

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden an erwachsenen männlichen THP-Knockout (THP^{-/-}) - Mäusen und Kontrollmäusen (wt) durchgeführt. Die Tiere wurden uns freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation von Herrn Dr. Kumar (University of Oklahoma Health Science Center, Oklahoma City) zur Verfügung gestellt. Das Uromodulin-Gen (UMOD, syn. THP) wurde bei THP^{-/-} Tieren durch die homologe Rekombination zerstört.

3.2 Prinzip der Geninaktivierung

Als homologe Rekombination wird die Fähigkeit von Säugetieren beschrieben, identische DNS-Bereiche zwischen homologen Chromosomen wechselseitig auszutauschen. Dies dient der neuen Kombination des Erbgutes während der Meiose. Homologe Rekombination findet auch zwischen einem Chromosom und einem rekombinanten homologen DNS-Molekül statt. Der Mechanismus wurde für die gezielte Geninaktivierung in Säugerzellen adaptiert. Ausgangspunkt der Geninaktivierung ist die Herstellung eines Inaktivierungsvektors. Dieser enthält zwei benachbarte, dem Zielgen homologe DNA-Bereiche, die durch ein positiv selektierbares Gen, häufig ein Aminoglykosid-Antibiotika Resistenz-Gen, getrennt sind. Das Konstrukt wird in eine pluripotente embryonale Stammzelle (ES-Zellen) eingebracht. Die den Vektor enthaltenden Zellen werden durch Gabe von Antibiotika angereichert (Positiv-Selektionsmarker). Anhand einer vorher optimierten Genotypisierungs-PCR wird die Richtigkeit des Rekombinationsortes überprüft. Die ausgewählten ES-Zellen werden in Mausembryonen im Blastozystenstadium injiziert, wo sie sich in die embryonale Zellmenge integrieren und am Aufbau aller Gewebe, einschließlich der Keimbahn, teilnehmen. Dies ermöglicht eine Übertragung des geninaktivierenden Konstruktes in haploide Keimzellen. Da die Blastozyste aus einem Mausstamm mit schwarzer Fellfarbe (C57BL/6J Maus), die ES-Zellen dagegen aus einem Mausstamm mit brauner Fellfarbe (Agouti) gewonnen werden, kann man den Anteil der genetisch veränderten Zellen an der Fellfarbe

abschätzen. Die Genotypverteilung zeigt sich in der verschiedenen Ausprägung von schwarzen und braunen Flecken, deren Verhältnis auf alle anderen Gewebstypen übertragbar ist. Im Folgenden kreuzt man die gewonnenen Chimäre-Tiere mit C57BL/6J Mäusen. Alle Nachkommen, die das genetisch veränderte Erbgut tragen, weisen eine braune (Agouti) Fellfarbe auf (das dominante Gen). Sie sind heterozygot für das Gen-Knockout. Tiere mit dem Erbgut der Blastozyste sind schwarz. Nach dem Nachweis des Defekt-Gens in den Agouti-Tieren, werden diese wiederum untereinander gekreuzt, um homozygot defiziente (Knockout) Mäuse zu erhalten. Diese Strategie führt zur kompletten Inaktivierung des betreffenden Gens.

3.3 Vorarbeiten zur Uromodulin (THP)-Geninaktivierung in Mäusen

Geplant wurde die eigenständige Generierung einer THP-Knockout-Maus. Dafür wurden einige Vorarbeiten erfolgreich durchgeführt. Da zum Beginn des Projektes die genomische DNS-Sequenz des Maus-THP (UMOD) noch nicht bekannt war, dienten die bereits publizierten Sequenzen der Rind- und Kaninchen-THP-Gene bzw. deren Exon/Intron Organisation (Yu H et al, 1994) als Ausgangspunkt zum Knockout-Konstrukt-Design. Die Maus-Uromodulin cDNS-Sequenz (Location No. L33406) wurde analysiert und optimale Primerpaare für die Amplifikation von genomischen THP-Fragmenten ausgewählt. Dabei wurden Exon/Intron Organisationen der obengenannten UMOD-Gene auf das Maus UMOD-Gen extrapoliert.

Primer für das kurze Fragment:

- 1) Forward Primer – TgC CAC AAC AAC gCC ACC Tg (THP 232 f),
Positionen 232 bis 252 laut der cDNS-Sequenz
- 2) Reverse Primer – CTT CgC AAg TCC CCT CCA Cg (THP 1027 r),
Positionen 1007 bis 1027 laut der cDNS-Sequenz

Eingeschlossen ist das Intron 3, die Länge des genomischen Fragmentes beträgt 880 Basenpaare.

Primer für das lange Fragment:

- 1) Forward Primer – gTg CCA gCT ACA gAg TTT ggg CTT T (THP 1170 f),
Positionen 1170 bis 1195 laut der cDNS-Sequenz
- 2) Reverse Primer – CgC AgT gAA ggT AgA CAA ggT CGT A (THP 1832
r), Positionen 1807 bis 1832 laut der cDNS-Sequenz

Eingeschlossen sind die Introns 5, 6 und 7. Das genomische Fragment ist 5700 Basenpaare lang.

