Auswahl den experimentellen Gruppen zugeteilt (Randomisierung). Den Tieren der salzbelasteten Gruppen wurde ein 75mg DOCA-Pellet subcutan implantiert und ihr frei verfügbares Trinkwasser mit 1% NaCl versetzt. Diese Behandlung wurde acht Wochen lang beibehalten und endete mit der Entnahme der Organe im Alter von 16 Wochen. Die Vertreter der zwei salzunbelasteten Referenzgruppen, bestehend jeweils aus salzsensitiven SBH/y und salzresistenten SBN/y Ratten, wurden Scheinimplantationsoperation ausgesetzt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Tiergruppen zu ermöglichen. Neben diesen beiden Gruppen und den salzbelasteten Ratten beider Linien wurden zwei weitere Versuchsgruppen gebildet. Diese Tiere

erhielten zusätzlich über das Futter für den Zeitraum ihrer Salzbelastung 50mg/kg/d des selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten Lu 135252 (Darusentan).

2.2 Methoden

2.2.1 Messung physiologischer Parameter

Biochemische Analyse des Urins

Zur genauen Stoffwechseluntersuchung wurden die Tiere aller Gruppen einzeln in Stoffwechselkäfige gesetzt. Der erste Tag diente zur Gewöhnung der Ratten an die neue Umgebung und die Isolation. Erst am zweiten Tag im Stoffwechselkäfig wurde die Urinmenge der einzelnen Tiere über 24 Stunden erfasst und die Konzentrationen verschiedener Ausscheidungsprodukte bestimmt.

Die Albuminausscheidung über den Urin wurde unter Verwendung eines rattenspezifischen Antikörpers mittels ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) bestimmt.

Für die Konzentrationsbestimmung des Endothelin-1 wurde ein kommerziell verfügbarer Immunoassay verwendet, der den direkten spezifischen ET-1 Nachweis im Urin ermöglichte (Rothermund et al., 2001).

Blutdruckmessung

Die Messung des systolischen arteriellen Blutdrucks (SBD) erfolgte standardisiert bei wachen, ungestörten Tieren durch oszillometrische Bestimmung des Schwanzarteriendrucks mittels einer aufblasbaren Druckmanschette (Tail-Cuff-Methode) sowie eines Pulssensors. Mit Hilfe eines Computers erhielt man den SBD und die Herzfrequenz. Um stressbedingte Blutdruckspitzen so weit wie möglich auszuschließen, gingen den eigentlichen Datenermittlungen mehrere simulierte Messabläufe voraus, die die Tiere an die Prozedur gewöhnten. Schließlich wurden an 3 aufeinander folgenden Tagen 3 Messungen pro Tier mit jeweils 2 Datenerhebungen durchgeführt. Aus den ermittelten Werten wurde der errechnete Durchschnitt als repräsentativer SBD angenommen.

Entnahme von Organen

Mittels intraperitonealer Gabe von Phenobarbital (60 mg/kg KG) wurden die Tiere in eine tiefe Narkose versetzt. Nach dem Wiegen wurde die Abdominal- und Thoraxhöhle mit einem Medianschnitt eröffnet. Bei allen Tieren wurden die Herzvorhöfe, linker und rechter Ventrikel, die Nieren und Nebennieren, die Lunge, die Aorta und die Leber herauspräpariert und Blut aus der Aorta abgenommen. Danach wurden die Nieren mit 0,9% NaCl gespült, trocken getupft und das Gewicht mit einer Feinwaage bestimmt. Die rechte Niere wurde im Hilus horizontal geschnitten in Dubosq-Brasil Lösung fixiert und für die histologische Untersuchung in Paraffin gebettet. Die linke Niere wurde vertikal in zwei Hälften geschnitten, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Auch das restliche Gewebe wurde sofort in gut beschriftete Eppendorf-Tubes überführt, schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.2 Morphologische Untersuchung der Nieren

