

2. Material und Methoden

2.1 Die MWF-Ratte als Modell für Albuminurie und Glomerulosklerose

Die Munich-Wistar-Frömter Ratte ist eine Weiterzucht aus der Munich-Wistar Ratte. Sie wurde erstmals von Hackbarth et al. 1980 beschrieben und eignet sich aufgrund verschiedener Eigenschaften hervorragend zur Untersuchung von Hypertonie und Nierenerkrankungen.

Als phänotypische Besonderheit besitzt der MWF-Stamm oberflächlich oder subkapsulär liegende Glomeruli, die somit leicht zu untersuchen sind.

Weiterhin ist die Anzahl der Nephrone, also der kleinsten funktionellen "Niereneinheit", reduziert.

Durch Verlauf der weiteren Inzucht (Bruder-Schwester-Verpaarung) kam es zu weiterer Reduktion der Nephronanzahl, die inzwischen nur noch ca. 50% der Gesamtmenge von gesunden Ratten beträgt (Fassi et al. 1998).

Weitere besondere Merkmale der MWF-Ratte sind der um 12% vergrößerter Durchmesser der Bowmannschen Kapsel sowie eine ausgeprägte Hypertonie und Proteinurie, insbesondere eine Albuminurie.

Diese phänotypische Ausprägung weist darauf hin, dass zwischen den Parametern subkapsuläre Glomeruli, Hypertonie und Proteinurie eine Korrelation besteht; Kreuzungsexperimente (Hackbarth et al. 1991) legen nahe, dass es bei der Selektion des Phänotyps "subkapsuläre Glomeruli" auch zu einer Auslese von einem oder mehreren Allelen für Hypertonie und Albuminurie gekommen ist. Hierbei handelt es sich wohl um einen rezessiven Erbgang.

Weiterhin wird eine beim MWF-Stamm vorhandene Glomerulosklerose beschrieben (Remuzzi et al. 1992).

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die auch beim Menschen auftretende Glomerulosklerose ursächlich mit Hypertonie und Proteinurie assoziiert ist, wobei letztere wohl als verursachende Risikofaktoren gelten können (Hillege et al. 2002).

Daher eignet sich die MWF-Ratte vorzüglich zur Untersuchung von der durch Hypertonie verursachten Glomerulosklerose, als deren erste klinische Manifestation oft die Albuminurie auftritt, und an deren Ende häufig die totale Niereninsuffizienz mit all ihren klinischen Begleiterkrankungen steht. (Ruilope et al. 1990).

Darüber hinaus ist das kardiovaskuläre Risiko bei an Hypertonie und Proteinurie

erkrankten Patienten drastisch erhöht (Baigent et al. 2000). Hypertonie ist dadurch besonders in den westlichen Industrienationen eine ernstzunehmende Bedrohung, sowohl für die Patienten als auch im volkswirtschaftlichen Sinne.

Eine weitere Gemeinsamkeit im Hinblick auf die Glomerulosklerose bei Mensch und Ratte ist die Tatsache, dass bei beiden ist die Progression der Hypertonie und der Albuminurie und der vermutlich daraus resultierenden Glomerulosklerose trotz gleicher Nephronzahl bei männlichen Individuen signifikant stärker ausgeprägt ist. Eine Ursache hierfür konnte bis jetzt noch nicht gefunden werden (Fassi et al. 1998).

Die SHR-Ratte ist ein klassisches Rattenmodell in der Hypertonieforschung. Hierbei handelt es sich um spontan hypertensive Tiere, bei denen über Phänotypisierung und gezielte Selektion der besonders betroffenen Tiere eine Zucht etabliert wurde mit dem Ziel, einen Stamm zu generieren, der einen von äußeren Einflüssen unabhängigen Hypertonus ohne Endorganschädigung aufweist.

2.2 Herkunft der Tiere

Bei den ingezüchteten Rattenstämmen der Art MWF/Rks und SHR/Rks handelt es sich um Tierstämme aus der Tierversuchsanstalt der Freien Universität Berlin, die mindestens über 20 Generationen durch Bruder/Schwesterverpaarung ingezüchtet worden sind, und so eine außerordentlich hohe Homogenität des Genoms aufweisen. Dadurch lassen sich bestimmte zu untersuchende Phänotypen auf einem Genort fixieren und verstärken, und die individuelle Ausprägung entfällt, da alle Tiere auf Umweltstimuli gleich reagieren.

2.3 Züchtung und Haltung eines Backcross (MWF x SHR)

Für die Generierung eines MWF/Rks x SHR/Rks - Backcross wurden jeweils 3 männliche MWF-Tiere mit 3 weiblichen SHR-Tieren verpaart und die resultierende weibliche F1-Generation wiederum mit dem MWF-Vatertier zurückverpaart.

So wurden insgesamt 246 Backcross-Tiere gezüchtet, von denen aus verschiedenen Gründen (Fehlen von Messdaten, vorzeitiger Tod der Tiere) am Ende 215 Ratten in die Studie einbezogen wurden. (Siehe Abbildung 1).

Die Haltung erfolgte in artgerechten Käfigen und den Tierschutz-, und Tierversuchsprotokollbestimmungen der Charite Universitätsmedizin Berlin entsprechend.

Als Futter wurde handelsübliches Rattenfutter mit NaCl-Gehalt 0,2% sowie Wasser ad libitum gegeben.

Eine Zeitschaltuhr sorgte für einen 12stündigen nocturnal/diurnalen Rhythmus.

Zur Weiterzüchtung in der F1-Generation wurden die Tiere mit den höchsten Albuminuriewerten ausgewählt.

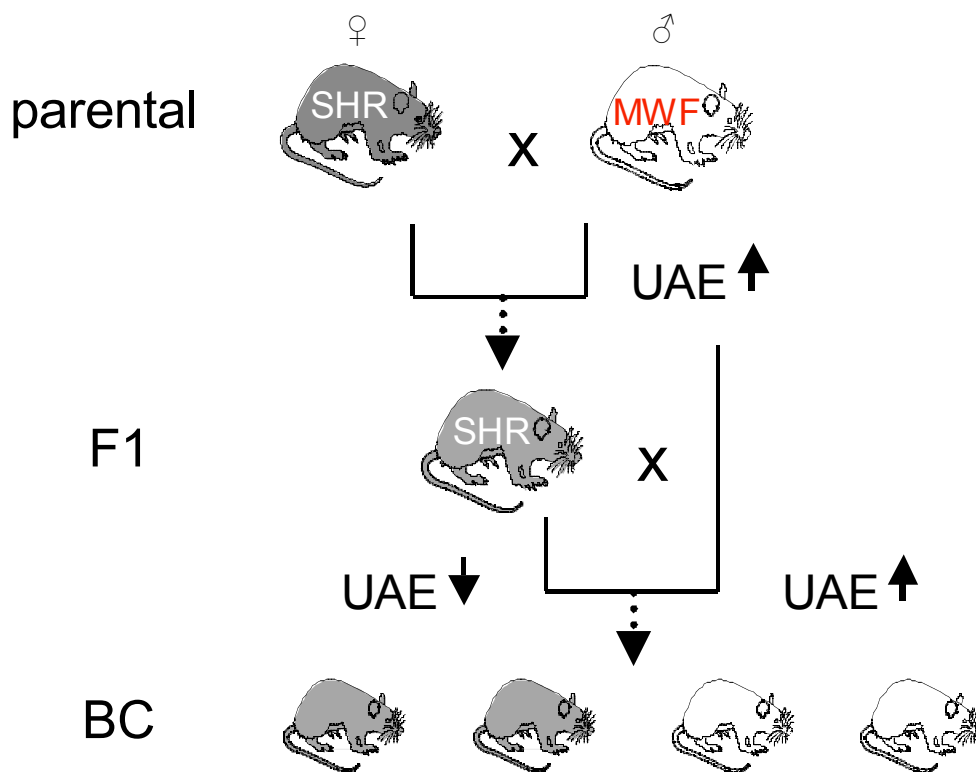


Abbildung 1: Kreuzungsschema der Backcrosszüchtung

MWF Männchen und SHR Weibchen werden verpaart und der weibliche Nachwuchs erneut mit dem MWF-Vater gekreuzt. UAE: Urin-Albumin-Exkretion.

2.4 Genom-Analyse mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker

Die Bedeutung der genetischen Kopplungsanalyse zur Untersuchung multifaktorieller Erbkrankheiten wie z.B. der Hypertonie oder der Nierenschädigung durch unterschiedliche Auslöser kann nicht überschätzt werden.

Bei dieser Methode wird versucht, Abschnitte des Genoms oder Kandidatengene genauer zu lokalisieren, die für bestimmte Phänotypen verantwortlich sind.

Man spricht hierbei auch von einer Kosegregationsanalyse, weil die Marker zusammen mit den für den gesuchten Phänotyp (z.B. UAE) verantwortlichen Allelen

kosegregieren, also aufgrund der räumlichen Nähe auf dem Chromosom gemeinsam vererbt werden.

Dabei spielt die Dichte von molekulargenetischen Markern eine entscheidende Rolle, denn so wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass der Marker auf dem Chromosom nahe an einem den Phänotyp mitbestimmendem Gen platziert ist.

Als "Marker" dienen hierbei mittels PCR leicht zu detektierende CA-repeats, sog. „simple sequence length polymorphisms“ (SSLP), die aus Di, Tri, oder Tetranukleotidrepeats bestehen, und die auf dem nicht kodierenden Abschnitt des Genoms (introns) aller Eukaryoten häufig auftreten und hinsichtlich einzelner Stämme der *rattus norvegicus* große Längenpolymorphismen aufweisen.

Sie können mithilfe der PCR-Technik sehr leicht genotypisiert werden (Stallings et al. 1991; Beckmann et al. 1992).

2.5 Geschichte der Kosegregationsanalyse

Als die Technik der Kosegregationsanalyse entwickelt wurde, hat man vermehrt auf Punktmutationen in Strukturgenen zurückgegriffen, die als Marker verwendet wurden. Voraussetzung war, dass sie einen Polymorphismus zwischen den unterschiedlichen Genotypen aufwiesen, wie z.B. die zunächst beim Menschen untersuchten Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP; Botstein et al. 1980).

Der nächste Schritt in der Entwicklung der Technik der Kosegregationsanalyse wurde dann auch zunächst beim Menschen eingesetzt, nämlich die Verwendung von Mini- und Mikrosatelliten als molekulargenetische Marker (Jeffreys et al. 1985; Weber et al. 1989). Zu Beginn der neunziger Jahre fing man an, auch das Rattengenom mit der Kosegregationsanalyse zu untersuchen. Hierbei wurde für die Erstellung von Mikrosatelliten auf bereits existierende Daten sequenzierter Gene bzw. der GenBank zurückgegriffen (Kunieda et al. 1992; Serikawa et al. 1992). Später wurden von verschiedenen Laboratorien große Mengen an SSLP entwickelt, indem sie in genomischen Bibliotheken ein Screening für Mikrosatelliten durchführten (Jacob et al. 1995; Pravenec et al. 1996; Bihoreau et al. 1997).

So konnten immer dichtere genomische Karten der Rattenchromosomen erstellt werden, was die QTL-Kartierung vereinfacht und präzisiert hat.

In den letzten Jahre sind die Techniken zur chromosomalen Lokalisation von Genen und die Erstellung von genetischen Karten immer weiterentwickelt worden,

inzwischen kann man auf die Somatic-Cell-Hybrid-Panel sowie die Radiation-Hybrid-Cell-Panel zurückgreifen (Watanabe et al. 1999).

Über das Internet sind Informationen hinsichtlich genetischer Marker und Chromosomenkarten, die im Rahmen groß angelegter genomischer Projekte systematisch erstellt und erforscht wurden, frei abrufbar.

<http://rgd.mcg.edu/>; <http://www.informatics.jax.org/rat/>; <http://ratmap.gen.gu.se/>;
<http://ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/>; <http://www.genome.wi.mit.edu/rat/public/>;
http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_resources/;
<http://www.nih.gov/niams/scientific/ratbase/>).

2.6 Prinzip der Kosegregationsanalyse

Man bedient sich der Tatsache, dass zwei nahe beieinander liegende Allele auf einem Chromosom eine hohe Wahrscheinlichkeit haben, auch nach dem crossing over der Meiose nebeneinander zu liegen, und so gemeinsam an die nächste Generation vererbt zu werden.

Beim crossing over kommen die beiden einander entsprechenden Chromosomen des väterlichen und mütterlichen Parentaltieres nebeneinander zu liegen.

Es kommt zum Übereinanderschlagen der Chromatiden mit Austausch von Allelen. Dabei werden nahe beieinander liegende Abschnitte auf einem Chromosom eher zusammen vererbt als weit voneinander entfernte, weil die Wahrscheinlichkeit eines interkurrierenden crossing over größer wird, je größer der räumliche Abstand zwischen zwei Allelen ist.

Die Einheit, mit der die Wahrscheinlichkeit einer Trennung zweier Genorte gemessen wird, heißt "Morgan", benannt nach dem Urvater der modernen Genetik, dem Amerikaner Thomas Morgan (1866-1945).

Ein Morgan entspricht statistisch einer Trennung pro Meiose, d.h. bei 1 cM (Centi-Morgan) kommt es auf hundert Meiosen zu einer Trennung und einem Rearrangement der Basenfolge der DNA.

Die Einheit Morgan ist also nur eine statistische Größe, die den Abstand zweier Gene auf einem Chromosom angibt, abhängig von ihrer Trennungswahrscheinlichkeit unter der Meiose.

Allerdings lassen sich daraus auch ungefähre physikalische Abstände herleiten, im menschlichen Genom entspricht 1 cM ca. 1×10^6 Basenpaaren, bei der Ratte doppelt so viele (Rapp 2000).

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein QTL und der daneben liegende Marker gemeinsam vererbt werden, wird als LOD-Score (logarithm of the odds) bezeichnet. Ein hoher LOD-Score bedeutet also, dass ein Marker nahe an einem Gen liegt, dessen Expression verantwortlich ist für den zu untersuchenden Phänotyp, in diesem Fall also der Albuminurie UAE. Je kleiner man die cM-Abstände der Marker wählt, desto genauer wird das Genom untersucht, und ein Marker, der nahe an einem für den Phänotyp wichtigen Allel liegt, ergibt einen hohen LOD-Score.

Man spricht hierbei auch von einer Kosegregationsanalyse, weil die Marker zusammen mit den für den gesuchten Phänotyp (z.B. UAE) verantwortlichen Allelen kosegregieren.

Um eine nachvollziehbare Statistik durchführen zu können, betrachtet man die Wahrscheinlichkeit des rein zufälligen Kosegregierens eines Markers und eines QTL als Nullhypothese. Sie ist direkt proportional der umweltbedingten Varianz des Phänotyps sowie der Zahl der an ihm beteiligten Gene.

Das bedeutet, je mehr Gene an der Ausprägung eines Phänotyps beteiligt sind, oder je stärker der Phänotyp von der Umwelt beeinflusst wird, desto wahrscheinlicher ist die Nullhypothese.

Demgegenüber steht die Wahrscheinlichkeit, dass die gemeinsame Vererbung von Marker und Gen nicht zufällig erfolgt. Sie wiederum ist direkt proportional der Größe der untersuchten Population, der Dichte und Verteilung der eingesetzten molekulargenetischen Marker innerhalb des untersuchten Genoms, dem Ausmaß der phänotypischen Differenz zwischen den ingezüchteten Parentalstämmen sowie dem relativen Beitrag eines einzelnen QTL bzw. Gens zum gesamten Phänotyp.

Hier gelten die Regeln für alle Studien, mit denen man eine hohe statistische Power erreichen möchte: große Stichprobenmenge n , genau definierte Studienkriterien bzw. Messpunkte, sowie eindeutige und reproduzierbare Messungen.

Das Verhältnis dieser beiden Wahrscheinlichkeiten wird als Ausdruck der Wahrscheinlichkeit betrachtet, dass ein QTL zum Phänotyp beiträgt, und wird in logarithmierter Form als LOD, als "logarithm of the odds" bezeichnet.

Lander (Lander et al. 1989) hat in seinen Arbeiten bewiesen, dass für Kopplungsanalysen neue Signifikanzkriterien herangezogen werden müssen. Während normalerweise eine Signifikanzgrenze von 1:20 gilt, also $p < 0,05$, kann man bei Kopplungsanalysen erst ab einer Wahrscheinlichkeit von 1:1000, einem

$p = 0,001$, davon ausgehen, dass eine Kosegregation von Gen und Marker bestätigt ist.

Dieser Signifikanzwert entspricht logarithmiert einem LOD-Wert (logarithm of the odds) von 3,3 (Lander et al. 1995) Dann liegt eine statistisch signifikante Wahrscheinlichkeit vor, dass Gen und Marker gemeinsam vererbt sind.

Eine relative Wahrscheinlichkeit besteht, wenn der LOD-Wert 1,9 beträgt.

Vereinfacht ausgedrückt: Der Abstand in Morgan zwischen Gen und Marker muss hinreichend klein sein, damit sich für diesen Marker eine hohe Kosegregationswahrscheinlichkeit und damit ein LOD-Score über 3,3 ergibt, der die statistischen Signifikanzkriterien erfüllt.

2.7 Genom-Analyse der Parental- und Backcross-Tiere

Mit Hilfe von für die Parentaltiere des MWF,- und SHR- Stammes polymorphen Mikrosatellitenmarkern wurde eine Analyse des gesamten Genoms von 46 Extremtieren im durchschnittlichen Abstand von 10 cM durchgeführt, insgesamt 231 Marker.

Die Extremtiere wurden jeweils primär nach den höchsten und niedrigsten Albuminuriewerten, und sekundär nach der Höhe ihres Blutdruckes ausgewählt.

Anhand einer vorläufigen Mapmakeranalyse der so gewonnenen Daten konnten mehrere potentiell interessante QTL identifiziert werden, deren p-Wert $< 0,01$ lag. Für diese Loci wurde dann eine Kopplungsanalyse für alle 215 Tiere durchgeführt.

2.8 Prinzip der Genotypisierung

Hierzu werden polymorphe Marker verwendet, die für die Parentalstämme MWF und SHR jeweils homozygot sind. Sie unterscheiden sich in der Länge bestimmter Di- oder Trinucleotid-Repeats auf dem nichtkodierenden Abschnitt des Genoms (Intron). Diese CA-repeats sind hochpolymorph für den jeweiligen Stamm, die individuellen Tiere eines Stammes unterscheiden sich genetisch jedoch kaum, was auf die vielen Inzuchtgenerationen zurückzuführen ist.

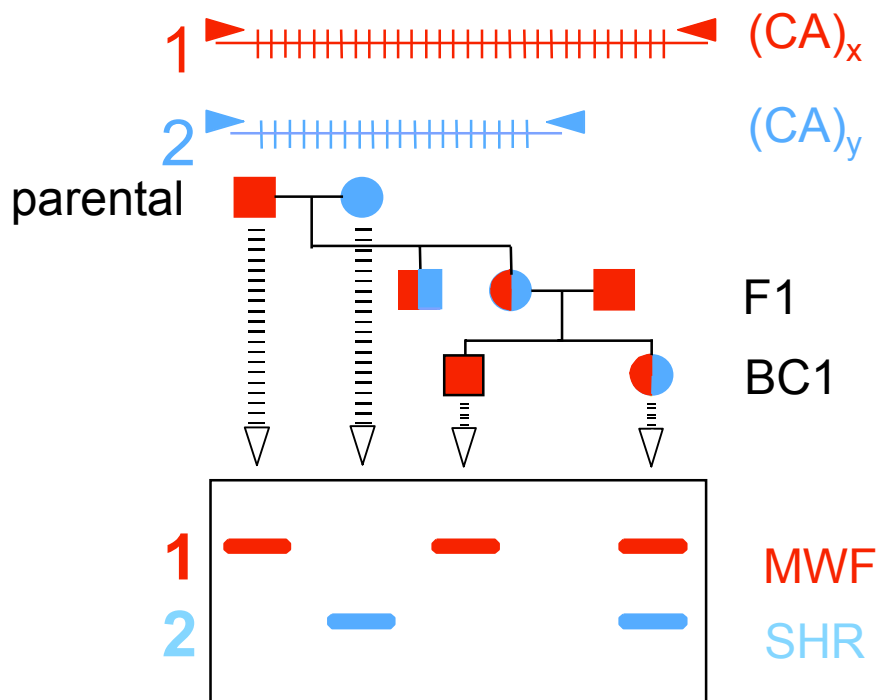


Abbildung 2: Prinzip der Genotypisierung

Ein nicht kodierendes CA-Repeat wiederholt sich bei einem Parentaltier x-mal, beim anderen y-mal. Kosegregierende QTL können so bis in die Backcrossgeneration verfolgt werden.

2.9 Kinasierung

Bei der Kinasierung wird ein Primer des benötigten Primerpaares mit in γ -Stellung radioaktiv markiertem ATP versehen. Hierzu wird wie folgt verfahren: Pro Probe werden 0,04 μ l Kinasepuffer, 0,017 μ l T4 Polynukleotidkinase und 0,0583 μ l ^{32}P - γ ATP als Kinase mix zusammengegeben; hiervon werden jeweils 0,11 μ l Kinase mix und 0,22 μ l eines der beiden Stränge des Primerpaares verwendet. Per Absprache wurde sich im Labor darauf verständigt, hierfür den "sense-primer zu verwenden. Die Kinasierung erfolgt in der PCR- Maschine mit folgendem Programm: 45 min bei 37°C und 10 min bei 65°C. Die kinasierten Proben werden bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

2.10 Polymerase Ketten Reaktion

Die Polymerasekettenreaktion dient dazu, eine bestimmte zwischen zwei flankierenden Primern liegende Basenabfolge zu amplifizieren. Dazu wird in einem automatisch ablaufenden Zyklus die doppelsträngige DNA denaturiert und dann mit

Hilfe einer Thermostabilen Polymerase die komplementären Basen eingebaut. Da in jedem neuen Zyklus auch die vorher amplifizierten Basenstränge als Matrizen dienen, vervielfältigt sich der gesuchte DNS-Abschnitt exponentiell.

Ein Mastermix aus je Probe 1,3 µl PCR-Puffer (Mg-frei), 0,78 µl MgCl₂ (25mM), 1,1 µl dNTP (2,5mM) und 2,92 µl Aqua bidest wird hergestellt. Daraus werden je Probe 5,0 µl Mastermix, der gesamte kinasierte Primer, 0,22µl des anderen "antisense"-primers mit 0,07 µl Taq-Polymerase versehen und hiervon jeweils 5,0 µl auf die 50 ng getrocknete genomische DNA in den Mikrotiterplatten gegeben und bei folgendem Programm amplifiziert: Initiale Denaturierung bei 94°C für 3 Minuten, anschließend jeweils 30 Zyklen wie folgt: 15 sec bei 94 °C, 1 min bei der spezifischen annealing-Temperatur des Primers (bei den meisten Primern 55°C, sonst anders angegeben) und eine Primerextension von 1 min bei 72 °C. Abschließend (nach den 30 Zyklen) werden die Amplifikatenden für 7 min bei 72°C aufgefüllt und schlussendlich bei 15 °C für 10 min auf Raumtemperatur abgekühlt und können dann bei +4°C für zwei Wochen gelagert werden (HWZ für γ-32P-ATP 14 Tage).

Um unsaubere Signale oder schlecht anealende Primer besser hervorzarbeiten, kann man ein sog. Touchdownprogramm verwenden, hierbei ist das PCR-Programm im Prinzip das gleiche, allerdings wird sich schrittweise mit jeder Zykluswiederholung an die jeweilige Temperatur des Primers herangetastet.

2.11 Polyamidacryl-Gelelektrophorese

Gelelektrophorese funktioniert nach dem Prinzip der Größeunterschiede von DNA oder RNA-Produkten und der damit verbundenen unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit in einer Matrix, an die eine elektrische Spannung angelegt wird. Hier wandern die negativ geladenen Fragmente auf den positiv geladenen Pol zu.

Zur Auftrennung der Proben werden PAA-Gele verwendet, die folgendermaßen hergestellt werden. Für einen Gelmix aus PAA und Wasser werden 31,5 g Harnstoff, 7,0 ml 10x TBE, 10,5 ml Rotiphorese (40 % Acrylamid) und 27,0 ml A. bidest zusammengegeben und auf dem vorgewärmten Mischer bei ca. 250 U/min gerührt, bis sich der Harnstoff aufgelöst hat.

Zwei Glasplatten der Abmessung 45x35 cm werden, nachdem die eine auf der Innenseite mit Ethanol und Aceton und die andere auf der Innenseite mit Ethanol und

Acrylease behandelt wurden, mit zwei Spacern am Rand als Abstandhalter aufeinander gelegt.

Ein Gelansatz wird aus 70 ml des Gelmix, 40 μ l Temed und 400 μ l APS hergestellt und dieser Gelansatz blasenfrei zwischen die beiden vorbehandelten Platten gegossen. Das Auslaufen am unteren Ende wird durch ein Plastikband verhindert, am oberen Ende wird ein Gelelektrophoresekamm verkehrt herum 6 mm tief zwischen die Platten eingeführt, um einen geraden Abschluss des Gels zu erreichen. Nach ca. zwei Stunden ist das Gel getrocknet und für drei Tage verwendungsfähig.

Der Kamm wird nun entfernt, gesäubert so herum wieder zwischen die Glasplatten in die Oberkante des Gels geschoben, dass 70 kleine Taschen zwischen den Kammzinken entstehen. Das Gel wird in eine Gelelektrophoresekammer gegeben, von Harnstoffrückständen gereinigt und beladen, d.h. die vorher 5 min bei 95°C denaturierten und mit dem radioaktiv markierten Primer amplifizierten DNA-Proben werden mithilfe einer Hamiltonpipette in die einzelnen Taschen gegeben, jeweils 5 μ l. Die Kammer wird mit Puffer aufgefüllt und eine Spannung von 70 Watt angelegt.

Dem elektrischen Gradienten folgend wandern die Proben durch das Gel, aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe jedoch schneller oder langsamer. Das ergibt nach 2 bis 4 Stunden, abhängig von der Größe der Amplifikate, eine unterschiedlich große Wanderstrecke. Wenn die Spannung abgestellt und der Puffer entfernt ist, können die Gele aus den Kammern abgebaut werden und die beiden Platten vorsichtig voneinander getrennt werden. Das Gel mit den Proben kann durch "Abklatschen" nun auf ein Papier übertragen werden (blotten). Das Gel auf dem Papier wird, um Kontamination zu verhindern, in Folie eingeschlagen und zusammen mit einem Röntgenfilm für 24h in einer Filmkassette belichtet. Nach der Belichtungszeit kann der Film entwickelt werden.

2.12 Genomische DNA-Isolierung aus Rattenschwänzen und Milz

Für eine DNA-Isolierung zur Genotypisierung werden entweder 0,5 cm Schwanzgewebe oder ca. 50 mg Milz verwendet. Das Gewebe wird in 40 μ l Proteinase K (10mg/ml) sowie 700 μ l Lysis-Puffer für drei Tage im Hybridisierungssofen bei 55°C überkopfdrehend verdaut.

Anschließend folgt Kühlung für 10 min in einem Eisbett, danach Eiweissfällung und Reinigung mit 300 μ l gesättigter NaCl-Lösung (6 M).

Nach fünfminütiger Inkubation, wiederum auf Eis, wird das Lysat für 15 min bei 14.000 U/min und 4°C zentrifugiert und 850 µl des Überstandes in ein neues Probengefäß abpipettiert

Dieser wird zur DNA-Fällung mit 1 ml Isopropanol vermischt und für ca. 50 min auf Eis gekühlt. Anschließend erneutes Zentrifugieren und Abpipettieren des Überstandes, so dass schließlich ein DNA-Pellet entsteht, welches mit 500 µl –20°C kaltem, 70%Ethanol in einem 15 min. dauernden Zentrifugationsschritt mit 14.000 U/min bei 4°C gewaschen wird.

Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur für 15 min, anschließend Zugabe von 200 µl A. bidest und Lösung des Pellets über 12 h bei 4°C darin.

Die DNA-Konzentration der Probe kann anschließend nach Verdünnung 1:20 durch Photometrie bei einer Wellenlänge von 260-280 nm bestimmt werden, die Einheit ist µg/µl.

Um Tier-, oder DNA-Verwechslungen auszuschließen, wurde eine Probegenotypisierung vor und nach Organentnahme durchgeführt, im Alter von vier Wochen aus der Schwanzspitze (Tailcut), und nach dem Tod der Tiere aus Milzgewebe.

Außerdem wurden die Tiere direkt nach der Geburt mit einer Lochzange in der Ohrmuschel markiert.

2.13 Präparation von DNA-Vorrats- und Arbeitsplatten

Um eine rationelle Handhabung multipler DNA-Proben und deren Genotypisierung mit einer Vielzahl an Markern zu gewährleisten, wurden DNA-Vorrats- und Arbeitsplatten angelegt. In die Vorratsplatten wurde dabei nach einem festgelegten Anordnungsschema in 93 Felder von 96er Impfplatten (Thermo-Fast 96 0,2 ml tube plate) je 100 µl der zu untersuchenden DNA-Lösungen mit einer Verdünnung von 10 ng/µl pipettiert. In die übrigen 3 Felder der Tube Plates wurden als Kontrollen jeweils DNA-Lösungen der beiden Parentalstämme mit der gleichen Verdünnung sowie als Negativkontrolle A. bidest. pipettiert. Aus den Vorratsplatten wurden später entsprechend der festgelegten Anordnung mit einer 8-Kanal-Pipette je 5 µl der DNA-Lösungen in weitere 96er Impfplatten, den Arbeitsplatten überführt. Abschließend wurden die DNA-Platten im Brutschrank bei 37 °C für 4-6 h getrocknet, zuletzt mit selbstklebender Plastikfolie verschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

2.14 Phänotypisierung der Parental- und Backcross-Tiere

Bei den männlichen Parentaltiere wurden in der 14. Woche die Phänotypen systolischer Blutdruck (SBP, Systolic Blood Pressure), Proteinurie (UPE, Urinary Protein Excretion), und Albuminurie (UAE, Urinary Albumin Excretion) untersucht. Hierbei wurde für den SBP die sog. "Tail-cuff-Methode" verwendet (Kreutz et al., 2000). Arterielle Durchblutungsschwankungen werden oszillatorisch mittels einer um die Schwanzwurzel gelegten Manschette gemessen und durch eine geeignete Software (TSE Blutdruck-Monitor Mehrkanal-System) in systolische Blutdruckwerte umgerechnet.

Die Tiere werden erst an zwei aufeinander folgenden Tagen durch eine Probemessung an den Messvorgang gewöhnt, um mögliche Fehlmessungen durch Stress zu vermeiden.

Die endgültigen Messungen erfolgten an wachen Tieren in der gewohnten Umgebung, jeweils sechs an zwei oder drei aufeinander folgenden Tagen.

Die so ermittelten Werte, mindestens 12, maximal 18 pro Tier, wurden arithmetisch gemittelt und als SBD, als systolischer Blutdruck, festgelegt.

Die totale Proteinurie (UPE) sowie die Albuminurie (UAE) der Backcross-Tiere wurden in der 8. Woche bei den Jungtieren sowie später in der 14. und 24. Woche bei den nun ausgewachsenen Tieren bestimmt, um möglicherweise vorhandene sog. "age-of-onset" Phänomene zu entdecken.

Die Tiere wurden hierzu für 24 h in besondere Stoffwechsellkäfige verbracht, wo der gesamte in dieser Zeit produzierte Urin gesammelt und analysiert werden kann.

Wasser und Futter waren auch hier ad libitum.

2.15 Albuminurie- und Proteinuriemessungen

Urin wurde in Szintillationsgefäßen aus Kunststoff gesammelt, um eine Fehlbestimmung durch Albuminablagerungen am Glas zu vermeiden.

Durch Auswiegen erfolgte die Urinvolumenbestimmung, 1g entspricht 1ml.

Zur Albuminmessung wurde ca. 1 ml Urin in ein 1,5ml Eppendorfgefäß gegeben und zur Entfernung von Verunreinigungen für 10 min bei 900U/min zentrifugiert.

Der Überstand wurde erneut in ein weiteres Eppendorfgefäß dekantiert; der restliche Urin wurde bei -20°C in Polyethylenflaschen gelagert.

Die Albuminkonzentration wurde mithilfe einer in der Arbeitsgruppe neu etablierten Methode bestimmt, der direkten kompetitiven Albumin-ELISA (enzyme linked immunoadsorbent assay).

Hierbei werden zum Coaten (zum Vermeiden von Fehlbestimmungen durch Plastikgefäße) einer 96-Mikrotiterplatte je 100µl Coatinglösung pro Loch vorpipettiert und erst für 3 h bei 37°C im Brutschrank und dann für 15 h bei 4°C inkubiert.

Um Verdunstung zu vermeiden wurden die Platten in Klarsichtfolie gewickelt.

Anschließend wurde die Coatinglösung durch Ausklopfen entfernt und die Platten mit 100µl Pufferlösung A auf einem Schüttler in mehreren Waschgängen mit anschließendem Ausklopfen ausgespült.

Die Platten konnten, in Klarsichtfolie eingeschlagen, für max. vier Wochen im Kühlschrank aufgehoben werden.

Eine Eichgerade wurde erstellt aus einem in 100 ml Puffer A verdünnten 100 µl-Aliquot einer Rattenserum-Albumin-Stock-Lösung (1,0 mg/ml), und in folgenden Standardkonzentrationen 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.

Nun wurden 40µl der bei -20°C gelagerten Urinproben je nach der zu erwartenden Albuminkonzentration 1:50, 1:500, 1:5000 und 1:20.000 mit Puffer A verdünnt.

Wenn die Extinktionen dieser Verdünnungen nicht mittig der Eichgeraden lagen, wurde eine entsprechend andere Verdünnung gewählt.

Die vorher gecoateten Mikrotiterplatten wurden nun wieder mit Pufferlösung A gewaschen und dann je Loch 50µl Puffer A zur Leerwertbestimmung sowie 50µl Standard- bzw. Probenverdünnung als Doppelbestimmung zugegeben.

