

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Radionukleotide

Substanz	Firma
[γ - ³² P]dATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, wässrige Lösung)	Amersham
10x PCR-Puffer	Rapidozym, Promega
10x TBE (Tris-Borat-EDTA-Lösung)	Gibco BRL
Aceton	Baker
Acrylease	Stratagene
Agarose	Roth
Albumin, Rat; Polyclonal Antibody, Anti-Rat	ICN
Ammoniumpersulfat	Sigma
Bromphenolblau, Natriumsalz	Merck
Chloroform	Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
Diethylmalonsäure (98 %, w/w)	Aldrich
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat (Titrierkomplex III, MG=372,24)	Roth
dNTP's (2,5 mM)	Rapidozym, Promega
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth
Esketaminhydrochlorid (Ketanest®S) 25 mg/ml	Pfizer
Essigsäure (100 %)	Merck, Roth
Ethanol (100 %)	J.T. Baker
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Merck
Formaldehyd (37 %, v/v)	J.T. Baker
Formamid	Merck
Gelatine (75 bloom)	Sigma
Glycerin	Roth
Harnstoff	Roth
Isopropanol	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kinase-10x-Puffer	Promega
Magnesiumchlorid (50 mM)	Rapidozym
Methanol	J.T. Baker
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Aldrich
Primer und Sonden	Tib Molbiol, Genset Oligos
Rattenserum-Albumin (RSA)	Sigma
Rotiphorese (40 % Acrylamid, 2 % Bisacrylamid)	Roth
Salzsäure (37 %, v/v)	Merck
Schwefelsäure (96 %, v/v)	Merck
SDS (Lauryl Sulfate)	Sigma

Substanz	Firma
TaqMan 2x Universal PCR MasterMix	Applied Biosystems
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin)	Sigma
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid (TMB-) Tabletten	Sigma
Trizma Base (MG=121,1)	Sigma
Trizol	Gibco BRL
Tween 20	BioRad, Sigma, Roth
Wasserstoffperoxid (30 %, v/v)	Sigma
Xylazinhydrochlorid (Rompun®) 2 %	Bayer
Xylen Cyanol FF	Sigma

2.1.2. Enzyme

	Enzym	Aktivität	Firma
Kinasen	T4-Polynukleotidkinase	5 U/µl	Promega
Polymerasen	Taq-Polymerase	5 U/µl	Rapidozym, Promega
Endoproteasen	Proteinase K	34 U/mg	Sigma

2.1.3. Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteile	Konzentration
Coating solution	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	0,2 mg/ml 0,1 M
Formamid-Laufpuffer	Bromphenolblau Xylen Cyanol FF Formamid Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	1 % (w/v) 1 % (w/v) 10 % (v/v) 0,5 M
10x Laufpuffer	Glycerin Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat Bromphenolblau Xylen Cyanol FF	50 % 10,0 mM, pH 7,0 0,25 % (w/v) 0,25 % (w/v)
Lysis-Puffer	Trizma Base Di-Natrium-EDTA-Dihydrat Natriumchlorid SDS	50 mM, pH 8,0 100 mM, pH 8,0 100 mM 1 % (w/v)
Methacarn	Methanol Chloroform Essigsäure	60 % 30 % 10 %
Polyacrylamidgel-Lösung	Harnstoff 10x TBE Rotiphorese (40 % Acrylamid) Aqua bidest.	31,5 g 7,0 ml 10,5 ml 27,0 ml
Puffer A	Diethylmalonsäure Natriumchlorid	20,0 mM 150,0 mM

Puffer/Lösung	Bestandteile	Konzentration
	Di-Natrium-EDTA-Dihydrat Tween 20 Gelatine Aqua bidest.	0,1 mM, pH 8,0 0,1 % (w/v) 5 g ad 1 l, pH 7,4
Rattenserum-Albumin-Stock-Lösung	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	1,0 mg/ml 0,1 M
Substrat	3,3',5,5'TMB Aqua bidest. Puffer A Wasserstoffperoxid 30 % (v/v)	2 Tabletten 10 ml 10 ml 4 µl
50x TAE	Trizma Base Essigsäure 100 % Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	2,0 M 5,71 % (v/v) 50,0 mM

2.1.4. Primer und Sonden für die TaqMan-PCR

Gene	Name	Sequenz
Kollagen III	Coll3-F	TGTTAACGGACAAATAGAGAGTCTTATCAG
	Coll3-R	CATCTTGCAGCCTTGGTTAGG
	Coll3 Sonde	FAM-TTCTGCCACCCTGAACTCAAGAGCG-TAMRA
PBGD	PBGD-F	TGAAAACCTTGTACCCTGGCATA
	PBGD-R	TCCAATCTTAGAGAGTGCAGTATCAAGA
	PBGD Sonde	FAM-TTGAAATCATTGCTATGTCCACCACAGG-TAMRA

2.1.5. Sonstige Materialien und Futtermittel

Artikel	Firma
96-well Optical Reaction Plates	Applied Biosystems
Bildanalyseprogramm Scion Image 1.62a	Scion Co.
BioMax MR-1-Röntgenfilme (35 x 43)	Kodak
Edelstahlklemmen	Peq Lab
Einmal-Filterhalter, steril, 0,2 µm	Schleicher & Schuell
Gel-Blotting-Papier GB 002	Schleicher & Schuell
Glasplatten für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse (Normalfutter)	Altromin
Haifischzahnkamm Mikrotiterformat, für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Lochzange für Labortiere	Esculap
Makrolonkäfige Typ III und Typ IV	Ebeco
Mehrkanalspritze (8-Kanal; 0-10 µl)	Hamilton
Multipipette plus	Eppendorf
Objekträger	Menzel-Gläser
Optical Adhesive Cover	Applied Biosystems
Optical Cover Compression Pads	Applied Biosystems

Artikel	Firma
Paketklebeband	Tesa
PCR-Tubes 0,2 ml	Biozym
Polystyrene Immulon microplates, flat-bottomed, Immunosorp Maxisorp, F96	Nunc
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Restrainer	Werkstatt UKBF
Röntgenkassetten Typ G, 35 x 43 cm	Peq Lab
Schweißfolie	GENETIX
Spacer für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Standardpipetten	Eppendorf
Standardtips 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Stoffwechselkäfige für Ratten bis 300 g	Ehret
Szintillationsgefäße aus Glas (für die Histologie)	Packard
Szintillationsgefäße aus Kunststoff	Packard
Thermo-Fast 96-Mikrotiterplatten (ohne Rand)	ABgene
Tube 50 ml	Sarstedt
Verpackungsfolie	Saran
Weithalsflaschen aus Polyethylen	Roth

