

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Radionukleotide

Substanz	Firma
Aceton	J.T. Baker
Acrylamid (Rotiphorese [®] Gel 40)	Roth
Acrylease	Stratagene
Albumin, Rat; Polyclonal Antibody, Anti-Rat	ICN
Ammoniumpersulfat	Sigma
[γ - ³² P] dATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, wässrige Lösung)	Amersham
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Bradford-Reagenz	Sigma
Bromphenolblau, Natriumsalz	Merck
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat (Titrierkomplex III, MG=372,24)	Roth
dNTPs (2,5 mM)	Rapidozym, Promega
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth
Essigsäure (100%)	Merck, Roth
Ethanol	J.T. Baker
Ether	Merck
Formaldehyd (37%, v/v)	J.T. Baker
Formamid	Merck
Harnstoff	Roth
Isopropanol	J.T. Baker
Kinase-10x-Puffer	Promega
Magnesiumchlorid (25 mM)	Rapidozym, Promega

Substanz	Firma
Natriumchlorid	Merck
10x PCR-Puffer	Rapidozym, Promega
Pikrinsäure	Merck
Primer	Life Technologies, TIB MOLBIOL, Genset Oligos
Rattenserum-Albumin (RSA)	Sigma
10x TBE (Tris-Borat-EDTA)	Gibco BRL
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	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 und Lösungen

Puffer / Lösung	Bestandteile	Konzentration / Zusammensetzung
BSA-Stammlösung	Bovines Serum Albumin Aqua bidest.	20 mg/ml
Coating solution	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	0,2 mg/ml 0,1 M
Fixativ für Histologie	Pikrinsäure Essigsäure (100%) Formaldehyd (37%) Ethanol (80%)	1 g 15 ml 60 ml 150 ml

Puffer / Lösung	Bestandteile	Konzentration / Zusammensetzung
Formamid-Laufpuffer (30x)	Bromphenolblau Xylen Cyanol FF Formamid Di-Natrium-EDTA-Dihydrat (0,5 M)	100 mg 100 mg 10 ml 200 µl
Polyacrylamidgel-Lösung	Harnstoff 10 x TBE Rotiphorese (40 % Acrylamid) Aqua bidest.	31,5 g 7,0 ml 10,5 ml 27,0 ml
Tail-Puffer	Tris-Puffer (1 M), pH 8,0 NaCl-Lösung (2 M) EDTA (0,5 M) Aqua bidest. 10 % SDS	10 ml 10 ml 40 ml 120 ml 20 ml

2.1.4 Polymorphe Primer für die Genomanalyse

Siehe Anhang

2.1.5 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
Histoacryl-Gewebekleber	Braun
Haifischzahnkamm Mikrotiterformat, Spacer für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Lochzange für Labortiere	Esculap
Makrolonkäfige Typ III und Typ IV	Ebeco
Mehrkanal-Spritze (8-Kanal; 0-10 µl)	Hamilton
96-er Mikrotiterplatten Qualilab; (F)	Merck
Paketklebeband	Tesa

Produkt	Firma
Reaktionsgefäße 0,2 ml MicroAmp™	Perkin Elmer
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Röntgenkassetten Typ G, 35 x 43 cm	Peq Lab
Schweißfolie	GENETIX
SMR-Zka 10 mm inklusive 4% NaCl (Spezialfutter)	Ssniff
Standardpipetten	Eppendorf
Standartips 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
Verpackungsfolie	Saran
Weithalsflaschen aus Polyethylen	Roth

2.1.6 Geräte

Gerät	Firma
Analysen-Waage BP 610	Sartorius
Automat für die Filmentwicklung X-OMAT 5000 RA	Kodak
Blutdruckmessgerät	TSE
Färbeautomat Robet-Stainer HM 760	Microm
Folienschweißgerät	MDC
Hybridisierungsöfen	Biometra
Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer mit Heizfunktion MR 2002	Heidolph
Microplate-Reader MRX Dynex	Dynex
Mikrotiterplattenschüttler	Roth

Gerät	Firma
Minifuge RF (Zentrifuge)	Heraeus sepatech
Minishaker MS 1	Clarkson Laboratory & Supply Inc.
Multipette plus	Eppendorf
PCR-Cycler	MJ Research
Photometer UV-1202	Shimadzu
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer	Peq Lab
Rotationsmikrotom HM 355	Microm
Stromversorgungsgerät für Elektrophoresekammer	Biometra
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Vortexer VF2	Janke&Kunkell KA Labortechnik

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung

Die Haltung der innerhalb dieser Arbeit verwendeten Rattenstämme, ebenso wie Kreuzung und Zucht, erfolgten in Absprache mit dem Institut für Klinische Pharmakologie der Freien Universität Berlin in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM / FU; amtl. Registriernummer G 0368/97). Die Tiere waren dabei nach Geschlecht getrennt in Gruppen zu je vier Tieren in Makrolonkäfigen vom Typ IV untergebracht. Für die Zeit der Verpaarung wurden die Tiere in Makrolonkäfigen vom Typ III gehalten. Über automatisierte Lichtschalter wurde ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus geregelt; die Temperatur betrug konstant 22 °C. Alle Ratten hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Jungtiere wurden im Alter von ca. 4 Wochen von der Mutter abgesetzt und erhielten mit Hilfe einer Lochzange eine Ohrmarkierung, die einer systematischen laufenden Nummerierung entsprach.

