

3 Materialien und Methoden

3.1 Hämodynamik

3.1.1 Versuchstiere

Alle Experimente wurden an männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Bis zur Erreichung des für die Versuche geeigneten Gewichtes von 350 g wurden die Tiere in einem klimatisierten Tierstall (Lufttemperatur 15° C; Luftfeuchtigkeit 22 %) mit einer automatisch gesteuerten Hell- und Dunkelperiode von jeweils zwölf Stunden Dauer gehalten. Die Versuchstiere wurden mit einer salzarmen Diät der Firma Roth ernährt und hatten jederzeit Zugang zu einer mit Leitungswasser gefüllten Trinkflasche.

Die Gruppe der salzreich ernährten Tiere erhielt Trinkwasser für die Dauer von sieben Tagen Leitungswasser, welches mit zwei Gewichtsprozent Kochsalz (MERCK) angereichert worden war. Die Flüssigkeitsaufnahme der Tiere wurde alle zwei Tage durch Wiegen der Trinkflasche und Bestimmen des Körpergewichtes kontrolliert. Tiere, die mehr als 75 g an Gewicht verloren hatten, wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen.

Allen Versuchstieren wurde acht Stunden vor Beginn des Versuches der Zugang zum Futter gesperrt. Flüssigkeit konnte bis vier Stunden vor Versuchsbeginn aufgenommen werden {250}.

3.1.2 Präparation der Versuchstiere

3.1.2.1 Implantation von Telemetriesender und Drosselungsvorrichtung

Sieben Tage vor Beginn der Messung wurden den Versuchstieren ein Telemetriesender der Firma DSI (Philadelphia, USA) sowie eine selbst konstruierte Kunststoffmanschette zur kontrollierten Senkung des Drucks in der Aorta abdominalis implantiert.

3.1.2.1.1 Drossel

Durch Injektion von 0.8 ml einer vierprozentigen Lösung Chloralhydrat (Sigma) pro Kilogramm Körpergewicht wurden die Tiere narkotisiert. Nach Rasur des Operationsgebietes erfolgte eine Antibiotikaprophylaxe durch subkutane Injektion eines Breitspektrum-Penicillins (Tardomycel, Penicillin G und Aminoglycosid). Die Haut auf der abdominalen Seite wurde von der Symphyse bis zum processus xiphoideus in der Medianlinie aufgetrennt. Anschließend wurde die

Bauchmuskulatur im unteren Drittel der linea alba stumpf penetriert und die Bauchmuskeln mit einer Schere voneinander getrennt. Die so eröffnete Abdominalhöhle wurde mit vier Haken aufgespannt. Es folgte die extrakorporale Lagerung der intraperitoneal gelegenen Darmabschnitte, die in feuchte Kompressen verpackt wurden. Nach Aufsuchen des Abgangs der Arteria renalis sinister aus der Aorta abdominalis wurde diese kranial bis zum Abgang der Arteria mesenterica superior stumpf mit Wattetupfern freipräpariert. Kranial von der Arteria mesenterica superior wurde die Aorta abdominalis mit einer um 45 Grad gebogenen Pinzette stumpf untertunnelt und die Drossel an dieser Stelle um die Aorta plaziert. Nach ventraler Verknotung der Drossel wurde der Druckschlauch subkutan bis in den Nacken des Tieres verlegt und dort eingenäht {251}.

3.1.2.1.2 Telemetriesender

Alle Telemetriesender wurden vor der Implantation auf ihre ordnungsgemäße Funktion hin überprüft. Hierzu wurde der Sender in einer Druckkammer installiert, in der über ein Quecksilbermanometer ein bestimmter Druck aufgebaut werden konnte. Am Manometer wurden die Druckstufen 0, 50, 100 und 200 mmHg eingestellt und das Drucksignal des Senders für 20 Sekunden aufgezeichnet. Mittels eines Computerprogramms wurden die Mittelwerte der einzelnen Druckstufen berechnet und mit dem Vorgabewert verglichen. Bei einer Abweichung von mehr als zwei mmHg des Sendersignals vom Vorgabewert wurde das Gerät für defekt erklärt und von den Versuchen ausgeschlossen.

In derselben Operationssitzung, in der die Drosselimplantation erfolgte, wurde dem Versuchstier ein Telemetriesender zur blutigen Messung des Drucks in der Aorta abdominalis unterhalb der Abgänge der Nierenarterien implantiert. Die Aorta abdominalis wurde hierzu von der Bifurcation bis kaudal des Abgangs der Arteriae renales stumpf mit einem Wattetupfer freipräpariert. Anschließend wurde die Aorta proximal der Bifurcation auf einer Strecke von einem Zentimeter untertunnelt und das Gefäß mit einem chirurgischen Faden der Stärke 3-0 angeschlungen und aufgespannt. Blutleere im Operationsgebiet wurde anschließend durch Abklemmen der Aorta unterhalb der Nierenarterien mittels eines Gefäßclips hergestellt. Es folgte die Incision des Gefäßes sowie das Einführen des Drucksensors mit Hilfe einer Gefäßpinzette. Anschließend wurde die Incision mit einem Fibrinkleber (Histoacryl, Braun) verschlossen und die Blutsperrung aufgehoben. Nach Injektion von zwei Millilitern physiologischer Kochsalzlösung

(Fresenius) in die Bauchhöhle zur Volumensubstitution erfolgte der mehrschichtige Wundverschluss unter gleichzeitiger Fixation des Telemetriesenders {251}.

3.1.2.2 Implantation von Vena-femoralis- und Arteria-carotis-Katheter

3.1.2.2.1 Implantation des Vena-femoralis-Katheters

Nach einer Erholungsphase von sieben Tagen erfolgte am Messtag um 12 Uhr die Implantation eines venösen Zugangs zur späteren Narkotisierung der Ratte. Zunächst wurde das Tier im Äthertopf betäubt und das Operationsgebiet in der Leiste rasiert. Unter Äthernarkose wurde die Haut in der Leiste durchtrennt und das subkutane Fettgewebe und die Muskulatur stumpf bis zum Erreichen der Gefäß-Nerven-Straße beiseite präpariert. Arteria und Vena femoralis wurden voneinander getrennt. Nach Anschlingen und Aufspannen der Vena femoralis erfolgte die Incision des Gefäßes und anschließend das Verschieben des Katheters bis in die Vena cava inferior. Nach Fixierung des Katheters (Polyurethane, ID: 0,46 mm, AD: 0,58 mm) am Gefäß mit Einzelknopfnähten erfolgte die subkutane Verlegung des Zugangs bis in den Nacken, wo dieser in gleicher Weise wie die Drossel befestigt wurde. Nach anschließendem Wundverschluss durch eine fortlaufende Hautnaht wurde die Narkose von Äther auf Hexobarbital-Natrium (Brevimethal, Lilly) intravenös umgestellt {252}.

3.1.2.2.2 Arteria-carotis-Katheter

Zur blutigen Messung des Blutdrucks in der Arteria carotis communis wurde der Ratte in derselben Operationssitzung ein Carotiskatheter implantiert. Nach Rasur des Operationsfeldes im vorderen Hals wurde die Haut in der Medianlinie zwei Zentimeter eingeschnitten. Mit Hilfe von zwei anatomischen Pinzetten wurden beide Thymuslappen stumpf voneinander getrennt sowie alle Faszien bis zum Erreichen der paratrachealen Muskulatur gespalten. Der Gefäß-Nerven-Strang wurde lateral in der Tiefe zwischen paratrachealer Muskulatur und Musculus sternokleidomastoideus erreicht. Nach vorsichtigem Trennen von Arteria carotis communis und nervus vagus erfolgten Anschlingen und Incision des Gefäßes. Der Katheter wurde vorsichtig bis in den arcus Aortae vorgeschoben und mit Haltefäden am Gefäß fixiert. Anschließend erfolgte die subkutane Verlegung des Katheters in den Nacken und die dortige Fixation. Nach Verschluss der Wunde durch eine Hautnaht wurde die Haltevorrichtung des chronischen Versuchsstandes im Nacken des Tieres durch Mullbinden befestigt und die Ratte im Messstand platziert {252}.

3.1.3 Messplatz

3.1.3.1 Versuchsstand

Als Rattenkäfig für die 24-Stunden-Messungen diente ein im Physiologischen Institut eigens zu diesem Zweck entworfener Spezialkäfig. Dieser Käfig sollte es dem Tier ermöglichen, sich frei zu bewegen, ohne dass die für die Experimente notwendigen Messleitungen beschädigt wurden. Dazu wurde ein runder Käfig drehbar gelagert und von einem Stellmotor über eine Regelelektronik so angetrieben, dass Drehbewegungen des Versuchstiers durch eine entgegengesetzt gerichtete Drehbewegung des Käfigs ausgeglichen wurden. So konnte verhindert werden, dass sich die im Nacken des Tieres ausgeleiteten Messleitungen beim Umherlaufen des Tieres verdrillten und dadurch beschädigt wurden. Die Detektion der Bewegungsrichtung, der Stärke und der Geschwindigkeit erfolgte über eine Infrarotsonde, die über dem Käfig angebracht war. Durch eine Lochscheibe wurde eine Lichtschranke in Abhängigkeit von den Bewegungen der Ratte geschlossen oder unterbrochen und so die Richtung und die Bewegungsgeschwindigkeit der Tierbewegung detektiert.