2.1.6. Geräte

Gerät	Firma
ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Agarose-Gelkammer	Bio-Rad
Analysen-Waage BP 610	Sartorius
Automat für die Filmentwicklung X-OMAT 5000 RA	Kodak
Blutdruckmessgerät	TSE
Färbeautomat Robet-Stainer HM 760	Microm
Folienschweißgerät	MDC
Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech
Magnetrührer mit Heizfunktion MR 2002	Heidolph
Mikrotiterplattenschüttler	Roth
PCR-Cycler	MJ Research
pH-Meter	Knick
Photometer UV-1202	Shimadzu
Photomikroskop Axiophot	Carl Zeiss, Oberkochen
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer	Peq Lab
Rotationsmikrotom HM 355	Microm
Stromversorgungsgerät für die Elektrophoresekammer	Biometra
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Trockenschrank	Heraeus Instruments
Ultra Turrax T25	Janke & Kunkell

2.2. Methoden

2.2.1. Haltung

Die Haltung und Zucht der für diese Arbeit verwendeten Rattenstämme erfolgte in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM / FU Berlin) in Absprache mit dem Institut für Klinische Pharmakologie der Charité, CBF in Berlin. Bis zu vier Tiere waren jeweils nach Geschlecht getrennt in Makrolonkäfigen des Typs IV untergebracht. Zu Paarungszwecken wurden sie in Makrolonkäfigen des Typs III gehalten. Die Tiere erhielten freien Zugang zu Futter und Wasser. Über eine Klimaanlage wurde eine konstante Temperatur von 22°C gewährleistet, sowie über automatisierte Lichtschalter ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus geregelt.

Im Alter von ca. vier Wochen wurden die Jungtiere von den Elterntieren abgesetzt und erhielten mit einer Lochzange eine Ohrmarkierung, die einer fortlaufenden systematischen Nummerierung entsprach.

2.2.2. Zucht

2.2.2.1. Parentaltiere MWF und SHR

Im Jahr 1996 wurden am Universitätsklinikum Benjamin Franklin (UKBF), Freie Universität Berlin (FU) durch Inzucht MWF_{Fub} (MWF)-Ratten etabliert (Kreutz et al., 2000), die aus der ursprünglichen Kolonie des Zentralen Tierlaboratoriums der Medizinischen Hochschule in Hannover stammten. Der Stamm wurde in MWF_{Rkb} umbenannt.

Die SHR_{Rkb} (SHR)-Ratten stammen aus der Zucht der SHR/Mol-Ratten von M&B, Bomholtvej, Dänemark. 1997 wurde der SHR/Mol-Stamm in Berlin an der FU eingeführt.

Beide Parentaltierstämme, MWF und SHR, sind sogenannte Inzuchtstämme, die durch konsequente Bruder-Schwester-Verpaarungen über mehr als 20 Generationen ingezüchtet wurden. Die Erhaltungszucht der MWF_{Rkb} - und SHR_{Rkb} -Ratten erfolgt an der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

2.2.2.2. Konsomer Stamm $MWF-6^{SHR}$

Der konsome Stamm $MWF-6^{SHR}$ wurde im Jahr 2005 am Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin etabliert (Schulz et al., 2006). Mit Hilfe eines Marker-unterstützten Selektions-Protokolls wurde das Chromosom 6 vom SHR-Stamm in den isogenetischen Hintergrund des MWF-Stammes übertragen.

2.2.2.2.1. Prinzip der Züchtung konsomer Rattenstämme

Die Züchtung konsomer oder kongener Stämme zur Übertragung von Chromosomen, Chromosomenabschnitten oder einzelnen Genen zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen zählt gegenwärtig zu den Standardverfahren für die Untersuchung des Einflusses eines QTL auf eine polygenetische Erkrankung bzw. für die Identifizierung der Kandidatengene. Das Zuchtprotokoll sieht nach der Bildung einer heterozygoten F1-Generation aus Spender- und Empfängerstamm eine Backcross-Kaskade mit Tieren des Empfängerstammes vor, bei der die Nachkommen mit dem gewünschten Spender-Chromosom oder -Chromosomenabschnitt in heterozygoter Form weiter verpaart werden. Bei der so genannten „speed congenics“ - Methode handelt es sich um ein Marker-unterstütztes Selektionsprotokoll, welches eine Verkürzung der Zeitspanne zur Etablierung eines kongenen Stammes über eine Reduktion der Backcross-Generationen von bisher 8 bis 10 auf 4 bis 8 ermöglicht. Es basiert auf der genomweiten Analyse von genetischen Polymorphismen, welche Spender- und Empfängerstamm voneinander unterscheiden und auf der natürlichen genetischen Varianz hinsichtlich der Heterozygotie in jeder Backcross-Population. Zur Weiterzucht werden speziell die Tiere selektiert, die den zu übertragenden genetischen Abschnitt tragen und zusätzlich den niedrigsten Grad an Heterozygotie für den Empfängerstamm im übrigen Genom aufweisen (Markel et al., 1997). Bei jeder Rückkreuzung mit dem Empfängerstamm nimmt der prozentuale Anteil des Empfängergenoms am Gesamtgenom zu, und wenn der genetische Hintergrund zu mehr als 99 % dem des Empfängerstammes entspricht mit Ausnahme des transferierten Chromosoms oder Chromosomenabschnittes, wird durch anschließende Bruder-Schwester-Verpaarungen im Intercross der kongene oder konsome Stamm generiert, welcher homozygot für den Spenderstamm im übertragenen Bereich und homozygot für den Empfängerstamm im übrigen Genom ist (Kreutz & Hübner, 2002; Cowley et al., 2004).

2.2.2.2.2. Züchtung des konsomen Stammes MWF-6^{SHR}

Analog zu den Ergebnissen der Kosegregations- und Kopplungsanalyse wurden die Rattenstämme MWF und SHR als Parentaltiere ausgewählt, wobei der SHR-Stamm als Spender- und der MWF-Stamm als Empfängerstamm fungierte. Ein SHR-Weibchen wurde zum Erhalt einer F1-Generation mit einem MWF-Männchen verpaart, um das Y Chromosom von MWF in allen männlichen Nachkommen zu fixieren. Für die erste Backcross-Generation wurde ein beliebiges F1-Männchen mit 4 MWF-Weibchen zurückgekreuzt (Abb. 4).