Die zu inaktivierende Sequenz ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

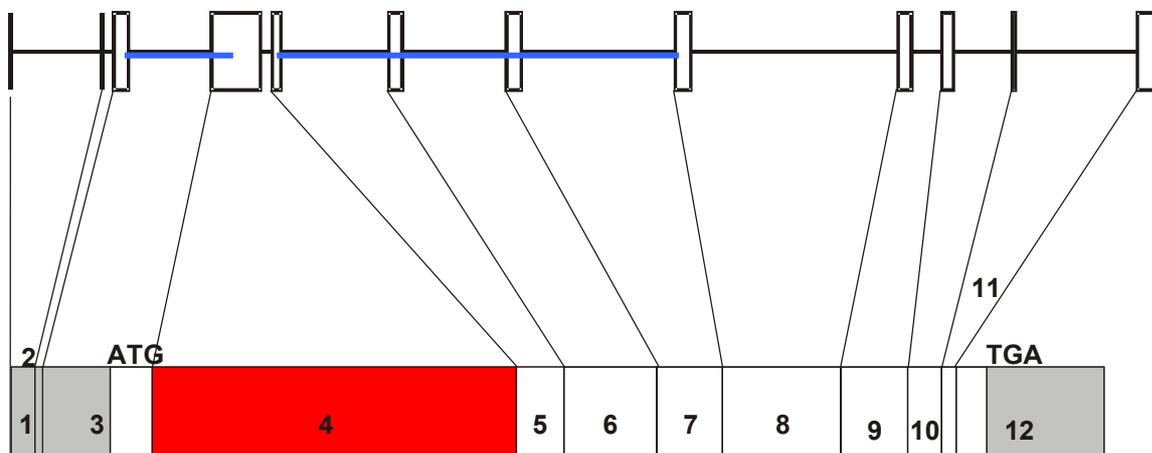


Abbildung 7. Struktur des THP-Gens. Oben – Schematische Darstellung der THP Intron/Exon-Gen-Organisation. Exons sind als vertikale Kästen dargestellt. Mit blauer Farbe sind die für das Knockout-Konstrukt ausgewählten Genbereiche markiert. **Unten** – THP mRNA. Mit roter Farbe ist das bei MCKD2 sowie FJHN von Mutationen meist betroffene Exon 4 gekennzeichnet.

Die Schmelztemperaturen für die Primer wurden mittels Amplifikation der THP-cDNS-Fragmente aus Gesamtnieren-cDNS optimiert. Anschließend wurden die genomischen THP-Fragmente aus der genomischen DNS des C57BL/6J Mausstammes mittels „Expand Long Template PCR-System“ von „Roche Diagnostics Corporation“ amplifiziert und jeweils in den „pCR®II-TOPO 3,9 Kb“ Vektor von „Invitrogen“ mit dem Ziel weiterer Manipulationen sowie der Erhaltung der DNS-Fragmente subkloniert. Das kurze Fragment wurde, relativ

der Plasmidorientierung, in 5'-3', das lange in 3'-5' Richtung inkloniert. Beide THP-Fragmente wurden mittels Restriktionsanalyse charakterisiert, das Knockout-Konstrukt wurde auf der Basis des pTV0 Plasmid zusammengebaut (Abb 8). Das kurze Fragment wurde aus dem pCR®II-TOPO Vektor mit den Restriktionsenzymen XbaI und SpeI, welche kompatible Überhänge hinterlassen, ausgeschnitten und in das mit XbaI linearisierte und dephosphorierte (Calf intestinal Phosphatase, MBI Fermentas) pTV0 Plasmid umkloniert. Das Ligationsprodukt wurde in chemisch-kompetente *E coli* transformiert. Mehrere *E coli*-Kolonien wurden analysiert. Die Plasmid-DNS wurde mittels Minipräparation aus Bakterien isoliert und die Orientierung mit Hilfe einer Restriktionanalyse festgestellt bzw. eine Kolonie mit 5'-3' Orientierung des inklonierten Fragments ausgewählt und weitergeführt. Das lange Fragment besaß eine interne XhoI Restriktionsstelle zwischen bp 12100 und 12500. Gemeinsam mit der im pCR®II-TOPO-Multiklonierungsort vorhandenen XhoI-Restriktionsstelle ermöglichte diese das Ausschneiden des THP-Fragments mit einer Länge von ca. 5000 Basenpaaren. Das TV0 Plasmid mit dem bereits 5'-3' inklonierten kurzen Fragment wurde mit dem Sall Restriktionsenzym geöffnet. Restriktion mit Sall und XhoI erzeugt kompatible DNS-Fragmente, die zusammenligiert werden können. Das lange Fragment wurde ins dephosphorierte Plasmid umkloniert. Das Konstrukt wurde wieder in *E coli* transformiert. Nach der Restriktionskontrolle wurde eine Kolonie mit 5'-3' Orientierung des Fragments relativ dem Vektor als Glyzerinkultur bei -80°C eingefroren. Die Richtigkeit des kompletten Inaktivierungskonstruktes wurde mit Hilfe einer DNS-Sequenzierung überprüft (Abb. 8).

Zu diesem Zeitpunkt wurde das THP-Knockout Mausmodell von Kumar et al in den USA etabliert. Daher wurde das eigene Projekt aus Zeit- und Kostengründen abgebrochen. Weitere Charakterisierungsarbeiten wurden an den uns von Dr. Kumar freundlicherweise zur Verfügung gestellten THP-Knockout-Mäusen durchgeführt (Bates JM et al., 2004).

