

## 2. Methoden

### 2.1. Probanden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden, nach Einholung des Einverständnisses, Blutproben von 6 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und von 6 gesunden Kontrollprobanden verwendet. Die Patienten unterzogen sich einer Dialysebehandlung seit 36 +/- 30 Monaten (Mittelwert +/- SEM). Routinemäßig erfolgte 3mal wöchentlich für 4 – 5 Stunden eine Hämodialyse.

Zum Untersuchungszeitpunkt waren alle Probanden in stabilen Zustand, frei von interkurrenten Krankheiten und nach klinischer Untersuchung in gutem körperlichem Zustand. Zur Dialyse wurden bei allen Patienten biokompatible Polysulfondialysemembranen (F60, Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland) genutzt, die nicht wieder verwendet wurden. Wasser und Dialysat entsprachen den Richtlinien der American Association of Medical Instrumentation; nach Anzuchtung entsprach das Bakterienwachstum weniger als 50 CFU/ml Wasser und < 200 CFU/ml im Dialysat (Lonnemann, 1998). Klinische und biochemische Charakteristika von Patienten und gesunden Kontrollpersonen siehe Tabelle 2.

Die Dialyseadäquanz wurde mittels des Kt/v – Wertes geschätzt (die Menge Plasma, die von Harnstoff gereinigt wurde geteilt durch das Harnstoffverteilungsvolumen), der nach der Formel

$$Kt/V = -\ln(R-0,03) + (4-3,5xR) \times UF / w$$

(R = Relation des Plasmaharnstoff – N vor und nach Dialyse;

UF = entfernte Ultrafiltratmenge in Litern

w = Gewicht nach Dialyse in Kg)

berechnet wurde (Daugirdas, 1995 und 1990). Die dadurch ermittelten Kt/V – Werte waren 1,2 +/- 0,1 (Mittelwerte +/- SEM).

Das Plasma von terminal niereninsuffizienten Patienten wurde vor der regulären Dialysesitzung gewonnen. Hierzu wurde aus dem arteriellen Schenkel der Dialysefistel unmittelbar vor Beginn der Dialyse Blut in einem EDTA – Vacutainer entnommen und sofort für 5 min bei 4000g und 20°C zentrifugiert. Danach wurde das Plasma bei -20°C tiefgefroren.

	<b>Patienten mit ESRD</b> <i>n=6</i>	<b>Gesunde</b> <b>Kontrollpersonen</b> <i>n=6</i>
Alter (Jahre)	62 +/- 8	60 +/- 9
Geschlecht ( m / w)	2/4	3/3
Körpergewicht (kg)	73 +/- 11	74 +/- 12
Dialysedauer (Monate)	36 +/- 30	0
Systolischer Blutdruck (mmHg)	138 +/- 12	123 +/- 9
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	79 +/- 12	78 +/- 5
Hämoglobin /g/dl)	11,2 +/- 0,8	14,1 +/- 0,9
Serum – Kreatinin (mg/dl)	9,4 +/- 2,5	0,8 +/- 0,1
Harnstoff – N (mg/dl)	24 +/- 3	16 +/- 1
Gesamteiweiß (g/l)	72 +/- 3	72 +/- 2

**Tabelle 2:** Klinische und biochemische Charakteristika der Versuchspersonen.

## 2.2. Präparation und Stimulation von Monozyten aus peripherem Blut

Monozyten wurden aus Blutproben gesunder Probanden mittels Dichtezentrifugation gewonnen. Dazu wurden 20 ml heparinisieretes Blut bei 240 g für 15 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden 5 ml des 1:1 mit isotoner NaCl – Lösung verdünnten Blutes auf 3 ml Histopaque® (5%/6% wt/vol Ficoll, Dichte 1.077 g/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) geschichtet und für 20 Minuten bei 240g zentrifugiert. Die dabei entstehende dünne Interphase mit den Makrophagen wurde sorgfältig aspiriert und 3mal mit isotoner NaCl – Lösung durch Zentrifugation bei 400g für 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in HBSS (enthält in mmol/l: NaCl 136; KCl 5,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,34; CaCl<sub>2</sub> 1; D – Glucose 5,6; N<sub>2</sub>-hydroxyethylpiperazin N'2 Ethansulfonsäure 10; pH 7,4) resuspendiert. Die Zellen wurden mittels eines CellCounters (CASY 1 Modell TT;

Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland) gezählt. Nach erneuter Zentrifugation bei 400g für 5 Minuten wurden  $1,8 \times 10^7$  Zellen in RPMI – 1840 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) mit 10% FCS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 25 mmol/l HEPES resuspendiert und in sterile 60 mm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gegeben. Nach 2 Stunden Inkubation in einem befeuchteten Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen für 6 Stunden mit 100 U/ml IFN $\gamma$  (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) und 1  $\mu$ g/ml LPS (LPS - Serotyp 0111:B4 von E.coli; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) stimuliert. Die Inkubation erfolgte

- a) ohne oder mit Zugabe von PAA in verschiedenen Konzentrationen ( 0,1 – 2 mmol/l)
- b) nach Zugabe von Plasma von terminal niereninsuffizienten Patienten mit Hämodialyse (n=6) und von Plasma gesunder Kontrollpersonen (n=6)
- c) nach Zugabe von Phenylalanin ( 1mmol/l), Homogentisinsäure (1 mmol/l) und Phenylethylamin ( 1 mmol/l ).

Nach der Inkubation wurden die Zellen mittels eines Zellschabers vorsichtig von ihrer Unterlage gelöst und bei 400g für 5 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

### **2.3. Präparation und Stimulation von RAW 264.7 Zellen**

Die murine Makrophagenzelllinie RAW 264.7 wurde von der European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, GB) bezogen. Die Zellen wurden in DMEM/F – 12 nach Zugabe von 2,44 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 2 mmol/l L – Glutamin, 1 mmol/l Natriumpyruvat, 10% FCS, Penicillin (100 u/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) kultiviert. Die Zellen wurden in sterilen Kulturgefäßen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Begasungsbrutschrank vermehrt. Ausplattiert wurde eine Konzentration von 10<sup>5</sup> Zellen/ml. Bei 80%iger Konfluenz in der mikroskopischen Kontrolle wurden die entsprechenden Kulturen zum Experiment genutzt.

Dazu wurden sie für 6 oder 12 Stunden mit 1  $\mu$ g/ml LPS (LPS - Serotyp 0111:B4 von E.coli; Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen, Deutschland) bei 37°C stimuliert. Das weitere Vorgehen erfolgte dann analog dem bei den aus Blut gewonnenen Monozyten.

## 2.4. Zellvitalität

Der Anteil lebender Zellen nach Inkubation wurde durch Anfärbung mit dem Farbstoff Trypanblau ermittelt. Hierzu wurde Trypanblau – Lösung (0,4%) in einem Verhältnis von 1:2 zur Zellsuspension gegeben. Nach Durchmischen wurden die Zellen mikroskopiert. Nicht angefärbte Zellen waren vital. Die Zellviabilität wurde als prozentualer Anteil der vitalen Zellen an der Zellgesamtzahl ermittelt.

## 2.5. Präparation der RNA und real – time PCR (TaqMan)

### 2.5.1. Primer- und Probendesign

Primer und TaqMan - Proben für die murine und humane iNOS – Sequenz sowie für  $\beta$  – Actin als housekeeping – Gen wurden unter Zuhilfenahme des Computerprogramms Primer Express 2.0 (Perkin Elmer Applied Biosystem, Foster City, California, USA) kreiert (Tabelle 3). Mit Ausnahme von  $\beta$  – Actin wurden die Primer in 2 verschiedenen Exons positioniert. In Tabelle 3 sind die Sequenzen der Primer sowie die Länge des resultierenden Amplikons für das humane und murine iNOS und  $\beta$  – Actin – Gen dargestellt.

