

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Radionukleotide

Substanz	Firma
Aceton	J.T. Baker
Acrylease	Stratagene
Ammoniumpersulfat	Sigma
[γ - ³² P]dATP (1 mCi, 3000 Ci/mmol., wässrige Lösung)	Amersham
Bromphenolblau-Natriumsalz	Merck
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat (Titrierkomplex III, MG=372,24)	Roth
dNTPs (2,5 mM)	Rapidozym, Promega
Ethanol	J.T. Baker
Ether	Merck
Harnstoff	Roth
Isopropanol	Sigma
Magnesiumchlorid (1,5 mM)	Rapidozym, Promega
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
10x PCR-Puffer	Rapidozym, Promega
Rattenserum-Albumin (RSA)	Sigma
Rotiphorese (40% Acrylamid, 2% Bisacrylamid)	Roth
SDS (Lauryl Sulfate)	Sigma
10x TBE (Tris-Borat-EDTA-Lösung)	Gibco BRL
Temed (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma
3,3',5,5' Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid (TMB-) Tabletten	Sigma
Xylen Cyanol FF	Sigma

2.1.2 Enzyme

Enzym	Aktivität	Firma
T4-Polynukleotidkinase	10 U/ μ l	Promega
Taq-Polymerase	5 U/ μ l	Rapidozym, Promega
Proteinase K	34 U/mg	Sigma

2.1.3 Puffer

Puffer	Bestandteil	Konzentration/ Mischungsverhältnis
Formamid-Laufpuffer	Bromphenolblau	1% (w/v)
	Xylen Cyanol FF	1% (w/v)
	Formamid	10% (v/v)
	Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	0,5 M
Polyacrylamidgel-Lösung	Harnstoff	31,5 g
	10 x TBE	7,0 ml
	Rotiphorese (40 % Acrylamid)	10,5 ml
	Aqua bidest.	27,0 ml
Tail-Puffer	Tris-Puffer (1 M), pH 8,0	10 ml
	NaCl-Lösung (2 M)	10 ml
	EDTA (0,5 M)	40 ml
	Aqua bidest.	120 ml
	10 % SDS	20 ml
Histologie-Fixativ (Bouinsche Lösung modifiziert nach Dubosq-Brasil)	Ethanol 80% (v/v)	150 ml
	Pikrinsäure	1 g
	Formaldehyd 37% (v/v)	60 ml
	Essigsäure 100%	5 ml

2.1.4 Sonstige Materialien und Futtermittel

Produkt	Firma
BioMax MR-1-Röntgenfilme (35 x 43)	Kodak
Edelstahlklemmen	Peq Lab
Gel-Blotting-Papier GB 002	Schleicher & Schuell
Glasplatten für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse (Normalfutter)	Altromin
Histoacrylkleber für Gewebe	Braun
Kämme und Spacer für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Lochzange zur Markierung der Labortiere	Aesculap
Makrolonkäfige Typ III und Typ IV	Ebeco
Paketklebeband	Tesa
Reaktionsgefäße 0,2 ml MicroAmp	Perkin Elmer
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße Safe-Lock 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße Safe-Lock 2,0 ml	Eppendorf

Röntgenkassetten Typ G, 35 x 43 cm	Peq Lab
Schweißfolie	GENETIX
SMR-Zka 10 mm inklusive 4% NaCl (Spezialfutter)	Sniff
Standardtips 20 µl	Eppendorf
Standardtips 100 µl	Eppendorf
Standardtips 1000 µl	Eppendorf
Stoffwechselfäfige für Ratten bis 300 g	Ehret
Szintillationsgefäße aus Kunststoff	Packard
Randlose Thermo-Fast 96-Mikrotiterplatten	ABgene
Verpackungsfolie	Saran

2.1.5 Geräte

Gerät	Firma
Analysen-Waage BP 610	Sartorius
Automat für die Filmentwicklung X-OMAT 5000 RA	Kodak
Blutdruckmessgerät	TSE
Folienschweißgerät	MDC
Hybridisierungssofen	Biometra
Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf
Magnetrührer mit Heizfunktion MR 2002	Heidolph
Mehrkanal-Spritze (8-Kanal; 0-10 µl)	Hamilton
Mikrotiterplattenschüttler	Roth
Minifuge RF - Zentrifuge	Heraeus sepatech
Multipette plus	Eppendorf
PCR-Cycler	MJ Research
Photometer UV-1202	Shimadzu
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer	Peq Lab
Standardpipetten	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Vortexer VF2	Janke&Kunkell KA Labortechnik

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

2.2.1.1 Parentaltierstämme

Verwendet wurden der Parentaltierstamm F344 und die spontan hypertensive Ratte mit Neigung zu Schlaganfällen, *Spontaneously Hypertensive Rat Stroke Prone* (SHRSP). Beide Stämme wurden in der Arbeitsgruppe *Kreutz* als Inzuchtstämme in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der medizinischen Fakultät der Charité Berlin (FEM) gezüchtet.

