

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tierexperimenteller Teil

#### 2.1.1. Verwendete Tiere

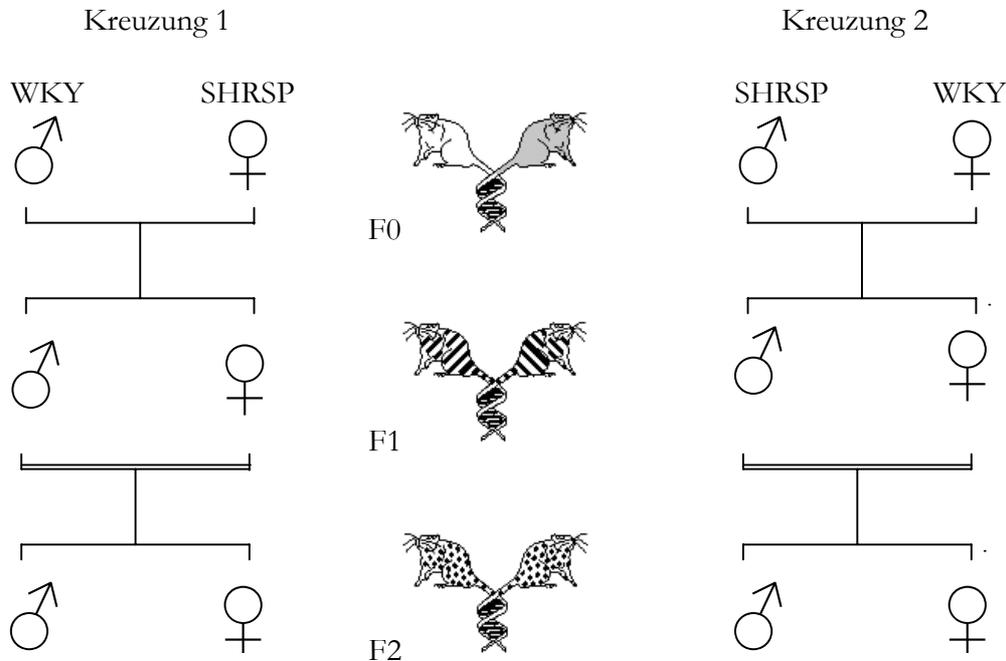
Von der Universität Heidelberg wurden 1974 zum Schlaganfall neigende Abkömmlinge der ursprünglich in Japan etablierten Kolonie (Okamoto und Aoki, 1963) der spontan hypertensiven Ratten (*stroke prone spontaneously hypertensive rats*, SHRSP) erworben und seitdem unter strengen Inzucht Kriterien als SHRSP<sub>HD</sub> weitergezüchtet. Desgleichen wurden normotensive Kontrolltiere des Wistar-Ratten-Stammes, die an der Universität Kyoto in Japan seit Generationen ingezüchtet wurden, erworben. Diese Tiere wurden unter der Bezeichnung WKY<sub>HD</sub>, ebenfalls unter strengen Inzucht Kriterien, in Heidelberg weitergezüchtet.

In dieser Arbeit wurde zunächst eine Rattenpopulation von 112 Tieren untersucht. Diese Population war bereits Gegenstand mehrerer Publikationen (Hilbert et al. 1991; Jacob et al. 1991; Lindpaintner et al. 1990; Lindpaintner 1993). Die hier als Kohorte A bezeichnete Population wurde gekreuzt aus SHRSP<sub>HD</sub> und WKY<sub>HD</sub>. Um eventuelle geschlechtschromosomale Einflüsse auf die untersuchten Phänotypen verfolgen zu können, wurde bei der Züchtung der F<sub>2</sub>-Kohorten ein reziprokes Kreuzungsschema angewandt (Abbildung 3).

Ein WKY<sub>HD</sub>-Männchen wurde mit zwei SHRSP<sub>HD</sub>-Weibchen und ein SHRSP<sub>HD</sub>-Männchen wurde mit zwei WKY<sub>HD</sub>-Weibchen gepaart. Die aus diesen Kreuzungen stammenden F<sub>1</sub>-Tiere der ersten Tochtergeneration wurden nach reziproken Kreuzungen getrennt und jeweils Bruder mit Schwestern verpaart, wieder ein Männchen mit zwei Weibchen. Die 112 resultierenden F<sub>2</sub>-Tiere der zweiten Tochtergeneration wurden nach Herkunft von einem WKY- oder SHRSP-Großvater unterteilt sowie nach Geschlecht getrennt und durch einen Ohrclip mit einer laufenden Nummer versehen. Von diesen 112 Tieren waren 53 von einem WKY- und 59 von einem SHRSP-Großvater.