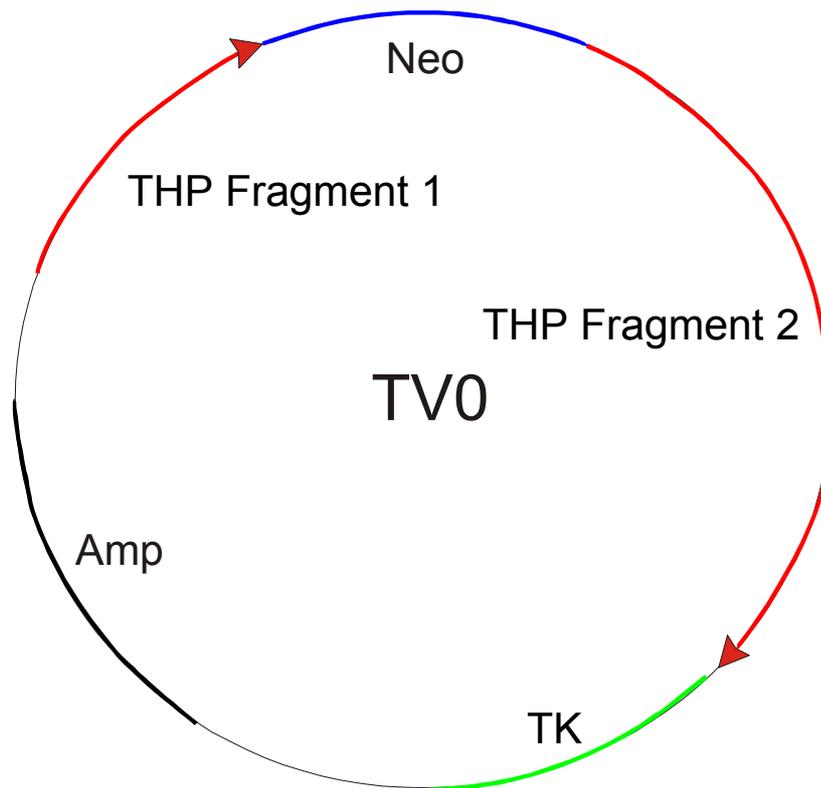


Abbildung 8. Das im Rahmen der Vorarbeiten angefertigte Knockout-Konstrukt. Das DNS-Konstrukt wurde auf der Basis vom TV0-Vektor mit den Neomycin- (**Neo, blau**) und Ampicillin-Resistenz-Genen (**Amp, schwarz**) als Positiv-Selektionsmarker sowie Thymidine-Kinase-Gen als Negativ-Selektionsmarker (**TK, grün**) zusammengesetzt. Die 5'-3' Orientierung von **THP-Fragmenten (rot)** ist mit Pfeilen gezeigt.

3.4 Generierung der THP-Knockout Mäuse

Das UMOD-Gen wurde bei THP^{-/-} Mäusen durch homologe Rekombination inaktiviert (Bates JM et al, 2004). Für die Geninaktivierung wurde ein Omega-Typ-Zielrichtungsvektor konstruiert, in dem ein zwei Kilobasenpaare langes THP-Fragment aus der 5' untranslatierten Region sowie die ersten vier Exons mit den davon umschlossenen Introns inkorporiert wurden. Das linearisierte Plasmid wurde in embryonale Stammzellen der Maus (Mausstamm 129/sv) transfiziert. Die erfolgreich transfizierten embryonalen Stammzellen wurden in eine Maus-Blastozyste (Mauslinie C57B1/6) injiziert. Die entstandenen Chimären männlichen Geschlechts wurden mit weiblichen „Black Swiss“-Mäusen gekreuzt und mit Hilfe von optimierten PCRs genotypisiert. Die für die

THP-Defizienz heterozygoten Mäuse wurden wiederum miteinander gekreuzt, um eine für das THP-Knockout homozygote Linie zu bekommen. Die UMOD-Gen Inaktivierung wurde mittels Immunohistochemie, Western blots sowie Northern blots verifiziert (Bates JM et al., 2004).

3.5 Wasserbilanz, Volumenbelastung und Durstversuch

Alle Versuchstiere wurden genotypisiert und die homozygote THP-Defizienz bzw. gegebenenfalls auch der Wild-Typ-Genotyp nachgewiesen.

Alle Tiere hatten im Vorfeld der Versuchsreihen freien Zugang zu Standardnahrung und Trinkwasser. Zum Zeitpunkt der Versuche waren die Tiere durchschnittlich 14 bis 16 Wochen alt mit einem Körpergewicht von 24 bis 26g.

Für Versuche zur Untersuchung der Wasserbilanz wurden die Mäuse in zwei Gruppen (8 wt- und 8 THP-/- Mäuse) aufgeteilt. Die Mäuse wurden einzeln in Stoffwechsellkäfige (Zevenaar, Holland) gesetzt, um die physiologischen Urinparameter unter Kontrollbedingungen, Volumenexpansion und während eines Durstversuches zu erfassen und auszuwerten. Die Tiere hatten in den ersten 2 Tagen ihres Aufenthaltes in den Käfigen freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter. Dabei wurde der erste Tag als Eingewöhnungszeit betrachtet und erst die Werte des zweiten Tages als Kontrollzustandswerte (Steady state) festgesetzt. Anschließend wurde ein 24h-Durstversuch durchgeführt, während dessen den Tieren der Zugang zu Trinkwasser verwehrt blieb. Der freie Zugang zu Futter blieb erhalten. Das Körpergewicht und der Wasserverbrauch jedes Tieres wurden täglich gemessen. 24h-Urin wurde gesammelt, die Urinmengen erfasst und die Osmolalität, osmolare Ausscheidung, Natrium, Kalium, Creatinin und Harnsäure mit Hilfe üblicher labordiagnostischer Methoden gemessen. Die Urinparameter beider Gruppen (wt und THP-/-) wurden miteinander verglichen. Nach drei Erholungstagen wurden die Mäuse einem Volumenexpansionsversuch ausgesetzt. Drei Tage wurde eine 300 mMol Sucroslösung anstatt normalem Leitungswasser zum Trinken angeboten. Der Geschmack der gesüßten Flüssigkeit erhöhte erwartungsgemäß die Trinkmenge der Tiere. Dies resultierte in einer akuten Wasserbelastung. Wieder wurden die oben genannten Urinparameter bestimmt

und zwischen beiden Gruppen verglichen.

3.6 Creatinin-Clearance

Creatinin ist ein harnpflichtiges, stark basisches Stoffwechselprodukt, das durch spontane und irreversible Umwandlung von Creatin und Creatinphosphat in Muskelzellen entsteht. Beim Menschen werden in 24 Stunden etwa 2% des Körpercreatins in Creatinin umgesetzt. Freies Creatinin wird als Stoffwechselendprodukt über die Nieren ausgeschieden. Dies erklärt die Eignung der Creatinin-Clearance für die Beurteilung der GFR. Voraussetzung für valide Meßdaten ist ein stabiler Körperzustand.