Nach Zugabe von 50µl Konjugat (Rattenantikörper der Firma ICN Biomedical, Eschwege, verdünnt mit Puffer A 1:9000) in jedes Loch wurde die Platte 1h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Für die Farbreaktion (blauer Farbkomplex) wurden 200µl Substratlösung pro Loch hinzugegeben und 15 min auf dem Schüttler durchmischt.

Da es sich dabei um eine sog. Inversreaktion handelt, zeigt eine stärkere Farbreaktion einen niedrigeren Albumingehalt an und umgekehrt.

Das Abstoppen der Reaktion wurde mit 50µl 2 molarer Schwefelsäure pro Loch erreicht.

Vorhandene Luftblasen wurden mit einer Kanüle entfernt und die optische Dichte mithilfe des ELISA-MRX-Plate-Readers bei 450 nm ermittelt.

Die Probenkonzentrationen wurden über die lineare Regression des Logarithmus der Extinktion vs. dem Logarithmus der Standard-Albuminkonzentration bestimmt. Die Erstellung der Eichgeraden, das Ablesen der jeweiligen Extinktionen und der Ausdruck der mg/l-Werte erfolgte mit dem Computerprogramm Dynex Revelation G 3.04. Unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnungen und Urinvolumina wurden die mg/24h-Werte der einzelnen Urinproben berechnet.

Die Inter-Assay-Abweichung bezogen auf denselben Untersucher, in mg/l-Werten, beträgt 0-10%, die Intra-Assay-Abweichung ist unbedeutend.

Die untere Detektionsgrenze für Albumin im Urin liegt bei 10mg/l, ein auch beim nierengesunden Menschen häufig vorkommender Wert.

Oberhalb von 200 mg/l Albumin im Urin fallen aufgrund von hohen Urinverdünnungen (z.B. 1: 200.000) Pipettierungenauigkeiten verstärkt auf, so dass es zu Fehlbestimmungen kommt. Die Methode ist jedoch im Rahmen einer Albuminkonzentration von 10 mg/l - 200 mg/l zuverlässig.

Insgesamt wurden aus 24h-Urin die Parameter Natrium, Gesamtprotein und Albumin bestimmt, die Kreatinin-Clearance konnte berechnet werden.

Kreatinin und Natrium wurden auch im Serum bestimmt.

Die Gesamtproteinbestimmung wurde nach der Bradfordmethode (Bradford, 1976) im eigenen Labor durchgeführt, alle anderen Messungen wurden mit Standardmethoden entweder im hauseigenen Labor für Klinische Chemie (CBF) oder im Labor 28 (Mecklenburgische Straße 28, 14197 Berlin) vorgenommen.

2.16 Präparation der Organe

Zur DNA-Isolierung wurde im Alter von 4 Wochen bei allen Tieren die Schwanzspitze abgeschnitten, die Wunde mit Histoacrylkleber versorgt und die so gewonnen "tailcuts" bei -20°C gelagert.

Für die Organentnahme wurden die Parentaltiere in der 18. Woche und die Backcross-Tiere in der 24. Woche in eine tiefe Äthernarkose versetzt.

Durch einen medianen Längsschnitt wurden Thorax und Abdomen eröffnet und sofort das Herz entnommen. Weiterhin wurden Milz und beide Nieren herauspräpariert.

Für histologische Untersuchungen wurde die rechte Niere am Nierenhilus transversal geschnitten und in ein Fixativ gegeben, welches nach 24h durch 80%igen Äthanol ausgetauscht wurde.

Milz, Herz, Aorta und linke Niere wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Blut wurde aus der A. descendens mit einer Kanüle gewonnen und bei 4°C für 10min bei 8000U/min zentrifugiert, und das so gewonnene Serum und Plasma bei -80°C für weitere Untersuchungen aufgehoben.

2.17 Statistische Analyse

Zur Beurteilung der Einflüsse von Stamm, Geschlecht und Diät auf die Phänotypen erfolgte die statistische Auswertung der Parentalstämme und der Backcrosspopulation über eine Varianzanalyse (ANOVA) mittels des Computerprogramms SPSS 10.0. Des Weiteren wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und der Korrelationskoeffizient ermittelt.

Für eine erste chromosomale Lokalisation der QTL und für die Bestimmung der p-Werte wurden die Programme MapManager QTXb03 und SPSS verwendet.

Die letztgültige chromosomale Lokalisation der QTL und die Bestimmung des LOD-Werts wurden über die Computerprogramme MAPMAKER/EXP und MAPMAKER/QTL 3.0b vorgenommen. Nach Lander und Kruglyak (1995) besteht eine signifikante Kopplung in einer Backcrosspopulation bei einem LOD-Wert $\geq 3,3$ ($p < 0,0001$) und eine wahrscheinliche Kopplung bei einem LOD-Wert von $\geq 1,9$ ($p < 0,0034$). Die genetische Distanz in centiMorgan (cM) wurde mit Hilfe dieses Programms über die Rekombinationsfrequenzen mittels des Kosambi-Algorithmus errechnet (Lander et al. 1987; Lander und Botstein 1989).