Jeweils drei Tiere wurden in einem Käfig gehalten, zur Phänotypisierung einzeln. Für die Dauer der Versuche hatten sie freien Zugang zu Wasser und Futter. Außer für die Phasen der notwendigen experimentellen Züchtung wurden die Ratten nach Geschlecht getrennt. Durch eine

automatische Lichtanlage waren die Tiere einem regelmäßigen zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt.



**Abbildung 3: Kreuzungsschema der F<sub>2</sub>-Tiere.** Bei der Darstellung der Ratten ist der Anteil der Gene des SHRSP-Vorgängers durch die dunkle Schraffierung dargestellt. Gekreuzt wird ein ingezüchtet hypertensives mit einem ingezüchtet normotensiven F<sub>0</sub>-Tier; diese sind beide homozygot für ihr Merkmal. Die Tochtergeneration F<sub>1</sub> erbt von jedem Elternteil einen Chromosomenstrang und ist durchgehend heterozygot. In der Meiose dieser Tiere wird nun das väterliche und das mütterliche, entweder hypertensinogene oder normotensinogene Erbmateriale zufallsbedingt rekombiniert. Die F<sub>1</sub>-Tiere werden weiter miteinander verpaart, Geschwister mit Geschwister; die resultierende F<sub>2</sub>-Filialgeneration weist eine zufällige Verteilung beider Genome auf: Sie sind homozygot für hypertensinogene bzw. normotensinogene Allele und somit hypertensiv bzw. normotensiv – oder heterozygot an den entsprechenden Genorten und weisen somit einen intermediären Phänotypen auf. Durch ein reziprokes Kreuzungsschema ist in den F<sub>2</sub>-Tieren die Herkunft der Geschlechtschromosomen bekannt: In Kreuzung 1 haben die F<sub>2</sub>-Männchen das Y-Chromosom des WKY-Vorgängers geerbt, in Kreuzung 2 das SHRSP Y-Chromosom des SHRSP-Vorgängers.

Diese Kohorte wurde später zur Verbesserung der statistischen Power um zusätzliche, insgesamt 102 Tiere erweitert. Für die Kohortenerweiterung kam das gleiche Kreuzungsschema zur Anwendung, sodass diese Tiere genetisch mit der ursprünglichen F<sub>2</sub>-Kreuzung der Kohorte A identisch sind. Die entstandene Gesamtpopulation aus 214 Tieren (112 Tiere der Kohorte A erweitert um 102 Tiere der Kohortenvergrößerung) benannten wir Kohorte B. Alle Tierversuche wurden den zuständigen Behörden angezeigt und unter dem Aktenzeichen G011/95 von der Senatsverwaltung für Gesundheit in Berlin genehmigt.

## 2.2. Bestimmung hämodynamischer Parameter

### 2.2.1. *Intraarterielle Blutdruckmessung*

Im Alter von vier Monaten wurden alle F<sub>2</sub>-Ratten der Kohorte A einer Katheterisierung der rechten Femoralarterie unter leichter Äthernarkose unterzogen. Dazu wurde die Femoralarterie von umliegendem Gewebe freipräpariert, leicht distal ligiert und ein PE-10-Schlauch eingebracht. Ein PE-50-Verbindungsstück wurde subkutan getunnelt und am Nacken nach außen geführt. Der Leistenschnitt wurde mit zwei Lagen 4-0-Nahtmaterial verschlossen, die Schläuche mit Heparin-Natrium (25 U/ml) gespült und den Ratten dann eine Erholungspause von 24 Stunden gewährt. An zwei aufeinander folgenden Tagen wurden nun drei Messungen von Blutdruck und Herzfrequenz mit einem P23PD Druck-Transducer (Gould-Statham, Oxnard, Kalifornien) und einem Grass Model 7B Polygraphen (Grass Instruments, Quincy, Massachusetts) unternommen: zwei zwischen Mitternacht und vier Uhr sowie eine zwischen neun und 13 Uhr. Anschließend wurde der Femoralkatheter rechts entfernt und den Ratten über zwölf Tage hinweg 1 % NaCl zum Trinkwasser hinzugefügt. Nach erfolgter Katheterisierung nun der linken Femoralarterie, wie zuvor beschrieben, wurden erneut dreimal am Tag die hämodynamischen Parameter nach gleichem Zeitprotokoll bestimmt.