Für die Bestimmung der Creatinin-Clearance wurden fünf wt und sechs THP-/Mäuse miteinbezogen. Die Tiere wurden einzeln in Stoffwechselkäfige gesetzt und die 24h-Urine nach einem Eingewöhnungstag gesammelt. Anschließend wurden die Mäuse mit Nembutal 100 mg/kg anästhesiert, die Bauchhöhle eröffnet und Blut aus der V. cava entnommen. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wurde dabei als Antikoagulans eingesetzt. Das Plasma wurde durch Zentrifugation isoliert. Die Nieren wurden entnommen, gewogen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Creatinin-Clearance wurde nach der Formel $C=U \cdot V/P$ (U = Harnkonzentration, V = 24h-Harnvolumen, P = Plasmakonzentration) berechnet und auf ein mg des Nierengewichtes bezogen.

3.7 Bestimmung der Plasma-Reninaktivität

Der juxtaglomeruläre Apparat bildet das Enzym Renin, welches Angiotensinogen (aus der Leber) in Angiotensin I spaltet. Dieses wird durch das Angiotensin-Converting-Enzym zum Oktapeptid Angiotensin II gespalten, das wiederum durch Angiotensinasen inaktiviert wird. Angiotensin II ist ein potenter Vasokonstriktor und stimuliert die Aldosteronsynthese in der Nebennierenrinde. Die im Rahmen der Creatinin-Clearance Bestimmung gewonnenen EDTA-Plasmaproben wurden weiter für die Auswertung der Reninaktivität im Plasma (PRA) eingesetzt. Der Routine-Test misst die Renin-Aktivität bei pH 6,0 unter Verwendung des endogenen Angiotensinogen.

3.8 Präparation der Nierenhomogenate

Zur Präparation der Nierenhomogenate wurden je sechs THP-/- und wt Tiere mit Äther narkotisiert, Bauchhöhlen geöffnet und beide Nieren entnommen. Eine der beiden Nieren wurde in Stücke geschnitten und anschließend in einem Homogenisierungspuffer (1% Triton X im PBS mit Proteaseinhibitoren) homogenisiert. Die Gesamt-Nieren-RNS wurde mit Hilfe von RNeasy-total-RNA-kit (Qiagen) aus der verbleibenden Niere extrahiert.

3.9 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen des Homogenates erfolgte indirekt kolorimetrisch mit einem Kit (Micro BCA.TM Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, USA).

BCA-Reaktionsprinzip

Im alkalischen Milieu werden durch die Peptidbindungen der Proteine zweiwertige Kupferionen reduziert. Diese bilden mit Bicinchoninsäure einen Chelatkomplex blauer Farbe, dessen Menge bei einem Absorptionsmaximum von 562nm bestimmt wird. Die Eichkurve wurde mit Hilfe einer linearen bovine serum albumine (BSA) Verdünnungsreihe erstellt.

Protein (Peptidbindungen) + Cu^{2+} → Tetradentat- Cu^+ Komplex

Tetradentat- Cu^+ Komplex + Bicinchoninsäure → Bicinchoninsäure- Cu^+ Komplex (Absorptionsmaximum bei 562nm)

Je 20µl Homogenat wurden in 1980µl des Reaktionsansatzes pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf Raumtemperatur abgekühlt und die Extinktion bei 562 nm photometrisch gemessen.

3.10 SDS-PAGE und Immunoblotting

Die Separation der Proteine erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese in einem 10 oder 12%igen Polyacrylamidgel. Je nach dem zu bestimmenden Protein wurden 50µg (AQP1, THP, NKCC2, Barttin, NCC, NHE3, ENaC α) oder 75 µg (Renin und COX-2) Proteinhomogenat in 12,5 µl Probenpuffer (2% SDS, 10%

Glycerin, 5% beta-Mercaptoethanol, 1% Bromphenolblau und 95mM Tris [pH 6,8] aufgenommen, mit Tris/EDTA auf ein Gesamtvolumen von 25µl aufgefüllt und für 2min bei 95°C (AQP1, THP, Barttin, NCC, NHE3 und ENaC α) bzw. für 10 min bei 60°C (NKCC2) denaturiert. 10%ige oder 12%ige Polyacrylamidgele wurden mit einem Sammelgel überschichtet und in eine mit Laufpuffer (0,192M Glycin, 0,1% SDS, 0,025M Tris [pH 8,3]) gefüllte Anodenkammer (Boehringer Ingelheim) gehängt. Pro Geltasche wurden je 20 µl Probevolumen aufgetragen. Eine Tasche pro Gel wurde mit dem Rainbow-Molekulargewichtsmarker (BioRad) beladen. Die angelegte Anodenspannung betrug 120V. Die Laufzeit der Gele betrug ca. 120min. Danach wurden die Gele für 2 min in Transferpuffer (0,192M Glycin, 20% Methanol, 0,025M Tris [pH 8,3]) kalibriert. Anschließend wurden die Proteine aus Minigelen in einer semi-dry Blottkammer (Biometra) bei 250mA für 45min auf Nitrozellulosemembranen (Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert. Die Ausbeute des Elektrotransfers wurde mit einer Ponceau S Färbung der Proteinbanden auf den Membranen beurteilt. Durch nachfolgende Waschschrte wurde der Farbstoff wieder entfernt. Die spezifischen primären Antikörper, die beim Western Blot bzw. Immunohistochemie zur Anwendung kamen, sind in der Tabelle 1 aufgelistet (siehe 3.12.2). Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Membranen für 30min in 5%iger Magermilchlösung/PBS gewaschen. Die Inkubation der Membranen mit dem entsprechenden Primärantikörper erfolgte in 5%iger Magermilchlösung für 2h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C. Die Membranen wurden dreimal in Tween PBS (0,1% Tween, [pH 7,5]) gewaschen. Danach erfolgte Inkubation mit einem entsprechenden Horse Radish Peroxidase (HRP)-konjugierten anti-Kaninchen-, anti-Meerschweinchen- oder anti-Huhn IGG Sekundärantikörper (1:2000 in PBS) für 2h bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden erneut mit PBS gewaschen und für 1min mit Enhanced chemiluminescence substrate reagent (ECL, Amersham, Freiburg) inkubiert. Das Luminol wird im alkalischen Milieu durch die an den Sekundärantikörpern gebundene Peroxidase mit H₂O₂ oxidiert. Dadurch fällt das Luminol unter Lichtemission auf einen energetisch niedrigeren Zustand zurück. Mit den inkubierten Membranen wurde ein Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL) in einer Dunkelkammer für ca. 5 bis