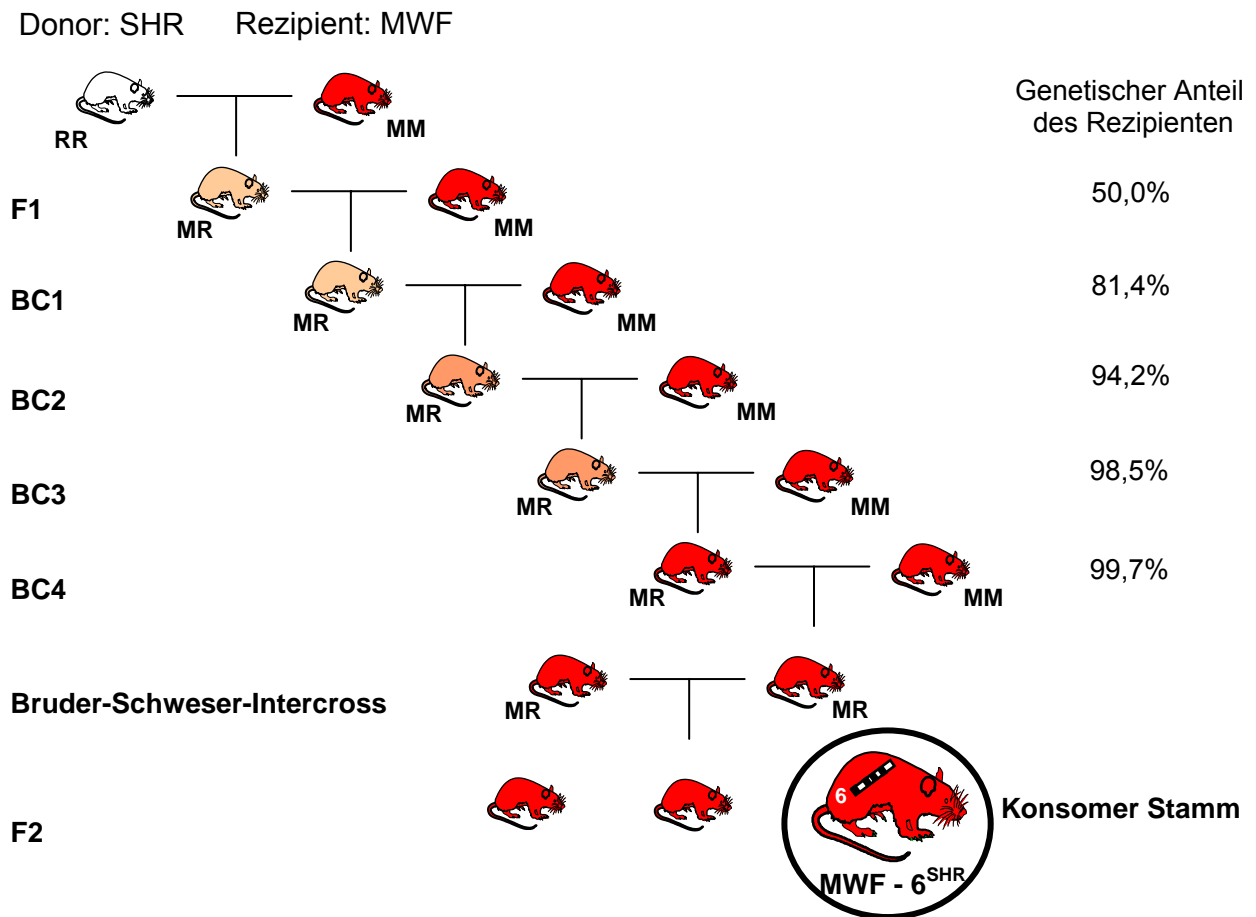


Abb. 4: Schematische Darstellung der Zucht des konsomen Stammes MWF-6^{SHR} nach der „speed congenics“ – Methode.

M = MWF-Allel; R = SHR-Allel; F = Filialgeneration; BC = Backcross-Generation.

Die aus den Schwanzspitzen isolierte DNA der männlichen Nachkommen dieser Verpaarung wurde mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern im 10 cM-Abstand auf das zu übertragende Chromosom 6 untersucht. Bei den Tieren, die das Chromosom 6 in heterozygoter Form aufwiesen, wurde anschließend das gesamte Genom getestet und das Männchen mit dem höchsten Grad an Homozygotie für den MWF-Stamm im übrigen Genom zur weiteren Zucht ausgewählt. Bei den folgenden Backcross-Generationen wurde nach dem gleichen Schema verfahren, wobei sich die Testung des genetischen Hintergrundes auf die bisher heterozygot gebliebenen Marker beschränkte. Nach 7 Backcross-Generationen wiesen ein Männchen und ein Weibchen neben dem komplett heterozygoten Chromosom 6 einen für MWF homozygoten genetischen Hintergrund auf und wurden im Intercross zur Generierung eines für SHR homozygoten Chromosoms 6 miteinander verpaart. In der vorliegenden Arbeit wurde die aus dieser Verpaarung hervorgegangenen Nachkommen mit dem für SHR homozygoten

Chromosom 6 einer erneuten vollständigen genetischen Testung unterzogen. Durch anschließende Bruder-Schwester-Verpaarungen der entsprechenden Tiere wurde der konsome Stamm MWF-6^{SHR} etabliert.

2.2.2.3. (MWF-6^{SHR} x MWF)-F1-Generation

Nach der Etablierung des konsomen Stammes MWF-6^{SHR} wurde durch die Verpaarung von MWF-6^{SHR}- und MWF-Ratten eine F1-Generation gezüchtet, die bei einem isogenetischen MWF-Hintergrund ein für das SHR- und MWF-Allel heterozygotes Chromosom 6 aufweist.

2.2.3. Versuchsprotokoll

Für die Charakterisierung des konsomen Stammes MWF-6^{SHR} im Vergleich zu den Parentaltierstämmen MWF und SHR wurde eine Verlaufsstudie durchgeführt (Genehmigungsnummer G 0089/04). Jeweils 10 männliche und weibliche SHR-Ratten wurden bis zur 24. Woche gezüchtet. Die Hälfte der 18 Männchen und Weibchen der Stämme MWF und MWF-6^{SHR} wurde bis zur 24. Woche, die andere Hälfte der Tiere bis zur 32. Woche gezüchtet. Zur Beurteilung des altersabhängigen Albuminurieverlaufs und für biochemische Analysen wurde der 24-h-Urin in der 4., 8., 12., 14., 18., 24. und 32. Woche gesammelt. In der 14. und in der 24. Woche wurde bei allen Tieren der systolische Blutdruck bestimmt. Zum Ende der Verlaufsstudie wurden die Tiere zur Gewebs- und Organentnahme präpariert.