### 2.2.2. *Radiotelemetrische Blutdruckmessung*

Die Blutdruckmessung parenteraler WKY- und SHRSP-Ratten sowie der F<sub>2</sub>-Tiere der erweiterten Population von zusätzlichen 102 Tieren erfolgte mithilfe einer radiotelemetrischen Messmethode. Dazu wurde ein radiotelemetrischer Drucktransducer in die Abdominalhöhle implantiert und ein mit dem Transducer verbundener Kapillarschlauch im Lumen der Aorta abdominalis verankert. Nach einer Erholungszeit von zehn Tagen wurde in einem Alter von vier Monaten die Blutdruckmessung durchgeführt. Aus drei zufällig gewählten Perioden der Tag- und Nacht-aufzeichnungen wurden die Werte gemittelt, um möglichst genau den Algorithmus der obigen Messmethode zu imitieren. Nach zwölf tägiger Zugabe von 1 % NaCl zum Trinkwasser wurden die Messungen wiederholt.

### 2.3. Gewebeentnahme zur DNA-Extraktion

Um Gewebe für die DNA-Extraktion zu gewinnen, wurden den Tieren im Alter von vier Wochen ca. 0,5 cm des Schwanzendes mit einem Skalpell abgeschnitten und in beschrifteten 2-ml-Eppendorfröhrchen (Eppendorf, Hamburg) auf Trockeneis gelegt. Die Schwanzwunde wurde mit einem Histoacryl-Gewebekleber versorgt. Sechs Wochen nach Abschluss der tierexperimentellen Phase wurden die Tiere in tiefer Äthernarkose dekapitiert. Die Abdominalhöhle wurde eröffnet und Leber sowie Milz herauspräpariert. Die Organe wurden in beschriftete 2-ml-Eppendorfröhrchen gegeben und in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff getaucht. Die Gewebe wurden danach bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4. Isolierung genomischer DNA

Ungefähr 0,5 cm Schwanzspitze bzw. 50 bis 100 mg Leber- oder Milzgewebe wurden in ein Eppendorfröhrchen platziert, mit 700  $\mu\text{l}$  Lysis-Puffer (1 % SDS; 250 mM Tris, pH 8,0; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl [Chemikalien von Sigma, Missouri] versetzt und 35  $\mu\text{l}$  Proteinase K (10 mg/ml; Sigma) dazupipettiert. Die Röhrchen wurden in einer mit Reagenzröhrchenseparatoren bestückten Pappschachtel am Rotor eines Hybridisierungsofens (Rainin) befestigt und bei  $55^{\circ}\text{C}$  unter leichter Rotation acht bis 15 Stunden inkubiert. Danach wurden die Röhrchen auf Eis platziert und 300  $\mu\text{l}$  gesättigte NaCl-Lösung (klarer Überstand) dazugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurden die Röhrchen zehn Minuten lang bei 14000 rpm bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415C, Palo Alto, Kalifornien). Der Überstand wurde in 2-ml-Eppendorfröhrchen transferiert, 5  $\mu\text{l}$  RNase A (4 mg/ml; Sigma) zugegeben und bei  $37^{\circ}\text{C}$  eine Stunde lang inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Isopropanol wurden die Röhrchen verschlossen und invertiert. Die so präzipitierte DNA wurde bei 14000 rpm erneut bei  $4^{\circ}\text{C}$  15 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand entfernt und nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  eiskalter 70 %iger Ethanollösung nochmals fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das DNA-Präzipitat über Nacht getrocknet, in Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für den Gebrauch wurden die DNA-Lösungen auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verdünnt.

## 2.5. Präparation von DNA-Vorratsplatten

Um eine möglichst rationelle Handhabung bei der Genotypisierung der DNA-Proben mit den verschiedenen Markern zu gewährleisten, wurden Titerplatten vorbereitet, in denen jeweils 96 DNA-Proben von jeweils 5 µl DNA mit einer Konzentration von 10 µg/µl angeordnet waren. Sie wurden mit 20 µl Mineralöl (Sigma) abgedeckt, die gesamte Platte bis zum Gebrauch mit einem Plastikaufkleber versiegelt und bei -20° C gelagert.