Die Katheter wurden am Nacken des Tieres ausgeführt. Als Schutz der Messleitungen diente eine weiche Stahlfeder, die zentral über dem Käfig an einer Taumelscheibe befestigt worden war. So konnte ein möglichst großer Bewegungsspielraum der Versuchstiere gewährleistet werden (*Abbildung 3.1*).

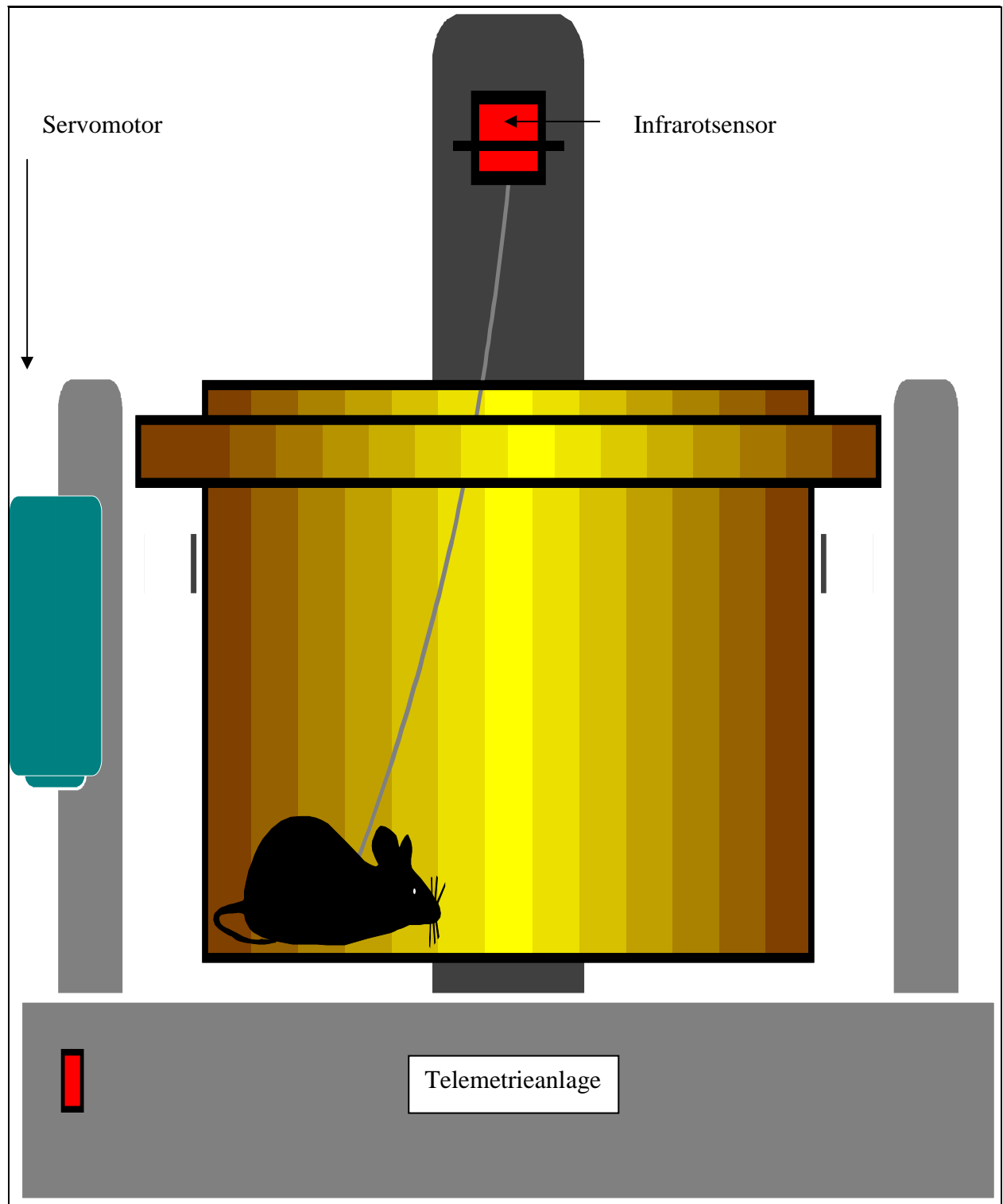


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Versuchsstandes: Ein Infrarotsensor, der über dem Käfig angebracht wurde, detektiert die Bewegungen der Ratte und dreht über einen Servomotor den Käfig entsprechend weit in die entgegengesetzte Richtung. Hierdurch wird ein Sich-Verdrillen der Messleitungen verhindert und dem Versuchstier ein maximaler Bewegungsfreiraum gegeben.

3.1.3.2 Telemetrieanlage

Die Registrierung der Blutdruckwerte in der Aorta abdominalis erfolgte mit Hilfe einer Telemetrieanlage der Firma DSI. Bei diesem System werden die Blutdrucksignale über einen mit einem Gel gefüllten, in der Aorta abdominalis implantierten Schlauch auf einen Druckwandler übertragen. Dieser wandelt das mechanische Signal in ein analoges elektrisches Signal um, welches frequenzmoduliert in ein Funksignal umgewandelt und an einen Empfänger übertragen wird. Immer wenn sich der Blutdruck um mehr als 1 mmHg ändert, erzeugt der Sender ein Funksignal. Die Wellenlänge des Funksignals verändert sich dabei proportional zu der Höhe des Blutdrucks. Vom Empfänger, der unter dem Messplatz positioniert war, wurden die Funksignale wieder in analoge elektrische Signale umgewandelt und an den Messrechner übertragen. Mittels eines Luftdrucksensors erfolgte hier zunächst die Abgleichung des Messsignals mit dem aktuellen Luftdruck. Anschließend wurden die einzelnen Messwerte durch Überlagerung von rationalen Funktionen mathematisch in ein kontinuierliches Signal umgewandelt. Dieses berechnete analoge Blutdrucksignal wurde dann von einem Analog/Digitalwandler in ein digitales Signal umgewandelt, so dass 100 Messwerte pro Sekunde erzeugt wurden. Diese Messwerte wurden mit einem Computerprogramm (Notebook) graphisch am Bildschirm dargestellt und gleichzeitig auf der Festplatte des Computers archiviert {253, 251}.

Die Registrierung des Blutdrucks in der Arteria carotis communis erfolgte mit Hilfe eines konventionellen Druckaufnehmers der Firma Gould. Bei diesem System wurde das Blutdrucksignal über einen mit einem Natriumchlorid- und Heparin-Gemisch gefüllten, in der Arteria carotis communis platzierten Kunststoffkatheter auf einen Druckaufnehmer übertragen. Dieser wandelte das mechanische Drucksignal direkt in ein elektrisches um und übertrug es mit einer Übertragungsgeschwindigkeit von 10 Messwerten pro Sekunde ohne Luftdruckabgleich direkt an den Messrechner. Hier wurde das digitalisierte Blutdrucksignal auf der Festplatte des Computers gespeichert. Gleichzeitig wurde vom Druckverstärker aus der Anzahl der auftretenden Druckimpulse des Blutdrucksignals die Herzfrequenz berechnet und mit einer Geschwindigkeit von einem Messwert pro Sekunde auf der Festplatte des Computers gespeichert.

Vor Beginn der Messung wurden die Druckaufnehmer mit Hilfe eines Quecksilbermanometers kalibriert. Hierzu wurde der Drucksensor an eine Druckkammer angeschlossen und in dieser die Drücke 0 und 100 mmHg erzeugt. Jede Druckstufe wurde für 20 Sekunden registriert und der vom Drucksensor registrierte Wert entsprechend dem in der

Druckkammer vorgegebenen Druckwert nachreguliert. Hierbei wurden Abweichungen von 0,5 mmHg als Messungenauigkeit toleriert.