2.2.4. Phänotypische Charakterisierung

2.2.4.1. Systolische Blutdruckmessung

Der systolische Blutdruck wurde an wachen Tieren mit einer nicht-invasiven Tailcuff-Methode bestimmt. Für die Messung wurde eine automatisierte, computergestützte, oszillatorische Technik verwendet (TSE, Bad Homburg). Zur Ruhigstellung wurden die Tiere in eine Plexiglas-Röhre gesetzt. In diesen so genannten Restrainern wurden die Tiere in eine zur Muskelentspannung auf 37-39°C temperierte Box gebracht. Die Blutdruckmessung erfolgte über eine Blutdruckmanschette, die an der Schwanzwurzel der Tiere angelegt wurde. Beim Aufpumpen der Manschette wurde der Druck registriert, der die Pulsation der Schwanzarterie verhinderte, sowie der Druck, der beim Ablassen der Manschette wieder den normalen Blutfluß zuließ. Diese beiden Werte wurden jeweils gemittelt.

Zur Gewöhnung der Tiere an diesen Messvorgang wurden zwei bis drei Probemessungen durchgeführt, deren Ergebnis anschließend verworfen wurde. Nach der Adaptation der Tiere wurde der systolische Blutdruck durch jeweils drei Messungen an drei aufeinander folgenden Tagen unter Berücksichtigung zirkadianer Rhythmen zu ähnlichen Zeitpunkten ermittelt. Die Daten der Blutdruckmessung wurden auf einen Computer übertragen und die Werte im Anschluss gemittelt.

2.2.4.2. Urinuntersuchungen

2.2.4.2.1. Uringewinnung

Zur Bestimmung verschiedener Stoffwechselfparameter wurde der 24-h-Urin entsprechend dem Versuchsprotokoll unter gleichen Haltungsbedingungen gesammelt. Dafür wurden die Tiere jeweils einzeln für 24 Stunden in einen Stoffwechselfkäfig gesetzt, in dem sie weiterhin freien Zugang zu Futter und Wasser hatten. Das Volumen des durch die Apparatur aufgefangenen 24-h-Urins wurde durch Auswiegen bestimmt ($1 \text{ ml} \cong 1 \text{ g}$). Der Urin wurde aus Polyethylen-Weithalsflaschen in Szintillationsgefäße aus Kunststoff dekantiert. Dabei war die Wahl des Gefäßmaterials bedeutsam, um die spätere Albuminbestimmung durch Albuminablagerungen an bestimmten Kunststoff- oder Glasmaterialien nicht falsch negativ zu beeinflussen. Für die Albuminbestimmung wurde nach sorgfältigem Durchmischen ca. 1,5 ml Urin in ein Eppendorfgefäß dekantiert und zur Entfernung von mechanischen und bakteriellen Verunreinigungen bei 900 Upm für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der restliche Urin wurde im Szintillationsgefäß aus Kunststoff bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4.2.2. Messung der Albuminurie

Die Bestimmung der Albuminkonzentration im 24-h-Urin erfolgte mit einer in der Arbeitsgruppe etablierten, direkten kompetitiven ELISA-Technik (Kreutz et al., 2000; Schulz, 2002).

Zunächst wurde eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit 100 μl Coating-Solution pro Loch beschichtet und für 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank und anschließend über Nacht bei 4°C in Verpackungsfolie eingeschlagen inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit jeweils 100 μl Puffer A pro Loch für 3 x 4 min bei 600 Upm auf einem Mikrotiterplattenschüttler gewaschen. Der Platteninhalt wurde nach jedem Waschvorgang verworfen.

Zur Erstellung einer Eichgeraden für die Albuminbestimmung wurden folgende mit Puffer A verdünnte Standardkonzentrationen einer Rattenserum-Albumin-Stock-Lösung angesetzt: 0,00 mg/l, 0,03 mg/l, 0,05 mg/l, 0,07 mg/l, 0,10 mg/l, 0,20 mg/l, 0,30 mg/l, 0,40 mg/l, 0,60 mg/l, 0,80 mg/l und 1,00 mg/l. Durch aufeinander folgende Verdünnungsschritte wurden 40 μl der Urinproben in Konzentrationen von 1:50, 1:500, 1:5000 und 1:20000 mit Puffer A verdünnt.

In jede Mikrotiterplatte wurden 50 µl Puffer A als Leerwert und 50 µl der Standard- sowie der Probenverdünnungen jeweils als Doppelbestimmungen nach einem bestimmten Schema pipettiert. Danach wurden 50 µl Konjugat (Rattentkörper 1:9000 mit Puffer A verdünnt) pro Loch zugegeben, wobei das Rattenserumalbumin der Wandbeschichtung und das Albumin der zugegebenen Proben um die Bindungsstellen des Antikörpers konkurrieren. Nach der Inkubation der Mikrotiterplatte für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank wurde der Platteninhalt durch Ausklopfen auf Papiertüchern verworfen und die Platte für 4 x 4 min mit 100 µl Puffer A pro Loch gewaschen. Für die blaue Farbreaktion, die die verbliebenen randfixierten Antigen/Antikörper-Komplexe detektiert, wurden 200 µl Substratlösung in jedes Loch pipettiert und die Platte für 15 min bei 600 Upm auf dem Mikrotiterplattenschüttler inkubiert. Aufgrund der Inversreaktion zeigt eine schwache Blaufärbung höhere und eine starke Blaufärbung niedrigere Albuminkonzentrationen der Proben an. Die Reaktion wurde mit 50 µl einer 2 M Schwefelsäure pro Loch unter Bildung eines gelben Farbkomplexes abgestoppt. Mit Hilfe eines ELISA-MRX-Plate-Readers wurden die Extinktionen bei 450 nm gemessen und mit dem Computerprogramm Dynex Revelation G3.04 wurden die Albuminwerte in mg/l errechnet. Die Umrechnung der Albuminwerte in mg/24h erfolgte unter Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnungsstufe und des Gesamtvolumens des 24-h-Urins.