15min belichtet und entwickelt. Zur Quantifizierung des Proteingehalts in den Proben wurde der Film anschließend eingescannt und die Schwärzung des Filmes mit BIO-PROFIL Bio-1D image software (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, Frankreich) densitometrisch ausgewertet.

3.11 Perfusionsfixierung und Gewebeprozessierung

Die Tiere wurden mit Äther narkotisiert und gewogen. Anschließend wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion einer Kombination aus Ketamin (Narketan 10, Chassot AG, Belp, Schweiz; 80mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (Rompun, Bayer, Leverkusen; 33mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Die Bauchhöhle wurde eröffnet und die Aorta abdominalis dargestellt. Nach der Punktion distal der Abgänge der Aa. renales wurde das Gefäß über einen ausgezogenen PE-Schlauch mit dem Perfusionssystem verbunden. Zum Druckausgleich wurde die Vena cava inferior eröffnet. Die Perfusionsrichtung war retrograd. Zunächst wurde bei einem konstanten Perfusionsdruck von 200mmHg mit einem Waschpuffer (6 Teile 0,1M Cacodylatpuffer [pH 7,5], 4 Teile Hydroxyethylstärke in physiologischer Kochsalzlösung [HAES steril, Fresenius AG, Bad Homburg] mit Sucrose auf 300mOsm eingestellt) für 45s vorgespült. Die Fixierung erfolgte durch anschließende Perfusion mit einer Lösung aus 3% Paraformaldehyd in PBS für 5min. Die Nieren wurden entnommen und in schmale Scheiben geschnitten. Für Gefrierschnitte wurden die Gewebe zum Schutz vor Gefrierartefakten in einer PBS-Sucrose-Immersionlösung (800mOsm/kg H₂O [pH 7,4]) bei 4°C über Nacht immerniert. Anschließend wurden die Gewebe in stickstoffgekühltem Isopentan schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Immunogoldfärbung und Elektronenmikroskopie wurden die Gewebe für 12h in einer Lösung aus 3% Paraformaldehyd und 0,05% Glutaraldehyd in PBS nachfixiert, in PBS gewaschen und bei 4°C gelagert. Für Paraffinschnitte wurden die Gewebe in einer Lösung aus 3% Paraformaldehyd in PBS für weitere 12h nachfixiert, in einer Ethanolreihe aufsteigender Konzentrationen entwässert und in Paraffin eingebettet.

3.12 Immunohistochemie

3.12.1 Antikörperinkubation und Antikörperdetektion

Die immunohistochemischen Färbungen wurden an Gefrierschnitten und Paraffinschnitten durchgeführt. 5µm dicke Gefrierschnitte und Paraffinschnitte wurden auf gelatinebeschichtete (Kaliumchromsulfat-12-Hydrat, Riedel-de-Haen) Objektträger aufgebracht. Die Paraffinschnitte wurden in Xylol für 30min entparaffiniert und anschließend in einer Ethanolverdünnungsreihe absteigender Konzentrationen rehydriert. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte mit einem Blocking-Medium (5% Magermilchpulver in PBS) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern verdünnt im Blocking-Medium (DAKO, Dänemark) für 2h in einer feuchten Inkubationskammer bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C. Die entsprechenden Primärantikörperverdünnungen sind in der Tabelle 1 angegeben. Alle eingesetzten Primärantikörper wurden bereits charakterisiert und erfolgreich eingesetzt. Am nächsten Tag wurden Waschschrte (in PBS 3X5 min) und Inkubation mit den passenden Sekundärantikörpern durchgeführt. Es wurden peroxidase- und fluorchromkonjugierte Sekundärantikörper verwendet. Für die Detektion der COX-2 und NOS1 Markierungen kam mit Cy3-Fluoreszenz konjugiertes Ziege-anti-Kaninnchen IgG und für die Reninmarkierung Cy3-Fluoreszenz konjugiertes Kaninnchen-anti-Huhn IgG (Dianova) zum Einsatz. Die Cy3 gekoppelten Antikörper wurden 1:500 in PBS verdünnt. Für die Detektion von THP wurde ein HRP konjugiertes Ziege-anti-Kaninnchen IgG (DAKO, Dänemark) in der Verdünnung 1:100 in PBS eingesetzt. Nach 1h Inkubationszeit mit den Cy3 gekoppelten Sekundärantikörpern wurden die Schnitte gewaschen, in Glycerin/PBS eingedeckelt und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRB) ausgewertet. Wurden HRP-konjugierte Sekundärantikörper verwendet, wurden die Schnitte nach dem Waschen mit 0,1% Diaminobenzidin (Sigma, Traufkirchen) und 0,02% H₂O₂ inkubiert. Die Inkubationszeiten wurden standardisiert. Die Peroxidase oxidiert das Diaminobenzidin mit H₂O₂ in einen stabilen braunen Farbstoff. Diese Präparate wurden kurz mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit Eukitt eingedeckelt.

3.12.2 Verwendete Primärantikörper

Tabelle 1. Primäre Antikörper für Western blot und Immunohistochemie.