Name	Sequenz (5' - 3')	Amplikonlänge (bp)
iNOS, murin miNOS – TP miNOS – FP miNOS - RP	CGG GCA GCC TGT GAG ACC TTT GA CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT	95
$\beta$ - Actin, murin m $\beta$ Act – TP m $\beta$ Act – FP m $\beta$ Act - RP	CAC TGC CGC ATC CTC TTC CTC CC CAA TAG TGA CCT GGC CGT AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC	148

iNOS, human hiNOS – TP hiNOS – FP hiNOS – RP	TCC GAC ATC CAG CCG TGC CA CAG GAG AGT TCC ACC AGG ATG TCA AAT CTC GGC AGA ATC TAC AAA	66
$\beta$ – Actin, human h $\beta$ Act - TP h $\beta$ Act - FP h $\beta$ Act - RP	TCA AGT ATC ATT GCT CCT CCT GAG GGC GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT CTG GCA CCC AGC ACA ATG	146

**Tabelle 3:** Sequenzen von Primern und TaqMan – Proben für das murine und humane iNOS- und  $\beta$  – Actin - Gen (TP – TaqMan – Probe, FP – forward primer, RP – reversed primer)

### 2.5.2. RNA – Gewinnung und –Vermessung

Aus den mit oben beschriebenen Methoden gewonnenen Zellen wurde die RNA mithilfe des Quiagen RNeasy Mini Kit (Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstellervorgaben extrahiert. Bei allen Arbeiten mit RNA wurden die Gerätschaften zuvor mit 70% Ethanol gereinigt, nur doppelt autoklavierte Verbrauchsmaterialien verwendet und alle Arbeiten auf Eis durchgeführt. Durch diese Maßnahmen sollte eine Degradation der RNA durch ubiquitär vorhandene RNAsen verhindert werden.

Die Konzentration der gewonnenen Gesamt – RNA erfolgte durch Messung der Absorption (OD – optical density) bei 260 nm ( $OD_{260}$ ). Dazu wurde 1ml der RNA – Lösung auf das 50fache verdünnt. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht dann einer RNA - Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Die Konzentration der unverdünnten Lösung errechnet sich dann nach

$$c = OD_{260} \times 40 \mu\text{g} / \mu\text{l} \times 50$$

(c = Konzentration der unverdünnten Lösung in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

$OD_{260}$  = optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 260 nm)

Die Reinheit der Lösung wurde durch Bestimmung des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  ermittelt. Dieser Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Bei kleineren Werten liegt

eventuell eine Verunreinigung z.B. mit Proteinen vor. Diese Proben wurden dann verworfen, da derartige Verunreinigungen weitere Reaktionsschritte beeinflussen können.

### 2.5.3. RT – Reaktion

1 – 2 µg der extrahierten RNA wurden mit 100 U Superscript II RT (Invitrogen GmbH) bei 42°C für 80 Minuten unter folgenden Konditionen revers transkribiert:

- 50 mmol/l Tris – HCl (pH 8,3)
- 5,7 mmol/l KCl
- 3 mmol/l MgCl<sub>2</sub>
- 5 mmol/l DTT
- 0,5 mmol/l DNTP's
- 8 U RNasin (Promega Corp. Madison, Wisconsin, USA)
- 5 µmol/l oligo (dT)<sub>16</sub> (Perkin – Elmer Applied Biosystems).

Für jeden Ansatz wurde eine RNA - Probe ohne Reverse Transkriptase geführt, um eine Negativkontrolle in der nachfolgenden PCR – Reaktion zu haben.

### 2.5.4. Amplifikation der c – DNA mit Real – time PCR

Die Real – Time PCR wurde mit dem Abi Prism 7700 Sequenzdetektor (TaqMan; Perkin Elmer Applied Biosystems) durchgeführt.

Das Prinzip der Real – time PCR beruht auf 2 Grundlagen (Overbergh et al., 1999; Giulietti et al., 2001):

1. 5' → 3'- Exonuklease – Aktivität der Taq – Polymerase
2. der Konstruktion von sogenannten TaqMan – Proben unter Ausnutzung des FRET - Prinzips.