## 2.6. Synthese und Aufbereitung der Primer

Mithilfe des Computerprogramms OLIGO (Rychlik und Rhoads 1989) wurden flankierende Sequenzen im Rattengenom bekannter oder neu entdeckter SSLP-Sequenzen nach thermodynamischen Gesichtspunkten als optimierte Primersequenzen bestimmt und dann auf einem Oligonukleotidsynthesegerät hergestellt.

Das sich in ammoniakalischer Lösung befindliche Syntheseprodukt wurde in zwei Sarsted-Röhrchen aliquotiert und mit lose verschraubten Deckeln im Vakuumtrockner Speedvac lyophilisiert. Das trockene Lyophilisat wurde in jeweils 65 µl Wasser gelöst. Die Aliquots wurden in einem Röhrchen vereint und fünf Minuten lang bei 15000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Microfuge). Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und erneut zentrifugiert. Die Extinktions-OD wurde photometrisch bestimmt und die Konzentration der Primer durch entsprechende Verdünnung auf 200 µM adjustiert. Die Primer wurden bei -80° C gelagert und für die Polymerasekettenreaktion (PCR) auf eine Arbeitskonzentration von 20 µM verdünnt.

Alle anderen verwendeten Primer wurden aufgrund der vorhandenen Kartierungsdaten aus öffentlich zugänglichen Datenbanken (MIT, RGD, Wellcome, RatMap) ausgewählt und über Research Genetics (ResGen) kommerziell bezogen. Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit auf Polymorphismen innerhalb der untersuchten Rattenstämme getestet. Die Tabelle zeigt die zusätzlichen, von uns getesteten Marker und ihre Polymorphismen zwischen den Stämmen WKY und SHRSP. Bei den mit dem Affix -2 bezeichneten Primern modifizierten wir die ursprünglichen, veröffentlichten Primersequenzen mithilfe des Programms OLIGO nach thermodynamischen Gesichtspunkten.

Folgende Marker wurden über die letztendlich tatsächlich genotypisierten Marker hinaus auf Polymorphismen getestet:

Rattenmarker	Sequenz des Vorwärtsstranges (5'-3')	Sequenz des Rückwärtsstranges (3'-5')	Produktgröße
<i>D6Got159-2</i>	GCCCTCATTTTGTTCAGAATAAGTC	CGTCAGTGGGCAGGTCTCTCTCT	166 bp
<i>D6Got138-2</i>	TGCATCAATAGCTGTACACAACCTCTT	TGGCCTCAGACTGCCATACAT	337 bp
<i>D6Got140-2</i>	TAGGGTTTTTGTAGCTGCTGTTGT	GCCAATAGGAGATCGAGTCTCATAG	184 bp
<i>D6Rat118-2</i>	ACCCACTGACCTTTGAGCTCTAC	CCCATGTCTGGGGATTAAACTT	186 bp
<i>D6Rat187-2</i>	TCCTTCAAGGGCTTTGCACTC	GGCTTGGGACTCATTGCTGAT	271 bp
<i>D6Got142-2</i>	CAGGAAGCCAAGACTTGGTGT	TGAGGCCCATCTTGTCTACAGAG	200 bp
<i>D6Got146-2</i>	GGCATTTACTGCCAAACCTGAA	GGGTGCAGGCAAGTGAGTCTC	248 bp
<i>D6Got143-2</i>	GGCTCCACAACCTCAGCAGTTT	TTCCATATIGCTTCTTTTTATACACTCT	191 bp
<i>D6Rat66-2</i>	GGAACCCACGTTCAGGTAGAG	GCCTGGCCTTTCAGGTCATAA	198 bp
<i>D6Rat81</i>	GGGGAGAGCCTGACCTCTAC	AACCCATGACCCTTTCCTTC	228 bp
<i>D6Rat91-2</i>	CGGCTTGTTCCTCGCTCATCAAG	AGGAAAGTGCCTTGTGCCTTTTTTCAC	177 bp
<i>D6Rat120</i>	CCGTCACTCAGGACATGTGA	TGAGCCCCTGGAAGTCATTA	226 bp
<i>D6Rat121</i>	GAGGATGTCCTTTGCTTTGC	CACATGTCTGTGCAACCCTC	135 bp
<i>D6Rat63</i>	TGCACCATTTTAACCCCTTC	CCAAGTGGACCAATAGGCAC	160 bp
<i>D6Got136-2</i>	AATTGAGCACCCAGATCAGAACTTAC	CTTTGCTAAGCAAGGCAGAGAGTC	202 bp
<i>D6Got133-2</i>	AGACCGGCACTGAGGAAAAAC	TGCCAGAAGGAGGTACACCTCTAA	187 bp
<i>D6Got132-2</i>	CAGGGAAAATCCGTGCAGGTC	TCTCGTGGATATTGCATCATTGTGTA	206 bp
<i>D6Got131-2</i>	TGGTGGCTCACACAGACAGT	TGCAATAAGGAAGCAGAGAGAGA	199 bp