Die in Paraffin gebetteten Proben wurden in 3µm dicke Scheiben geschnitten, mit periodic acid Schiff (PAS) gefärbt und mit Hämatoxylin gegengefärbt. Der Glomeruloskleroseindex (GSI) wurde mit einer semiquantitativen Methode bestimmt. Beurteilt wurde nach FSGS bzw. nach globalen Veränderungen. Dabei wurden 40 Glomeruli bei einer 200-fachen Vergrößerung nach einem Score von 0 bis 4 bewertet. Grad 0 bedeutete, dass keine Veränderungen sichtbar waren. Auffälligkeiten bei weniger als 25% der Untersuchungsproben entsprach Grad 1. Waren zwischen 25 und 50% der Proben betroffen sprach man von Grad 2. Grad 3 kodierte Veränderungen bei 50 bis 75% und Grad 4 stand für Läsionen bei mehr als 75% der Proben. Als Parameter der Schädigung galten die Abnahme der Kapillardichte und die Einlagerung von amorphem Material. Diese PAS-positiven Ablagerungen fanden sich im Mesangium und um die Kapillarschlingen. Daraus wurde ein kumulativer Index gebildet und der Mittelwert berechnet. Schäden wie tubuläre Atrophie, Dilatationen, interstitielle Entzündungen und Fibrose wurden durch den tubulointerstitiellen Index (TDI) erfasst, der nach einem vergleichbaren Verfahren bei 100facher Vergrößerung ermittelt wurde. Alle Parameter wurden unabhängig von zwei Untersuchern bewertet.

2.2.3 Northern blot

Das Northern-blot Verfahren ermöglichte eine Auskunft über die Expressionsstärke eines Gens durch Hybridisierung einer auf eine Membran aufgetragenen, elektrophoretisch aufgetrennten RNA mittels einer radioaktiv markierten, spezifischen Sonde.

Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettentreaktion (PCR= polymerase chain reaction) diente der selektiven in vitro Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnitts durch Nachahmung der in vivo ablaufenden repetitiven Syntheseschritte. Dieses Verfahren eignete sich u.a. zur Herstellung von genspezifischen Sonden zum Einsatz beim Northern blot.

Der 50µl PCR-Ansatz beinhaltete 1,0µl cDNA, 5,0µl 10fach Puffer, 4,0µl dNTP 2,5mM, 3,0µl MgCl₂ 25mM sowie 1,0µl des Enzyms Taq-Polymerase und jeweils 5,0µl der spezifischen Primer, aufgefüllt mit DEPC-H₂O.

Zur Denaturierung der DNA begann das Verfahren mit einer dreiminütigen Inkubation bei 94°C. Anschließend wurden die entstandenen Einzelstränge mit zwei kurzen flankierenden Oligonukleotiden, den so genannten Primern, 45s lang hybridisiert. Die gewählte Temperatur war spezifisch für die jeweiligen Primer und wird Annealingtemperatur genannt. Die Primer wurden so designt, dass sie das interessierende DNA-Stück einrahmten, wobei der eine komplementär zum Sense- und der andere Primer komplementär zum Antisense-Strang war. Die eigentliche Vervielfältigung, die Polymerasereaktion, fand 1min lang am Aktivitätsmaximum der Taq-DNA-Polymerase bei 72°C statt. Daraufhin wurde der Ansatz nochmals zum Denaturieren für den nächsten Zyklus 30s lang auf 94°C erhitzt. Der Zyklus von Denaturierung, Annealing und Polymerisation wurde 40-mal wiederholt, wobei sich mit jedem Zyklus die Anzahl der vorhandenen DNA-Moleküle verdoppelte. Am Ende des letzten Zyklus wurde der Ansatz zur Vervollständigung unfertiger Fragmente 6min lang bei 72 C hybridisiert, ehe das Reaktionsgemisch 10min lang bei 4°C gekühlt wurde.

Das PCR-Produkt wurde nach Durchführung einer Gelelektrophorese zur Abschätzung von Reinheit und Ausbeute von den Primern und überzähligen Nukleotiden gereinigt und in einer Konzentration von 25ng in 2µl aliquotiert.

Extraktion der RNA

Da die RNA sehr schnell durch Kontakt mit den ubiquitär vorkommenden und RNA-Moleküle abbauenden RNAsen degradiert, wurden alle Arbeitsschritte mit RNase-away vorbehandelten oder autoklavierten Materialien durchgeführt. Zur Zentrifugation wurde, sofern nicht anders beschrieben, die Kühlzentrifuge 5417 R (Eppendorf) verwendet.

Die RNA wurde mit Hilfe von TRIzol-Reagenz extrahiert. Dafür wurden 100mg bis zuletzt gekühltes Gewebe in je 1ml TRIzol-Reagenz gegeben. Mittels Polytron® wurde die Mischung zu einer Suspension homogenisiert. Schwerere Gewebsanteile wurden bei 5000 U/min über eine Dauer von 5min pelletiert. Zu den dekantierten Überständen wurde zur Phasentrennung 0,2ml Chloroform gegeben und die Mischung 30s geschüttelt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei 1000U/min entstanden drei sichtbare Phasen. Die untere rote Phenol-Chloroform-Phase enthielt die Proteine, die Interphase die DNA und in der oberen farblosen wässrigen Phase war die RNA gelöst. Diese wurde sorgfältig abpipettiert, zur Fällung der RNA mit 0,5ml Isopropanol versetzt und 20min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation bei 10000 U/min und 4°C über 5min wurde die RNA in einem Pellet konzentriert. Dieses wurde mit 1ml eiskaltem 70% igem Ethanol gewaschen und anschließend 5-10min luftgetrocknet. Das RNA enthaltene Pellet wurde in 50µl DEPC-H₂O aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren, Vortexen und Inkubation bei 55°C gelöst.

Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA

Die RNA Menge wurde durch mindestens zweimalige Messung der optischen Dichte durch das Photometer ermittelt. Dazu wurde 1µl der Probe mit 99µl DEPC-H₂O verdünnt. Die Messwerte wurden gemittelt. Die photometrischen Messungen erfolgten bei den Wellenlängen A₁=260nm und A₂=280nm. Das Verhältnis von A₁/A₂ sollte zwischen 1,5 und 2,1 liegen. Abweichungen würden auf Protein- oder

Trizol- Verunreinigungen hinweisen. Das erhaltene Durchschnittsverhältnis von A1/A2 von 1,6 bestätigte die Reinheit der RNA-Ausbeute.

Da bei einer Konzentration von 1µg/µl die optische Dichte bei 260nm etwa 40 beträgt, ließ sich die Konzentration mit folgender Formel errechnen:

Konzentration RNA µg/µl = 260nm Messwert * 40 * Vorverdünnung (1/100) / 1000.

Testgel

Zur Prüfung der RNA-Integrität wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde 1% iges TAE Agarosegel luftblasen- und RNase-frei gegossen, Kamm und Schlitten wurden hierzu kurz mit RNase-away inkubiert und danach kräftig mit DEPC-Wasser gespült. Die Agarosekonzentration bestimmt die Porengröße des Gels und richtet sich nach der Anzahl der Basenpaare der zu untersuchenden Probe. Zur Detektion der RNA fügte man 3µl des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid auf 30ml Gel zu. 500ng der isolierten gesamt-RNA wurden zur Visualisierung der Laufweite mit 1µl des Loadingbuffers versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Nach Anlegen einer Spannung von 70 Volt wanderte die negativ geladene RNA zum positiven Pol und wurde entsprechend ihrer Größe relativ zur Porengröße des Gels aufgetrennt. Das hinzugefügte Ethidiumbromid interkalierte im RNA Molekül und fluoreszierte unter UV-Licht (254nm). Auf diese Weise ließ sich bei intakter RNA eine 28S- und eine 18S-Bande sichtbar machen, die Rückschluss auf die Qualität der mRNA zuließen.

Auftrennung der linearisierten RNA im Gel

Um unerwünschte Sekundärstrukturen innerhalb der RNA aufzulösen, wurde sie linearisiert. Dazu wurden zu 20µg RNA 2,5µl 10fach Mops sowie 12,5µl Formamid, 4µl Formaldehyd und 1µl Ethidiumbromid 4µg/ml, zur Erkennung der mRNA unter UV-Licht, hinzugefügt. Diese Ansätze wurden 10min bei 60°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Danach wurden die Proben mit 2µl Loadingbuffer gemischt und auf das vorbereitete Gel aufgetragen.

Das Gel wurde wie folgt hergestellt: 3g Agarose wurden in 216ml DEPC-H₂O unter Erwärmung gelöst, auf ca. 60°C abgekühlt, 30ml 10fach MOPS sowie 54ml Formaldehyd hinzugegeben. Dieses Gel wurde in einen RNase freien Schlitten luftblasenfrei gegossen. Als Laufpuffer diente 1fach MOPS. Bei einer Spannung von

50 Volt wanderte die anschließend in die Taschen pipettierte RNA ca. 3h, was einer Laufweite von etwa 8cm entsprach. In die äußeren Taschen wurden zur Abschätzung der Bandengröße RNA-Leitern aufgetragen.