2.2.4.2.3. Biochemische Analysen

Aus dem 24-h-Urin wurde die Albumin- und die Kreatininausscheidung ermittelt. Kreatinin wurde im Serum gemessen und anschließend die Kreatinin-Clearance berechnet. Des Weiteren wurden aus dem Serum Harnstoff, Gesamtcholesterin, HDL, LDL und Triglyceride bestimmt. Die Messung der Albuminausscheidung erfolgte nach der oben beschriebenen Methode im eigenen Labor. Die übrigen klinischen Parameter wurden über Standardmethoden in einem externen Labor (Labor 28, Mecklenburgische Straße 28, 14197 Berlin) bestimmt.

2.2.4.3. Präparation

2.2.4.3.1. Narkose

Dem Versuchsprotokoll entsprechend wurden die Tiere im Alter von 24 und 32 Wochen präpariert. Für die Narkose wurden gewichtsadaptiert S-(+)-Ketamin und Xylazin intraperitoneal injiziert (26G-Kanüle). In einer Dosierung von 87 mg/kg KG S-(+)-Ketamin und 13 mg/kg KG Xylazin wurde sicher und nebenwirkungsarm ein tiefer Narkosezustand erreicht.

2.2.4.3.2. Organentnahme

Nach dem Erlöschen der Reaktion auf gezielte Schmerzreize wurde das Abdomen mit einem Medianschnitt eröffnet. Über eine (20G-) Kanüle wurde Blut aus der Aorta abdominalis

entnommen und sofort zur Gewinnung von Serum in ein Eppendorfgesäß überführt. Danach wurde der Thorax eröffnet, das Herz entnommen und in eine kardioplegische 1 molare Kaliumchloridlösung gelegt. Anschließend erfolgte die Entnahme beider Nieren, die nach Entfernung der Nierenkapsel gewogen wurden. Die rechte Niere wurde am Nierenhilus transversal in zwei Hälften geschnitten. Eine Hälfte wurde für die histologischen Untersuchungen zur Fixierung in ein mit Methacarn gefülltes Szintillationsgefäß aus Glas gegeben. Die andere Nierenhälfte wurde schockgefroren. Das Herz wurde gewogen und dann durch Präparation der rechte Ventrikel vom linken Ventrikel und Septum getrennt. Vor dem Einfrieren wurde von beiden Ventrikeln nochmals separat das Gewicht bestimmt. Alle Gewebe und Organe wurden nach der Schockfrierung bei -80°C gelagert.

2.2.4.3.3. Gewebe- und Organaufbereitung

Im Anschluss an die Präparation wurde das Blut für 15 min bei 4°C und 6.000 Upm zentrifugiert und der vorsichtig abpipettierte Überstand (Serum) schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Nierenhälften für die Histologie wurden über 24 Stunden lichtgeschützt in Methacarn fixiert. Danach wurde das Fixativ durch 80 %igen Ethanol ausgetauscht, worin die Nieren bis zur Einbettung in Paraffin gelagert wurden.

2.2.4.4. Histologie

2.2.4.4.1. Anfertigung der Nierenschnitte

Von den für die Histologie in Methacarn fixierten und in 80%igem Ethanol gelagerten Nieren wurden nach Entwässerung und anschließender Paraffineinbettung standardisierte $3\ \mu\text{m}$ dicke transversale Schnitte mit einem Rotationsmikrotom angefertigt. Es wurden jeweils 8 Schnitte in Serie auf 3 Objektträger aufgebracht und bei 37°C getrocknet. Die Färbung der Schnitte nach Hämatoxylin-Eosin (HE), „Periodic Acid Schiff“ (PAS) und Sirius-Rot erfolgte standardisiert in einem Färbeautomaten. Im Anschluss wurden die Nierenschnitte für die Auswertung systematisch geblindet.

2.2.4.4.2. Oberflächliche Glomeruli

Die mit HE gefärbten Nierenschnitte wurden lichtmikroskopisch hinsichtlich der Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt ausgewertet. Zu den subkapsulären Glomeruli mit Kapselkontakt wurden alle Glomeruli pro Nierenschnitt gezählt, deren Bowman'sche Kapsel einen direkten Kontakt zur Nierenkapsel aufwies. Als subkapsuläre Glomeruli ohne Kapselkontakt wurden diejenigen Glomeruli definiert, die im Cortex corticis unterhalb der Nierenkapsel und innerhalb einer Zone von einem durchschnittlichen

Glomerulidurchmesser lagen. Die Zählung erfolgte in der 40er Vergrößerung an jeweils drei Schnitten pro Niere. Die Ergebnisse wurden anschließend gemittelt.

2.2.4.4.3. Glomeruloskleroseindex

Die semiquantitative Bewertung der Glomerulosklerose wurde mit Hilfe eines Photomikroskops am besten der 8 nach PAS gefärbten Nierenschnitte auf einem Objektträger vorgenommen. Insgesamt 40 superfizielle und juxtamedulläre Glomeruli wurden für den Glomeruloskleroseindex (GSI) bei 200facher Vergrößerung nach einem Score von 0 bis 4 bewertet (Raj et al., 1984). Als Schädigungsparameter bei der Bewertung der Glomeruli wurde die Ablagerung von PAS-positivem Material in das Mesangium und um die Kapillarschlingen mit Verlegung des extrakapillären Raumes befundet. Die Bewertungsskala gab den Grad der pathologischen Veränderungen in Prozent zur Gesamtfläche der Glomeruli an („0“ keine Veränderungen, „0,5“ Veränderungen von weniger als 12 %, „1“ Veränderungen von 12 bis 25 %, „1,5“ Veränderungen von 25 bis 37 %, „2“ Veränderungen von 37 bis 50 %, „2,5“ Veränderungen von 50 bis 62 %, „3“ Veränderungen von 62 bis 75 %, „3,5“ Veränderungen von 75 bis 90 %, „4“ Veränderungen von mehr als 90 %). Aus den 40 Einzelwerten wurde der Mittelwert berechnet.