**Tabelle A:** Liste der auf Polymorphismen zwischen den Stämmen WKY und SHRSP getesteten Marker. Die hier mit ihren Sequenzen und den durch die Datenbanken erwarteten PCR-Produktgrößen aufgeführten Marker waren in diesen beiden Stämmen nicht polymorph.

bp: Länge in Basenpaaren

Folgende Marker wurden in den Rattenpopulationen genotypisiert und kartiert:

Rattenmarker	Sequenz des Vorwärtsstranges (5'-3')	Sequenz des Rückwärtsstranges (3'-5')	Produktgröße
<i>D6Rat90</i>	TATTGTGGCACACGAACCTG	GACCATACACACACCATGGG	112 bp
<i>D6Mgb1</i>	TTGTTGATGTCTATGGATACCCC	ACAAAACCAGCAAATAAATGAGC	134 bp
<i>D6Mgb2</i>	GTTCTTCTCATTCTCTGACTCTG	AGCTGGGCTGAGAAAAACA	147 bp
<i>D6Rat94</i>	GCTGTGCTAAAGTAAGCCCC	CCCTTATGGTATATACATGCCTGC	103 bp
<i>D6Rat79</i>	CGTAATCTCAAGGCTCACCC	CCCTACACACCTCTTTGGGA	224 bp
<i>D6Arb19</i>	AAGCTGCTTTCTTGTCCCCTCCTC	CTAACCTAGTCCAGAGCCTTC	338 bp
<i>BKRB2</i>	ATGCCTGTATTTTCTTCTTTCCAGTT	CCCAGCACCAGAAAACAAAATTAG	260 bp
<i>Kallistatin</i>	CCTGCAGGAAGATTTGGCTTCTCTT	TCCAAGAAGACCCATGGACTTCTCAG	456 bp
<i>D6Mgb3</i>	TTCATCTATGCCACAGCTCTG	AGAACATTCAAACCATAGCTTTCT	160 bp
<i>D6Rat9</i>	GGTACAGCATATCCCTTCTGC	ACCAGCACACTGCTGTGAAC	164 bp
<i>D6Wox5</i>	AGCTTATAAAAAATACACAAAACC	GAGAACAGTTTTAATCATACAG	99 bp
<i>D6Mgb10</i>	GTCTCCCCCAACACTC	TTTATGATGCCCCGAAAGAC	142 bp
<i>D6Rat91</i>	GTTCTCGCTCATCAAGGTC	CCITGTGCCTTTTTCACCAT	160 bp
<i>D6Got131</i>	TGGTGGCTCACAACAGACAG	CCAGTCATACTGCATCTGCAATA	218 bp
<i>D6Rat120</i>	CCGTCCTCAGGACATGTGA	TGAGCCCCTGGAAGTCATTA	226 bp
<i>D6Rat121</i>	GAGGATGTCCTTTGCTTTGC	CACATGTCTGTGCAACCCTC	135 bp
<i>D6Rat63</i>	TGACCATTTTAACCCCTTC	CCAAGTGGACCAATAGGCAC	160 bp

**Tabelle B: Liste der zwischen den Stämmen WKY und SHRSP polymorphen Marker.** Aufgeführt sind sämtliche Marker, die Polymorphismen zwischen beiden Stämmen aufwiesen und genotypisiert wurden. Die Marker sind mit ihren Sequenzen und den PCR-Produktgrößen angegeben.