Transfer der mRNA auf die Nylonmembran

Das Gel wurde vorsichtig 2mal 15min in DEPC-H₂O geschwenkt. Mittels Kapillartransfer wurde die RNA auf einen Hybond®N-Membranfilter übertragen. Das Gel wurde auf einen mit 10fach SSC angefeuchteten Whatman-Läufer gelegt. Die Enden dieses Läufers lagen in einem ausreichenden Reservoir von 10fach SSC als Transfermedium. Die Membran in Größe des Gels wurde in DEPC-H₂O angefeuchtet (mindestens 1min) und danach in 10fach SSC inkubiert. Danach wurde sie auf dem Gel platziert und alle Luftblasen entfernt. Drei in 10fach SSC getränkte und 3 trockene Whatmanblätter wurden darüber luftblasenfrei aufgebracht und mindestens 5cm hoch Zellstoff darüber gestapelt. Das Ganze wurde mit 500g Gewicht beschwert.

Der Transfer war nach 12 Stunden abgeschlossen. Die Membran wurde 20min bei RT getrocknet, ihre linke obere Ecke zur Markierung abgeschnitten und der Transfer unter UV-Licht beurteilt und fixiert. Die 28S- und die 18S-Bande der RNA Leiter wurden mit Bleistift angezeichnet.

Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Zur Quantifizierung der RNA hybridisierte man diese mit einer komplementären radioaktiv markierten Sonde. Zur Markierung wurde das rediprime® DNA-labelling-kit nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) eingesetzt. Bei dieser Methode lagen eine gepufferte Lösung aus dATP, dGTP, dTTP sowie das Klenow-Fragment und random hexamer Primer gefriergetrocknet in einem Reaktionsgefäß vor. Zunächst wurde die DNA-Sonde in 43µl TE-Puffer gelöst, 5min lang in kochendem Wasser denaturiert und unmittelbar anschließend auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Sonde und 5µl [³²P]dCTP in das Reaktionsgefäß mit den übrigen Komponenten gegeben und 20min lang bei 37°C inkubiert. Nicht gebundene Nukleotide wurden mittels spezifischer Säulen durch wiederholte Zentrifugation bei 1100U/min beseitigt.

Die Stärke der radioaktiven Strahlung eines 1µl-Aliquots wurde in einem Szintillationszähler gemessen und diente als Kontrolle der Labellinggüte.

Hybridisieren des Blots

Nach sorgfältiger Reinigung der Hybridisierungsflaschen wurde die in H₂O gereinigte Membran luftblasenfrei an die Flaschenwand gelegt. Abhängig von der Membran- bzw. Flaschengröße wurden 12-16ml Hybridisierungsflüssigkeit hinzugegeben und das Ganze bei 68°C 20min lang prähybridisiert.

Währenddessen wurde die radioaktive Sonde sowie 100µl Heringsspermien-DNA als unspezifischer Kompetitor 5 min lang in kochendem Wasser denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und der Membran hinzugegeben.

Die Hybridisierung erfolgte eine Stunde lang bei 68°C. Zur Entfernung ungebundener Sonde wurde die Membran 3mal in 6fachen SSC, 2mal in 2fachen SSC, 0,1% SDS sowie 1mal bei 60°C in 0,1fachen SSC, 0,1% SDS gründlich gewaschen. Um ein Austrocknen der Membran zu verhindern wurde diese feucht in doppelter Saranfolie luftblasenfrei verpackt, ausgewertet und bei -20°C gelagert.

Detektion und Quantifikation der Sondenbindung

Die feucht eingepackte Membran wurde in einer Röntgenkassette direkt auf einen Röntgenfilm gelegt und dieser ca. 24h bei -80°C exponiert. Nach Entwicklung des Films konnte anhand der Schwärze der Banden auf die Menge der gebundenen Sonde geschlossen werden.

Eine genauere quantitative Aussage ermöglichte die Benutzung eines Phosphor-Imagers. Dabei wurde, analog zum Röntgenfilm allerdings bei Raumtemperatur (RT), eine für radioaktive Strahlung sensitive Image Plate exponiert und die Intensität der hybridisierten Sonden direkt als Counts ausgegeben.