Antikörper	Host	Verdünnung (IHC/WB)	Hersteller
Anti-rat AQP1	Kaninchen	- /1:5000	Alpha Diagnostic
Anti-mouse barttin	Kaninchen	- /1:2000	T.J. Jentsch
Anti-mouse COX-2	Kaninchen	1:30/1:100	Cayman Chemicals
Anti-rat NaPi IIa	Kaninchen	- /1:2500	J. Biber
Anti-mouse NCC	Kaninchen	- /1:500	D.H. Ellison
Anti-rat NHE3	Kaninchen	- /1:300	Biotrend
Anti-rabbit NKA α	Maus	- /1 :5000	Upstate
Anti-rat NKCC2	Meerschweinchen	- /1:200	D.H. Ellison
Anti-swine NOS1	Kaninchen	1:800/ -	Alexis
Anti-rat Renin	Huhn	1:500/1:500	A. Kurtz
Anti-human ROMK	Ziege	- /1:100	Santa Cruz
Anti-human THP	Kaninchen	1:250/1:250	J. Hoyer

-, Parameter wurde nicht bestimmt.

3.13 In-situ-Hybridisierung

In situ-Hybridisierung mit nicht-radioaktivem Detektionssystem

3.13.1 Präparation der cDNS

Zur Herstellung der Riboproben für THP wurde aus einem Mausniere-RNS-Extrakt mittels RT-PCR ein 492 bp langes THP-cDNS-Fragment generiert. Die hierzu nötigen Primer waren so gewählt, daß die synthetisierte Sequenz die Positionen 1170-1662 der mRNA für THP umfaßte (Accession number L33406; +1170 5'-GTG GTG CAC AGA GAT CCA GG 3' und +1662 5'-AGG GTG TTG CTG TAG GTG GC -3'). Die Identität der generierten Probe wurde durch maschinelle Sequenzierung (Perkin-Elmer) abgesichert. Die cDNS wurde in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pCR® II TOPO (Invitrogen, USA) einkloniert. Die cDNS zur Herstellung der Renin-Riboprobe (ein 356 bp langes cDNS-Fragment des Maus-Renin) wurde von Bachmann S et al bereits charakterisiert und angewendet und lag so in klonierter Form im pBluescript SK⁺ (Stratagene) Plasmid vor. Die Klonierungsstelle vom pCR® II TOPO Vektor wird jeweils von einer Promotorstelle für die Transkriptionspolymerasen SP6 und T7 flankiert. Das

pBluescript SK⁺ Plasmid besitzt eine T3- und eine T7- Promoterstelle, welche die Klonierungsstelle flankieren.

3.13.2 In vitro-Transkription zur Herstellung Digoxigenin-markierter Riboproben

Die in vitro-Transkription zur Herstellung markierter RNS-Proben wurde mit Hilfe einer SP6, T3 oder T7 Polymerase (Boehringer, Mannheim) unter Verwendung von Digoxigenin-markiertem Substrat durchgeführt. Bei der Herstellung jeder Probe wurden in verschiedenen Ansätzen beide Polymerasen verwendet, so daß durch die komplementäre Leserichtung der Enzyme jeweils eine Antisense- und eine Sense-RNS-Probe entstand. Die Antisenseprobe, die das komplementäre Gegenstück zur zellulären mRNA bildet, diente als Nachweis für RNS-Expression, während die Sense-Probe als Kontrollsonde benutzt wurde.

Für die Transkription wurde jeweils 1 µg des linearisierten Plasmids als Matrize eingesetzt und zusammen mit 13 µl Diethyl-Pyrocbonat (DEPC, Sigma, St. Louis, USA) behandeltem H₂O, 2 µl Transkriptionspuffer (Boehringer, Mannheim), 2 µl Nukleotidgemisch mit Digoxigenin-markiertem Uridin 5'-Triphosphat (DIG-Labeling Mix; Boehringer, Mannheim) und 2 µl der jeweiligen RNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim) für 2 ¼ Std. bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte der enzymatische Verdau der DNA-Matrize durch eine 15-minütige Inkubation mit RNase freier DNase (Boehringer, Mannheim). Die RNA wurde mit Lithium-Chlorid und 100% Ethanol gefällt, mit 80% Ethanol gewaschen und nach anschließender Trocknung in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Um die RNA zu quantifizieren und die Güte des Transkriptionsproduktes zu beurteilen, wurden photometrische Bestimmungen und Agarosegel-Elektrophoresen durchgeführt.

3.13.3 Hybridisierung Digoxigenin-markierter Riboproben

Für die In-situ-Hybridisierung wurden Gefrier- oder Paraffinschnitte von 6 µm Dicke verwendet. Die Gefrierschnitte wurden an einem CM3000 Kryostat (Leica) hergestellt, auf silanisierte (1% Aminopropyltriethoxysilan in H₂O, Sigma, St. Louis, USA) Objektträger aufgebracht. Die Paraffinschnitte