TaqMan – Sonden sind kurze Oligonukleotide, die an beiden Enden mit einem Farbstoff

versehen – also zweifach gelabelt – sind. Einer dieser Farbstoffe, der so genannte Reporter, sendet nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge ein Fluoreszenzsignal aus. Dieses Signal wird in der intakten Probe durch den am anderen Ende gelegenen Farbstoff, den so genannten Quencher, unterdrückt.

Das dafür zugrunde liegende Prinzip heisst FRET: *fluorescence resonance energy transfer* (oder, nach dem Entdecker, Förster resonance energy transfer). Darunter versteht man einen physikalischen Prozess, bei dem die Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor) strahlungsfrei über Dipol – Dipol – Wechselwirkungen auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor) übertragen wird.

Im Rahmen der Extensionsphase einer PCR wird durch die Taq – Polymerase die Taqman – Probe zerstört. Dabei werden Reporter und Quencher voneinander räumlich soweit getrennt, dass das Fluoreszenzsignal nicht mehr unterdrückt werden und durch geeignete Detektionsmodule registriert werden kann.

Eine Weiterentwicklung der TaqMan – Sonden sind sogenannte molecular beacons. Das sind Sonden, die eine stabile Haarnadelstruktur ausbilden. Dies wird durch eigenkomplementäre Enden ermöglicht. Dadurch kommen Quencher und Reporter in unmittelbare Nachbarschaft zu liegen und das Fluoreszenzsignal kann vollständig unterdrückt werden. Normale TaqMan – Sonden dagegen bilden unter bestimmten Bedingungen ungünstige Tertiärstrukturen aus, die auch ohne Bindung an eine DNS – Matritze eine Signalemission ermöglichen, weil Quencher und Reporter zu weit voneinander entfernt liegen. Die TaqMan – Sonden für die für diese Arbeit durchgeführten Versuche waren solche molecular beacons.

Bei der DNA – Synthese schneidet die Taq – Polymerase die an die template – DNS gebundene TaqMan – Probe in kleine Bruchstücke, so dass Quencher und Emitter ihre Nachbarschaft verlieren. Es werden dabei natürlich nur die Sonden fragmentiert, die an die template – DNS hybridisiert vorliegen. Frei im Reaktionsansatz befindliche TaqMan – Sonden bleiben unbeschadet. Nach jedem PCR- Zyklus wird das dabei freiwerdende Fluoreszenzsignal von einem optischen Detektionsmodul registriert. Die Zunahme der Reporterfluoreszenz ist proportional der DNS – Templatmenge im Reaktionsgefäß.

Die Quantifizierung erfolgt mittels spezieller Software über die Ermittlung des sogenannte threshold – cycle (Ct – Wert). Das ist der PCR – Zyklus, bei dem die gemessene Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Zu Beginn der Reaktion wird nur dieses Hintergrundsignal gemessen, weil die

Templatekonzentration im Reaktionsansatz zu gering ist. Mit Erreichen des threshold cycle tritt die PCR in die exponentielle Phase über.

Im Vergleich mit der Messung der Fluoreszenz eines von der experimentellen Prozedur unbeeinflussten Gens kann eine relative Quantifikation durchgeführt werden. Dafür eignen sich sogenannte housekeeping – Gene wie  $\beta$  – Actin, das in den Versuchen dieser Arbeit verwandt wurde.

Für die Durchführung der Reaktion wurden kommerziell erhältliche Reagenzien (TaqMan PCR Reagent Kit, Perkin Elmer Applied Biosystems) und Konditionen analog den Herstellervorgaben angewendet (2,5  $\mu$ l von cDNA und Oligonukleotiden in einer Endkonzentration von 200 nmol/l). Jeder Reaktionsansatz enthielt 100 nmol/l der korrespondierenden Detektionsprobe.

