

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus dem Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Martin Paul
Abteilung Klinische Pharmakologie
Abteilungsleiter Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz

**Charakterisierung der genetischen Grundlage der
Albuminurie bei der Munich-Wistar-Frömter Ratte:
Identifizierung eines wichtigen Genlocus auf
Rattenchromosom 8**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Martin Mostler
aus Hamburg

Referent: Prof. Dr. med. R. Kreutz

Korreferent: Prof. Dr. med. F. C. Luft

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 23.03.2007

In Dank gewidmet

Professor Gerhard Mostler
und
meinen Eltern

“Quamvis sint alatae dubitationes“

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1 Hypertonie als gesundheitspolitisches Problem	3
1.2 Proteinurie als Zeichen der Nierenschädigung	4
1.3 Die Rolle der Niere in der Entstehung der Hypertonie	7
1.4 Bauweise und Funktion der Niere	8
1.5 Tiermodelle	9
1.6 Vorteile der Genomweiten Kopplungsanalyse	10
1.7 Experimenteller Ansatz	12
1.8 Ziel der Arbeit	12
2. Material und Methoden	
2.1 Die MWF-Ratte als Modell für Albuminurie und Glomerulosklerose	13
2.2 Herkunft der Tiere	14
2.3 Züchtung und Haltung eines Backcross (MWF x SHR)	14
Abbildung 1: Kreuzungsschema der Backcrosszüchtung	15
2.4 Genom-Analyse mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker	15
2.5 Geschichte der Kosegregationsanalyse	16
2.6 Prinzip der Kosegregationsanalyse	17
2.7 Genomanalyse der Parental- und Backcross-Tiere	19
2.8 Prinzip der Genotypisierung	19
Abbildung 2: Prinzip der Genotypisierung	20
2.9 Kinasierung	20
2.10 Polymerase Ketten Reaktion	20
2.11 Polyamidacryl-Gelelektrophorese	21
2.12 Genomische DNA-Isolierung aus Rattenschwänzen und Milz	22
2.13 Präparation von DNA-Vorrats-, und Arbeitsplatten	23
2.14 Phänotypisierung der Parental- und Backcross-Tiere	24
2.15 Albuminurie und Proteinuriemessungen	24
2.16 Präparation der Organe	24
2.17 Statistische Analyse	27
3. Ergebnis	
3.1 Charakterisierung der Parentalstämme	28
Abbildung 3 Systolischer Blutdruck der Parentaltiere im Vergleich	28
Abbildung 4 Gesamtproteinurie der Parentaltiere im Vergleich	29
Abbildung 5 Albuminurie der Parentaltiere	29
Tabelle 1 Phänotypen Parentaltiere	30
3.2 Charakterisierung der Backcrosspopulation	31
3.3 Phänotypisierung aller Tiere	31
Tabelle 2 Backcross-Tiere UAE und UPE Woche 8, 14, 24	31

3.4 Genotypisierung der Extremtiere	32
Tabelle 3 Ergebnisse Kopplungsanalyse der Extremtiere	33
3.5 Kopplung Systolischer Blutdruck	34
3.6 Kartierung RNO8 für Albuminurie	34
Abbildung 6 LOD-Werte UAE Chromosom 8	35
3.7 Kartierung RNO8 für Proteinurie	36
Abbildung 7 LOD-Werte UPE Chromosom 8	36
Tabelle 4 LOD-Werte aller UAE, UPE und SBD auf RNO8	38
Abbildung 8: Chromosomenkarte RNO 8	39
4. Diskussion	
4.1 Phänotypisierung der Parentaltiere	40
4.2 Phänotypisierung der Backcrosstiere	40
4.3 RNO8 UAE	41
4.4 RNO8 UPE	43
4.5 Bedeutung der gefundenen QTL	43
4.6 Einzelne Gene oder ein Zusammenspiel ?	45
4.7 Geschlechtsspezifische Unterschiede	47
4.8 Ausblick	48
4.9 Zusammenfassung	49
5. Literaturverzeichnis	51
6. Eigene Veröffentlichung	54
7. Materialien	
7.1 Chemikalien und Substanzen	55
7.2 Enzyme	55
7.3 Lösungen und Puffer	56
7.4 Sonstige Materialien	56
7.5 Geräte	57
7.6 Software	57
7.7 Internetseiten	57
8. Danksagung	58
9. Lebenslauf	59
10. Erklärung	60