2.2.4.4.4. Renale interstitielle Fibrose

Die computergestützte Auswertung der renalen interstitiellen Fibrose (RIF) erfolgte an standardisierten Bildausschnitten des äußeren Nierenmarkes der mit Sirius-Rot gefärbten Präparate. Mit Sirius-Rot lässt sich spezifisch Gesamtkollagen anfärben und das Ausmaß der interstitiellen Fibrose ist darüber detektierbar. Für die Quantifizierung der RIF wurden jeweils 10 unterschiedliche Bildausschnitte der oben genannten Region mit einer standardisierten Größe von $301146,94 \mu\text{m}^2$ bei 100facher Vergrößerung mit dem Photomikroskop aufgenommen. Die Bilder wurden digitalisiert und mit Hilfe des Programms Scion Image 1.62a ausgewertet. Die Werte von allen 10 ausgemessenen Bildausschnitten pro Schnitt wurden gemittelt.

2.2.4.4.5. Tubulärer Schädigungsindex

Mit Hilfe eines Photomikroskops erfolgte die semiquantitative Bewertung der tubulären Schädigung im Rinden- und Markbereich am jeweils besten der 8 nach PAS gefärbten Nierenschnitte. Dazu wurde der gesamte Nierenschnitt in 20 Quadranten eingeteilt, welche bei 100facher Vergrößerung nach einem Score von 0 bis 3 bewertet wurden (Raj et al., 1984). Als Parameter für die Schädigung der Tubuli wurden deren Atrophie und Dilatation sowie vorhandene Zylinder betrachtet. Keine Veränderungen im Tubulointerstitium erhielten den Wert „0“, Veränderungen von weniger als 30 % den Wert „1“, Veränderungen zwischen 30 und 60 %

den Wert „2“ und Veränderungen, die mehr als 60 % der Untersuchungsprobe betrafen, erhielten den Wert „3“. Aus den 20 Einzelwerten wurde der Mittelwert gebildet.

2.2.5. Genomanalyse mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker

2.2.5.1. Prinzip der Genomanalyse

Die genotypische Charakterisierung der Ratten wurde unter Analyse von Mikrosatelliten-DNA vorgenommen, die weniger als 1 kB lange Tandemrepeats aus Di-, Tri oder Tetranukleotidmotiven (wie z.B. das $(CA)_n$ -Dinukleotid) darstellen (Abb. 5).

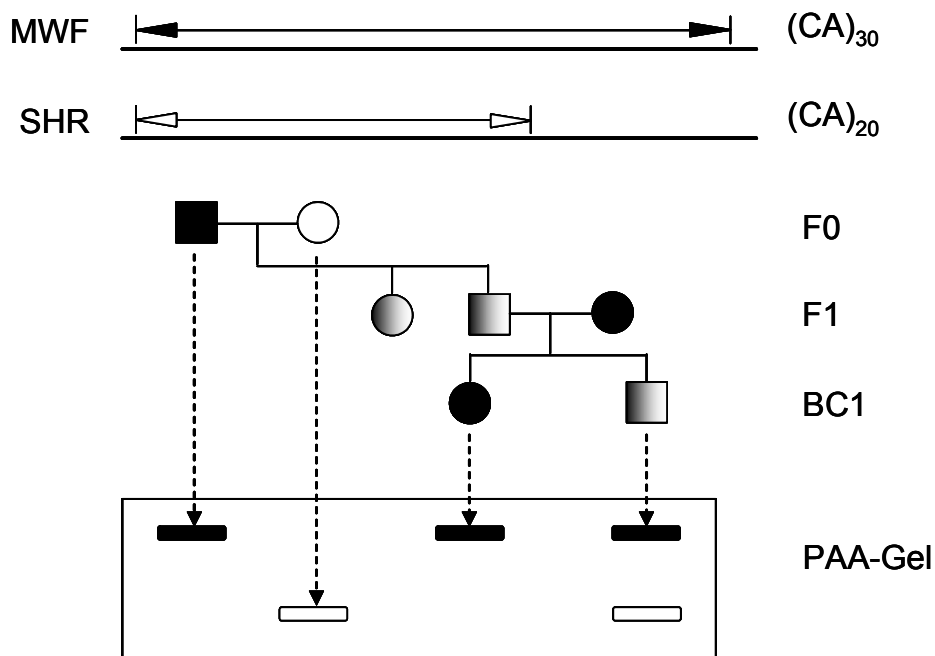


Abb. 5: Prinzip der Genomanalyse mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern.

$(CA)_n$ = CA-Repeat mit stammspezifischer Länge, F0 = Parentalgeneration, F1 = 1. Filialgeneration, BC1 = 1. Backcross-Generation. Homozygotie für das MWF-Allel schwarz, Homozygotie für das SHR-Allel weiß, Heterozygotie für beide Allele grau dargestellt im Zuchtschema. PAA-Gel = Polyacrylamidgel, MWF-Allel = schwarze Bande, SHR-Allel = weiße Bande.

Diese auch als SSR (simple sequence repeats) oder SSLP (simple sequence length polymorphism) bezeichneten DNA-Abschnitte kommen über das gesamte Genom verteilt in hypervariablen, vorwiegend nichtkodierenden Bereichen vor und aufgrund ihrer hohen Längen-

Polymorphismusrate eignen sie sich zur Unterscheidung verschiedener Individuen oder Rattenstämme. Die als polymorph zwischen den Rattenstämmen identifizierten SSR wurden mittels radioaktiv markierten flankierenden Primerpaaren in einer PCR-Reaktion amplifiziert und deren Produkte wurden bei der anschließenden Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Anhand der durch die Autoradiographie auf einem Röntgenbild sichtbar gemachten Bandenmuster der jeweiligen Amplifikate lässt sich die Homo- oder Heterozygotie der Allele nachweisen.

2.2.5.2. Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA wurde ein ca. 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze verwendet, welches den Tieren im Alter von vier Wochen unter CO₂-Narkose im FEM entfernt („Tailcut“) und bei -20°C gelagert wurde. Das Gewebe wurde in 700 µl Lysis-Puffer und 40 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 55°C verdaut. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gekühlt und zur Eiweißfällung und Reinigung 300 µl gesättigte Natriumchlorid-Lösung (6 M) zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden die Proben für 15 min bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgesäß überführt, zur Fällung der DNA mit 1 ml Isopropanol vermischt und für ca. 50 min auf Eis gestellt. Die Proben wurden zum zweiten Mal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70%igem, -20°C kaltem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für 15 min bei RT getrocknet und anschließend mit 200 µl Aqua bidest. aufgenommen. Zum vollständigen Auflösen des Pellets wurden die Proben bei 4°C über Nacht gelagert. Zur Mengen- und Reinheitsbestimmung der gewonnenen DNA wurden die Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 260-280 nm gemessen und die DNA-Konzentration in der Einheit µg/µl errechnet.