2.2.2 Zucht

2.2.2.1 Parentaltiere

Die verwendeten Dahl/SS/Jr-Ratten wurden 1996 von Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN, USA) bezogen. Ein Jahr später, 1997, wurden die aus der Zucht von M & B, Bomholtvej (Dänemark) stammenden SHR/Mol-Ratten an der Freien Universität Berlin eingeführt. Sowohl der Dahl/SS/Jr- als auch der SHR/Mol-Stamm stellen durch systematische Bruder-Schwester-Verpaarungen über mehr als 20 Generationen Inzuchtstämme dar. Die Erhaltungszucht beider Kolonien erfolgte ebenfalls durch Bruder-Schwester-Verpaarungen in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin.

2.2.2.2 F2-Tiere Dahl/SS/Jr x SHR/Mol

Für die Kosegregationsanalyse wurden Dahl/SS/Jr-Männchen mit SHR/Mol-Weibchen zu einer F1-Generation verpaart. Durch anschließende Bruder-Schwester-Verpaarungen der aus diesen Würfen hervorgegangenen genetisch identischen Jungtiere wurde eine F2-Generation mit insgesamt 230 männlichen F2-Tieren erhalten (Abb. 7).

Box unter Einsatz einer automatisierten, computergestützten, oszillatorischen Technik (TSE, Bad Homburg) vorgenommen. Zur Gewöhnung der Ratten an die Messmethode wurden vor der eigentlichen Messung drei bis vier Probemessungen durchgeführt, deren Ergebnis anschließend verworfen wurde. Nach Adaptation der Tiere und Kalibrierung des Systems wurde der systolische Blutdruck durch drei getrennte Messungen ermittelt, wobei die Daten jeder Messung auf einen Computer übertragen wurden. Dieser Vorgang wurde an drei aufeinander folgenden Tagen unter Berücksichtigung zirkadianer Rhythmen nach demselben Schema zur selben Tageszeit durch dieselbe Person wiederholt. Zum Schluss wurden die Ergebnisse aller Messungen gemittelt.

2.2.4.2 Uringewinnung für die Ermittlung klinischer Parameter

Zur Bestimmung verschiedener Stoffwechselfparameter wurde in der 15. Lebenswoche der 24-h-Urin gesammelt. Die Tiere wurden dazu einzeln unter ansonsten gleichen Haltungsbedingungen in einen Stoffwechselkäfig gesetzt, in dem sie weiterhin freien Zugang zu Futter und Wasser hatten. Der in der Adaptationszeit von 12 Stunden angefallene Urin wurde verworfen. Nach weiteren 24 Stunden wurde der gesammelte Urin in Weithalsflaschen aus Polyethylen dekantiert und das 24-h-Urinvolumen durch Auswiegen bestimmt ($1 \text{ g} \cong 1 \text{ ml}$). Dabei war die Wahl des Gefäßmaterials bedeutsam, damit Albuminablagerungen an Glas- oder bestimmte Kunststoffmaterialien die spätere Albuminbestimmung nicht falsch negativ beeinflussen konnten. Für die analytischen Bestimmungen wurde nach sorgfältigem Durchmischen ca. 1 ml Urin in ein 1,5 ml Eppendorfgesäß dekantiert, der restliche Urin wurde nach Dekantieren in ein Szintillationsgefäß aus Kunststoff bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.2.4.3 Bestimmung der Protein-Ausscheidung

Die Konzentration der mit dem Urin ausgeschiedenen Proteine wurde im 24-h-Urin mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) ermittelt. Zur Erstellung der Eichgeraden für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst eine Stammlösung aus Bovinem Serum Albumin (BSA) in der Konzentration 20 mg/ml hergestellt. Die Stammlösung wurde danach 1:100 mit Aqua bidest. verdünnt und daraus die Standardverdünnungen in den Konzentrationen 0 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,1 mg/ml sowie 0,15 mg/ml BSA hergestellt. Die Urinproben wurden je nach zu erwartender Proteinkonzentration mit Aqua bidest. verdünnt (Verdünnungen 1:50 – 1:500). Nach intensivem Durchmischen der Probe mit Hilfe des Vortexers wurden in einer Doppelbestimmung jeweils 100 μl Aqua bidest., 100 μl Standardverdünnung bzw. 100 μl Urinverdünnung pro Mikrotiterplattenloch pipettiert. Anschließend

wurden jedem Loch zügig 150 µl Bradford-Reagenz mit einer Multipipette zugesetzt. Nach 5 Minuten und einer der Messung unmittelbar vorausgehenden Schüttelzeit von 3 Sekunden wurde die Extinktion bei 595 nm mit dem Microplate-Reader gemessen. Lag die ermittelte Konzentration nicht im mittleren Bereich der Eichgeraden, wurde die Messung in einer entsprechend anderen Verdünnung wiederholt.

2.2.4.4 Biochemische Analysen

Aus dem 24-h-Urin wurden die Albumin-, Gesamtprotein- und Kreatininausscheidung ermittelt. Die Bestimmung des Albumins erfolgte dabei mit einer in der Arbeitsgruppe etablierten, direkten kompetitiven ELISA-Technik (Kreutz et al., 2000). Der Gesamtproteingehalt wurde mit der oben beschriebenen Methode nach Bradford gemessen. Kreatinin und Harnstoff wurden aus dem Serum, Gesamtcholesterin, HDL, LDL und Triglyceride aus dem Plasma bestimmt. Die Messung dieser klinischen Parameter erfolgte mithilfe von Standardmethoden entweder im hauseigenen Labor für Klinische Chemie (UKBF) oder im Labor 28 (Mecklenburgische Strasse 28; 14197 Berlin).

2.2.4.5 Präparation

Im Alter von 4 Wochen wurde allen Ratten ein ca. 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze zur Isolierung der DNA abgeknipst und bei -20° C gelagert. Die entstandene Wunde wurde mit Histoacryl-Gewebekleber verschlossen. Unmittelbar vor der Präparation wurde das Körpergewicht der Tiere bestimmt. Für die Präparation, die sowohl bei den Parentaltieren, als auch bei den F2-Tieren in der 15. Lebenswoche erfolgte, wurden die Tiere zunächst mit Ether narkotisiert. Danach wurden Abdomen und Thorax eröffnet und zur Gewinnung von Serum und Plasma Blut über eine Kanüle aus der Aorta descendens abgenommen. Im Anschluss daran erfolgte die Entnahme des Herzens, beider Nieren und eines Teils der Aorta. Für die spätere DNA-Isolierung wurde darüber hinaus die Milz entnommen. Alle Organe, mit Ausnahme der Milz, wurden gewogen und vermessen. Das Herz wurde in linken Ventrikel plus Septum und rechten Ventrikel präpariert und von beiden Ventrikeln nochmals einzeln das Gewicht bestimmt. Die Aorta wurde unter Vermeidung übermäßigen Dehnens vorsichtig durch Entfernung des umgebenden Gewebes und der Adventitia präpariert und anschließend die Länge in cm und das Gewicht in mg ermittelt. Die linke Niere wurde in Medulla und Cortex separiert. Ein Stück der Aorta, ein ca. 3 mm breites Mittelstück des linken Ventrikels und eine Hälfte der rechten Niere wurden für die Histologie in ein Gläschen mit Fixativ (Dubosq-Brasil) gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Fixativ gegen 80 %igen Ethanol ausgetauscht. Alle übrigen entnommenen Organe wurden in

flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Blutproben zur Plasma- bzw. Serum-Gewinnung wurden bei 6000 Upm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Kühlzentrifuge 5402), der Überstand vorsichtig abpipettiert und anschließend ebenfalls bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Als quantitative Phänotypen für die kardiale Hypertrophie wurden das zum Körpergewicht in Relation gesetzte relative linksventrikuläre – und Gesamtherzgewicht verwendet. Für die vaskuläre Hypertrophie diente das zur Länge relative Aortengewicht als quantitativer Phänotyp. Da die bei salzbelasteten Dahl/SS/Jr-Ratten beobachtete Gefäßwanddickenzunahme größtenteils auf eine Hypertrophie der Media zurückzuführen ist, wurde dieser Parameter in der Literatur als gut geeignet beschrieben (Hayakawa et al., 1997). Weitere Phänotypen stellten das Körper- und Nierengewicht dar.

2.2.4.6 Histologie

Von den in 80 %igem Ethanol gelagerten Organen wurden nach Entwässerung und Einbettung in Paraffin standardisierte Schnitte mit einem Rotationsmikrotom angefertigt. Die Schnittdicke betrug bei allen Organen $3\text{ }\mu\text{m}$, die Niere wurde transversal geschnitten. Die auf Objektträger aufgebraachten Organschnitte wurden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet und anschließend standardisiert in einem Färbeautomaten (Robet-Stainer HM 760) nach Hämatoxylin-Eosin (HE), „Periodic Acid Schiff“ (PAS), Azan und Sirius Red gefärbt. Die Auswertung der Schnitte erfolgte lichtmikroskopisch insbesondere hinsichtlich sklerotischer und fibrotischer Gewebeveränderungen.

2.2.5 Genom- und Kopplungsanalyse

2.2.5.1 DNA-Isolierung

Für die Isolierung der DNA wurden entweder ca. 50 mg Milzgewebe oder ein etwa 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze eingesetzt. Das Gewebe wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 700 μl Tail-Puffer und 40 μl Proteinase K (34 U/mg) versetzt und entweder 24 Stunden (Schwanzspitze) oder 48 Stunden (Milz) bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Kopf drehend inkubiert. Anschließend wurden der auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlten Lösung zur Fällung der Proteine und zur Reinigung 300 μl gesättigte Natriumchlorid-Lösung (6 M) zugesetzt. Nach intensivem Durchmischen erfolgte der erste Zentrifugations-schritt für 15 Minuten bei 14000 Upm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Überstand wurde vorsichtig in ein 2,0 ml Eppendorf-Gefäß dekantiert und danach zur Ausfällung der DNA mit 1 ml Iso-propanol versetzt und gut durchmischt. Der nachfolgende zweite Zentrifugations-schritt wurde ebenfalls für 15 Minuten bei 14000 Upm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Nach Verwerfen

des Überstandes wurde das erhaltene DNA-Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol (-20 °C eiskühlt) gewaschen und abermals bei 14000 Upm und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet für ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 200 µl Aqua bidest. aufgenommen. Die vollständige Auflösung des DNA-Pellets erfolgte über Nacht durch Aufbewahrung bei 4 °C im Kühlschrank. Für alle hier aufgeführten Zentrifugationsschritte wurde die Eppendorf Kühlzentrifuge 5402 verwendet. Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurde die DNA-Probe 1:20 mit Aqua bidest. verdünnt und die optische Dichte bei der Wellenlänge 260-280 nm im Photometer ermittelt. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte in der Einheit µg/µl.

2.2.5.2 Prinzip der Genomanalyse

Die genotypische Charakterisierung der Ratten erfolgte unter Verwendung von Mikrosatellitenmarkern, die auch unter den Bezeichnungen short tandem repeats (STR), simple sequence length polymorphism (SSLP) oder simple sequence repeats (SSR) in der Literatur zu finden sind und kurze, repetitive, ein bis vier Nukleotide umfassende Sequenzen, vorwiegend in nichtkodierenden DNA-Abschnitten, darstellen. Aufgrund ihrer hohen Polymorphismusrate macht man sie sich mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) in Verbindung mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung zur Unterscheidung verschiedener Individuen oder Rattenstämme zunutze (Stallings et al., 1991; Beckmann & Weber, 1992). So kann ein zwischen den Parentalstämmen als polymorph identifizierter DNA-Abschnitt, beispielsweise ein repetitives Dinukleotid (CA)_n, mit radioaktiv markierten Primern, deren Lokalisation aufgrund von Kartierungsuntersuchungen bekannt ist, mittels PCR vervielfältigt und anschließend zur Größenauftrennung der Amplifikate auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (PAA-Gel) aufgetragen werden. Auf der Autoradiographie ergibt sich für Tiere einer F2-Population der entsprechenden Parentalstämmen daraufhin ein Bandenmuster, bei dem entweder für das Vater-Allel homozygote, für beide Allele heterozygote oder für das Mutter-Allel homozygote PCR-Produkte nachzuweisen sind (Abb. 8). Durch die bei männlichen Tieren auftretende Hemizygotie des X-Chromosoms kommt es bei Markern des X-Chromosoms zur 1 : 1-Aufspaltung zwischen für das Vater-Allel homozygoten und für das Mutter-Allel homozygoten Tieren.

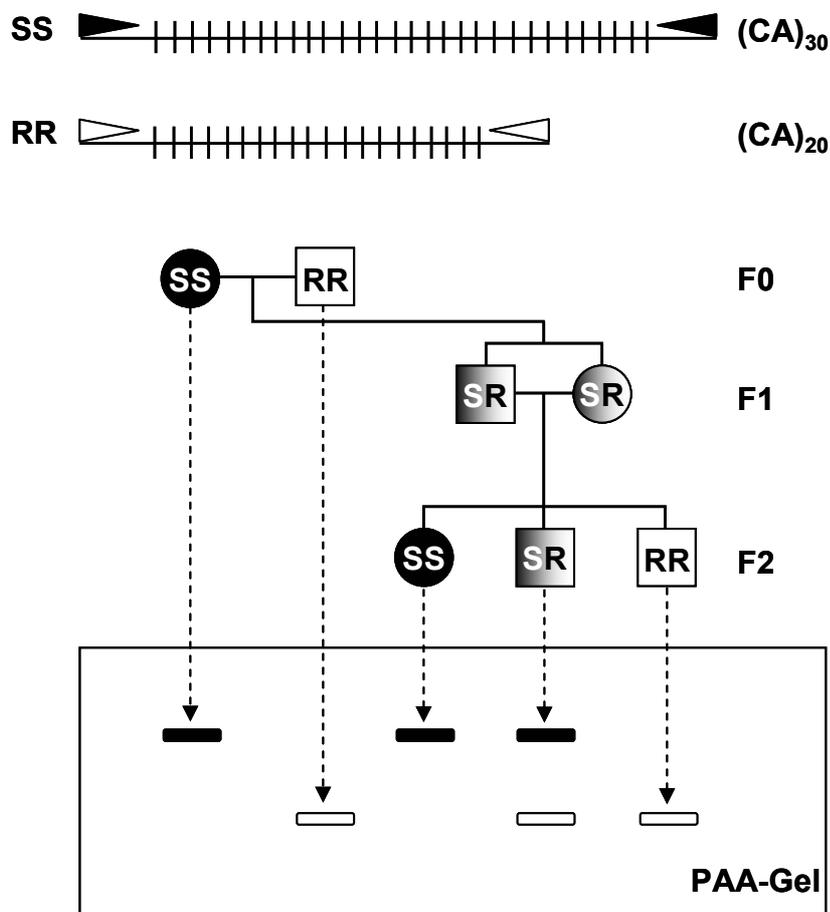


Abb. 8: Prinzip der Genomanalyse mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern am Beispiel der Parentalstämme Dahl/SS/Jr (SS) und SHR/Mol (RR): Stammspezifische Unterschiede in der Länge eines (CA-) Dinukleotidrepeats ermöglichen die Auftrennung der nach PCR mit einem polymorphen Mikrosatellitenmarker erhaltenen Amplifikate auf einem denaturierenden PAA-Gel: In einer F2-Generation sind für das SS-Allel (schwarze Bande) homozygote, für beide Allele heterozygote (SR) sowie für das RR-Allel (weiße Bande) homozygote Tiere zu unterscheiden.