Rehybridisierung

Um die Membran erneut rehybridisieren zu können, wurde die Sonde mit 95°C heißer 0,1%iger SDS-Lösung abgewaschen. Bis zur vollständigen Abkühlung auf RT wurde die Membran in der Lösung geschüttelt. Bei gutem Ergebnis waren nach erneuter Exposition einer Phosphorimager Plate keine Banden mehr nachweisbar.

Bis zur nächsten Hybridisierung wurde die Membran feucht in Folie verpackt (s.o.) bei -20°C gelagert.

Quantifizierung durch Normalisierung mittels GAPDH-Signal

Um kleine Konzentrationsunterschiede der RNA auf der Nylonmembran abgleichen zu können, wurden die Membranen nach dem Waschen mit einer für GAPDH spezifischen Sonde rehybridisiert. Diese GAPDH Signale waren erwartungsgemäß homogen stark und gleichförmig bei allen Tiergruppen nachzuweisen, da GAPDH auf mRNA Ebene keine Regulierung erfährt. Die Stärke der gemessenen Sondersignale konnte nun mit den GAPDH Signalen in Relation gesetzt werden, da bei gleicher Menge mRNA auch gleiche Mengen an GAPDH-Transkripten vorhanden sind.

2.2.4 Scatchard-Bindungsanalyse

Die Scatchard Analyse gibt Auskunft über die Dichte und Affinität des zu untersuchenden Rezeptors durch Messung eines spezifisch gebundenen, radioaktiv markierten Liganden. Mit dem Massenwirkungsgesetz lässt sich über die eingesetzte Ligandenmenge und den Anteil des markierten gebundenen Anteils die membrangebundene Rezeptorgesamtmenge und -affinität errechnen.

Theoretische und mathematische Grundlagen

Die Ermittlung von Rezeptormenge und -affinität erfolgte durch die Zugabe von radioaktiv markierten und unmarkierten Liganden zu einer Membransuspension. Um das Ergebnis von unspezifischen Bindungen unbeeinflusst zu wissen und um die Strahlung möglichst gering zu halten, erfolgte die Bindungsstudie nach dem Prinzip der „kalten Sättigung“.

Dabei wurde die Zellsuspension mit einer konstanten Menge radioaktiv markierter Liganden und definiert ansteigenden Mengen unmarkierter Liganden inkubiert. Markierter und unmarkierter Ligand konkurrierten um dieselbe Rezeptorbindung. Nach spätestens 2h stellte sich ein Gleichgewicht ein.

Die unspezifische Bindung erhielt man durch Messung des radioaktiv markierten Liganden bei überschüssig zugegebenen unmarkierter Liganden. Zur genauen Ermittlung der spezifischen Bindung wurde dieser Wert von den Messwerten bei nicht überschüssigen unmarkierten Liganden subtrahiert.

Setzte man die Stöchiometrie $L + R \leftrightarrow \{LR\}$ für die Bindung des Liganden an den Rezeptor voraus, stellte die Scatchard- Analyse eine lineare Funktion dar. Die

Rezeptoraffinität entsprach der Dissoziationskonstante K_d , die Rezeptormenge wurde als B_{\max} festgelegt.

Es gilt: $L + R \leftrightarrow \{LR\}$ (a)

(L=Ligand, R=unbesetzte, {LR}=Ligandenrezeptorkomplex)

Wenn $\frac{d\{LR\}}{dt} = 0$

Ist die Geschwindigkeit der Rezeptor-Liganden-Bindung gleich deren Zerfall, dann ist das Reaktionsgleichgewicht erreicht und die Zunahme der Konzentration des Komplexes {LR} gleich null.

$$K_d = L \frac{R}{\{LR\}} \quad (b) \quad R_t = R + \{LR\} \quad (c)$$

Aus (b) und (c) kann eine lineare Beziehung abgeleitet werden.

$$\frac{K_d}{L} = \frac{R}{\{LR\}} \leftrightarrow \frac{K_d \cdot \{LR\}}{L} = R \leftrightarrow \frac{R}{K_d} = \frac{\{LR\}}{L} \leftrightarrow \frac{R_t - \{LR\}}{K_d} = \frac{\{LR\}}{L} \leftrightarrow \frac{\{LR\}}{L} = \frac{-\{LR\}}{K_d} + \frac{R_t}{K_d} \quad (d)$$

{LR} wird als Gebunden (= Bound = B), R_t als B_{\max} und L als Ungebunden (= Free = F) bezeichnet:

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_d} B + \frac{B_{\max}}{K_d} \quad (e)$$

Diese Gleichung (e) ist eine lineare Funktion der Form $y = mx + b$.