2.2.5.3. Herstellung der DNA-Stockplatten

Für eine effiziente Genomanalyse und zur Vermeidung von Tierverwechslungen wurden DNA-Stockplatten angelegt, mit einer jeweiligen DNA-Konzentration von 10 ng/µl. Aus diesen wurden 5 µl der entsprechenden DNA-Probe in Mikrotiterplatten (ABgene) für die spätere PCR ausplattiert. Die Platten wurden anschließend für 2 Stunden bei 55°C getrocknet und dann bei -20°C gelagert.

2.2.5.4. Mikrosatellitenmarker

Für die genotypische Charakterisierung des konsomen Stammes MWF-6^{SHR} wurden 237 Mikrosatellitenmarker im 10 cM Abstand verwendet. Diese (CA)_n-Dinukleotide wurden an folgenden Instituten entwickelt: a) Medical College of Wisconsin [(Rat) <http://www.rgd.mcw.edu/>], b) Massachusetts General Hospital [(Mgh) Cambridge, MA;

<http://www.genome.wi.mit.edu/>], c) Massachusetts Institute of Technology [(Mit) Cambridge, MA; <http://www.genome.wi.mit.edu/rat/public/>].

2.2.5.5. Primer-Kinasierung / Radioaktive Markierung der Primer am 5'-Ende

Von jedem Primerpaar wurde der sense-Primer am 5'-Ende durch radioaktives Phosphat (in γ -Stellung) markiert, um die in der PCR-Reaktion entstehenden Amplifikate mittels Autoradiographie sichtbar machen zu können. Dazu wurden in einem Eppendorfgemäß pro Reaktion 0,04 μ l Kinase-10x-Puffer, 0,017 μ l T₄-Polynukleotidkinase (10 U/ μ l) und 0,0583 μ l [γ -³²P] dATP (3000 Ci/mmol) gemischt. Von diesem Ansatz wurden 0,11 μ l zu 0,22 μ l 6 μ M sense-Primer gegeben und anschließend bei 37°C für 45 min und bei 65°C für 10 min in der PCR-Maschine inkubiert. Die radioaktiv markierten Primer konnten einige Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

2.2.5.6. PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Für die PCR wurden pro Ansatz 50 ng genomische DNA eingesetzt, die vorher nach einem Pipettierschema in die Mikrotiterplatten vorgelegt wurden. Zunächst wurde jeweils eine Mischung aus 1,3 μ l 10x PCR-Puffer, 0,39 μ l 50 mM MgCl₂, 1,1 μ l 2,5 mM dNTPs, 0,07 μ l Taq-Polymerase, 0,22 μ l 6 μ M antisense-Primer, 8,91 μ l Aqua bidest. und dem gesamten kinasierten sense-Primer hergestellt. Von diesem Ansatz wurden der DNA 10 μ l zugesetzt. Im Anschluss wurde die Mikrotiterplatte mit Schweißfolie verschlossen und das PCR-Programm gestartet. Die Amplifikation begann mit einer initialen Denaturierung bei 92°C für 2 min, gefolgt von 30 Zyklen bestehend aus 15 Sekunden bei 92°C, 1 min bei der primerspezifischen Annealing-Temperatur und 1 min bei 72°C. Die finale Elongation erfolgte bei 72°C für 7 min. Bei einigen Primern wurde zur spezifischeren Bindung und zum Erhalt deutlicherer Amplifikate eine PCR mit „Touch-Down-Programmen“ durchgeführt. Diese Programme laufen nach folgendem, für das „Touch-Down 55-50°C“ exemplarisch angegebenen Schema ab: 94°C für 3 min, 55°C für 45 sec, 72°C für 45 sec, 94°C für 30 sec, 54°C für 45 sec, 72°C für 45 sec, 94°C für 30 sec, 53°C für 45 sec, 72°C für 45 sec, 94°C für 30 sec, 52°C für 45 sec, 72°C für 45 sec, 94°C für 30 sec, 51°C für 45 sec, 72°C für 45 sec, 94°C für 30 sec, 50°C für 45 sec, 72°C für 45 sec, 94°C für 30 sec, weitere 29 Zyklen bestehend aus 50°C für 45 sec, 72°C für 45 sec, 94°C für 30 sec und anschließend 5 min bei 72°C. Nach Beendigung der PCR wurden die Proben bei 4°C aufbewahrt.

2.2.5.7. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Auf einem durch Beigabe von Harnstoff denaturierenden Polyacrylamidgel erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte innerhalb von zwei Wochen nach der Durchführung der PCR, bedingt durch die 14-tägige Halbwertszeit des [γ -³²P] dATP. Für die Herstellung des Gels

wurden je zwei 45 cm lange und 35 cm breite Glasplatten verwendet, wobei eine der beiden Glasplatten mit 70%igem Ethanol und Aceton gesäubert und die zweite Glasplatte nach der Reinigung mit 70%igem Ethanol mit Acrylease beschichtet wurde. Danach wurden beide Platten, durch 0,4 mm dicke Spacer an den Längsseiten voneinander getrennt, übereinander gelegt und mit Edelstahlklammern fixiert. Die untere Schmalseite der Platten wurde für das Gießen des Gels mit Paketklebeband verschlossen. Für einen Gelansatz wurden 70 ml der Polyacrylamidlösung verwendet, welche zur Polymerisierung mit 40 µl Temed zur Quervernetzung und 400 µl Ammoniumpersulfat-Lösung (10 mg/ml) zum Starten der Reaktion versetzt wurden. Anschließend wurde dieser Ansatz luftblasenfrei zwischen die beiden Glasplatten gegossen und der Kamm zum Erhalt einer glatten Gel-Kante umgekehrt an der oberen Schmalseite ca. 5 mm in die Gelflüssigkeit geschoben. Nach 1½ - 2 Stunden war das Gel auspolymerisiert, Klemmen und Klebeband wurden entfernt, der Kamm herausgezogen und mit den Zacken 1-2 mm tief in den Gelsaum eingeführt, so dass pro Gel ca. 64 Taschen zur Probenauftragung resultierten. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt, die danach mit 1x TBE-Puffer gefüllt wurde. Die Proben wurden mit 10 µl Formamid-Laufpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 94°C denaturiert. Mit einer Mehrkanal-Spritze wurden anschließend ca. 3 µl der jeweiligen Proben in die Taschen des Gels gegeben. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei 70 Watt für ca. 2½ Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die beschichtete Glasplatte abgehoben, das Gel auf Gel-Blotting-Papier überführt, in Verpackungsfolie eingeschlagen und in eine Röntgenkassette gelegt. Die Expositionszeit der aufgelegten Kodak-Filme betrug je nach Signalstärke ca. 18 Stunden bei -20°C, die Entwicklung der Filme erfolgte automatisch. Anschließend wurden die fertigen Autoradiographien ausgewertet und durch einen zweiten unabhängigen Untersucher begutachtet.