2.2.1.2 Aktenzeichen und behördliche Genehmigung der Tierversuche

Das Aktenzeichen für die Tierversuche lautet G 0089/04, die behördliche Genehmigung wurde am 13.10.2004 durch das Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales (Referat I C) erteilt.

2.2.1.3 Haltung

Die Haltung der Tiere erfolgte ebenfalls an der FEM der Charité. Dort wurden bis zu vier Ratten getrennt nach Geschlecht in einem Makrolonkäfig Typ IV gehalten und zu Verpaarungszwecken in einen Makrolonkäfig des Typs III umgesetzt.

Wasser und Futter waren frei zugänglich. Die Umgebungstemperatur betrug konstant 22°C. Durch einen automatischen Lichtschalter konnte ein gleich bleibender Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gewährleistet werden.

Alle Ratten wurden in einem Alter von ca. 21 bis 28 Tagen vom Muttertier abgesetzt und erhielten zum Ermöglichen der weiteren eindeutigen Identifizierung eine Ohrmarkierung mit einer Lochzange.

2.2.1.4 Kreuzungsschema

Für die Kosegregationsanalyse wurde eine F2-Generation aus den Stämmen SHRSP und F344 erzeugt. Dazu sind zunächst männliche F344-Ratten mit weiblichen SHRSP-Ratten zu einer F1-Population verpaart worden. Durch Bruder-Schwester-Verpaarungen der so erhaltenen Tiere wurde daraus dann eine F2-Generation gezüchtet (Abb. 3). Für die Analyse sind männliche Tiere (n=232) verwendet worden.

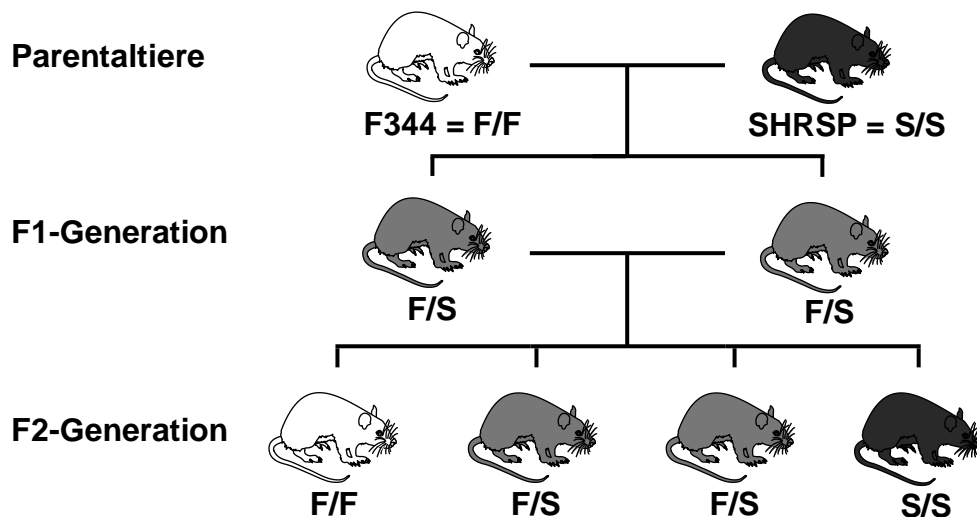


Abb.3: Kreuzungsschema: Die Parentaltiere F344 (Genotyp F/F) und SHRSP (Genotyp S/S) wurden über eine F1-Generation (Genotyp F/S) zu einer F2-Generation verpaart. Sämtliche Tiere der F1-Generation weisen den heterozygoten Genotyp F/S, während sich die Gesamtheit der Genotypen der F2-Generation in F/F, F/S und S/S in einem Verhältnis von 1:2:1 aufteilen.

2.2.1.5 Diät

Für die Parentaltierstudie wurden vier Gruppen aus jeweils sechs bis zehn Tieren gebildet. Zwei Gruppen bestanden aus SHRSP-Tieren und zwei aus F344-Tieren. Jeweils eine Gruppe eines jeden Tierstammes erhielt von der Geburt an bis zur 14. Lebenswoche eine Diät aus Standardfutter für Ratten mit einem NaCl-Gehalt von 0,2% und Trinkwasser *ad libitum*. Die beiden anderen Gruppen erhielten bis zur sechsten Lebenswoche die gleiche Diät. Von der sechsten bis zur 14. Lebenswoche bekamen sie jedoch eine Diät mit 4%-NaCl. Der Zugang zu Trinkwasser war frei.

Die Tiere der F2-Population bekamen bis zum Ende der fünften Lebenswoche ebenfalls Standardfutter für Ratten mit einem NaCl-Gehalt von 0,2% und Trinkwasser *ad libitum*. Ab der sechsten Lebenswoche erhielten sie eine Hochsalzdiät mit einem NaCl-Gehalt von 4%. Der Zugang zu Wasser war weiterhin frei. Diese Ernährungszusammensetzung wurde bis zur 14. Woche beibehalten.

2.2.1.6 Phänotypisierung

Am Ende der 14. Lebenswoche bzw. zu Beginn der 15. Lebenswoche wurden die Phänotypen der Parentaltiere sowie die der F2-Population bestimmt. Dabei sind zunächst Körpergröße, Körpergewicht, systolischer Blutdruck und Urinvolumen pro 24 Stunden gemessen worden. Bei der Organentnahme wurden Herz, Aorta, Niere und Gehirn auf Größe und Gewicht untersucht. In der biochemischen Untersuchung sind im Serum die Konzentrationen von Harnstoff und Kreatinin, im Plasma die Konzentrationen von HDL, LDL, Triglyceriden und Gesamtcholesterin und im Urin die Konzentrationen von Kreatinin, Albumin und der Gesamtproteine bestimmt worden.

2.2.1.6.1 Systolische Blutdruckmessung

Zur Messung des systolischen Blutdruckes wurde eine oszillatorische, computer-gestützte Tail-Cuff-Methode (TSE Blutdruck-Monitor Mehrkanal-System) verwendet. Dazu ist eine aufblasbare Druckmanschette, die einen Pulssensor enthält, um die Rattenschwanzwurzel angelegt worden. Bei dieser Methode registriert dieser Sensor nach Aufblasen der Manschette Druckschwankungen in den arteriellen Gefäßen. Aus diesen so gewonnenen Daten wird computergestützt der systolische Blutdruckwert und die Pulsfrequenz errechnet.

Zur Vorbereitung dieser nicht-invasiven Methode wurden die wachen Tiere zur Gewöhnung an die Messbedingungen an zwei aufeinander folgenden Tagen zur gleichen Tageszeit in einen Restraîner gesetzt, welches ein eigens für diesen Zweck entwickelter Messkäfig ist. Bereits hier fanden Probeblutdruckmessungen statt. Diese Werte wurden jedoch nicht verwendet. Erst anschließend erfolgte die eigentliche Messung: An drei weiteren Tagen wurden jeweils zwei Messzyklen mit je drei Messungen durchgeführt. Aus den 18 erhaltenen Werten ist der Blutdruck gemittelt worden und wurde als repräsentativer Blutdruckwert für das jeweilige Tier verwendet.

2.2.1.6.2 Organentnahme

Als Narkosemittel zur Präparation wurde Ether verwendet. Zu Beginn der Präparation sind Körpergewicht und Körpergröße der Tiere bestimmt worden. Daraufhin wurden Thorax und Abdomen eröffnet. Die Aorta abdominalis ist mit einer Kanüle zur Blutentnahme punktiert worden. Danach wurden Herz, Leber und Nieren entnommen und anschließend vermessen und gewogen.

Das Herz wurde einer genaueren Präparation unterzogen. Hier wurde der rechte Ventrikel vom Rest des Herzens getrennt, wobei das Septum komplett dem linken Ventrikel zugerechnet worden ist.

Die Aorta wurde vom umliegenden Gewebe inklusive der Adventitia vorsichtig abpräpariert. Auch hier sind Gewicht und Länge bestimmt worden. Für eine eventuelle histologische Aufarbeitung wurden ein Teil des linken Ventrikels, der Aorta und der Niere vorsorglich zunächst mit Bouinscher Lösung fixiert und nach 24 Stunden in Ethanol (80%) überführt und gelagert.

Die anderen Organe und die Blutproben (nach Zentrifugation über 15 Minuten bei 6000 Upm und 4 °C) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Da das Herzgewicht eine starke Abhängigkeit zum Körpergewicht aufweist, ist es sinnvoll mit dem Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht zu arbeiten, da durch diese Relativierung ein stabilerer und vergleichbarer Parameter erzeugt wird. Analog dazu wird das aortale Gewicht zur Länge der entnommenen Aorta gesetzt, um einen Index für die aortale Hypertrophie zu erhalten.

2.2.2 Genomuntersuchung und QTL-Kartierung

2.2.2.1 Prinzip der Genomuntersuchung

Zunächst wurde bei einem Teil der F2-Population eine selektive Genomuntersuchung durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere mit den höchsten bzw. niedrigsten Blutdrücken ausgewählt. Sind bei dieser orientierenden Untersuchung bestimmte Genomabschnitte in der statistischen Analyse auffällig geworden, wurden die betreffenden Regionen nochmals in der gesamten F2-Population untersucht. Durch dieses Vorgehen sollten Kosten und aufgewendete Zeit minimiert werden.

Die Genotypisierung der Ratten wurde mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern durchgeführt. Zur Genomuntersuchung werden die Mikrosatellitenmarker zunächst radioaktiv markiert und mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Durch die Gelelektrophorese können die Produkte der PCR ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Durch Autoradiographie kann die aufgetrennte DNA auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Man erhält ein für Marker und Tierstamm spezifisches Bandenmuster.

Anhand der verschiedenen Muster lässt sich in der F2-Population ermitteln, welches Tierexemplar heterozygot bzw. homozygot an einem untersuchten chromosomalen Abschnitt ist (Abb. 4).

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 227 Mikrosatelliten verwendet. Für die Auswahl der Marker war entscheidend, dass sie polymorph zwischen den Parentaltierstämmen sind und die ausgewählten Marker sich gleichmäßig über das gesamte Genom in regelmäßigem Abstand (etwa 10 cM) verteilen.

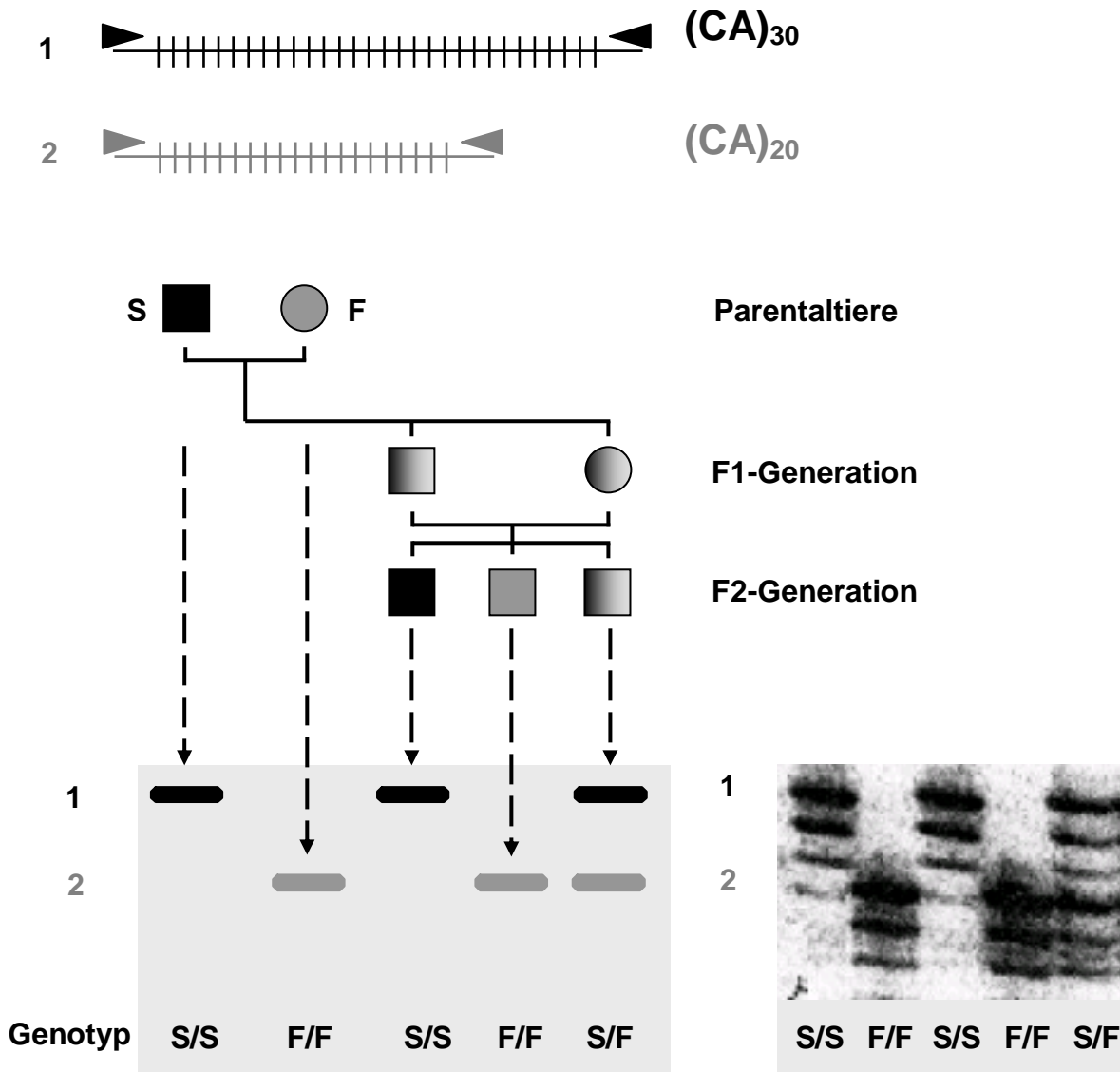


Abb.4: Prinzip der Genomuntersuchung: Parentaltier S besitzt einen Marker, der eine 30-fache Wiederholung der Basen Cytosin und Adenosin $(CA)_{30}$ aufweist (1). Derselbe Marker ist durch einen Polymorphismus bedingt bei Parentaltier F kürzer und weist nur eine 20-fache Wiederholung auf (2). Während in der F1-Generation sämtliche Marker heterozygot vorliegen, kommt es in der F2-Generation zu einer Aufteilung der Marker an den verschiedenen Markerpositionen in homozygot für jeweils eines der Parentaltiere (S/S, F/F) oder heterozygot (S/F). In der Gelelektrophorese wandern kleinere Fragmente schneller als große. Aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit können die verschiedenen Genotypen den Parentaltieren zugeordnet werden (unten links). Unten rechts ist exemplarisch eine Originalabbildung darstellt.

2.2.2.2 Mikrosatellitenmarker

Die für die Arbeit verwendeten entsprechenden PCR-Sonden wurden vom Medical College of Wisconsin entwickelt und lassen sich käuflich erwerben. Die Informationen über die Mikrosatellitenmarker sind im Internet über die Rat Genome Database (RGD) verfügbar (<http://www.rgd.mcw.edu/>).

2.2.2.3 Genotypisierung

2.2.2.3.1 Isolierung genomischer DNA

In 2,0-ml Eppendorfgefäße mit 700 µl Tail-Puffer und 40 µl Proteinase K wurden 30 bis 60 mg Milzgewebe bzw. ein ca. 0,5 cm langes Stück Rattenschwanzgewebe gegeben. Diese Gefäße sind am Rotor eines Hybridisierungssofens befestigt worden und wurden über 24 bis 48 h bei 55°C überkopf drehend inkubiert. Nachdem die Proben für 10 Minuten auf Eis lagerten, sind 300 µl klarer Überstand einer 6 M NaCl-Lösung hinzugegeben worden. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße für ein bis zwei Minuten überkopf geschwenkt und nochmals für 5 Minuten auf Eis gelagert. Dem folgte eine Zentrifugation über 15 Minuten bei 14000 U/min bei 4°C. Der Überstand, der sich dadurch bildete, ist in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol versetzt worden. Nach kurzem Schwenken wurden die Gefäße für etwa 30 Minuten auf Eis gelegt. Es folgte eine weitere Zentrifugation mit 14000 U/min für 15 Minuten bei 4°C. Der gebildete Überstand wurde verworfen und das DNA-Präzipitat ist zum Waschen einmal mit 500 µl Ethanol (70%, -20°C) versetzt worden. Der Überstand wurde entfernt und das DNA-Pellet, welches am Boden des Gefäßes sichtbar wurde, getrocknet. Anschließend wurde es in 200 µl Aqua bidest über Nacht bei 4°C resuspendiert.

Zur Bestimmung der Konzentration der gelösten DNA wurde eine Verdünnung mit Aqua bidest im Verhältnis 1:50 hergestellt, deren optische Dichte mit einem UV-1202 Spectrophotometer bei 260 und 280 nm bestimmt wurde.

Zur weiteren Verwendung ist eine DNA-Lösung mit einer Konzentration von 10 ng/µl hergestellt worden. Ausgangssubstanz und Verdünnung wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2.3.2 Herstellung von DNA-Vorratsplatten

Um die große Anzahl an Mikrosatelliten-Markern möglichst zweckmäßig zu handhaben, wurden DNA-Stockplatten vorbereitet. Dabei sind in Eppendorfgefäße je 200µl DNA-Probe (Konzentration 10 ng/µl) pipettiert worden. Zur Kontrolle enthielten jeweils zwei bis vier Proben DNA der Parentaltierstämme. Aus diesen Vorratsplatten sind dann nach einem festen Anordnungsschema mit einer 8-Kanal-Pipette 5µl jeder DNA-Probe entnommen und in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gebracht worden. Wurden die Mikrotiterplatten nicht sofort benötigt, konnten die Proben bei 37°C im Brutschrank eingetrocknet und anschließend bei -20°C gelagert werden. Auch die Stockplatten wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.3.3 Die Polymerasekettenreaktion

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode, bei der durch enzymatische Vermehrung von DNA aus wenig Probenmaterial in kurzer Zeit genügend Material für genetische Analysen von Nukleinsäuresequenzen gewonnen werden kann. Dieser Vorgang wird auch Amplifikation genannt. Zur Durchführung der Amplifikation sind zwei Primer essentiell, die auf beiden Seiten der Sequenz jeweils an einen der beiden DNA-Stränge binden (Sense- und Antisense-Primer). Außerdem sind einzelne Nukleosidtriphosphat-Moleküle und eine hitzestabile Taq-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wird, nötig.

Die PCR wird heute apparativ in einem Thermocycler durchgeführt. Zunächst erfolgt die Denaturierung durch Erwärmung des Versuchs-Assays auf bis zu 94°C. Bei dieser Temperatur werden die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Ketten der zu vervielfältigenden DNA aufgespaltet. Die Nukleinsäure liegt als Einzelstrang vor, der Primer kann nach Abkühlung auf etwa 70°C an das 5'-Ende der Gensequenz binden. Anschließend erfolgen die Bindung der Taq-Polymerase und die eigentliche DNA-Synthese. Dabei synthetisiert die Taq-Polymerase vom Primer aus in 5'-3'-Richtung den komplementären Strang. Diesem Vorgang folgt ein zweiter Zyklus, der wiederum mit einer Denaturierung beginnt. Je nach Bedarf einer bestimmten Menge von DNA können beliebig viele Zyklen durchgeführt werden (Abb. 5).

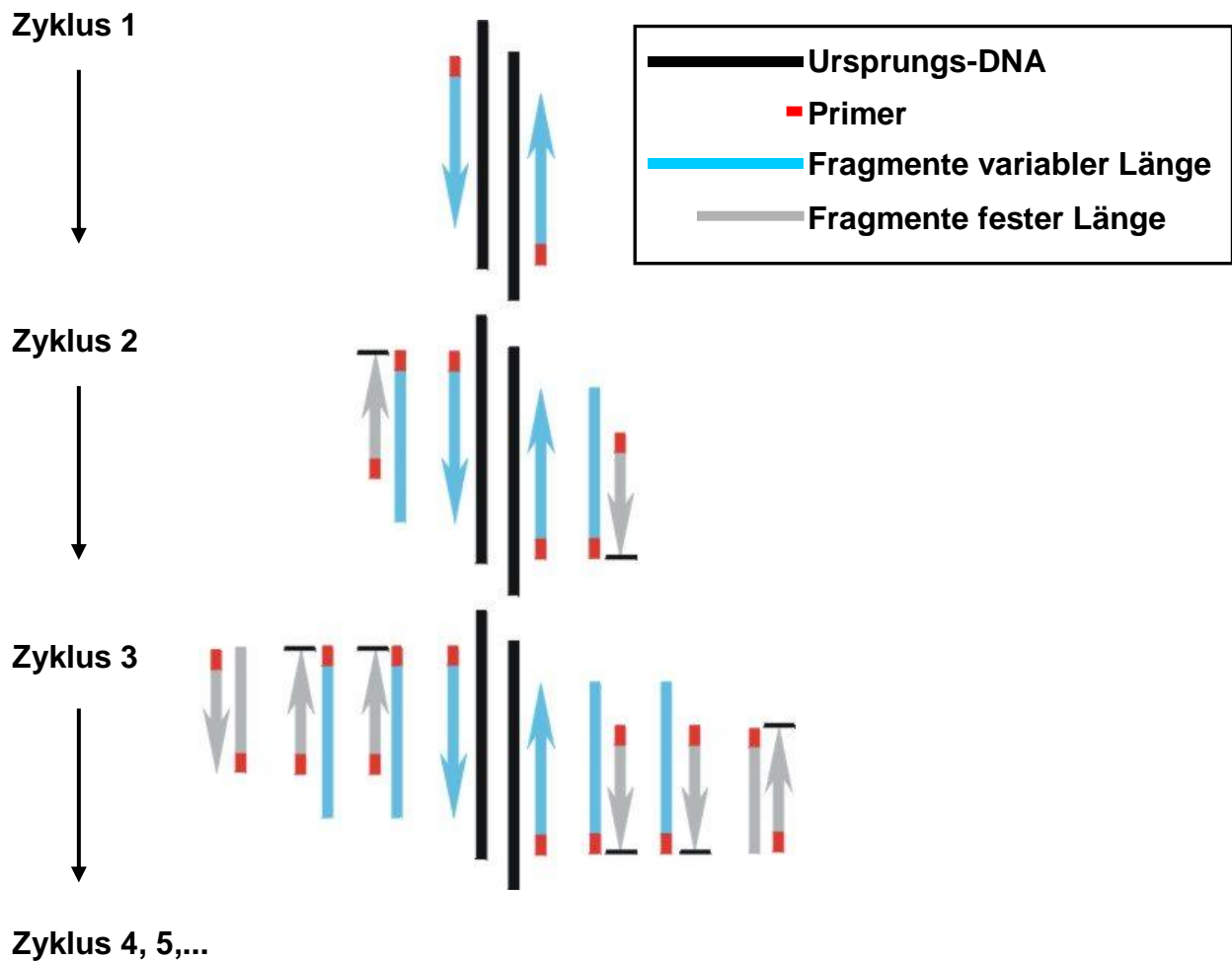


Abb.5: Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion: An einer DNA-Vorlage bindet nach Denaturierung ein Primer. Eine hitzestabile Taq-Polymerase beginnt von dort in 5'-3'-Richtung die DNA gemäß der Vorlage zu synthetisieren. Dabei entstehen Fragmente variabler Länge. In einem zweiten Zyklus wird dieser Vorgang wiederholt. Zusätzlich werden auch die bereits synthetisierten Fragmente kopiert. Die Synthese endet jedoch am Primer aus dem ersten Zyklus. Es entstehen Fragmente fester Länge. Da sich in jedem Zyklus die Menge an DNA-Fragmenten verdoppelt, nimmt die Anzahl der DNA-Fragmente exponentiell zu. Der Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden.

2.2.2.3.4 Markierung von Primern mit radioaktivem Phosphat

Um radioaktiv markierte Primer für die Gelelektrophorese zu erhalten, müssen zunächst die Nukleotidtriphosphat-Moleküle einer so genannten Endmarkierung mit einer T4-Polynukleotidkinase unterzogen werden. Dieses Enzym katalysiert den Austausch des 5'-terminalen Phosphats der DNA mit einer radioaktiven Phosphatgruppe (^{32}P), welche sich in γ -Position eines ATP-Moleküls befindet.