wurden mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Gefrier- und Paraffinschnitte wurden für 15 Min. in eisgekühltem 4% Paraformaldehyd (in PBS, pH 7,4) nachfixiert. Nach Waschschritten in PBS (3x5 Min.) und einem Deproteinierungsschritt mit Proteinase K in PBS (5 Min. für Gefrier- und 30 Min. für Paraffinschnitte) wurden die Schnitte für 20 Min. in 0,1 M HCl inkubiert. Es folgten zwei weitere 5-minütige Waschschrritte in PBS und die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 5 Min. in 70%, 80% und 96% Ethanol). Nachdem die Schnitte für 20Min. bei Raumtemperatur luftgetrocknet waren, wurden sie mit einem Prähybridmix (50% deionisiertes Formamid [Merck, Darmstadt], 40 mM Tris-HCl [Trometamol, Merck, Darmstadt/HCl; pH 7,4], 25 mM EDTA [Roth, Karlsruhe], 20 mM NaCl, 0,25 mg/ml tRNA, 2,5x Denhardt-Lösung [100 x = 0,05% Ficoll, 0,05% Polyvinylpyrrolidon und 0,05% bovines Serumalbumin], alle Produkte - soweit nicht anders angegeben - von Boehringer, Mannheim) bedeckt und für 2h bei 40°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Entfernen des Prähybridmix wurden die Schnitte mit dem Hybridmix (50% deionisiertes Formamid, 200 mM Tris-HCl [pH 7,4], 1 mM EDTA [pH 8], 0,2 M Dithiothreitol [Biomol, Hamburg], 0,33 M NaCl, 5 mg/ml tRNA, 1 mg/ml Heringsperma [beides Boehringer, Mannheim], 10x Denhardt-Lösung, 10% Dextransulfat [Sigma, St. Louis, USA], mit 2-8 pg Digoxigeninmarkierter Riboprobe [die optimale Sondenkonzentration wurde für jede Riboprobe austitriert]) überschichtet. Es wurden jeweils Sense- und Antisense-Hybridisierungen durchgeführt. Um eine Austrocknung der Schnitte zu verhindern, wurden sie mit silikonisierten (Sigmacote, Sigma, St. Louis, USA) Deckgläschen bedeckt und für 18-20h bei 40°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

3.13.4 Waschschritte zur Entfernung nicht hybridisierter Riboproben

Die silikonisierten Deckgläschen wurden in einer Natriumzitratlösung (2x Standard Sodium Citrat, SSC = 18% NaCl/15% Na-Citrat [beides Merck, Darmstadt]) abgelöst und die Schnitte für 30 Min. in derselben Lösung bei 40°C gewaschen. Es folgten weitere Waschschritte in verschiedenen Waschlösungen bei unterschiedlichen Temperaturen (30 Min. in 0,38x SSC/50% deionisiertem Formamid und 1 Std. in 0,1x SSC/50 % deionisiertes Formamid, beide Waschschritte bei 40°C; 2x 10 Min. in 0,5x SSC und 10 Min. in 0,2x SSC bei Raumtemperatur).

3.13.5 Detektion der hybridisierten Riboproben

Zur Detektion der hybridisierten Riboproben wurden die Schnitte nach einer ½ h. Inkubation mit Blockier-Medium (1% Boehringer Blockierungsreagenz, 0,5% Rinderserumalbumin in 100 mM Tris-HCl [pH 7,5]/150 mM NaCl gelöst), mit einem alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper (Boehringer, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:500 in Blockier-Medium beschichtet. Nach einer 1-2 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttelgerät wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C gelagert. Die enzymatische Farbentwicklung der Schnitte wurde unter Verwendung eines Entwicklungspuffers nach Boehringer (enthält Nitroblau Tetrazolium und 5Bromo-4Chloro-3Indolyl-Phosphat als Enzymsubstrate, sowie Levamisol [Sigma, St. Louis, USA] zur Hemmung endogener Phosphatasen; pH 9,5) unter Lichtabschluss bei 4°C oder bei Raumtemperatur durchgeführt und in Abhängigkeit von der angestrebten Intensität der Nachweisreaktion nach 4-48h abgestoppt. Nachdem die Schnitte 2x 15 Min. in Tris-puffer (100 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) gewaschen worden waren, folgten 2 weitere Waschschritte für jeweils 15 Min. in PBS. Abschließend wurden die Schnitte mit 50% Glycerin (Merck, Darmstadt)/PBS eingedeckt und an einem Leica DMRB Mikroskop mit Interferenzkontrastlicht ausgewertet.

3.14 Elektronenmikroskopie und Immunelektronenmikroskopie

Für die morphologische Feinanalyse wurde perfusionsfixiertes Gewebe in Epon 812 (Serva, Heidelberg) eingebettet. Mit einem Mikrotom (Reichert Ultracut S, Leica) wurden ultradünne (60nm) Schnitte angefertigt, auf Nickelnetzchen aufgetragen und mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert. Die Präparate wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 900, Zeiss) analysiert und fotografiert. Für die Immunelektronenmikroskopie wurden kleine Gewebestücke gefriersubstituiert, für 4 Tage bei ansteigenden Temperaturen von -90°C bis -40°C in Ethanol äquilibriert und mit London LR-White Harz (Science Service, München) für 11 Stunden bei -15°C und für 48 Stunden bei -10°C infiltriert. Nach Zugabe eines Akzelerators wurden die Gewebestücke, beginnend bei -20°C , auspolymerisiert. Ultradünne Schnitte wurden auf Nickelnetzchen aufgetragen und mit Milch (5% in PBS) geblockt. Die Schnitte wurden über Nacht mit dem anti-THP Antikörper (Verdünnung 1:250) inkubiert. Nach mehreren Waschgängen in PBS wurde der Primärantikörper mit dem 5nm goldpartikelmarkierten Gans anti Kaninchen IgG (Amersham, Chalfont) detektiert. Nach weiteren Waschgängen wurden die Präparate in 5% Glutaraldehyd fixiert und silberimprägniert.

3.15 Semiquantitative Auswertung der JGA Parameter

3.15.1 Quantifizierung von COX-2, NOS1 und Renin

Es wurden je 4 Tiere pro Gruppe (THP-/- und wt) ausgewertet. Zunächst wurden je 4 Nierenparaffinschnitte pro Tier mit entsprechenden Antikörpern inkubiert (COX-2, NOS1 oder Renin; Tabelle 2). Signale wurden mit passenden Cy-3-konjugierten (COX2, NOS1) oder HRP-gekoppeltem (Renin) sekundären Antikörpern detektiert. Die immunoreaktiven MD-Zellen und Zellen aus den anliegenden tubulären Portionen sowie Glomeruli (als Indikator der Cortexoberfläche) wurden jeweils auf einem ganzen Schnitt gezählt. Die Relation der Zahl von immunoreaktiven Zellen (Arteriolen) zu Glomerulizahl wurde als Vergleichsparameter zwischen wt und THP-/- Gruppen benutzt. Renin-immunreaktive Arteriolen und Renin-mRNS-Expression bei In-situ-Hybridisierung wurden auf die gleiche Weise ausgewertet.