Um B, F und B/F zu berechnen, musste für jeden Ansatz die Gesamtmenge an Ligand (markiert und unmarkiert) in mol bestimmt werden. Der Anteil der eingesetzten Radioaktivität, der eine spezifische Bindung eingegangen ist, wurde als Faktor ausgedrückt. B ergab sich aus der mit dem Faktor multiplizierten

Gesamtmenge an Ligand. F ergab sich aus der Subtraktion von B von der Gesamtmenge Ligand.

Eine graphische Auftragung von B/F über B erlaubte die Berechnung von K_d und

B_{\max} (Steigung der Geraden $= -\frac{1}{K_d}$, Schnittpunkt mit der y-Achse $= \frac{B_{\max}}{K_d}$)

Die lineare Regressionsanalyse wurde nach der Gauss'schen Methode der kleinsten Abweichungsquadrate durchgeführt. Als linear wurde ein Zusammenhang angenommen, wenn $r^2 > 0,95$ ist.

Isolierung der Zellmembran

Alle Schritte wurden sofern nicht anders angegeben auf Eis durchgeführt.

Von jedem Organ wurden 0,3g abgewogen und in 8ml 20mM NaHCO₃ mit einem Homogenisator S bei 1000U/min zerkleinert. Anschließend wurde mit dem Hand-Homogenisator die Zerkleinerung in 16 Arbeitsschritten vervollständigt. Die Suspension wurde 15min lang bei 3000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde nun bei 4°C 30min lang bei 20000U/min zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthielt die Membranfraktion, die in 1,5ml Scatchard-Bindungspuffer ohne Humanalbumin resuspendiert wurde. Aus dieser Suspension wurde die Proteinmenge bestimmt.

Proteinbestimmung

Der Gesamtproteingehalt wurde nach der Methode von Lowry bestimmt. Es wurde ein photometrisch messbarer Farbstoff gebildet, dessen Intensität mit der Proteinkonzentration korrelierte. Bei allen Proben wurden für jeden Messpunkt Zweifachbestimmungen durchgeführt. Es wurden 5µl der vorbereiteten Standards, 2,3µg/µl, 6,3µg/µl, 10,3µg/µl und 12,3µg/µl Rinderserumalbumin (bovine serum albumin (BSA)) sowie jeweils 5µl der Proteinproben in eine Microtiterplatte pipettiert. Dazu fügte man 25µl des Reagenz A' vom DC Protein Assay, das unmittelbar zuvor aus den Reagenzien S und A im Verhältnis 20µl zu 1000µl gemischt wurde. Nach Zugabe von 200µl des Reagenz B wurde 15min lang bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Microplate Reader 5s lang geschüttelt und die Absorption bei 750nm gemessen. Anhand der Kurve der Standardkonzentrationen wurde die Konzentration der Proteine errechnet.

Bindungsreaktion

Um die Bindungsaktivität nur eines definierten Endothelin-Rezeptors messen zu können, wurde der nicht untersuchte Rezeptor antagonisiert. Dazu verwendete man die Substanz BQ3020 als ET_B- und die Substanz BQ123 als ET_A-Rezeptorantagonisten (beide in Konzentrationen von 1mg/ml gelöst in 0,01M PBS-Puffer).

Es wurde die standardisierte Proteinmenge von 50µg/µl für die Bindungsstudie eingesetzt, verdünnt entsprechend des Ergebnisses der Konzentrationsbestimmung unmittelbar vor Versuchsbeginn.

Um Einflüsse von Proteasen während der Bindungsreaktion zu unterdrücken wurde dem Bindungspuffer + Humanalbumin (BP+HA) der Proteaseinhibitor Bacitracin hinzugefügt. Anschließend gab man zu je 10ml BP+HA 60µl ¹²⁵I-markiertes Endothelin (BP+HA+E*) hinzu, pro 50µl Reaktionsgemisch sollten 30.000-40.000 Zerfälle pro Minute (cpm) enthalten sein. Diese Werte dienten zur späteren Normierung der Ergebnisse unterschiedlicher Meßreihen.