Dazu wurden in ein Eppendorfggefäß zur Herstellung des dazu nötigen Kinase-Mixes 0,04 μl 10x Kinase-Puffer, 0,017 μl T4-Polynukleotidkinase, 0,03887 μl [γ - ^{32}P]-ATP und 0,01943 μl Aqua bidest gegeben. Für jeden einzelnen Marker sind in einem Eppendorf-Gefäß jeweils 0,22 μl Sense-Primer und 0,11 μl Kinase-Mix miteinander vermischt worden. Das Gefäß wurde verschlossen und in einem Thermocycler zuerst für 45 Minuten bei 37°C und dann für 10 Minuten bei 65°C inkubiert

2.2.2.3.5 Technisches Vorgehen bei der PCR

Für die Polymerasekettenreaktion wurde zunächst ein so genannter PCR-Mastermix hergestellt. Das benötigte Volumen für jede DNA-Probe betrug 5 μl und setzte sich wie folgt zusammen: 1,07 μl 10 x PCR-Puffer (Mg-frei), 0,64 μl MgCl_2 (25 mM), 0,9 μl dNTP's (2,5mM) und 2,39 μl autoklaviertes Aqua bidest. Dieser Mix ist dann in einem 0,2 ml-Eppendorfggefäß mit dem ^{32}P -markiertem Sense-Primer (0,33 μl), 0,22 μl Antisense-Primer und 0,07 μl hitzestabiler Taq-Polymerase kombiniert worden. Sollten Mikrotiterplatten mit eingetrockneter DNA verwendet werden, so musste noch dem Reaktionsvolumen das gleiche Volumen an autoklaviertem Aqua bidest (5,62 μl) hinzugegeben werden.

Von diesem Ansatz wurden 5 μl (bzw. 10 μl bei eingetrockneter DNA) in jedes Loch der vorbereiteten DNA-Mikrotiterplatte gegeben und die pipettierten Platten mit Folie verschweißt. In jedem befand sich dann in 10 μl Reaktionsvolumen gelöst 50 ng genomische DNA, die im Thermocycler amplifiziert wurde.

Das Amplifikationsprogramm bestand aus einer drei Minuten dauernden Denaturierung bei 94°C und einem sich 30-mal wiederholenden Zyklus von 15 Sekunden bei 94°C, einer Minute bei der Primer-spezifischen Annealing-Temperatur und eine Minute bei 72°C. Das Programm ist beendet worden durch eine Extension bei 72°C für sieben Minuten und eine Kühlung für zehn Minuten bei 15°C. Gelagert wurden die hergestellten PCR-Produkte bei 4°C.

2.2.2.3.6 Polyacrylamidgel (PAA)-Elektrophorese

Die amplifizierte PCR-Produkte wurden in einem 0,4 mm dicken, denaturierenden Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Zur Herstellung der Gele wurden zwei Glasplatten pro Gel benötigt. Diese 44 x 37,5 cm messenden Platten sind mit Ethanol gereinigt worden. Anschließend wurde eine der beiden Platten mit Aceton zur besseren Haftung des Gels nachbearbeitet. Die andere Platte ist mit Acrylease™ imprägniert worden, um eine bessere Ablösung des Gels von der Glasplatte nach der Elektrophorese zu ermöglichen. Im Anschluss an diese Behandlung wurde an den beiden längeren Seiten einer Glasplatte jeweils ein 0,4 mm dicker und 0,8 cm breiter Kunststoffstreifen aufgelegt, um den entsprechenden Raum zwischen den Glasplatten für das Gel zu schaffen. Die Platten wurden aufeinander gesetzt und mit je zwei Klammern an den Außenseiten fixiert. Die untere Seite wurde mit Paketklebeband abgedichtet.

Zum Gießen des Gels wurden 70ml einer Polyacrylamid-Lösung mit 400µl Ammoniumpersulfat und 40µl TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin) versetzt, um eine Polymerisation des Gels einzuleiten. In die obere Seite der Platten ist ein Kunststoffkamm von 0,4 mm Dicke eingesetzt worden. Dabei zeigten die 64 Zacken des Kamms vom Gel weg, um einen glatten Gelrand zu schaffen. Diese Seite wurde ebenfalls mit Klammern fixiert. Nach etwa 1,5 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur war das Gel polymerisiert und damit fest. Die Klammern, das Klebeband und der zuletzt eingefügte Kunststoffstreifen konnten nun entfernt werden. Der Kamm wurde nun gewendet, sodass die Spitzen der Kammzacken etwa ein bis zwei Millimeter in das Gel hineinreichten.

Das so vorbereitete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit 1xTBE-Puffer gefüllt. Zum Beladen der Gele wurde die aufgeschweißte Plastikfolie der PCR-Platten mit einem Skalpell geöffnet und 10 µl Ladepuffer zu jeder DNA-Probe hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben fünf Minuten bei 95°C im Thermocycler denaturiert.