6. Eigene Veröffentlichung

Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden veröffentlicht in:

Schulz A, Standke D, Kovacevic L, Mostler M, Kossmehl P, Stoll M, Kreutz R:

A Major Gene Locus Links Early Onset Albuminuria with Interstitial Fibrosis in the MWF Rat with polygenetic Albuminuria. *J Am Soc Nephrol* **14**: 3801-3809, 2003

7. Materialien

7.1 Chemikalien und Substanzen

Substanz	Hersteller
[γ - ³² P]-ATP (3000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40)	Roth
Acrylease	Stratagene
Agarose zur Elektrophorese	Life Technologies, Roth
Ammoniumacetat (5 M)	Ambion, Merck
Albumin, Rat; Polyclonal Antibody, Anti-Rat	ICN
Äther	Sigma
Chloroform	Sigma
dATP, dCTP, dGTP	Ambion
dNTPs (2,5 mM) (5'-Desoxynukleotidtriphosphate)	Rapidozym, Promega
DEPC (Diethyl Pyrocarbonat)	Sigma
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth
Elutions Puffer	Ambion
Ethanol	J.T. Baker
Glycerin (99%)	Janssen Chimica
Harnstoff	Roth
Isopropanol	Sigma
MgCl ₂	Promega
NaCl	Merck
NaOH	Merck
10x PCR-Puffer	Rapidozym, Promega
Pikrinsäure Merck	Merck
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v/v)	Sigma
Phenol	Merck
Proteinase K	Sigma
Primer	Life Technologies, Genset Oligos
Rattenserum-Albumin (RSA)	Sigma
Rotiphorese (40% Acrylamid, 2% Bisacrylamid)	Roth
Salzsäure (HCl, 37%, v/v)	Merck
SDS (Lauryl Sulfate)	Sigma
Szintillationsflüssigkeit	Packard
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma
Tris	Merck
10x TBE (Tris-Borat-EDTA-Lösung)	Gibco BRL
10x Kinase Puffer	Promega
10x PCR Puffer	Promega

7.2 Enzyme

Enzym	Aktivität	Hersteller
Taq Polymerase	5 U/μl	Promega
T4-Polynukleotidkinase	10 U/μl	Promega

7.3 Lösungen und Puffer

Lösung	Inhaltsstoff	Menge
Elutions Puffer	Ammoniumacetat EDTA SDS	0,5 M 1 mM 0,2%
Fixativ für die Histologie	Ethanol 80% Pikrinsäure Formaldehyd 37% Essigsäure 100%	150 ml 1 g 60 ml 5 ml
Coating solution	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	0,2 mg/ml 0,1 M
Denaturierungslösung	Natriumhydroxid Natriumchlorid	0,5 M 1,5 M
Rattenserum-Albumin-Stock-Lösung	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	1,0 mg/ml 0,1 M
TE Puffer	Tris (pH 8,0) EDTA <i>Aqua bidest.</i>	10 mM 1 mM auf 100 ml auffüllen + autoklavieren
10x Kinase Puffer	Tris-HCl (pH 7,6) MgCl ₂ DTT	700 mM 100 mM 50 mM
10x PCR Puffer	Tris-HCl (pH 9,0) KCl Triton®X-100	100 mM 500 mM 1%