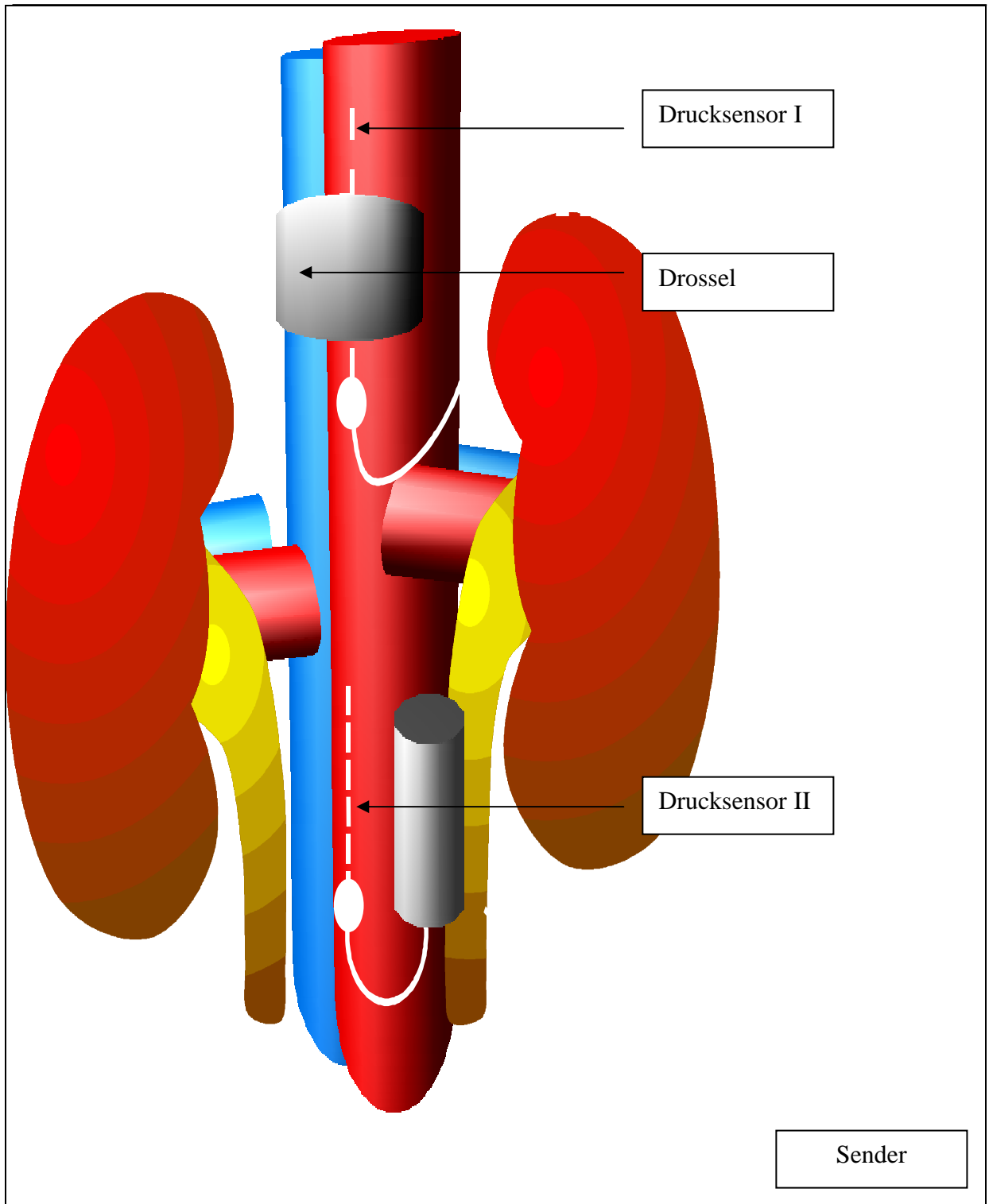


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Anordnung der Implantate in der Ratte. Eine aufblasbare Kunststoffmanschette wurde um die Aorta abdominalis platziert. Distal des Abgangs der Nierenarterien wurde der Telemetriesender zur Blutdruckmessung in der Aorta abdominalis platziert (Drucksensor II). Der Katheter zur Messung des Drucks in proximal der Kunststoffmanschette befindet sich in der Arteria carotis communis (Drucksensor I). Zur besseren Übersicht ist der Drucksensor I in der Abbildung in der Aorta abdominalis eingezeichnet.

3.1.3.3 Druckregelung

Die Regelung des Drucks in der Aorta abdominalis erfolgte mittels eines eigens zu diesem Zweck konstruierten Gerätes. Ein elektropneumatischer Regler pumpte mittels Druckluft die um die Aorta abdominalis plazierte Kunststoffmanschette auf und konnte so den Druck in der Aorta abdominalis distal der Manschette senken bzw. durch Ablassen der Druckluft wieder erhöhen. Die Ein- und Auslassventile des Druckreglers wurden von einer eigenen Elektronik gesteuert. Diese verglich den vom Benutzer vorgegebenen Sollwert mit dem Blutdrucksignal des Telemetriesenders und regelte über die Ein- und Auslassventile den Manschettendruck entsprechend der Abweichung des Telemetriesignals von dem vorgegebenen Sollwert. So konnte der Druck in der Aorta abdominalis distal der Manschette auf dem vorgegebenen Sollwert konstant einreguliert werden (*Abbildung 3.3, Teil B*). Für die Erzeugung von Sinuswellen wurde dem Sollwert von einer externen Elektronik eine Schwingung überlagert. Zunächst wurde der Sollwert mit einer Rechteckspannung einer niedrigen Frequenz (0,05 Hz) überlagert (*Abbildung 3.3, Teil C*). Durch Einregeln der Amplitude der Rechteckspannung wurde die Amplitude der späteren Sinuswellen auf die Höhe von ± 10 mmHg festgelegt. In einem letzten Schritt wurde nun dem Sollwert anstelle der Rechteckspannung eine Sinusspannung derselben Amplitude und der gewünschten Frequenz von 0,1 Hz überlagert (*Abbildung 3.3, Teil D*).

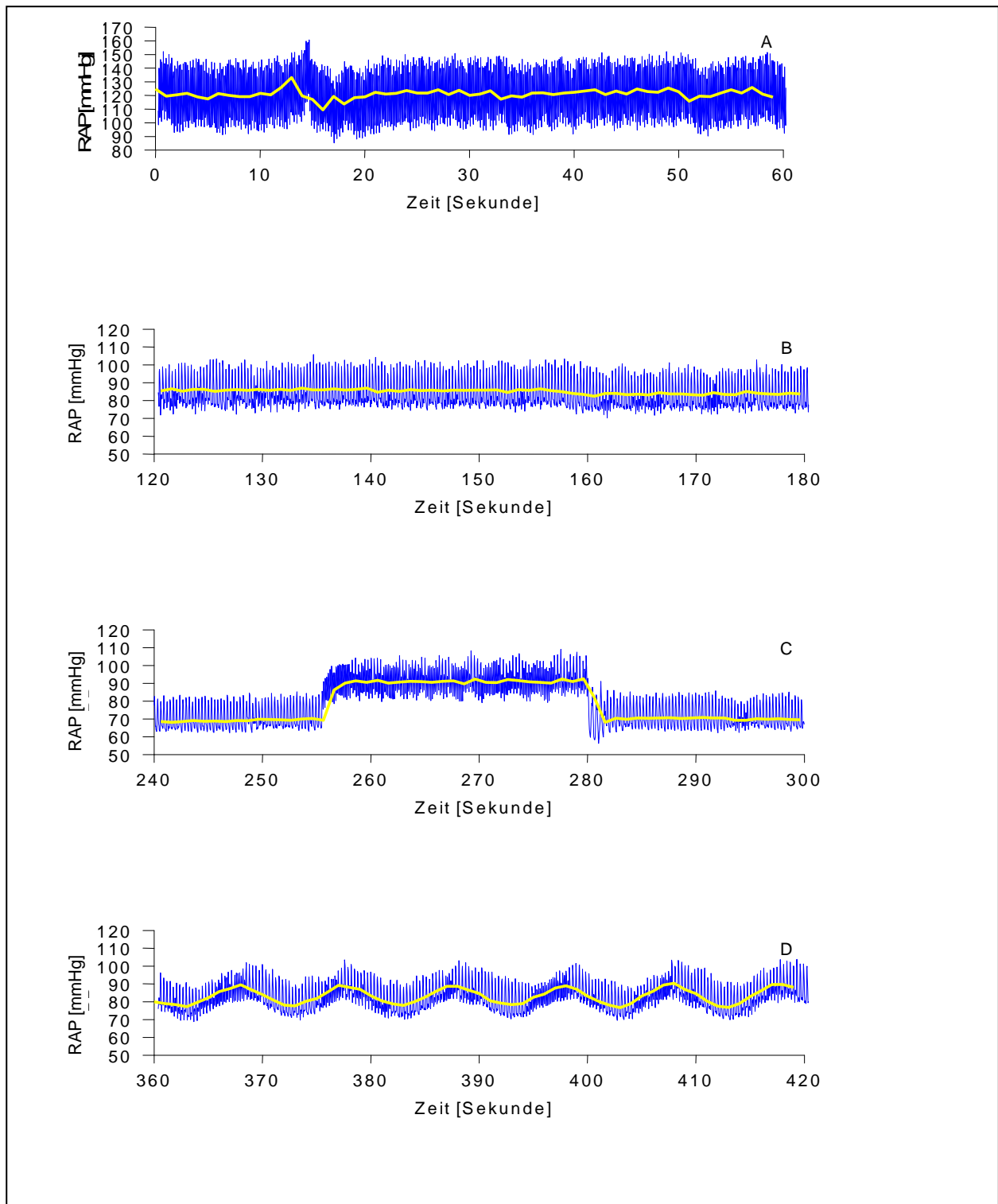


Abbildung 3.3: Originalregistrierung des renalen Perfusionsdrucks (RAP) während der Einstellung der Sinuswellen (0.1 Hz; ± 10 mmHg Amplitude). Im Teil A der Abbildung ist der Ruhedruck dargestellt. Im ersten Schritt der Einstellung wird der renale Perfusionsdruck auf 80 mmHg einreguliert (Teil B). Es folgt zunächst die Überlagerung von Rechtecken zur Einstellung der Amplitude (Teil C) und zuletzt die Darstellung der Sinuswellen (Teil D).

3.1.3.4 Versuchsdurchführung

3.1.3.4.1 Versuchsbeginn

Am Messtag wurde den Tieren acht Stunden vor Versuchsbeginn der Zugang zum Futter gesperrt. Vier Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere in den Versuchsständen platziert, um ihnen ausreichend Zeit zur Gewöhnung an die neue Messumgebung zu gewähren. Von diesem Zeitpunkt an konnten die Tiere kein Wasser mehr zu sich nehmen. Die Versuche wurden in einem klimatisierten Raum mit einer Raumtemperatur von 15° C und einer Luftfeuchtigkeit von 20 % durchgeführt. In dem Versuchsraum herrschte eine 12 Stunden dauernde Hell-Dunkel Periodik; auf größtmögliche Schallisolierung wurde geachtet. Alle Versuche begannen genau um 19.00 Uhr mit der Inbetriebnahme der Versuchsstände und dem Einstellen des gewünschten Versuchsprotokolls. Anschließend wurde der Druck in der Arteria carotis communis für 60 Minuten registriert. Nach Beendigung der Registrierung wurde den Ratten über den Katheter in der Arteria carotis communis ein Milliliter Blut zur Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität entnommen und das fehlende Blutvolumen durch einen Milliliter physiologischer Kochsalzlösung ersetzt. Der Katheter in der Arterie wurde anschließend mit einem Gemisch aus Natriumchlorid und Heparin gespült und versiegelt. Während der nächsten 22 Stunden wurden an den Versuchstieren keine weiteren Manipulationen vorgenommen.

3.1.3.4.2 Versuchsbeendigung und Probengewinnung

60 Minuten vor Beendigung der Versuche wurde der Messkatheter in der Arteria carotis communis erneut an den Druckaufnehmer angeschlossen und die Messwertregistrierung fortgesetzt. Unmittelbar vor Versuchsende wurde den Ratten dreimal ein Milliliter Blut über den Katheter in der Arteria carotis entnommen und in eisgekühlte Eppendorfgefäße gefüllt. Diese wurden bei 4° C für 10 Minuten bei 8000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das abpipettierte Plasma wurde bis zur weiteren Analyse bei -20° C gekühlt gelagert {254}.

Es folgte die Nierenentnahme. Hierzu wurden die Ratten mit einer Bolusinjektion von einem Milliliter Brevimethal-Natrium intravenös narkotisiert. Nach Entnahme der Tiere aus dem Versuchstand erfolgte die Eröffnung des Abdomens durch einen medianen Bauchschnitt und je einen Schnitt in der rechten und linken Flanke. Die Nieren wurden freipräpariert und, beginnend mit der rechten Niere, entnommen. Diese wurde halbiert und anschließend dekapsuliert. Eine Hälfte wurde umgehend in flüssigem N₂ schockgefroren. Bei der anderen Hälfte erfolgte zunächst die Trennung von Rinde und Mark unter dem Operationsmikroskop mit einem Skalpell.

Für die histologischen Verfahren wurde die linke Niere nach Entnahme kurz auf RNase-freiem Filterpapier abgetupft und mit steriler Skalpellklinge in mehrere ca. 3 mm dicke Scheiben geteilt. Die Schnittführung erfolgte dabei radial vom Nierenbecken ausgehend um in jeder Probe etwa gleich große Anteile der Nierenrinde und des Nierenmarkes zu erhalten. Außerdem erfolgte die Abtrennung und getrennte Fixierung der Polkappen um rein kortikales Gewebe zu gewinnen. Anschließend wurde das Organ dekapsuliert. Es folgte die Immersionsfixierung in einer 3%igen Lösung in PBS gelöstem Paraformaldehyd (pH 7,4) für 6 Stunden bei 4° C. Danach wurden die Nieren zum Schutz vor Gefrierartefakten für 12 Stunden in einer Sacharose-PBS-Lösung (800mOsm/kg H₂O; pH 7,4) bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe auf Styroporplättchen aufgebracht und in stickstoff-gekühltem Isopentan (Riedel-de Haen) schockgefroren. Alle Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -80° C gelagert {255, 82, 236}.

3.1.3.5 Versuchsprotokolle

In allen Gruppen wurden 12 Versuche durchgeführt. Im Einzelnen wurden in der Gruppe der salzarm ernährten Tiere folgende Versuchsprotokolle durchgeführt:

- 24 Stunden Ruhemessung als Kontrollgruppe;
- 24 Stunden Senkung des Drucks in der Aorta abdominalis auf 90 mmHg;
- 24 Stunden Senkung des Drucks in der Aorta abdominalis auf 80 mmHg;
- 24 Stunden Senkung des Drucks in der Aorta abdominalis auf 70 mmHg;
- 24 Stunden Senkung des Drucks in der Aorta abdominalis auf 80 mmHg mit Überlagerung von Sinuswellen einer Frequenz von 0.1 Hz und einer Amplitude von ± 10 mmHg. Im Folgenden werden diese Versuche zur sprachlichen Vereinfachung als Versuche mit reduziertem Druck in der Aorta abdominalis mit erhöhter und verminderter Blutdruckvariabilität bezeichnet.

In der Gruppe der salzreich ernährten Tiere wurden im Einzelnen folgende Versuchsprotokolle durchgeführt:

- 24 Stunden Ruhemessung als Kontrollgruppe;
- 24 Stunden Senkung des Drucks in der Aorta abdominalis auf 90 mmHg;
- 24 Stunden Senkung des Drucks in der Aorta abdominalis auf 80 mmHg;

- 24 Stunden Senkung des Drucks in der Aorta abdominalis auf 70 mmHg;
- 24 Stunden Senkung des Drucks in der Aorta abdominalis auf 80 mmHg mit Überlagerung von Sinuswellen einer Frequenz von 0.1 Hz und einer Amplitude von ± 10 mmHg. Im Folgenden werden diese Versuche zur sprachlichen Vereinfachung als Versuche mit reduziertem Druck in der Aorta abdominalis mit erhöhter und verminderter Blutdruckvariabilität bezeichnet.

In allen Versuchen wurde der Druck in der Aorta abdominalis, der Blutdruck in der Arteria carotis communis und die Herzfrequenz aufgezeichnet. In dem am Ende des Versuchs gewonnenen Plasma-Proben wurde die Plasma-Renin-Aktivität bestimmt. An den für die Histologie vorbereiteten Nieren wurden an je drei Gewebeschnitten die Diaphoraseaktivität, die Immunreaktivität für Renin und die mRNA-Aktivität für Renin bestimmt. Für jeden Versuch wurde im Nierenhomogenat die mRNA-Menge für Renin durch einen Northern-Blott bestimmt.

3.2 Molekularbiologie

3.2.1 Zellkultur und DNA-Darstellung

Die Darstellung der DNA für die Sondenpräparation erfolgte aus tiefgefrorenen *E. coli*-Glycerinkulturen. Dazu wurde eine sterile Luria-Bertani-Lösung hergestellt (1g NaCl, 0.5g Hefe und 1g Trypton auf 100ml Aqua bidest) und mit 50µg/ml Ampicillin versetzt.

Nach dem Beimpfen mit der jeweiligen Glycerinkultur erfolgte die Vermehrung der Zellen bei 37° C im Schwenkbrutschrank (16h, 240 U/min). Hierdurch wurden Zelldichten von $> 3 \times 10^9$ Zellen/ml erreicht.

Die Trennung und Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte in Anlehnung an einen kommerziellen Kit (Nucleobond AX, Marcherey-Nagel, Deutschland), der auf einem modifizierten Verfahren nach Birnboim und Doly beruht. Die durch Zentrifugation (6000g, 30min, 4° C) aus der Kultur gewonnenen Zellen wurden zunächst in einer Lösung aus 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA und 100µg RNase A resuspendiert und anschließend mit 200mM NaOH und 1% SDS lysiert. Durch Zugabe von 2.8 M Kaliumazetat (pH 5.1), Homogenisierung, Inkubation auf Eis (5min) und anschließender Zentrifugation (14000g, 30min, 4° C) wurden die chromosomale DNA und andere Zellbestandteile präzipitiert, während die Plasmid-DNA in Lösung gehalten wurde. Der Überstand wurde mit 5ml Pufferlösung (100mM Tris-HCl, 15% Ethanol, 900mM KCl und H₃PO₄, pH 6.3) auf eine silicabestückte Ionenaustauschersäule (Nucleobond AX500) gegeben. Nach dreimaliger Waschung (3x15ml) mit Pufferlösung wurde die gereinigte Plasmid DNA von der Säule gelöst (zweimalige Waschung mit 100mM Tris-HCl, 15% Ethanol, 1000mM KCl und H₃PO₄, pH 8.5), mit 4.2ml Isopropanol versetzt und durch anschließende Zentrifugation (14000g, 10min, 4°C) präzipitiert. Durch abschließende Waschung mit 70% Ethanol und Trocknung (5min, 22°C) wurde die gereinigte DNA von präzipitierten Salzresten befreit.

Zur weiteren Verarbeitung wurde die DNA in 10mM Tris-HCl (pH 8.5) gelöst. Um die Qualität der Plasmid-DNA und die Ausbeute zu kontrollieren, wurde ein Agarosegel (1%) angefertigt und die DNA-Konzentration photometrisch bei 260nm/290nm bestimmt.

3.2.2 RNA-Isolierung

Die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Gewebe wurden auf Eis genommen und in vorgekühlten Röhren zusammen mit 800µl Denaturierungslösung (Lösung D: 236g

Guadinium Thyozyanat, 125ml Natriumzitat 0,1M und 8,25ml Sarcosyl 10% in 500ml DEPC-Wasser gelöst) homogenisiert. Danach erfolgte die mehrschrittige RNA-Extraktion:

- Zugabe von 80µl 2M Natriumazetat (pH 4), anschließend 1 Minute schütteln;
- Zugabe von 800µl wassergesättigtem Phenol, anschließend 1 Minute schütteln;
- Zugabe von 160µl Chloroform, anschließend 1 Minute schütteln und dann 15 Minuten auf Eis stellen;
- Separation der wässrigen (RNA-haltigen) Phase von der phenolhaltigen Phase durch Zentrifugation (15000g, 15min, 4°C).

Die mehrschrittige RNA-Präzipitation und Waschung erfolgten nach folgendem Protokoll:

- pipettieren von 1ml der wässrigen Phase in 1ml Isopropanol;
- nach schütteln des 1:1-Gemischs Fällung über 12h bei -20°C;
- pelletieren der RNA durch Zentrifugation (15000g, 15min, 4°C);
- absaugen des Überstandes mittels Pasteur Pipette;
- Resuspension des Niederschlages in 300µl Lösung D, anschließend Zugabe von 50µl Natriumazetat (2M, pH 4) sowie 1,25ml Ethanol (95%) und 12h Fällung bei 20° C;
- Zentrifugation (15000g, 30min, 4°C), Überstand mit Pasteur-Pipette abnehmen und mit 1ml Ethanol 70% waschen;
- erneute Zentrifugation (15000g, 30min, 4°C) mit anschließender Lösung in 50µl RNase-freiem Wasser.

Abschließend wurden 5µl der Probe entnommen und photometrisch die Konzentration und die Reinheit (Messung der optischen Dichte bei 260nm/ 290nm) der RNA bestimmt. Zusätzlich wurde mittels eines denaturierenden Ethidiumbromid-Agarose-Gels das Intensitätsverhältnis der 28S und 18S Banden der ribosomalen RNA bestimmt, um die Integrität der RNA sicherzustellen {236, 255}.

3.2.3 Northern Blot

3.2.3.1 Sondenpräparation

Für die nichtradioaktive mRNA-Quantifizierung wurde die zu transkribierende Renin Plasmid-DNA linearisiert und in die Polylinkregion eines Transkriptionsvektors kloniert der einen Promotor für SP6 RNA- Polymerasen enthielt. Dazu wurde 1µg linearisierte Plasmid-DNA zusammen mit 10µl Nukleotidgemisch und digoxigeninmarkiertem Uridintriphosphat (DIG RNA Labeling Mix, Boehringer Mannheim) und 10µl 10x Puffer (100mM Dithiotreit, 400mM Tris-HCl (pH=8.0), 60mM MgCl₂, 20mM Spermidin) auf Eis pipettiert und mit sterilem Aqua bidest (4°C) auf 95µl aufgefüllt. Nach kurzer Durchmischung erfolgte die Zugabe von SP6-RNA-Polymerase. Nach erneuter gründlicher Durchmischung und kurzer Zentrifugation wurde der Einbau von DIG-11- UTP an ca. jede 20. Position des Transkripts durch eine 2 stündige Inkubation im Wasserbad (37°C) erreicht. Anschließend erfolgte die Entfernung der Template DNA durch Zugabe von 10µl RNase-freier DNase I (7.5 U), Mischung und 15 minütige Inkubation der Reaktionslösung bei 37°C im Wasserbad. Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10µl 0.2 M EDTA auf Eis gestoppt. Um die markierten RNA Transkripte lagerfähig zu machen wurden sie mit einem Gemisch aus 375µl Ethanol (70%, -20°C) und 12.5µl 4M LiCl vermischt und 12h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (15000g, 1h, 4°C) wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet in 500µl Ethanol gewaschen (70%, -20°C). Schließlich erfolgte die Trocknung in der Vakuumzentrifuge und Resuspension des Pellets in 100µl Aqua bidest. Die quantitative und qualitative Analyse des Transkriptes erfolgte durch photometrische Bestimmung sowie durch Darstellung im Agarosegel (Ethidiumbromidfärbung).

3.2.3.2 Northern Blot

Nach Auftauen der RNA Proben in eisgekühlten Ständern erfolgten die Bestimmung der RNA-Konzentration wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Aus diesen Werten wurde für jede Probe das einzusetzende Probenvolumen ermittelt. Bei jeder Bestimmung liefen als interner Standard gepoolte RNA Proben von Kontrolltieren mit um verfahrensbedingte RNA-Verluste bei der abschließenden Quantifizierung zu korrigieren. Die Denaturierung der RNA-Proben erfolgte bei 65°C im Wasserbad (10min) nachdem die Proben mit DEPC-Wasser und 26.1µl Probenpuffer (hergestellt aus 625µl deionisiertes Formaldehyd, 207.5µl Formaldehyd, 10µl Bromphenolblau 1% und 125µl 10x MOPS (0.2M Morpholinpropansulfonsäure, 50mM Natriumacetat, 10mM EDTA, pH=7) auf ein Volumen von 33µl aufgefüllt wurden. Anschließend erfolgte die

elektrophoretische Auftrennung der RNA über ca. 2h bei 75V in einem standard Formaldehyd-Formamidgel. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS verwendet. Die Aufbereitung der Proben und die Durchführung des Kapillarblots wurden dann wie folgt durchgeführt:

- Entfernung der Formaldehydreste durch vorsichtige Waschung des Gels für 5min in 6x SSC (3M NaCl, 0.3M Natriumcitrat, pH=7), anschließend Äquilibrierung in 20x SSC (20°C, 12h).
- Einlegen der positiv geladenen Nylonmembran (Boehringer Mannheim) in 20x SSC (20°C, 15min) und erneute vorsichtige Waschung des Gels in 20x SSC (20°C, 30min).
- Kapillarblotsäule (aufgebaut aus Glasplatte, Blottingpapier, Gel, Nylonmembran, Blottingpapier, 5cm Zellstoff, Glasplatte) in 20x SSC einstellen und mit ca. ½kg beschweren. Anschließend 18h bei Raumtemperatur blotten.
- Da die kombinierte Anwendung von UV - crosslink und Thermostabilisierung in Vorversuchen zu einer besseren Fixierung führte als die alleinige Verwendung nur eines der Verfahren wurde die Membran zunächst erhitzt (120°C, 30min) und nachfolgend beidseitig mit UV - Licht bestrahlt. Die Fixierung wurde durch zweimalige Waschung in 2x SSC abgeschlossen.
- Danach erfolgte eine Qualitätskontrolle durch kurze Einlage der Membran in Ethidiumbromidlösung (15min, 5µl/100ml), Spülung in 2x SSC und abschließende UV - Belichtung.

Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgten in folgenden Schritten:

- Einlage der Nylonmembran für 1½h in Dig Easy Hib (20ml/100cm² Membranfläche, Boehringer Mannheim).
- Nach Entnahme der Dig Easy Hib Lösung, Zugabe der DIG - markierten Sonde und Hybridisierung über 12h bei 68°C.
- Zweifache Waschung (10min) der Nylonmembran bei Raumtemperatur in 2x Waschlösung (2x SSC welches 0.1% SDS enthielt).
- Abschluß der Hybridisierung durch Waschung bei 68°C über 15 Minuten in 0.1x Waschlösung.

Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung des DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim). Dabei wird die Membran (nach Äquilibrierung und Blockung mit einer Lösung aus

proteolytischen Kaseinfragmenten) mit einer verdünnten Anti-DIG-AP-Antikörperlösung inkubiert. Nach mehreren Wasch- und Äquilierungsschritten in denen überschüssige Antikörperlösung abgetrennt wird, erfolgt die Zugabe eines Farbstoffsubstrates (CSPD, Boehringer Mannheim). Inkubation über 15min bei 37°C führt über den chemischen Angriff der alkalischen Phosphatase der membrangebundenen Anti-DIG-AP-Antikörper am CSPD zur Freisetzung von Photonen. Zur Quantifizierung der mRNA wurde die Intensität dieser Strahlung mit einem optischen System erfaßt (Hamamatsu, Luminograph Imaging System), digitalisiert und einer späteren densitometrischen Auswertung zugeführt.

3.3 Histochemie

3.3.1 NADPH-Diaphorase

Die catalytische Aktivität der Stickstoff-Monoxyd-Synthase-Isoformen in der Niere wurde durch die enzymatische Reduktion von Nitro-Blautetrazolium in Anwesenheit von NADPH gezeigt. Hierzu wurden 5µm dicke Cryostat-Schnitte der Niere auf mit Chromgelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und für 10 Minuten an der Luft getrocknet. Anschliessend wurden die Objektträger dreimal zehn Minuten in PBS gewaschen und dann in einem Reaktionspuffer inkubiert. Dieser Reaktionspuffer bestand aus einem 0,1M Phosphatpuffer, der mit 0,3% Triton X 100 zur Permeabilisierung der Zellwände, mit 0,01% Nitro-Blautetrazolium und mit 0,1% β-NADPH für die Stickstoff-Monoxyd-Synthase abhängige Farbreaktion versetzt wurde. Die optimale Reaktionszeit wurde an ebenfalls 5µm dicken Kontrollschnitten ausgetestet. Hierbei wurde die Zeit bis zum Anfärben der macula densa gestoppt, ohne dass Hintergrundsaktivität in Form einer gleichmäßigen Blaufärbung des Schnittes auftrat. Die so ermittelte Inkubationszeit betrug 25 Minuten bei einer Temperatur von 37° C in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss. Die Reaktion wurde nach der Inkubationszeit durch dreimaliges Waschen für je zehn Minuten in PBS gestoppt. Zur dauerhaften Hydrierung der Schnitte für die Auswertung wurden die Gewebeschnitte mit 50% PBS-Glycerin (pH 8,6) überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Aktivität der Stickstoff-Monoxyd-Synthase wurde durch Präzipitation des dunkelblauen Reaktionsproduktes lokalisiert. Zur Kontrolle wurde je ein Objektträger mit einem Reaktionspuffer inkubiert, bei der das NADPH durch NADH ersetzt wurde. Bei dieser Reaktion fand sich kein Reaktionsprodukt {256, 257, 82}.

3.3.2 Immunhistochemie

3.3.2.1 Primärantikörper

Die bei den Experimenten verwendeten polyklonalen Antikörper sind bereits in anderen Arbeiten auf ihre Spezifität untersucht worden. Für den Nachweis von Renin wurde ein gegen Ratten-Renin gerichteter polyklonaler Kaninchen-Antikörper verwendet (freundlichsten überlassen von E.Hackenthal, Heidelberg) {258}.

3.3.2.2 Antikörperinkubation und Antikörperdetektion

Für die Immunhistochemie wurden Gefrierschnitte in einer Dicke von 5µm verwendet. Die Gefrierschnitte wurden auf mit Chromgelatine beschichtete Objektträger aufgebracht, eine Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen mit Blocking-Medium für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Blocking-Medium diente 2% bovines Serum-Albumin in PBS. Nach Entfernen des Blockin-Mediums durch zweimaliges Waschen für je fünf Minuten in PBS wurden die Schnitte mit den jeweiligen Primärantikörpern überschichtet und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Antikörperkonzentration für den Antikörper wurde in Verdünnungsreihen (Verdünnungsmedium PBS) ausgetestet. Sie betrug für Renin 1:10.000. Anschließend wurden die Schnitte für 12 Stunden bei 4°C in einer feuchten Kammer auf einem Schüttler gelagert. Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Schnitte viermal für je zehn Minuten in PBS gespült und mit den jeweiligen Sekundärantikörpern beschichtet. Die verwendeten Sekundärantikörper waren direkt fluoreszenzmarkiert. Es handelte sich um ein mit einem Cytochrom 3 konjugiertes Zige Anti-Kaninchen-IgG-Serum mit einer Verdünnung von 1:250 in PBS. Nachdem die ungebundenen Antikörper nach einer Stunde Inkubation durch dreimaliges Waschen von je fünf Minuten in PBS entfernt worden waren, wurden die Schnitte mit 50% PBS-Glycerin (pH 8,6) eingedeckelt und fluoreszenzmikroskopisch (Leika DMRB mit Auflicht-Fluoreszenz Zusatz) analysiert und fotografiert {82, 257}.

3.3.3 In-situ-Hybridisierung

3.3.3.1 Präparation der cDNA-Matrizen

Die cDNA-Plasmide zur Herstellung der Riboproben waren im Labor von Professor Bachmann schon zur Anwendung gekommen und lagen bereits in klonierter Form vor. Alle cDNAs waren

in der EcoRV-site des pBluescript KS+ Vektors subkloniert. Diese Klonierungsstelle wird jeweils von einer Promotorsite für die Transkriptionspolymerasen T3 und T7 flankiert. Im einzelnen handelte es sich bei der cDNA um ein 666 Basen-Paare langes cDNA-Fragment des Maus-Renin-Gens, Position 30-50. Als Matrize zur Transkription der Sonden wurde ein PCR-Produkt hergestellt. Dieses umfaßte den jeweiligen einklonierten cDNA-Abschnitt und die plasmid-eigenen Transkriptionspromotoren und wurde mittels PCR unter Verwendung von vektorspezifischen Primern synthetisiert. Für eine spätere Transkription mit T7 wurden die Primer für die T3- und -47S-Positionen des pBluescript KS+ Vektors verwendet. Sollte die Matrize bei der Transkription von der T3 Position aus abgelesen werden, kamen die Primer für die T7 und R2 Position des pBluescript KS+ Vektors zum Einsatz. Der PCR Reaktionsansatz, bestehend aus 1µl 1:1.000 verdünntem Plasmid, je 1µl der entsprechenden Primer (Edkonzentration 20pmol/µl), 10µl Nukleotidpufferlösung (Endkonzentration 4pmol/µl, Boehringer) und 36µl Aqua dest, wurde zunächst zum Lösen unspezifischer Bindungen für 5 Minuten auf 98° C erhitzt. Nach Zugabe von 1µl DNA-Polymerase (1:5 verdünnt in DNA Polymerase Puffer, Boehringer) erfolgte die DNA Synthese in 22 Zyklen, bestehend aus einer 40 Sekunden dauernden Linearisierungsphase bei 98° C, einer 40 Sekunden dauernden Primerbindungsphase bei 66° C für 40 Sekunden und einer DNA Synthese Phase für 45 Sekunden bei 77° C. Durch Extraktion mittels Phenol / Chloroform (T.J. Baker) und Lithium-Chlorid/Ethanol-fällung (4 M LiCl, MERCK; 100% Ethanol, T.J. Baker) wurde die DNA aufgereinigt. Zur Qualitätskontrolle und Quantifizierung der DNA wurden Agarosegel-Elektrophoresen (Seakem ME Agarose, FMC, USA) und photometrische Bestimmungen (GeneQuantII, Pharmacia Biotech) durchgeführt {259, 260, 62, 82, 257}.

3.3.3.2 In-vitro-Transkription zur Herstellung mit Digoxigenin markierter Riboproben

Die In-vitro-Transkription zur Herstellung markierter RNA-Proben wurde mit Hilfe einer T3 Polymerase bzw. feiner T7 Polymerase (Boehringer) 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-RNA-Probe entstand. Die Antisenseprobe, die komplementär zur zellulären mRNA ist, diente als Nachweis für die mRNA-Synthese im Gewebe, während die Sense-Probe als Negativ-Kontrolle benutzt wurde. Für die Transkription wurden 0,3 µg des PCR-Produktes als Matrize eingesetzt und zusammen mit 13 µl Diethyl-

Pyrocarbonat (DEPC, SIGMA) behandeltem Aqua dest, 2µl Transkriptionspuffer (Boehringer), 2µl Nukleotidgemisch mit Digoxigenin-markiertem Uridin 5'-Triphosphat (DIG-Labeling mix, Boehringer) und 2µl der jeweiligen RNA-Polymerase (Boehringer) für 135 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach erfolgte der Verdau der DNA-Matrize in einer 15-minütigen Inkubation mit RNase freier DnAse (Boehringer). Die RNA wurde mit Lithium-Chlorid und Ethanol gefällt, mit 80% Ethanol gewaschen und nach anschließendem Trocknen 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. Da die Zugänglichkeit zellulärer mRNA für lange Riboproben eingeschränkt ist, wurden die markierten Riboproben für Renin und Stickstoff-Monoxid-Synthase (Isoform II) nach erfolgter Transkription durch alkalische Hydrolyse fragmentiert. Hierzu wurden 50µl gelöstes Transkript mit einem Carbonatpuffergemisch (20µl 0,2 M NaHCO₃ / 30µl 0,2 M Na₂CO₃, Riedel-de Haen) bei 60° C inkubiert.

Die Inkubationsdauer wurde entsprechend der Ausgangslänge der Riboprobe nach folgender Formel berechnet:

$$t = (\text{Istwert} - \text{Sollwert}) / (0,11 * \text{Istwert} * \text{Sollwert})$$

Die Inkubationszeiten betragen für Renin 20 Minuten. Die Fällung der hydrolysierten RNA erfolgte analog zur Fällung der Transkripte {259, 260, 62, 82, 257}.

3.3.3.3 Hybridisierung Digoxigenin-markierter Riboproben

Für die In-situ-Hybridisierung wurden Gefrierschnitte von 7 µm Dicke verwendet. Die Gefrierschnitte wurden an einem Kryostaten (Kryostat CM3000, Leica) hergestellt, auf sialinisierte Objektträger aufgebracht und für 15 Minuten in eisgekühltem 4% Paraformaldehyd (in PBS, pH 7,4) nachfixiert. Nach mehreren Waschschritten (3 * 5 Minuten in PBS, 2 * 5 Minuten in Aqua dest, 2 * 5 Minuten in PBS) und einem Deproteinierungsschritt (10 Minuten in 0,1 M HCl) wurden die Schnitte für 20 Minuten in 0,25% Essigsäure (T. T.J. Baker) / 0,1 M Triethanolamin (SIGMA) inkubiert. Es folgten zwei weitere fünfminütige Waschschriffe in PBS und die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils fünf Minuten in 70%, 80% und 96% Ethanol). Nachdem die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet worden waren, wurden sie mit einem Prähybridmix (50% deionisiertes Formamid [MERCK], 40mM Tris-HCL [Trometamol {MERCK} / HCl {T.J.Baker} pH 7,4], 25 mM

EDTA [ROTH], 20 mM NaCl, 0,25 µg/µl tRNA, 2,5x Denhardt-Lösung [100x = 0.05% Ficoll, 0.05% Polyvinylpyrrolidon und 0,05% bovines Serumalbumin], alle Produkte - soweit nicht anders angegeben - von Boehringer) bedeckt und für 120 Minuten bei 40° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Entfernen des Prähybridmixes wurden die Schnitte mit dem Hybridmix (50% deionisiertes Formamid, 200 mM Tris-HCl [pH 7,4], 1 mM EDTA [pH 8,0], 0,2M Dithiothritol [BIOMOL, Hamburg], 0,33 M NaCl, 5 µg/µl tRNA, 1µg/µl Heringssperma [beides Boehringer], 10xDenhardt-Lösung, 10% Dextransulfat [SIGMA] und 2-8 pg digoxigenerter Riboprobe) überschichtet. Die optimale Sondenkonzentration wurde für jede Sonde in separaten Verdünnungsreihen ausprobiert. Sie betrug für Renin 2pg/Reaktionsansatz. Es wurden jeweils Sense und Antisense Hybridisierungen durchgeführt. Um während der Inkubation für 20 Stunden bei 40° C in einer feuchten Kammer eine Austrocknung der Schnitte zu verhindern, wurden sie mit Deckgläsern abgedeckt. Diese waren zuvor silikonisiert worden, um eine Absorption der markierten Riboprobe zu verhindern {259, 260, 62, 82, 257}.

3.3.3.4 Entfernung nicht-hybridisierter Riboproben

Die silikonisierten Deckgläser wurden in einer Lösung aus 2x Standard Sodium Citrat (SSC entspricht 18% NaCl/15%Na-Citrat [beides MERCK]) abgelöst und die Schnitte für 30 Minuten in derselben Lösung bei 40° C gewaschen. Es folgten weitere Waschschrte in verschiedenen Waschlösungen bei unterschiedlichen Temperaturen (30 Minuten in 0,38x SSC/50% deionisiertes Formamid und 60 Minuten in 0,1x SSC/50% deionisiertes Formamid, beide Waschschrte bei 40°C, 2 mal 10 Minuten in 0,5xSSC und 10 Minuten in 0,2x SSC bei Raumtemperatur) {259, 260, 62, 82, 257}.

3.3.3.5 Detektion der hybridisierten Riboproben

Zur Detektion der hybridisierten Riboproben wurden die Schnitte 30 Minuten in einem Blocking-Medium (1% Boehringer Blocking Reagenz, 0,5% bovines Serumalbumin in 100mM Tris-HCl [pH 7,5]/150 mM NaCl gelöst) inkubiert. Anschließend wurden sie mit einem alkalisch Phosphatase-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper (Boehringer; Verdünnung 1:500 in Blocking-Medium) beschichtet. Nach einer 120-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttler wurden die Schnitte für 12 Stunden bei 4° C in einer feuchten Kammer gelagert. Die enzymatische Farbentwicklung der Schnitte wurde unter Verwendung eines Entwicklungspuffers nach Boehringer, bestehend aus Nitroblue Tetrazolium und 5-Bromo-4-

Chloro-3-Indolyl-Phosphat als Enzymsubstrate, sowie Levamisol [SIGMA] zur Hemmung endogener Phosphatasen (Ph 9,5) unter Lichtabschluss in einer feuchten Kammer bei 4°C durchgeführt. Für alle Versuchsgruppen wurde die Farbreaktion nach 6 Stunden für die Hybridisierung mit der Renin-Sonde abgestoppt. Dies erfolgte durch zweimaliges Waschen im Abstopp-Puffer (100mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) PBS für je 15 Minuten und anschließend durch zwei weitere Waschschrte in PBS für je 15 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte mit 50% Glycerin (MERCK)/PBS gegen Austrocknung geschützt und an einem Leica-DMRB-Mikroskop mit Interferenzkontrastlicht ausgewertet {259, 260, 62, 82, 257}.

3.3.4 Objektträger-Behandlung

3.3.4.1 Chromgelatine-Objektträger

Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte bei der Diaphorase-Reaktion und bei der immunhistochemischen Behandlung erfolgte die Beschichtung der Objektträger mit Chromgelatine. Hierzu wurden die Objektträger zunächst für je zehn Minuten in Aceton und danach in 95% vergälltem Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und für zehn Minuten mit Chromgelatine, bestehend aus 0,5% Gelatine und 0,005% Kalium-Chrom-III-Sulphat, überschichtet. Es folgte das zweimalige Waschen der Objektträger in Aqua dest für je zwei Minuten. Die fertigen Objektträger wurden für 12 Stunden bei 40 °C getrocknet {259, 260, 62, 82, 257}.

3.3.4.2 Silanisierung der Objektträger

Um ein Abspülen der Gewebeschnitte während der In-situ-Hybridisierung zu verhindern, kamen ausschliesslich silanierte Objektträger zur Verwendung. Hierzu mußten die Objektträger zunächst 10 Minuten in Aceton und anschliessend 10 Minuten in 96% vergälltem Ethanol gewaschen und dann luftgetrocknet werden. Es folgte die 12-stündige Überschichtung mit 1% Aminopropyltriethoxysilan in Aqua dest [SIGMA, pH 3,45] bei 70° C. Nach Abspülen des Aminopropyltriethoxysilan mit deionisiertem Wasser wurden die Objektträger für 12 Stunden bei 100° C getrocknet. Es folgte die 30 minütige Inkubation der Objektträger in 10% Glutaraldehyd bei Raumtemperatur. Nach sechsmaligem Waschen in deionisiertem Wasser für je zwei Minuten wurden die Objektträger für 10 Minuten mit 0,1 M Natrium-Metaperjodat

überschichtet. Nach einem erneuten Waschschrift (sechsmal 2 Minuten in deionisiertem Wasser) wurden die Objektträger luftgetrocknet {259, 260, 62, 82, 257}.