3.15.2 Quantifizierung der NADPH-Diaphorase Reaktion

Die immunohistochemische Demonstration der NOS1 Aktivität in der Niere wurde mittels NADPH-Diaphorase (NADPH-d) Reaktion auf 6 µm dicken Cryostat-Schnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden mit nitro blue tetrazolium (NBT), β-NADPH im 0,1 M Phosphat-Puffer mit Triton X-100 behandelt. Die Schnitte aus Kontrolltieren wurden bei 37°C bis zur guten Entwicklung des MD Signals bei gleichzeitigem optimalen Signal/Hintergrund Verhältnis inkubiert. Die optimale Entwicklungszeit betrug 25 min und wurde für das gesamte Experiment eingesetzt.

3.16 Semiquantitative PCR

cDNS wurde aus 5 µg gesamt Nieren-RNS mit Hilfe des cDNA synthesis kit (Invitrogen) gewonnen. Mit Hilfe der PCR können kleine Mengen von cDNS amplifiziert werden. Optimiert man Konzentrationen der Ausgangsproben auf eine gleiche Expression eines Produktes, das in dem konkreten Falle bei allen Proben stabil gleich exprimiert sein sollte (so genanntes Housekeeping Gen), lassen sich semiquantitative Aussagen über die Transkriptionsrate anderer spezifischer mRNS machen. Die Methode wurde erstmals 1985 beschrieben (Saiki et al. 1985). Die Auswahl der Primer erfolgte mit Hilfe des von der GenBank (NCBI, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellten Computerprogramms BLAST. Die Primer wurden von der Firma TIB MOBIOL (Berlin) synthetisiert und sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die PCR wurde mit der hitzestabilen Taq Polymerase (GIBCO, Eggenstein) mit 23 bis 35 Zyklen in einem Thermocycler (Perkin Elmer, FRG) durchgeführt. Der PCR Ansatz enthielt 3µl Template, 5µl PCR Puffer, 1,5µl MgCl₂ (50mM), 1µl dNTP Mix (10mM), 2x je 1 µl Primer (20pM), 0,5µl Taq Polymerase (5U/µl) und 37µl aq. Dest. Jeder Zyklus bestand aus Denaturierung bei 94°C, Annealing bei 59-66°C und Amplifikation bei 72°C für je 1min. Die Anzahl der Zyklen wurde für jedes untersuchte Genprodukt so angepasst, dass die Signalintensitäten der PCR Produkte im linearen Korrelationsbereich zur cDNA Konzentration lagen. Die PCR Produkte wurden in einem 1% igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Die gewonnenen Banden wurden mit BIO-PROFIL Bio-1D image software (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, Frankreich) densitometrisch ausgewertet und zwischen den THP-/- und wt Gruppen verglichen.

Tabelle 2: Primer für RT-PCR.

Gen	Accession number	Primersequenzen (5'-3')	Produktlänge, bp	Schmelztemperatur, °C
NaPi	U22465 Maus	GTC CAG AGC AGC TCC GTG TT	300	59
		CAG CAA ACC AGT GGT ACT TG		
NKAA	BC032187 Maus	TGG GGG TGT CTT TCT TCA TC	345	59
		TGG CTG ACG TCT TGT CAA AG		
NKAb	NM_009721 Maus	ACT GAA GCC CAC ATA CCA GG	262	59
		CCT GCA CAC CTT CCT CTC TC		
NHE3	NM_012654 Ratte	AAC AGT GCA CCG TGC TCT TG	300	59
		AGG ATC CAT ACA TCA TTG CGC		
NKCC2	NM_183354 Maus	CAA CAT TTC TCA TCC CTC GCG C CTC	326	60
		CAC GAA AGC CAC AAA GAT		
barttin	AF391088 Maus	AGC CTC CCA GAC TTC ACT CA	396	59
		TGT AGG GGT GTC GTC AAT CA		
CIC-K2	NM_019701 Maus	ACT CCC AGA GTCT GAA GAC CA	300	59
		AAC AGG ACA CCA CTG AAG GG		
ROMK	NM_019659 Maus	AGA AGA GGT GCT TTG GGG TT	313	59
		GAT GCT TCT GAA CAC AGC CA		
COX-2	AF233596 Ratte	ACA CTC TAT CAC TGG CAT CC	585	63
		GAA GGG ACAA CCC TTT CAC AT		
Renin	J00621 Maus	TCA CCA TCC ACT ACG GAT CA	356	59
		GGA ATC AGT CTT GCT GAG GC		
EnaCa	NM_011324 Maus	CAC AGC AGG TGT GCA TTC AC	417	66
		AGG TTG GAC AGG AGG CTG AC		
NCC	U10097 Ratte	CTG CCC TGG ATT ACG GCG	659	59
		GGC CAT GAG TGT TCC CTT G		
GAPDH	BC059110 Ratte	TAT CCG TTG TGG ATC TGA C	304	58
		TGG TCC AGG GGT TTC TTA C		
THP	L33406 Maus	GTG GTG CAC AGA GAT CCA GG	492	62
		AGG GTG TTG CTG TAG GTG GC		

3.17 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS verwendet. Es wird davon ausgegangen, dass die Meßwerte in homogenen Gruppen einer Normalverteilung entstammen. Die Signifikanz der Messwerte wurde mit Hilfe des gepaarten Student'schen t-Tests ermittelt. Für jede Messreihe wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der SEM (standard error of the mean) berechnet. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM gegeben.