Das BP+HA+E* wurde nun in zwei gleiche Mengen geteilt und jeweils mit den spezifischen Antagonisten BQ123 bzw. BQ3020 versetzt (110µl Antagonist auf 6ml BP+Ha+E*).

Von jeder Probe wurden drei Versuchsansätze hergestellt und gemessen.

Um die Bindungsstudie nach dem Prinzip der „kalten Sättigung“ durchführen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe ausgehend von einer 400µM Lösung aus nicht radioaktiv markiertem Endothelin hergestellt. Als Lösungsmedium wurde BP+HA verwendet.

Zu Beginn wurden für jede zu untersuchende Probe jeweils 50µl dieser hergestellten ET-1 Verdünnungen (10µM; 45nM; 22,5nM; 15nM; 5nM; 1,66nM; 0,55nM) sowie einmal 50µl reines Verdünnungsmedium (BP+HA) ohne Endothelin in verschließbare Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurden 50µl BP+HA+E* hinzugefügt.

Die Reaktion wurde nach zügiger Zugabe von jeweils 50µl der Proteinproben durch die anschließende Mischung gestartet und die Ansätze zwei Stunden lang bei RT zum Erreichen eines Reaktionsgleichgewichts inkubiert.

Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1ml eiskalten BP+HA gestoppt. Um Einflüsse auch geringfügig unterschiedlicher Inkubationszeiten auszuschalten, wurde dieselbe Reihenfolge wie bei der Proteinzugabe streng eingehalten.

Die Proben wurden 10min lang bei RT und 14.000U/min zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände mit Hilfe einer an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette so behutsam abesaugt, dass die feinen Niederschläge unbeeinträchtigt bleiben.

Um die ungebundenen Liganden herauszuwaschen wurde das Pellet mit eiskaltem B+HA übergossen, nochmals bei RT und 14.000U/min zentrifugiert und der Überstand erneut abgesaugt.

Berechnung von Rezeptordichte und Affinität

Die Reaktionsgefäße mit enthaltenem Pellet wurden nun in einem Gamma-Counter gemessen, die ermittelte Radioaktivität korrelierte mit der Menge an gebundenem I125-markiertem Endothelin. Diese nahm mit zunehmender Konzentration von unmarkiertem Endothelin ab. Die unspezifische Bindung bei Überschuß von unmarkiertem ET-1 wurde als Baselinewert von allen anderen Meßergebnissen subtrahiert.

Die Auswertung erfolgte rechnergestützt mittels der Programme Microsoft Excel und Sigma Plot. Zunächst wurde die spezifische Bindung für jeden Ansatz errechnet, der Mittelwert der drei gleichen Proben gebildet, und das Verhältnis F/B graphisch dargestellt. Im Plot wurde dann B/F über B als lineare Funktion dargestellt. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ist gleich B_{max}/K_d , ihre Steigung ist gleich $-1/K_d$ (= negativ reziproke Affinität).

Der angestrebte Aktivitätsbereich der ^{125}I ET-1 Lösung von ca. 30.000cpm wurde bei allen Messungen erreicht. Der jeweils exakt ermittelte Wert wird in der Berechnung berücksichtigt, so dass auch kleine Aktivitätsunterschiede zwischen den Messreihen keinen Einfluss auf das Ergebnis haben. Die gemessene Strahlungsintensität korreliert mit der Menge an gebundenem, ^{125}I -markiertem Endothelin.

Die rechnerische Auswertung liefert für jede Verdünnungsstufe Konzentrationswerte für gebundene (bound) und ungebundene (free) Liganden, die in entsprechender graphischer Darstellung im Koordinatensystem eine asymptotische Funktion zeigen (für x = gebunden und y = ungebunden).

2.2.5 Statistische Analyse

Die Auswertung der experimentell erworbenen Daten erfolgte mit SPSS 11.0 für Windows. Die Werte werden als Mittelwert \pm Standardfehler (Mittelwert \pm SEM). Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der Zweiweg-Varianzanalyse (ANOVA = *Analysis of Variance*) und des nicht-parametrischen Mann-Whitney Test durchgeführt. Angeschlossen wurde die Adjustierung nach Bonferroni. Die Analyse der Korrelation erfolgte durch den Koeffizienten nach Pearson. Unterschiede wurden bei einem $P < 0,05$ angenommen. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Sigmaplot 8.0 für Windows verwendet.