3.3.4.3 Silanisierung der Deckgläschen

Um eine Absorption der markierten Sonden an das Glas des Deckgläschens zu verhindern, wurden diese silanisiert. Hierzu wurden die Deckgläschen für 30 Sekunden in Sigmakote gelegt und anschliessend 10 Minuten in Aqua dest und 5 Sekunden in 96% unvergälltem Ethanol gewaschen. Es folgte die Trocknung der Deckgläschen bei 80° C für 12 Stunden {259, 260, 62, 82, 257}.

3.4 Plasma-Renin-Aktivität

Renin setzt aus dem Substrat Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I frei. Die Plasma Renin Aktivität wurde deshalb indirekt über die Menge des pro Zeiteinheit gebildeten Angiotensin I bestimmt. Der Nachweis erfolgte radioimmunologisch mit einem kommerziell erhältlichen RenCTK von Sorin Diagnostics Deutschland. Für die Bestimmungen wurden dazu 40-90µl Plasma benötigt.

3.5 Auswertungen

3.5.1 Quantitative Auswertung der Hämodynamik:

3.5.1.1 Druck in der Aorta abdominalis

Aus dem Telemetrie-Signal des Senders in der Aorta abdominalis wurde zum einen ein Mittelwert für den Ruheblutdruck der Ratte während der letzten Stunde unmittelbar vor Versuchsbeginn gebildet. Zum anderen wurde der Mittelwert der Blutdrucksignale während der 24stündigen Regelphase errechnet. Um die Erhöhung der Blutdruckvariabilität bei den Sinuswellenversuchen zu messen, wurde mit den Messwerten der ersten Versuchsstunde eine Fast Fourier Transformation (FFT) durchgeführt. Um Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen des Ateria-carotis-Katheters herzustellen, wurde eine weitere FFT durchgeführt, wobei aber nur jeder zehnte Messwert verwendet wurde {238, 259}.

3.5.1.2. Druck in der Arteria carotis communis

Aus dem Signal des Katheters in der Arteria carotis wurde jeweils der Mittelwert der ersten und der letzten Stunde des Versuches berechnet. Zur Berechnung der Druckanstiegsgeschwindigkeit während der ersten und letzten Versuchsstunde wurden aus den Blutdrucksignalen Ein-Minuten-Mittelwerte gebildet. Aus den gegen die Zeit aufgetragenen Mittelwerten wurde durch eine lineare Regression die mittlere Druckanstiegsgeschwindigkeit berechnet. Ferner wurde mit den Signalen der ersten Versuchsstunde der Sinuswellenversuche und der entsprechenden statischen Drucksenkungen eine FFT durchgeführt. Aus den Signalen der Herzfrequenzen wurde der Mittelwert für die erste und letzte Versuchsstunde berechnet {261, 262}.

3.5.2 Quantitative Auswertung der mRNA-Bestimmung

Die (semi)quantitative Auswertung der Northern-Blots wurde durch erfolgte durch densitometrische Erfassung und Vermessung der Banden (Hamamatsu Imaging System, Scan Pack). Dazu wurde zunächst die Intensität jeder Bande der Membran bestimmt und die Hintergrundaktivität subtrahiert. Die Zuordnung der Banden zu den jeweiligen Sonden wurde durch Vergleich der Lokalisation auf der Membran vorgenommen. Um eine möglichst weitgehende Standardisierung zu erreichen wurde die Intensität jeder Bande auf die Aktivität der β -Aktinbande der gleichen Probe bezogen. Die Interassayvariabilität wurde durch die Verwendung des auf jeder Membran mitlaufenden internen Standards korrigiert{255}.

3.5.3 Statistik

Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden signifikant genannt wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p unter fünf Prozent lag. Zur Ermittlung der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde in der Regel ein ANOVA und anschließend der zweiseitige Student-t-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Stichproben verwendet (entsprechend der Zusammensetzung der untersuchten Stichproben). Mehrgruppenvergleiche wurden unter Anwendung einer Testung nach Student-Newman-Keuls untersucht.

3.5.4 Fast Fourier Transformation

Die Spektralanalyse der Blutdruckdaten wurde auf der Grundlage der digitalisierten Messwerte durchgeführt. Die Digitalisierung erlaubt die reproduzierbare, versuchsunabhängige Analyse und

mathematische Bearbeitung der erfassten Daten hat aber den Nachteil, dass das stetige Signal durch die Abtastung in eine Reihe zeitlich äquidistanter Messwerte überführt wird. Da kommerziell erhältliche Programme eine Spektralanalyse mit den zur Beantwortung der physiologischen Fragestellungen nötigen Datenmengen nicht durchführen konnten, wurden die entsprechenden Routinen unter Nutzung eines linearen 4GB Speichermodells selbst implementiert. Der verwendete Algorithmus für die Fourier Analyse basiert dabei auf einer Modifikation des Verfahrens, welches durch J. W. Cooley und J. W. Tookey bekannt wurde. Der Vorteil dieser Berechnungsmethode liegt darin, dass es sich um einen Algorithmus der Ordnung $N \log_2(N)$ handelt. Bei den hier verwendeten Datenmengen ist dieser Algorithmus fast 8000x schneller als übliche N^2 - Algorithmen der FFT. Ein Nachteil besteht darin, dass es sich um einen Radix-2-Algorithmus handelt weshalb die Länge der Versuchsphasen immer so gewählt werden musste, dass jede Phase aus 2^n ($n \in \mathbb{N}$) Messwerten bestand.

3.5.5 Semiquantitative Auswertung der Histochemie

Das Auszählen der Gewebsschnitte erfolgte für In-situ-Hybridisierung, Immunhistochemie und NADPH-Diaphorase-Reaktion nach dem gleichen Prinzip. Je Niere wurden mindestens vier Schnitte, die jeweils kortikale und medulläre Areale aufwiesen beurteilt. Auf jedem Schnitt befanden sich ca. 150- 200 Glomeruli so dass die Auswertung der Signale an der Macula densa auf ca. 600-800 Glomeruli bzw. ca. 4000 Macula densa Zellen pro Niere basiert.

Für die näherungsweise Bestimmung der Menge an produziertem Renin bzw. der produzierten Renin-mRNA wurden an jedem Schnitt die Renin-positiven Stellen am juxtaglomerulären Apparat und an den periglomerulären Blutgefäßen ausgezählt. Diese Auszählmethode beruht auf der Tatsache, dass die Reninproduktion bei einer Stimulation des Systems entlang der afferenten Arteriole ausgeweitet wird. Diese Ausweitung der Renin-produzierenden Abschnitte der afferenten Arteriole korrespondiert gut mit der Menge an in der Niere produziertem Renin und den Plasma-Renin-Spiegeln. So kann von einer größeren Anzahl von Renin-positiven Stellen pro 100 Glomerula indirekt auf eine Stimulation des Renin-Systems geschlossen werden. Die Farbintensität des einzelnen zellulären Signals konnte hierbei nicht berücksichtigt werden, da das Signal für Renin bereits im Ruhezustand des Systems relativ kräftig ausgeprägt ist. Deswegen ist es möglich, dass geringfügige Änderungen im Aktivitätszustand des Systems mit dieser Methode nicht erfasst worden sind {82}.

Für die Bestimmung der Diaphoraseaktivität wurde die Anzahl der Stickstoff-Monoxyd-Synthase (Isoform II) positiven Zellen pro Schnitt ausgezählt. Hierbei wurde angenommen, dass im Ruhezustand des Systems nicht alle Zellen der Macula Densa ein Signal oberhalb der Nachweisgrenze für Stickstoff-Monoxyd-Synthase (Isoform II) besitzen. Im Falle einer Stimulierung des Systems werden diese zuvor negativen Zellen durch eine erhöhte Enzymaktivität im Sinne der Nachweisreaktion positiv. So konnte davon ausgegangen werden, dass eine erhöhte Anzahl von positiven Zellen pro Schnitt auch einen erhöhten Aktivitätszustand des Systems widerspiegelt. Da an verschiedenen Tierspezies bereits gezeigt werden konnte, dass es sich bei der Diaphoraseaktivität in den Zellen der Macula Densa um die Stickstoff-Monoxyd-Synthase (Isoform II) handelt, wurde eine Änderung der Diaphoraseaktivität in der Macula Densa der Isoform II der Stickstoff-Monoxyd-Synthase zugeschrieben. {62, 82, 257}.