bp: Produktgröße in Basenpaaren

## 2.7. Radioaktive Markierung der Oligonukleotidprimer

Das 5'-Ende dephosphorylierter DNA kann zur späteren Visualisierung mit Hilfe der T<sup>4</sup>-Poly-nukleotidkinase (T<sup>4</sup>PNK) mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP radioaktiv markiert werden. Dazu wurden in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen pro Primer für die jeweilige Anzahl an PCR-Reaktionen jeweils 0,03  $\mu$ l T<sup>4</sup>PNK-10x-Puffer sowie 0,09  $\mu$ l Wasser und 0,013  $\mu$ l T<sup>4</sup>PNKinase mit 0,043  $\mu$ l  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP gebracht. Jeweils 0,176  $\mu$ l dieses Kinase-Mastermixes wurde in einem PCR-Röhrchen zu 0,075  $\mu$ l Sense-Primer mit einer Konzentration von 20  $\mu$ M pipettiert. Schließlich wurde auf einer PCR-Maschine die Kinasereaktion gestartet nach dem Protokoll 45 Minuten lang bei 37° C, 2 Minuten bei 94° C, 1 Minute bei 4°C und die radioaktiv markierten Primer anschließend sofort für die PCRs verwendet.

## 2.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine elegante Methode zur Vervielfältigung von DNA-Segmenten. Dazu werden zwei Primer hergestellt, die zu flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden DNA-Segmentes komplementär sind. Die DNA wird zuerst durch Hitze einsträngig gemacht (Denaturierung), sodass sich die Primer in einem nächsten Schritt bei der für sie spezifischen Temperatur an das DNA-Segment anlagern können (*Annealing*, Anlagerung), das nun als Matrize dient. Durch im Reaktionsgemisch vorhandene DNA-Polymerase und Desoxynukleotide werden die Primer nun bei einer spezifischen Temperatur entsprechend der Sequenz der Matrize komplementär verlängert (Extension) und können in den nun folgenden Amplifikationszyklen aus Denaturierung, Anlagerung und Extension ebenfalls als Matrize dienen. Am Ende der Kettenreaktion ist das DNA-Segment exponentiell vervielfacht.

Für eine radioaktive PCR gaben wir pro Reaktion zu 50 ng genomischer DNA in 5 µl Wasser, 200 µmol/L dNTPs, 1,5 µmol/L MgCl<sub>2</sub>, 100 nmol/L Antisense-Primer (20 mM) sowie dieselbe Menge radioaktiv markierten Sense-Primers in 0,251 µl Kinasereaktion, 0,25 Units Taq Polymerase (Quiagen) und PCR-Puffer sowie Wasser, um ein einheitliches Reaktionsvolumen von insgesamt 10 µl zu schaffen.

Die PCR wurde in einer PCR-Maschine (PTC 100/200, Peltier Programmable Cycler, MJ Research Inc., Watertown, Massachusetts) nach folgendem Protokoll gestartet: initial 3 Minuten Denaturierung bei 96° C; dann 35 mal der Zyklus Anlagerung 1 Minute lang bei 55° C oder einer anderen primerspezifischen Temperatur, Extension 1 Minute lang bei 72° C und Denaturierung 15 Sekunden lang bei 96° C; danach weitere 7 Minuten Extension bei 72° C, schließlich Beenden der Reaktion 5 Minuten lang bei 10° C. Die PCR-Produkte wurden sofort weiterverarbeitet bzw. bei 4° C aufbewahrt.

## 2.9. Polyacrylamid-Elektrophorese

Die radioaktiven PCR-Produkte wurden in Polyacrylamidgelen elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe separiert. Um die 0,4 mm dünnen Gele herzustellen, wurden zwei 44 x 37,5 cm breite Glasplatten zunächst sorgfältig mit Ethanol gereinigt. Anschließend wurden sie, durch 0,4 mm dünne Plastikstreifen an den seitlichen Rändern getrennt und am Unterrand durch einen Streifen Blotting-Papier (3M Whatman, Springfield Mill, UK) abgeschlossen, aufeinander gelegt. Die drei Ränder wurden mit Klammern abgedichtet. In den vierten, noch offenen oberen Rand wurden 70 ml der noch flüssigen, mit Tetramethyldiamid (TEMED) und 10 %-igem Ammoniumper-sulfat (APS) versetzten Acrylamidlösung (37,5 % Formamid, 8 M Urea, 90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA, 7 % Acrylamid:Bisacrylamid 19:1) gegossen und ein weiterer Plastikstreifen eingesetzt, um eine glatte Begrenzung zu schaffen. Auch der vierte Plastikstreifen wurde mit einer Klammer abgedichtet.

Das Gel polymerisierte mindestens zwei Stunden lang bei Zimmertemperatur. Der obere Plastikstreifen wurde dann entfernt und ein ebenfalls 0,4 mm dünner Kamm eingesetzt, dessen Spitzen ca 1 mm in das Gel ragten, sodass kleine Ladetaschen für die PCR-Produkte entstanden. Das Gel wurde nun in die Elektrophoresekammer geklemmt und die obere und untere Puffer-kammer mit TBE-Puffer (0,09 M Tris-Borat mit 0,001 M EDTA) gefüllt. Anschließend wurden eine Stunde lang 60 W angelegt, um das Gel gleichmäßig zu temperieren.

Die PCR-Produkte wurden mit Ladepuffer versetzt, 5 Minuten lang bei 94° C denaturiert und auf Eis gekühlt. Die durch den Gelkamm erzeugten Ladetaschen wurden durch Spülen mit Puffer von Luftblasen befreit, und es wurden jeweils ca. 3 bis 4 µl eines PCR-Produktes pro Ladetasche geladen. Die Anordnung der Proben wurde dabei so gewählt, dass auf jedem Gel mindestens ein bekannter Standard jedes parentalen Genotyps mitlief. Durch die vorher getestete Größe der Amplifikationsprodukte konnten bis zu drei Marker unterschiedlicher Länge sequentiell hinter-einander auf dasselbe Gel geladen werden (Multiplex).

Nach jedem Ladevorgang wurde jeweils durch 5 - 10-minütiges Einschalten der Gelspannung das Eintreten der frisch geladenen PCR-Produkte in die Gelmatrix erreicht. Die Elektrophorese lief je nach Größe der Amplifikationsprodukte zwischen 1,5 und 6 Stunden bei 60 W. Zum Schluss

wurde eine der Glasplatten entfernt, das Gel auf Blotting-Papier (3M Whatman, Springfield Mill, UK) transferiert und in Plastikfolie eingeschlagen. Die Gele wurden in eine Metallkassette gelegt, und ein Kodak Biomax Film (Eastman Kodak, Rochester, NY) wurde auf ihnen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  exponiert. Die Filmexposition dauerte je nach Stärke des radioaktiven Markersignals zwischen vier und über 100 h.

Alle Filme wurden am Schluss von zwei Personen unabhängig voneinander ausgewertet und die Genotypen jedes Tieres für jeden Marker bestimmt. Nicht eindeutige Genotypen wurden als Dropouts so lange wiederholt, bis das Ergebnis von beiden auswertenden Personen übereinstimmend zweifelsfrei festgelegt werden konnte.

## **2.10. Restriktionsverdau und Elektrophorese auf Agarose-Gelen**

Für die Genotypisierung des RFLP in Exon 3 des Kallistatin-Gens (Markerarbeitsbezeichnung: *KallEx32* [Kall = Kallistatin, Ex3 = Exon3, 2 = 2. modifiziertes Primerpaar]), amplifizierten wir in einer nichtradioaktiven PCR je 50 ng genomischer DNA in 5  $\mu\text{l}$  Wasser mit 100 nmol/L Sense- sowie derselben Menge Antisense-Primer (20 mM), 1,5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs, 0,25 units Taq Polymerase (Quiagen), 3  $\mu\text{l}$  Sucrose-Cresolrotmischung (100 ml enthalten 75 g Sucrose, 6 mg Cresolrot und Wasser) und schließlich PCR-Puffer sowie weitere 2,45  $\mu\text{l}$  Wasser, um ein einheitliches Reaktionsvolumen von insgesamt 15  $\mu\text{l}$  zu schaffen.

Das Protokoll war Denaturing 3 Minuten lang bei  $96^{\circ}\text{C}$ , dann für 35 Zyklen Annealing 1 Minute lang bei  $65^{\circ}\text{C}$ , Extension 1 Minute lang bei  $72^{\circ}\text{C}$ , Denaturing 15 Sekunden lang bei  $96^{\circ}\text{C}$ , danach weitere 7 Minuten Extension bei  $72^{\circ}\text{C}$ , schließlich Beenden der Reaktion bei  $10^{\circ}\text{C}$  5 Minuten lang. Das PCR-Produkt wurde 12 Stunden lang über Nacht mit 4 Units *Cac8I* (NE Biolabs) und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer (buffer #3) bei  $37^{\circ}\text{C}$  in 20  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen verdaut. Das Enzym wurde anschließend bei  $65^{\circ}\text{C}$  20 Minuten lang hitzeinaktiviert.