2.2.5.3 Genotypische Charakterisierung der F2-Population

Um zu untersuchen, welche genetischen Faktoren zu den bei salzsensitiver Hypertonie verstärkt auftretenden Endorganschäden führen, wurden die Tiere der F2-Population im Rahmen einer das gesamte Genom, mit Ausnahme des Y-Chromosoms, umfassenden Kopplungsstudie untersucht. Die genotypische Charakterisierung erfolgte dabei in zwei Etappen: Die erste Analyse mit insgesamt 264 Primern umfasste 20 % der Ge-

samtpopulation und beinhaltete 23 Tiere mit den höchsten und 23 Tiere mit den niedrigsten Blutdruck- und Albuminurie-Werten. Im Anschluss an die statistische Analyse der hierbei erhaltenen Daten erfolgte im zweiten Schritt die Testung aller verbliebenen Tiere für chromosomale Regionen mit einem nah am oder über dem Grenzwert für eine wahrscheinliche Kopplung liegenden LOD-Score. Bei der Definition der Grenzwerte für eine wahrscheinliche bzw. signifikante Kopplung wurden dabei die Richtlinien von Lander und Kruglyak herangezogen (s. 2.2.5.4).

Mikrosatellitenmarker

Die für die Genomanalyse verwendeten Mikrosatellitenmarker wurden in den folgenden Instituten entwickelt: (1) Medical College of Wisconsin [(Rat) <http://www.rgd.mcw.edu/>], (2) Massachusetts General Hospital [(Mgh), <http://www.genome.wi.edu/>], (3) Massachusetts Institute of Technology [(Mit) <http://www.genome.wi.mit.edu/rat/public/>]; der Abstand zwischen benachbarten Markern betrug durchschnittlich 10 centiMorgan (cM).

DNA-Stockplatten

Für die effiziente Genomanalyse und zur Festlegung einer einheitlichen Reihenfolge der Tiere auf dem PAA-Gel wurden DNA-Stockplatten für die spätere PCR angelegt. Dazu wurden Mikrotiterplatten der Firma ABgene verwendet und pro Loch jeweils 5 µl DNA-Lösung (10 ng/µl) pipettiert. Zur besseren Lagerung wurden die Platten für ca. 2 Stunden bei 37 °C getrocknet und anschließend bei -20 °C aufbewahrt. Das bei der Trocknung verdunstete Wasser wurde beim Pipettieren des PCR-Ansatzes wieder ergänzt.

5'-Markierung mit Polynucleotidkinase

Zur Sichtbarmachung der in der PCR-Reaktion entstandenen Amplifikate mittels Autoradiographie wurde der sense-Primer am 5'-Ende durch radioaktives Phosphat (in γ -Stellung) markiert. Dazu wurde pro DNA-Probe eine Mischung aus 0,04 µl Kinase-10x-Puffer, 0,017 µl T₄-Polynukleotidkinase (10 U/µl) und 0,0583 µl [γ -³²P] dATP (3000 Ci/mmol) hergestellt. 0,11 µl dieser Mischung wurden 0,22 µl 6 µM sense-Primer (Endkonzentration 4 µM) zugesetzt und die Reaktion (45 Minuten bei 37 °C, 10 Minuten bei 65 °C) gestartet.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Über die PCR ist es in vitro innerhalb kurzer Zeit möglich, mit Hilfe von Oligonucleotid-primern definierte DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Zur systematischen Analyse der DNA wurden pro PCR-Ansatz 50 ng genomische DNA eingesetzt. Dabei wurde zunächst eine Mischung aus 1,3 µl 10x PCR-Puffer (Endkonzentration 1x), 0,78 µl 25 mM MgCl₂ (Endkonzentration 1,5 mM), 1,1 µl 2,5 mM dNTPs (Endkonzentration 0,2 mM), 0,22 µl 6 µM antisense-Primer (Endkonzentration 0,1 µM), 0,07 µl Taq-Polymerase (Endkonzentration 0,026 U/µl), der gesamten Kinasierung und 2,92 µl Aqua bidest. hergestellt und im Fall der vorherigen Trocknung der DNA-Stockplatte um das verdunstete Aqua bidest. (5µl) ergänzt. Von dieser Mischung wurden der in Mikrotiterplatten pipettierten DNA entweder 5 µl (frisch pipettierte DNA-Stockplatte) oder 10 µl (getrocknete DNA-Stockplatte) zugesetzt (Endvolumen 10 µl). Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit Schweißfolie verschlossen und das PCR-Programm gestartet. Die PCR-Bedingungen waren dabei folgende: Einer initialen Denaturierung von 3 Minuten bei 94 °C schlossen sich 30 Zyklen bestehend aus 15 Sekunden bei 94 °C, 1 Minute Primer-spezifische Annealingtemperatur, 1 Minute bei 72 °C an, die finale Elongation erfolgte durch 7 Minuten bei 72 °C. Zur spezifischeren Bindung und stärkeren Amplifikationsausprägung wurde bei einigen Primern eine PCR mit „Touch-Down“-Programm nach dem in Tab. 1 exemplarisch für „Touch-Down 55-50 °C“ angegebenem Schema durchgeführt. Nach Beendigung der PCR wurden die Proben bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

PAA-Gel-Elektrophorese

Aufgrund der ca. 14-tägigen Halbwertszeit des [γ -³²P] dATP erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte innerhalb von zwei Wochen nach Durchführung der PCR auf einem denaturierenden PAA-Gel. Zur Herstellung des Gels wurden zwei 43 cm lange und 35 cm breite Glasplatten verwendet. Eine der Glasplatten wurde mit 70 %igem Ethanol und Aceton behandelt, die andere wurde nach der Reinigung mit 70 %igem Ethanol mit Acrylease beschichtet. Danach wurden die Platten, durch ca. 1,0 cm breite und 0,4 mm dicke Spacer an den Längsseiten voneinander getrennt, übereinander gelegt und mit Edelstahlklemmen fixiert. Die untere Schmalseite wurde zum Gießen des Gels mit Paketklebeband verschlossen. Zum Auspolymerisieren des Gels wurden pro Gel ca. 70 ml einer PAA-Gel-Lösung zur Quervernetzung mit 40 µl Temed und zum Starten der Reaktion mit 400 µl Ammoniumpersulfat-Lösung (10 mg/ml) vermischt. Anschließend wurde diese Lösung luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm

zum Erhalt einer glatten Gel-Kante umgekehrt an der oberen Schmalseite ca. 5 mm zwischen die Glasplatten in die Gelflüssigkeit geschoben. Nach ca. 1 ½ Stunden bei Raumtemperatur war das Gel auspolymerisiert, Klemmen und Klebeband wurden entfernt, der Kamm herausgezogen und mit den Zacken ca. 2 mm tief in die Gel-Kante geschoben. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1 x TBE-Puffer gefüllt und das Gel in die Kammer eingespannt. Die mit 10 µl Formamid-Laufpuffer (2x) versetzten Proben wurden für 5 Minuten bei 94 °C denaturiert und unmittelbar danach ca. 3 µl mit einer Mehrkanal-Spritze auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 2 ½ Stunden bei 70 W. Nach der Elektrophorese wurde die beschichtete Glasplatte abgehoben, das Gel auf Gel-Blotting-Papier überführt, in Verpackungsfolie eingeschlagen und in eine Röntgenkassette gelegt. Je nach Signalstärke betrug die Expositionszeit des Röntgenfilms bei -20 °C durchschnittlich 18 Stunden. Die Entwicklung der Filme erfolgte automatisch.

Tab. 1: „Touch-Down“-PCR-Programm 55-50 °C

Schritt	Zeit	Temperatur
1	3 min	94 °C
2	45 sec	55 °C
3	45 sec	72 °C
4	30 sec	94 °C
5	45 sec	54 °C
6	45 sec	72 °C
7	30 sec	94 °C
8	45 sec	53 °C
9	45 sec	72 °C
10	30 sec	94 °C
11	45 sec	52 °C
12	45 sec	72 °C
13	30 sec	94 °C
14	45 sec	51 °C
15	45 sec	72 °C
16	30 sec	94 °C
17	45 sec	50 °C
18	45 sec	72 °C
19	30 sec	94 °C
20	29 x zu 17	
21	5 min	72 °C

2.2.5.4 Statistische Analyse

Linkage-Analyse und QTL-Mapping

Die erste chromosomale Lokalisation der QTL erfolgte mit dem MapManager QTXb03. Für die Erstellung der Chromosomenkarten und die sich anschließende parametrische Linkage-Analyse der F₂-Generation wurde das von Lander entwickelte Computerprogramm MAPMAKER/QTL verwendet. Die in cM angegebenen genetischen Abstände wurden dabei über die Rekombinationshäufigkeit mit Hilfe des Kosambi-Algorithmus errechnet (Lander et al., 1987). Vor Durchführung der Linkage-Analyse wurden die Phänotypen der F₂-Population mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Bei fehlender Normalverteilung wurde durch Logarithmieren eine Normalverteilung des entsprechenden Phänotyps erreicht. Die Interpretation der mit dem MAPMAKER/QTL-Programm erhaltenen LOD-Scores wurde anhand der Empfehlungen von Lander und Kruglyak (Lander & Kruglyak, 1995) vorgenommen, wonach ein LOD-Score $\geq 4,3$ einer signifikanten, ein LOD-Score $\geq 2,8$ einer wahrscheinlichen Kopplung entspricht. Die Bestimmung des 95 %-Konfidenzintervalls, innerhalb dessen sich ein QTL zu 60-95 % befindet, erfolgte durch Ermittlung der genetischen Distanz 1 LOD-Score ober- und unterhalb des maximalen Peak-LOD-Scores (Rapp, 2000). Um den genetischen Einfluss der Parentalstämme auf den jeweiligen Phänotyp feststellen zu können, wurden die am dichtesten am ermittelten QTL-Peak liegenden Marker einer Genotyp-Phänotyp-Analyse mittels one-way-Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Die Ermittlung der p-Werte erfolgte ebenfalls über die ANOVA des SPSS-Programms. Phänotyp-Phänotyp-Korrelationen wurden durch lineare Regressionsanalyse mit den Programmen Origin und Excel untersucht. Als Signifikanzschwelle galt hierbei ein p-Wert $< 0,05$.

2.2.6 Kongene Rattenstämme

2.2.6.1 Prinzip

Die Züchtung kongener Rattenstämme wird zur Übertragung von Chromosomen, Chromosomenabschnitten oder einzelnen Genen zwischen verschiedenen Inzuchtrattenstämmen eingesetzt. Die von George Snell (Snell, 1948) entwickelte Methode ermöglicht es, die Relevanz eines Genes oder eines QTL zu verifizieren oder zu widerlegen und damit funktionelle und genetische Eigenschaften aufzuklären. Gegenwärtig stellt die Züchtung kongener Stämme die Standard-Methode für den Transfer von Ziel-Genen oder Transgenen in einen definierten genetischen Hintergrund dar. Das traditio-

nelle Protokoll zur Zucht eines kongenen Stammes erfordert zwischen 8 und 12 Backcross-Generationen gefolgt von einem Intercross zum Erhalt von Tieren, die am gewünschten Genort homozygot sind (Wakeland et al., 1997; Kreutz & Hübner, 2002). Um die Anzahl der benötigten Generationen und damit die Zeitspanne zur Etablierung eines kongenen Stammes zu verkürzen, wurden so genannte Marker-unterstützte Selektions-Protokolle (marker-assisted selection protocols – MASPs) entwickelt. Basierend auf der genomweiten Analyse von Polymorphismen, die Spender- und Empfängerstamm voneinander unterscheiden, erfolgt die Zucht nachfolgender Generationen, im Gegensatz zum traditionellen Protokoll, gezielt. Dabei ist die Auswahl der Tiere nicht nur vom Vorhandensein des zu übertragenden genetischen Abschnitts, sondern auch von der Abwesenheit kontaminierender Gene / Fragmente des Spenderstammes abhängig. Mit dieser Methode der gezielten Züchtung reduziert sich die Anzahl der nötigen Backcross-Generationen von ursprünglich mindestens 8 auf 4 bis 5. Da diese Verringerung somit auch mit einer Halbierung der benötigten Zeit einhergeht, wird die Methode der gezielten Züchtung auch als „Speed congenics“ bezeichnet (Wakeland et al., 1997).

2.2.6.2 Züchtung nach der Speed congenics-Methode

Ausgehend von den Ergebnissen der Kosegregationsstudie wurden die Chromosomen 3, 6 und 19 für die Zucht von insgesamt sechs kongenen Rattenstämmen nach der Speed congenics-Methode ausgewählt. Dabei fungierten die Parentalstämme SHR/Mol und Dahl/SS/Jr sowohl einerseits als Spender- als auch andererseits als Empfängerstamm. Zur Zucht wurde zunächst ein Empfänger-Stamm-Weibchen mit einem Spender-Stamm-Männchen zum Erhalt einer F1-Generation verpaart. Die aus dieser Verpaarung resultierenden F1-Tiere weisen im gesamten Genom einen heterozygoten Genotyp auf und sind damit untereinander genetisch identisch. Zur weiteren gezielten Züchtung wurde ein beliebiges F1-Männchen mit 4 bis 5 Weibchen des Empfängerstammes zum Erhalt einer Backcross-Generation zurückgekreuzt. Den aus dieser Verpaarung erhaltenen männlichen Jungtieren wurde im Alter von etwa 4 Wochen ein ca. 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze zur Isolierung der DNA abgeknipst. Die daraus isolierte DNA wurde mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern im 10 cM-Abstand auf das zu übertragende Chromosom untersucht. Tiere, die auf dem gesamten Chromosom einen heterozygoten Genotyp aufwiesen, wurden anschließend einer vollständigen Testung des Genoms mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern im 10 cM-Abstand unterzogen. Das Männchen, das an den meisten Markerpositionen, mit Ausnahme des zu übertragenden Chromosoms, den für den Empfänger-Stamm homozygoten Geno-

typ aufwies, wurde für die weitere Züchtung verwendet. Um pro Generation etwa 16 männliche Nachkommen zu erhalten, wurde das für die Weiterzucht am besten geeignete Backcross-Männchen mit 4 bis 5 Weibchen des Empfänger-Stammes zur nächsten Backcross-Generation verpaart. Mit den auf den ersten Backcross folgenden Backcross-Generationen wurde nach demselben Schema verfahren, wobei sich die Testung des genetischen Hintergrundes auf die verbliebenen heterozygoten Marker der Vorgängergeneration verringerte. Da die Methode relativ große Populationen pro Generation erfordert und ein Männchen mit mehreren Weibchen gleichzeitig verpaart werden kann, wurden für die genetische Untersuchung bis zur Fixierung des zu übertragenden Chromosoms nur Männchen ausgewählt. Sobald in einem Backcross ein Männchen an allen Markerpositionen, mit Ausnahme des zu übertragenden Chromosoms, den für den Empfänger-Stamm homozygoten Genotyp aufwies, wurden auch alle Weibchen der entsprechenden Generation einem Genomscreen unterzogen. Wiesen ein oder mehrere Weibchen neben dem komplett heterozygoten zu übertragenden Chromosom ein vollständig dem Empfänger-Stamm entsprechend homozygoten Gesamtgenom auf, erfolgte die Fixierung des zu übertragenden Chromosoms durch Bruder-Schwester-Verpaarung. Die aus dieser Verpaarung stammenden Jungtiere mit vollständig für den Spender-Stamm homozygotem, zu übertragendem Chromosom wurden nochmals einer kompletten genetischen Testung unterzogen. Durch Bruder-Schwester-Verpaarung der entsprechenden Tiere wurde der Stamm etabliert und erhalten (Abb. 9). Während der Zucht erhielten alle Tiere Normalfutter.

2.2.7 Homologievergleich und Ermittlung krankheitsrelevanter Kandidatengene

Für den Homologievergleich mit dem menschlichen Genom sowie zur Ermittlung von Kollokalisationen der identifizierten QTL zu krankheitsrelevanten Kandidatengenen wurden die folgenden Internet-Ressourcen genutzt: RGD - Rat Genome Database (<http://rgd.mcw.edu/>), NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und NCBI National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>).

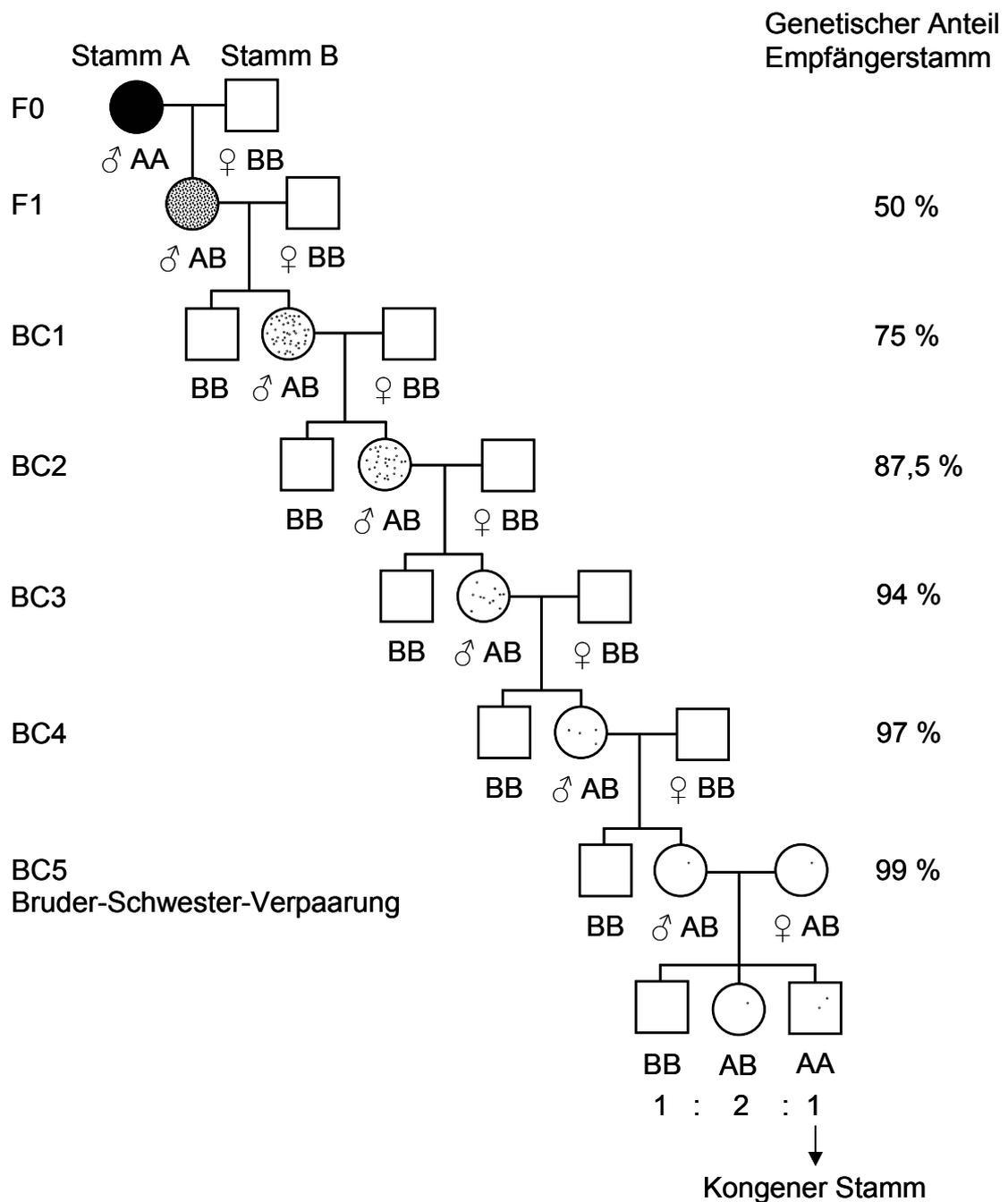


Abb. 9: Übertragung von Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitten mit der Speed congenics-Methode: Das vom Spender-Stamm AA in den Empfänger-Stamm BB zu übertragende Zielallel ist das A-Allel. Durch gezielte, kontinuierliche Rückkreuzung eines F1-Männchens mit Weibchen des Empfängerstammes BB reduziert sich der Anteil des Spendergenoms pro Backcross-Generation etwa um die Hälfte. Nach 4 bis 5 Generationen werden durch Bruder-Schwester-Verpaarung heterozygoter A-Allel-Tiere homozygote Nachkommen zur Fixierung des übertragenen Chromosoms / Chromosomenabschnittes und Etablierung des kongenen Stammes erhalten.