2.2.6. Differentielle Genexpressionsanalyse

Für die differentielle Genexpressionsanalyse wurde die quantitative Real-Time PCR, eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren, genutzt. Die Menge der zu untersuchenden mRNA im Gewebe wird dabei indirekt über die durch Reverse Transkription gewonnene cDNA gemessen.

2.2.6.1. RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus dem bei -80°C eingefrorenen Nierengewebe erfolgte mittels der Trizol-Methode. In 1 ml eisgekühltem Trizol wurden 100 mg Gewebe 3 x 30 sec mit

dem Ultra Turrax homogenisiert und für 10 min bei 5.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der abpipettierte Überstand wurde zur Proteindenaturierung für ca. 1 Stunde bei RT inkubiert, anschließend zur Phasenseparation mit 200 µl Chloroform vermischt und nach 2 - 3 min Inkubation bei RT für 15 min bei 12.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die RNA enthaltene obere, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol zur Fällung versetzt und nach 10 min Inkubation bei RT für 10 min bei 12.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das erhaltenen RNA-Pellet wurde mit 1 ml eisgekühltem 75 %igen Ethanol gewaschen, für 10 min bei 4.900 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und abschließend in 50 µl DEPC-Wasser (0,1 %) gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung erfolgte photometrisch bei 260 und 280 nm. Zur Qualitätsüberprüfung wurden ca. 500 ng RNA mit 1 µl Laufpuffer versetzt und auf ein 1 %iges Agarose-Ethidiumbromid-Gel, bestehend aus 30 ml 1x TAE und 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml), aufgetragen. Der Gellauf erfolgte über einen Zeitraum von ungefähr 40 min bei ca. 75 V und ca. 200 mA.

2.2.6.2. Reverse Transkription

Für die Synthese der cDNA wurden 4 µg RNA mit DEPC-Wasser (0,1 %) auf 10 µl aufgefüllt. Zur Hybridisierung der zugesetzten 1 µl Random Hexamer Primer wurde der Ansatz in der PCR-Maschine für 5 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf 4°C für 5 min gekühlt. Danach wurden 4 µl 5x Reaction Buffer, 1 µl RNase inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP-Mix und zuletzt 2 µl reverse Transkriptase (M-MULV) auf Eis zugegeben. Die Inkubation erfolgte in der PCR-Maschine nach folgendem Schema: 10 min bei 25°C, 60 min bei 37°C, 10 min bei 70°C und abschließend 10 min bei 4°C.

2.2.6.3. Quantitative Real-Time PCR

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR nach dem TaqMan-Prinzip (Livak et al., 1995) wurden differentielle Genexpressionsanalysen im Nierengewebe der Rattenstämme vorgenommen. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt dabei über eine fluorogene Sonde, die innerhalb des zu amplifizierenden, von den beiden Primern flankierten cDNA-Bereiches hybridisiert. Bei der intakten Sonde wird die Fluoreszenz des am 5'-Ende befindlichen Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher-Farbstoff am 3'-Ende der Sonde durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der Elongationsphase der PCR wird die hybridisierte Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase geschnitten und vom Strang verdrängt. Mit der Sondenhydrolyse werden die räumliche Nähe und der FET zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Die Fluoreszenz des Reporters, die proportional zur Menge der gebildeten PCR-Produkte ansteigt, wird im ABI Prism 7000 Sequence Detection System bei jedem Zyklus gemessen.

Um bei der Quantifizierung von mRNA auf Unterschiede in der Gesamtmenge an RNA zu normalisieren, wird jeweils eine Co-Amplifikation eines so genannten Housekeeping-Gens, welches relativ konstant in allen Zellen exprimiert werden sollte, durchgeführt. Das Gen der Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) erwies sich dabei für Untersuchungen im Nierengewebe als geeignet (Fink et al., 1999). Die Bestimmung der Expressionslevel des zu untersuchenden Gens als auch des Housekeeping-Gens PBGD (GenBank Accession Nr. X06827) erfolgte über Standardkurven, deren Standards durch sieben serielle 1:10 Verdünnungen hergestellt und bei jedem Lauf mitgeführt wurden.

Die relative Expression (rE) des zu untersuchenden Gens (Kollagen III) wurde folgendermaßen berechnet:

$$rE_{\text{Kollagen III}} = \frac{E_{\text{Kollagen III}}}{E_{\text{PBGD}}}$$

Jede Probe wurde als Triplikat gemessen, woraus anschließend der Mittelwert gebildet wurde. Zur Auswertung der relativen Expression wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe auf 100 % gesetzt und die Mittelwerte der anderen Gruppen prozentual zur Kontrolle angegeben.

Für die PCR-Reaktion wurden jeweils 2 µl cDNA mit 12,5 µl TaqMan 2x Universal PCR MasterMix, je 2,25 µl 10 µM sense- und antisense-Primer (Endkonzentration 900 nM), 0,5 µl 10 µM Sonde (Endkonzentration 200 nM) und nukleasefreiem Wasser zu einem Reaktionsvolumen von 25 µl angesetzt. Die Ergebnisauswertung erfolgte mit der ABI Prism 7000 SDS Software.

2.2.7. Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms SPSS 13.0. Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die Werte zuerst auf Normalverteilung getestet. Konnte auch nach der Logarithmierung der Werte keine Normalverteilung festgestellt werden, wurde für die statistische Auswertung der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Bei normalverteilten Werten erfolgte die Auswertung bei zwei Gruppen über den t-Test und bei Drei- oder Mehrgruppenvergleichen über eine Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließender Post-Hoc-Testung (Bonferroni). Als Signifikanzschwelle wurde ein p-Wert $p < 0,05$ definiert.

Aufgrund der starken Streuung der Albuminurie wurden die Werte zur statistischen Auswertung logarithmiert, der Übersichtlichkeit wegen wurden für die Abbildungen jedoch die unlogarithmierten Werte benutzt.