Die Auftrennung der Spaltprodukte erfolgte in 4 % Metaphor-Agarose-Gelen. Dazu wurde die Metaphor-Agarose (FMC Bioproducts, Rockland, ME) in 1x TAE-Puffer (0,04 M Tri-Acetat; 0,001 M EDTA) durch Sieden aufgelöst und mit einem mit DNA interkalierenden Farbstoff,

Cybr Green<sup>®</sup> (FMC Bioproducts, Rockland, ME) im Verhältnis 1 : 10 000 versetzt. Die noch flüssige Agarose wurde in eine Gelform gegossen. Ein Kamm wurde aufgesteckt, dessen Spitzen 2 bis 3 mm in das Gel ragten. Durch Ziehen des Kammes aus dem abgekühlten Gel entstanden Ladetaschen. Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer bedeckt, die Ladetaschen von Luftbläschen befreit und die DNA geladen. Pro 1 cm Kammerlänge wurden 5 V (insgesamt 100 V) Spannung angelegt. Die visuell ausreichende elektrophoretische Separation der verdauten allelischen PCR-Produkte dauerte unter den oben genannten Bedingungen 90 Minuten.

Die PCR-Produkte wurden sofort nach Beendigung der Elektrophorese durch UV-Illumination (254 nm) des Gels visualisiert und mit einem Polaroid-Film fotografiert. Das erzielte Genotypisierungsergebnis für jedes Tier wurde ebenfalls von zwei Personen unabhängig voneinander ausgewertet. Nicht eindeutig zu interpretierende Genotypen wurden wiederum als Dropouts so lange wiederholt, bis das Ergebnis von beiden auswertenden Personen übereinstimmend zweifelsfrei festgelegt werden konnte.

### **2.11. Testung der Primer auf Polymorphismen**

Alle SSLP-Marker wurden vor ihrer Genotypisierung in allen F<sub>2</sub>-Tieren zunächst in einigen wenigen Referenz-DNAs von F<sub>0</sub>-Tieren auf Polymorphismus zwischen WKY- und SHRSP-Tieren verifiziert. Dazu wurde zunächst eine nichtradioaktive Test-PCR mit vier verschiedenen Anlagerungstemperaturen pro Marker-Primerpaar in 2° C-Abständen, beginnend mit der von OLIGO vorgeschlagenen Temperatur, nach dem oben beschriebenen Standardprotokoll für die nicht-radioaktive PCR durchgeführt.

Die PCR-Produkte wurden in 2 % Agarose-Gelen aufgetrennt (s. o.) und unter UV-Licht visualisiert. Die Anlagerungstemperatur mit dem stärksten PCR-Signal auf dem Agarose-Gel wurde für die anschließende radioaktive PCR mit denselben DNA-Proben von WKY- und SHRSP-F<sub>0</sub>-Tieren nach dem oben beschriebenen Protokoll verwandt. Die Auswertung der Genotypen auf den Polyacrylamid-Gelen erfolgte nach beschriebenem Schema.

## 2.12. Statistische Analyse, Kartierung und Kopplungsanalyse

Die Berechnungen zur genetischen Kartierung der Marker wurde mit dem Programm MAPMAKER/EXP durchgeführt. Die chromosomale Anordnung der Marker wurde mit einem LOD-Score von über 3 für ihre wahrscheinlichste Positionierung zueinander festgelegt. Die Kopplungsberechnung der QTLs erfolgte durch das Programm MAPMAKER QTL (Lander et al. 1987).

Der Einfluss der Loci auf den Blutdruck und andere physiologische Parameter der Stämme (Phänotypen, *dependent variables*) wurde mit einer Drei-Weg-Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) unter Berücksichtigung der großväterlichen Herkunft, des Geschlechts und des Genotypen ausgewertet. Die p-Werte des paarweisen Gruppenvergleichs bei der ANOVA wurden mit der Bonferroni-Adjustierung ( $p_{adj}$ ) angeglichen.