Die PCR – Reaktion wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt, um zufällige Effekte zu eliminieren. Die PCR erfolgte unter folgenden Konditionen:

- 2 Minuten bei 50°C
- 10 Minuten bei 94 °C
- anschließend 45 Zyklen von jeweils 15'' bei 94°C und 1' bei 60°C

## 2.6. Proteingewinnung und Westernblot

Die nach Stimulation mit LPS 1  $\mu$ g/ml gewonnenen RAW 264.7 Zellen wurden in Lysepuffer (50 mmol/l Tris – Cl (pH 7,4), 150 mmol/l NaCl, 100  $\mu$ g/ml PMSF, 1% Nonident P – 40 und 4% Proteaseninhibitor) lysiert. Bis zur weiteren Analyse wurden die Zelllysate bei -70°C gelagert.

Die einzelnen Aliquots wurden einer SDS – PAGE auf 7,5 % Polyacrylamid Plattengel unterworfen und auf PVDV – Membranen geblottet. Die Blots wurden für 1 Stunde in Tris – gepufferter Lösung (TBS; 150 mmol/l NaCl, 20 mmol/l Tris, pH 7,5) mit 5% fettarmer Milch geblockt und bei 4°C mit Antikörpern gegen iNOS (1:10.000 Verdünnung; Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen in TBS gewaschen und mit Ziegenantikörpern, konjugiert mit anti – Kaninchen – AP, (1:3.000 Verdünnung) für 1,5 Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBS wurden die Blots mit der verstärkten

Chemilumineszenz – Methode unter Zuhilfenahme eines Immunoblot – Assay – Kits (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) untersucht.

### **2.7. Messung der Nitrit – Produktion**

Die NO – Produktion wurde durch Messung der Nitritkonzentration im Kulturmedium gemessen. Dazu wurde der sogenannte Griess – Assay mit Natriumnitrit als Standard genutzt. Aliquots des Kulturmediums wurden mit dem gleichen Volumen Griess – Reagenz (1% Sulfanilamid/0,1% N(1 naphthyl - ethylendiamin - dihydrochlorid in 5% Phosphorsäure) gemischt und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde mit einem Photometer (iEMS reader, Labsystems, Helsinki, Finnland) bei 540 nm gemessen. Standardkurven wurden mit bekannten Konzentrationen von Natriumnitrit erstellt. Die effektive NO – Produktion nach Stimulation wurde durch Subtraktion der basalen NO – Produktion von der Gesamtproduktion ermittelt und als prozentuale Freisetzung im Verhältnis zur Kontrolle ausgedrückt.

### **2.8. Präparation von Endothelzellen**

Um den Einfluss von PAA auf die endotheliale NOS – Isoform zu untersuchen, wurden ECV 304 – Zellen genutzt. Diese Zellen gehören zu einer immortalisierten Endothelzelllinie, die durch spontane Transformation von Zellen aus der Vene einer normalen menschlichen Nabelschnur entstand. Die Endothelzellen wurden freundlicherweise von Prof. Schönfelder, Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie, Charité Berlin zur Verfügung gestellt und in dem Zellkulturmedium M199, supplementiert mit 10% FCS, 100 u/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gehalten. Die Vermehrung erfolgte in einem befeuchteten Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Vor Verwendung der Zellen in den Experimenten wurden sie durch Inkubation in einem serumfreien Medium M199 ausgehungert. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit Acetylcholin (1µmol/l) über 30 Minuten. Anschliessend wurde der Einfluss verschiedener PAA – Konzentrationen sowie des eNOS – Inhibitors L – NAME (NG – nitro – L – Argininmethylester) in einer Konzentration von 10 µmol/l auf die Aktivität der

eNOS durch die Messung der gebildeten NO – Menge mit dem Griess – Assay untersucht.

### **2.9. Statistik**

Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Die statistische Analyse wurde mithilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism 3.0 (GraphPad Software for Science Inc., San Diego, California, USA) durchgeführt. Um die verschiedenen Gruppen vergleichen zu können, wurde der nonparametrische Wilcoxon – Rangsummentest und der nonparametrische Wilcoxon – matched – pairs – test angewandt. Ein 2 – tailed – p – Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant angesehen.