Direkt im Anschluss an die Denaturierung wurden mit einer 8-Kanal-Glaspipette in jede Aussparung des Kamms etwa 5 µl DNA Probe aufgetragen, wobei die Anordnung der Proben so gewählt war, dass auf jedes Gel von jedem Parentaltierstamm mindestens eine Probe als Kontrolle aufgetragen war. Nach Beladen des Gels ist die Elektrophorese für etwa zwei bis drei Stunden bei 70 Watt durchgeführt worden.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Amplifikate wird durch Ladung und Größe bestimmt. Je kleiner ein Amplifikat und je mehr Ladungen es besitzt, desto schneller wandert es durch das Gel.

Im Anschluss an die Elektrophorese sind die Glasplatten mit dem dazwischen befindlichen Gel aus der Kammer genommen worden. Eine der beiden Glasplatten wurde entfernt, das Gel auf Gel-Blotting-Papier übertragen und dann in Klarsichtfolie zur Verhinderung der Austrocknung eingepackt. Anschließend wurden sie in Röntgenkassetten gelegt. Zur Darstellung der amplifizierten und radioaktiv markierten DNA-Produkte ist für sechs bis zwölf Stunden bei -20°C ein Kodak BioMax Röntgenfilm dem Gel exponiert worden. Nach der Entwicklung des Films konnten so die DNA-Banden sichtbar gemacht werden und die Genotypen für jeden Marker bestimmt werden. Die Auswertung der Filme erfolgte durch zwei Personen unabhängig voneinander.

2.2.2.4 Statistische Analyse und Kopplungsanalyse

Die statistische Auswertung beinhaltete eine vergleichenden Untersuchung der phänotypischen Daten der Parentaltiere sowie der F₂-Population. Regressionsanalysen wurden mit dem Programm SPSS 11.0 durchgeführt. Dadurch wurden die Phänotypen auf Korrelation untereinander untersucht. Neben dem Korrelationskoeffizienten r wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 berechnet.

Die weitere statistische Analyse erfolgte nach der Ermittlung der Genotypen der F₂-Population. Zunächst wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests die Phänotypen auf Normalverteilung hin überprüft. Bei fehlender Normalverteilung wurden die Werte logarithmiert, um eine Normalverteilung zu erhalten. Anschließend wurden mit dem MapMaker/EXP Chromosomenkarten erstellt und eine Kopplungsanalyse mit dem MapMaker/QTL 3.0b-Programm durchgeführt. Die Berechnung der chromosomalen Abstände in *centiMorgan* (cM) erfolgte über die Rekombinationshäufigkeiten mittels des Kosambi-Algorithmus. Die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens eines QTL wurde als LOD-Wert ausgedrückt.

Um zu entscheiden, ob LOD-Werte ein signifikantes Ereignis anzeigen, ist es nötig festgelegte Kriterien zu formulieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die von Lander und Kruglyak 1995 postulierten Signifikanzkriterien verwendet. Gemäß diesen kann bei der Analyse einer F₂-Population von einer wahrscheinlichen Kopplung bei einem LOD-

Wert von $\geq 2,8$ und einer signifikanten Kopplung bei einem LOD-Wert von $\geq 4,3$ ausgegangen werden (Lander & Kruglyak, 1995).

Auf diese Weise gefundene wahrscheinliche und signifikante QTL wurden einer Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) zur Ermittlung des Einflusses der einzelnen Genotypen auf die Varianz der verschiedenen Phänotypen in einer Genotyp-Phänotyp-Analyse unterzogen. Dabei sind jene Marker gewählt worden, die sich am nächsten zu den LOD-Wert-Peaks befanden. Für diese Berechnung sowie für die Berechnung der p-Werte wurde ebenfalls das SPSS 11.0-Programm verwendet.

2.2.2.5 1-LOD- und 2-LOD-Intervall

Um den vom QTL angezeigten Bereich zu beschreiben, wird das 1-LOD- sowie das 2-LOD-Intervall gebildet. Dabei handelt es sich um die Region um den maximalen LOD-Wert, in dem die LOD-Werte maximal um den Betrag 1 beim 1-LOD-Intervall bzw. 2 beim 2-LOD-Intervall niedriger sind als der maximale LOD-Wert. Das 1-LOD-Intervall beinhaltet mit einer Sicherheit von 95% das für den Anstieg der LOD-Werte verantwortliche Gen.

Eine größere Verlässlichkeit kann das 2-LOD-Intervall geben. Hiermit werden auch Gene erfasst, die nur geringe Effekte auf den untersuchten Phänotypen ausüben (Van Ooijen, 1992; Mangin et al., 1994).

2.2.2.6 Kandidatengensuche und Homologievergleich

Da diese Studie letztlich darauf abzielt, krankheitsrelevante Kandidatengene bei der Ratte und Homologien beim Menschen zu finden, wurde im Anschluss an die statistische Analyse nach bereits bekannten, an dieser Position sich befindlichen Genen gesucht. Dazu sind Internetdatenbanken genutzt worden, die Informationen über bereits kartierte Gene und deren chromosomaler Lage bei Ratte und Mensch zur Verfügung stellen. Die hierfür verwendeten Datenbanken waren im Einzelnen die bereits erwähnte Rat Genome Database, des weiteren das National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und die NCBI National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>).