7.4 sonstige Materialien

Artikel	Hersteller
Aceton	J.T. Baker
Acrylase™	Stratagene
Biomax Filme	Kodak
Ethanol	J.T. Baker
Glasplatten, Spacer, Kämmen große PAA-Gele (44x37,5 cm)	PEQLAB
Impfplatten / Thermo-Fast® 96er 0,2 ml Tubeplate	ABgene
Multipipette	Eppendorf
Röntgenkassetten Hypercassette™	Amersham Pharmacia Biotech
Saran™ Plastikfolie	DOW Chemical Company
Schweißfolie	GENETIX
selbstklebende Plastikfolie Thermowell™	Costar
Standardpipetten	Eppendorf
Standartips 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Whatman Papier	3M
0,2 ml PCR-Röhrchen MicroAmp™	Perkin Elmer
1,5 ml, 2,0 ml Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf
8-Kanal Glaspipette 0-10 µl	Hamilton
15 ml Falcon-Röhrchen	Sarstedt
20 ml Greiner-Zentrifugenröhrchen	Greiner

7.5 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Varioclav®	H+P Labortechnik
Brutschrank	Heraeus Instruments
TSE Blutdruck-Monitor Mehrkanal-System	TSE – Technical & Scientific Equipment GmbH
elektronischen Feinwaage BP610	Sartorius
Elektrophoresekammer für große PAA-Gele	Stratagene, PEQLAB
Folienschweißgerät	MDC
Hybridisierungsöfen	Biometra
Magnetrührer MR2002	Heidolph
PCR-Cycler PTC-100™	MJ Research
Photometer UV-1202	Shimadzu
Rotationsinkubator	Infors
Stromversorgungsgeräte Elektrophoresekammern	für Biometra, Life Technologies
Thermoblock Dri-Block® DB3A	Techne
Tischzentrifuge 5414	Eppendorf
Wasserbad	GFL
³² P-Counter 1219 Rackbeta	LKB Wallac

7.6 Software

Programm	Hersteller
MAPMAKER/EXP 3.0, MAPMAKER/QLT 1.1	Whitehead Institute for Biomedical Research / MIT Center for Genome Research, Cambridge, Massachusetts, USA
Software zur Blutdruckmessung	TSE–Technical & Scientific Equipment GmbH
SPSS 8.0 für Windows	SPSS

7.7 Internetseiten

Internetseite	Anwendung
http://ratmap.gen.gu.se/	genetische Marker und Karten für das Rattengenom
http://rgd.mcw.edu/	genetische Marker und Karten für das Rattengenom
http://www.genome.wi.mit.edu/rat/public/	genetische Marker und Karten für das Rattengenom
http://www.informatics.jax.org/rat/	genetische Marker und Karten für das Rattengenom
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/	National Library of Medicine, Literatur
http://www.niams.nih.gov/rtbc/ratgbase/index.htm	genetische Marker und Karten für das Rattengenom
http://www.nih.gov/niams/scientific/ratgbase/	genetische Marker und Karten für das Rattengenom
http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_resources/	genetische Marker und Karten für das Rattengenom

8. Danksagung

Für das Gelingen dieser Arbeit möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Reinhold Kreutz bedanken, unter dessen Leitung das Projekt durchgeführt wurde.

Weiterhin möchte ich mich für theoretisch und praktische Hilfe und Unterstützung bei Dr. A-K. Siegel und insbesondere bei Dr. A. Schulz für die Geduld und vielfache Hilfe bedanken.

Dr. L. Kovacevic danke ich für die geleistete Vorarbeit.

Außerdem danke ich Frau H. Müller, Frau G. Siebert und Frau B. Lack für die Unterstützung im Labor, sowie Frau S. Rademacher für die gute Stimmung bei der Arbeit.

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronische Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht

10. Erklärung

Ich, Martin Mostler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Charakterisierung der genetischen Grundlage der Albuminurie bei der Munich-Wistar-Frömter Ratte: Identifizierung eines wichtigen Genlocus auf Rattenchromosom 8" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe.