

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Radionukleotide

Substanz	Firma
[γ - ³² P]dATP (1 mCi, 3000 Ci/mmol, wässrige Lösung)	Amersham
[α - ³² P]dCTP (50 μ Ci, 3000 Ci/mmol, wässrige Lösung)	Amersham
10x PCR-Puffer	Rapidozym, Promega
10x TBE (Tris-Borat-EDTA-Lösung)	Gibco BRL
Aceton	Baker
Acrylease	Stratagene
Agarose zur DNA/RNA Elektrophorese	Roth
Albumin, Rat; Polyclonal Antibody, Anti-Rat	ICN
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin-Natriumsalz	Roth
Bacto-Agar	Difco-Laboratories
Bacto-Tryptone	Difco-Laboratories
Bacto-Yeast Extract	Difco-Laboratories
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck
n-Butanol	Sigma
Chloroform	Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
Diethylmalonsäure (98%,w/w)	Aldrich
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat (Titrierkomplex III, MG=372,24)	Roth
dNTPs (2,5 mM)	Rapidozym, Promega
dNTPs, Ultrapure Solution (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Pharmacia Biotech
Essigsäure (100%)	Merck, Roth
Ethanol	Baker
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Merck
ExpressHyb Hybridization Solution	Clontech
Formaldehyd (37%, v/v)	Baker
Gelatine (75 bloom)	Sigma
Glycerin (99%, w/v)	Janssen Chimica
Harnstoff	Roth
Isopropanol	Sigma
Kaliumhydroxid	Aldrich
Magnesiumchlorid (1,5 mM)	Rapidozym, Promega
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Aldrich
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Merck
Pikrinsäure	Merck
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v/v)	Sigma
Proteinase K	Sigma
Rattenserum-Albumin (RSA)	Sigma
Rotiphorese (40% Acrylamid, 2% Bisacrylamid)	Roth
Salzsäure (HCl, 37%, v/v)	Merck

Substanz	Firma
Schwefelsäure (96%, v/v)	Merck
SDS (Lauryl Sulfate)	Sigma
Szintillationsflüssigkeit	Packard
Temed (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma
3,3',5,5' Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid (TMB-) Tabletten	Sigma
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Trizma Base (MG=121,1)	Sigma
Trizol	Gibco BRL
Tween 20	BioRad, Sigma, Roth
Wasserstoffperoxid (30%, v/v)	Sigma
x-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid)	Roth
Xylen Cyanol FF	Sigma

2.1.2 Enzyme

	Enzym	Aktivität	Firma
Restriktionsenzyme	EcoR I	20.000 U/ml	NEB, Amersham
	Rsa I	10.000 U/ml	NEB
Polymerasen	Superscript II	200 U/ μ l	Gibco BRL
	Taq-Polymerase	5 U/ μ l	Rapidozym, Promega
Kinasen	T4-Polynukleotidkinase	5 U/ μ l	Promega

2.1.3 Basenpaarleitern für die Agarosegel-Elektrophorese

Marker	Firma
ϕ X174 RF DNA/Hae III Fragments (72-1,353 bp; 0,5 μ g/ μ l)	Gibco BRL
1 kb-Leiter (1 μ g/ μ l)	Gibco BRL
100 bp-Leiter (1 μ g/ μ l)	Gibco BRL

2.1.4 Kits und kompetente Zellen

Kit	Firma
Advantage cDNA Polymerase Mix	Clontech
DNA Sequencing Kit [®]	Applied Biosystems
Original TA Cloning Kit [®] with pCR2.1 vector	Invitrogen
PCR-Select cDNA Subtraction Kit [®]	Clontech
PCR-Select Differential Screening Kit [®]	Clontech
Qiaex II	Qiagen
Qiagen Plasmid Kit [®] (Plasmid Mini)	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit [®]	Qiagen
Rat Radiation-Hybrid-Panel	Research Genetics
SMART PCR cDNA Synthesis Kit [®]	Clontech
Subcloning Efficiency DH5 α Competent Cells	Gibco BRL

2.1.5 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer	Bestandteil	Konzentration
Coating solution	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	0,2 mg/ml 0,1 M
Denaturierungslösung	Natriumhydroxid Natriumchlorid	0,5 M 1,5 M
DEPC-Wasser	DEPC	0,1% (w/v)
Fixativ für die Histologie	Ethanol 80% (v/v) Pikrinsäure Formaldehyd 37% (v/v) Essigsäure 100%	150 ml 1 g 60 ml 5 ml
Formamid-Laufpuffer	Bromphenolblau Xylen Cyanol FF Formamid Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	1% (w/v) 1% (w/v) 10% (v/v) 0,5 M
High-stringency-Waschlösung	SSC SDS	0,2x 0,5% (w/v)
10x Laufpuffer	Glycerin Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat Bromphenolblau Xylen Cyanol FF	50% (v/v) 10,0 mM, pH 7,0 0,25% (w/v) 0,25% (w/v)
LB-Medium	Bacto-Tryptone Bacto-Yeast extract Natriumchlorid	1,0% (w/v) 0,5% (w/v) 1,0% (w/v)
Low-stringency-Waschlösung	SSC SDS	2x 0,5% (w/v)
Lysis-Puffer	Trizma Base Di-Natrium-EDTA-Dihydrat Natriumchlorid SDS	50 mM, pH 8,0 100 mM, pH 8,0 100 mM 1% (w/v)
Neutralisierungslösung	Tris-HCl Natriumchlorid	0,5 M, pH 7,5 1,5 M
Puffer A	Diethylmalonsäure Natriumchlorid Di-Natrium-EDTA-Dihydrat Tween 20 ad 800 ml Aqua bidest. pH 7,4 mit 1 M Kaliumhydroxid ad 1 l Aqua bidest. Gelatine	20,0 mM 150,0 mM 0,1 mM, pH 8,0 0,1% (w/v) 5 g
Rattenserum-Albumin-Stock-Lösung	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	1,0 mg/ml 0,1 M
20x SSC	Natriumchlorid Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	3,0 M 0,3 mM, pH 7,0
Substrat	3,3',5,5' TMB Aqua bidest. Puffer A Wasserstoffperoxid 30% (v/v)	2 Tabletten 10 ml 10 ml 4 µl
50x TAE	Trizma Base Essigsäure 100% Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	2,0 M 5,71% (v/v) 50,0 mM

Puffer	Bestandteil	Konzentration
TE-Puffer	Trizma Base Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	10 mM, pH 7,6 1 mM, pH 7,6
1x TNE	Tris-HCl Natriumchlorid Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	10,0 mM, pH 8,0 10,0 mM 0,1 mM, pH 8,0

2.1.6 Sonstige Materialien und Futtermittel

Artikel	Firma
12 ml-Greiner-Röhrchen	Sarstedt
BioMax MR-Röntgenfilme	Kodak
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell
Glasplatten für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse (Normalfutter)	Altromin
Histoacryl-Gewebekleber	Braun
Hybond N-Membranen	Amersham/Pharmacia
Kämme, Spacer für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Lochzange für Labortiere	Esculap
Makrolonkäfige Typ III und Typ IV	Ebeco
Mehrkanal-Spritze (8-Kanal)	Hamilton
Micro Amp Reaction Tube with Cap (0,2 ml, dünnwandig)	Perkin Elmer GeneAmp
Phosphoimagerplatten	Raytest
Polystyrene Immulon microplates, flat-bottomed, Immunosorp Maxisorp, F96	Nunc
Quick Spin-Säulen	Boehringer
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Restrainer	Werkstatt UKBF
Röntgenkassetten	Amersham
Rundboden-Röhrchen aus Polypropylen	Falcon
SMR-Zka 10mm inklusive 4% NaCl (Spezialfutter)	Ssniff
Standartips 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Sterilfilter Tips 0,5-10 µl ART20E	Fisher Scientific
Sterilfilter Tips 100-1000 µl ART20E	Fisher Scientific
Sterilfilter Tips 10-100 µl ART100E	Fisher Scientific
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

2.1.7 Geräte

Gerät	Firma
Agarosegelkammer	Bio Rad
Blutdruckmeßgerät	TSE
Brutschüttler	Infors AG
377 DNA Sequencer	ABI Prism
ELISA-MRX-Plate-Reader	Dynex
Hybridisierungssofen	Biometra
Mikrotiterplattenschüttler	Roth
Minifuge RF (Zentrifuge)	Heraeus sepatech
PCR-Maschine	MJ Research
pH-Meter	Knick
Phosphoimager	Raytest
Photometer	Shimadzu
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer	Peq Lab
Schüttelwasserbad	Köttermann
Sono-Stab Polytron	Janke&Kunkel
Szintillations-Zähler	LKB Wallace
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf
UV-Stratalinker	Stratagene
Waage	Sartorius

Methoden

2.2 Parentalstamm-Charakterisierung und Kosegregationsanalyse

2.2.1 Zucht

2.2.1.1 Parentaltiere MWF und Lew

MWF_{Fub} (MWF)-Ratten wurden 1996 am Universitätsklinikum Benjamin Franklin (UKBF), Freie Universität (FU) Berlin (Kreutz et al., 2000) durch Inzucht etabliert, die aus der ursprünglichen Kolonie MWF/Ztm aus dem Zentralen Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule in Hannover stammten. Die normotensiven Lew-Ratten (Garrett et al., 1998) wurden von M&B, Bomholtvej, Denmark bezogen. Bei den MWF- und Lew-Rattenstämmen handelt es sich um sogenannte Inzuchtstämme. Diese wurden durch konsequente Bruder-Schwester-Verpaarung über weit mehr als 20 Generationen ingezüchtet. Zu Beginn der Arbeit im Januar 1998 befanden sich die MWF-Ratten in der 46. Inzuchtgeneration.

2.2.1.2 Haltung

Die Haltung der Ratten erfolgte in Absprache mit dem Institut für Klinische Pharmakologie, UKBF, an der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM/FU). Maximal 4 Tiere wurden nach Geschlecht getrennt in einem Makrolonkäfig (Typ IV) gehalten (zu Paarungszwecken Typ III) und erhielten freien Zugang zu Futter und Wasser. Ein 12stündiger Tag-Nacht-Zyklus wurde über automatisierte Lichtschalter ermöglicht und ein konstantes Raumklima mit einer gleichbleibenden Temperatur von 22° C gewährleistet.

Nach dem Absetzen der Tiere im Alter von ca. 21 Tagen erhielten alle Ratten mittels einer Ohrmarkierung eine Kennzeichnung (laufende Nummer), die mit Hilfe einer Lochzange vorgenommen wurde.

2.2.1.3 Zucht und Diät

2.2.1.3.1 Parentaltiere

Jeweils 8 Männchen des MWF- und Lew-Rattenstammes erhielten zur Untersuchung der Salzsensitivität in der 6.-18. Woche eine normale Diät (normales Haltungsfutter mit 0,2% Natriumchlorid für Ratten und Mäuse) bzw. eine Hochsalzdiät (Spezialfutter mit 4% Natriumchlorid).

Jeweils 10 männliche und weibliche MWF- und Lew-Ratten wurden für eine vergleichende phänotypische Charakterisierung in der 14. und 24. Woche gezüchtet und auf eine Normaldiät gesetzt.

12 Männchen und 12 Weibchen beider Stämme wurden für die Untersuchung des (altersabhängigen) Albuminurieverlaufs gezüchtet und mit Normalfutter versorgt.

2.2.1.3.2 Backcross (Lew x MWF)

Für die Kosegregationsanalyse wurden drei männliche MWF-Ratten mit weiblichen Lew-Ratten verpaart. Die aus dieser Zucht resultierenden weiblichen F1-Tiere wurden mit dem jeweiligen parental MWF-Männchen (Vater) zurückgekreuzt, so daß insgesamt 213 Backcross-Tiere generiert wurden (Abb. 5). Alle Tiere erhielten Normalfutter.

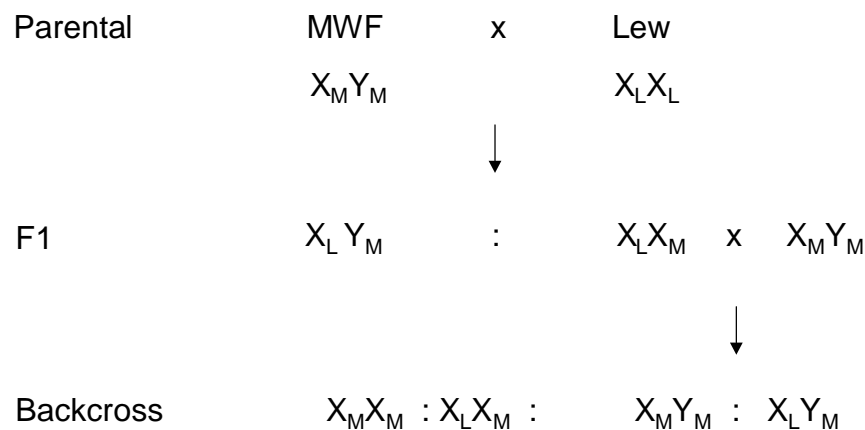


Abb. 5: Züchten der Backcross-Population Lew x MWF (X = X-Chromosom, Y = Y-Chromosom, M = MWF-Allel, L = Lew-Allel, F1 = 1. Filialgeneration).

2.2.2 Phänotypisierung

2.2.2.1 Systolische Blutdruckmessung

Die systolische Blutdruckmessung wurde mit einer nicht-invasiven Tailcuff-Methode an wachen Tieren vorgenommen. Dazu wurde eine automatisierte, computergestützte, oszillatorische Technik verwendet (TSE, Bad Homburg). Während der Messung wurden die Ratten zur Ruhigstellung in einen „Restrainer“ gesetzt und zur Adaption an diese Haltungsbedingungen drei aufeinanderfolgende Tage unter Berücksichtigung circadianer Rhythmen zu ähnlichen Zeiten antrainiert. Nach Kalibrierung des Systems wurden jeweils drei Blutdruckmessungen durch denselben Untersucher durchgeführt. Die Daten der Blutdruckmessung wurden auf einen Computer übertragen und die Werte des dritten Tages gemittelt.

2.2.2.2 Urin- und biochemische Untersuchungen

2.2.2.2.1 Uringewinnung für die Erstellung klinischer Daten

Die Ratten wurden jeweils für 24 Stunden unter gleichen Haltungsbedingungen in einen Stoffwechselkäfig gesetzt. Die Volumenbestimmung des 24-Stunden-Urins erfolgte durch Auswiegen ($1 \text{ ml} \cong 1 \text{ g}$). Der Urin wurde in Szintillationsgefäße aus Kunststoff dekantiert, damit Albuminablagerungen an Glas- oder an bestimmten Kunststoffmaterialien die spätere Albuminbestimmung nicht falsch-negativ beeinflussen konnten. Für die Albuminbestimmung wurde ca. 1 ml Urin in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß dekantiert und zur Entfernung von mechanischen und bakteriellen Verunreinigungen bei 900 Upm (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Dekantieren in ein neues Eppendorfgefäß überführt, der restliche Urin in Weithalsflaschen aus Polyethylen dekantiert und bei -20°C gelagert.

2.2.2.2.2 Messung der Albuminurie

Die Albuminkonzentration im 24-Stunden-Urin wurde über einen direkten kompetitiven Albumin-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) bestimmt. Die Methode wurde in der Arbeitsgruppe neu etabliert.

Zum Coaten einer (96-Loch-) Mikrotiterplatte (Nunc) wurden 100 μl Coating-Solution/Loch pipettiert. Zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten wurde die Mikrotiterplatte in Verpackungsfolie gewickelt und für 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank und anschließend für 15 Stunden bei 4°C (über Nacht) inkubiert. Anschließend wurde die Coating-Solution

durch Ausklopfen auf Papiertüchern entfernt und die Mikrotiterplatte 3 x 4 min mit 100 µl Puffer A/Vertiefung bei 600 Upm auf einem Mikrotiterplattenschüttler gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wurde der Platteninhalt durch Ausklopfen auf Papiertüchern verworfen. Bis zum Gebrauch war die Aufbewahrung der Platte für maximal 4 Wochen bei 4° C in Frischhaltefolie verpackt möglich.

Zur Erstellung einer Eichgeraden für die Albuminbestimmungen wurden aus einem in 100 ml Puffer A verdünnten 100 µl-Aliquot einer Rattenserum-Albumin-Stock-Lösung (1,0 mg/ml) folgende 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. Für die Messungen wurden 40 µl 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. Lagen die Extinktionen dieser Verdünnungen nicht mittig der Eichgeraden, wurden entsprechend andere Verdünnungen gewählt.

Die bei 4° C aufbewahrte und gecoatete Mikrotiterplatte wurde für 4 min mit 100 µl Puffer A/Loch auf dem Mikrotiterplattenschüttler bei 600 Upm gewaschen und der Puffer durch Ausklopfen auf Papiertüchern quantitativ entfernt. Pro Loch wurden 50 µl Leerwert (Puffer A) und 50 µl Standard- bzw. Probenverdünnungen jeweils als Doppelbestimmung in die Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von 50 µl Konjugat (Rattenantikörper 1:9000 mit Puffer A verdünnt)/Loch wurde die Mikrotiterplatte für 1 Stunde bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Platteninhalt durch Ausklopfen auf Papiertüchern verworfen und die Mikrotiterplatte 4 x 4 min mit 100 µl Puffer A/Loch auf einem Mikrotiterplattenschüttler gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wurde der Puffer durch Ausklopfen auf Papiertüchern entfernt. Für die Farbreaktion (blauer Farbkomplex) wurden 200 µl Substratlösung/Loch in die Platte pipettiert und diese für 15 min auf dem Mikrotiterplattenschüttler bei 600 Upm inkubiert. Da eine sogenannte Inversreaktion vorliegt, zeigte eine geringe Blaufärbung höhere und eine starke Blaufärbung niedrigere Albuminkonzentrationen an. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 50 µl 2 M Schwefelsäure/Loch (gelber Farbkomplex). Entstandene Luftblasen wurden für die Messung der optischen Dichte mittels einer Kanüle entfernt. Die Messung der einzelnen Extinktionen wurde mit Hilfe eines ELISA-MRX-Plate-Readers bei 450 nm vorgenommen. 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 des Albumin-ELISAs, bezogen auf mg/l-Werte, beträgt bei demselben Untersucher ca. 0-10%. Die Intra-Assay-Abweichung ist unbedeutend und somit zu vernachlässigen. Das untere Detektionslimit wurde auf 10 mg/l festgelegt. Oberhalb einer Albuminkonzentration von ca. 20.000 mg/l sind die Werte sehr ungenau, da aufgrund besonders hoher Urinverdünnungen (zum Beispiel: 1:200.000) Pipettierungenauigkeiten bzw. Pipettierfehler zunehmend eine größere Rolle spielen.

2.2.2.3 Biochemische Analysen

Aus dem 24-Stunden-Urin wurden die Parameter Natrium, Gesamtprotein und Albumin bestimmt. Die Kreatinin-Clearance wurde berechnet. Die Parameter Natrium und Kreatinin wurden zusätzlich im Serum der Ratten ermittelt. Das Gesamtprotein wurde nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) im eigenen Labor gemessen. Die Bestimmung der übrigen Parameter wurde über Standardmethoden entweder im hauseigenen Labor für Klinische Chemie (UKBF) oder im Labor 28 (Mecklenburgische Straße 28, 14197 Berlin) vorgenommen.

2.2.2.3 Phänotypisierung der Parental- und Backcross-Tiere

Die Messung des systolischen Blutdrucks der Parentaltiere erfolgte in der 14. und 24. Woche. Albumin wurde im 24-Stunden-Urin in der 14. Woche gemessen. Zur Bestimmung des altersbedingten Albuminurieverlaufs wurde bei 12 MWF-Männchen zwischen der 6.-16. Woche 14täglich und ab der 16. Woche alle 2 Monate bis zum natürlichen Tod der Tiere die Albuminurie im 24-Stunden-Urin ermittelt und das Lebensalter der Ratten bestimmt. Zusätzlich wurde die altersabhängige Albuminurie-Entwicklung bei jeweils 12 Weibchen des MWF- und Lew-Parentalrattenstammes von der 5.-8. Woche zweimal wöchentlich, zwischen der 8.-16. Woche 14täglich und ab der 16. Woche alle 2 Monate bis zum natürlichen Tod der Tiere über die Albuminausscheidung im 24-Stunden-Urin untersucht und das Lebensalter der Ratten bestimmt.

Zur Erfassung genetischer Faktoren mit einem altersabhängigen Effekt auf die Phänotypen systolischer Blutdruck und Albuminurie („age of onset“) erfolgte die Messung des systolischen Blutdrucks bei den Lew x MWF-Backcross-Tieren in der 14. und 24. Woche und die Bestimmung der Albuminkonzentration im 24-Stunden-Urin in der 8., 14. und 24. Woche. Die Albuminurie der für die Backcrosszucht eingesetzten drei MWF-Männchen wurde zur Kontrolle bestimmt. Zur Überprüfung des altersbedingten Albuminurie-Verlaufs wurde bei 12 F1-Männchen der Backcrosszucht die Albuminurie von der 6.-16. Woche 14täglich und

vom 4.-14. Monat alle 2 Monate gemessen. In der 14. Woche wurden Messungen des systolischen Blutdrucks vorgenommen.

Die übrigen Parameter zur klinischen Chemie wurden für die Parentaltiere in der 14. Woche und für die Backcross-Tiere in der 24. Woche ermittelt.

Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweiweg-Varianzanalyse.

2.2.2.4 Präparation

Zur DNA-Isolierung wurden bei allen Ratten im Alter von 4 Wochen ca. 0,5 cm der Schwanzspitze abgeknipst („Tailcut“) und bei -20°C gelagert. Die Wunde wurde mit Histoacryl-Gewebekleber verschlossen. Für die Präparation der Parentaltiere in der 18. und der Backcross-Tiere in der 24. Woche wurden die Ratten in eine tiefe Äthernarkose versetzt. Sofort nach Eröffnung des Abdomens wurde der Thorax durch einen medianen Schnitt geöffnet und das Herz entnommen. Anschließend erfolgte eine Entnahme der Milz und beider Nieren. Für die Histologie wurde die rechte Niere am Nierenhilus transversal geschnitten und in ein Fixativ gegeben. Das Fixativ wurde nach 24 Stunden durch 80%igen Ethanol ausgetauscht. Die übrigen Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Gewinnung von Plasma und Serum wurde Blut entweder retroorbital oder aus der Aorta descendens über eine Kanüle gewonnen. Das Blut wurde bei 8.000 Upm (Eppendorf Tischzentrifuge 5402), für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand (Serum bzw. Plasma) bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.5 Histologie

Aus der rechten Niere der Parental- und Backcross-Tiere wurden standardisierte $3\ \mu\text{m}$ breite coronare Nierenschnitte angefertigt und nach Hämatoxylin-Eosin (HE), „Periodic Acid Schiff“ (PAS) und Azan gefärbt. Die Nierenschnitte wurden hinsichtlich der Anzahl subkapsulärer Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt lichtmikroskopisch ausgewertet. Als subkapsuläre Glomeruli mit Kapselkontakt wurden alle Glomeruli pro Nierenquerschnitt definiert, deren Bowman'sche Kapsel direkten Kontakt zur Nierenkapsel aufwiesen. Zu den subkapsulären Glomeruli ohne Kapselkontakt wurden diejenigen Glomeruli gezählt, die im Cortex Corticis unterhalb der Nierenkapsel lagen.

2.2.3 Genom- und Kopplungsanalyse

2.2.3.1 Genom-Analyse mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker

2.2.3.1.1 Prinzip

Die Genotypisierung der Ratten wird mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern vorgenommen. Dazu werden zwischen den Parentalstämmen MWF und Lew polymorphe SSR-Marker wie z. B. das repetitive Dinukleotid $(CA)_n$ verwendet. Diese Marker werden mit radioaktiv markierten Primern in einer PCR-Reaktion amplifiziert wird. Nach der Größenaufftrennung der PCR-Produkte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel werden Amplifikate erhalten, die homozygot für ein Allel oder heterozygot für beide Allele sind (Abb. 6).

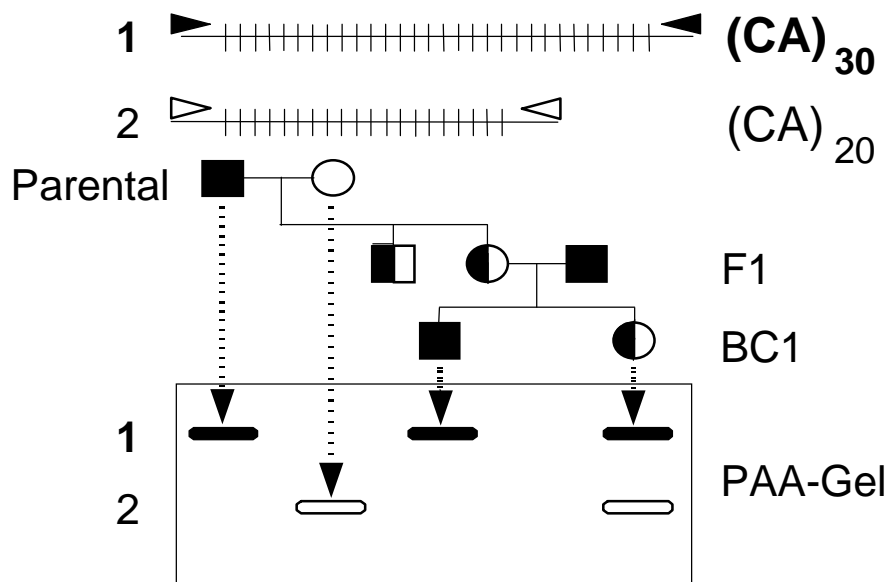


Abb. 6: Genotypisierung mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern (BC = Backcross, F1 = 1. Filialgeneration, PAA-Gel = Polyacrylamidgel, CA = CA-Repeat, ■ = MWF-Männchen, ○ = Lew-Weibchen, ■ = MWF-Allel, ○ = Lew-Allel).

2.2.3.1.2 Genomische DNA-Isolierung aus Rattenschwänzen und Milz

Für die DNA-Isolierung wurden entweder ca. 0,5 cm Gewebe vom Schwanzende oder ca. 50 mg Milz eingesetzt. Das jeweilige Gewebe wurde in 700 μ l Lysis-Puffer und 40 μ l Proteinase K (10 mg/ml) für drei Tage bei 55°C über Kopf drehend im Hybridisierungsofen verdaut. Der Ansatz wurde anschließend für 10 min auf Eis gestellt und zur Eiweißfällung und Reinigung mit 300 μ l gesättigter Natriumchlorid-Lösung (6 M) versetzt.

Nach 5minütiger Inkubation auf Eis wurde die Probe bei 14.000 Upm für 15 min bei 4° C zentrifugiert und ca. 850 µl des resultierenden Überstandes in ein neues Probengefäß überführt. (Alle Zentrifugationsschritte wurden mit Hilfe der Eppendorf Tischzentrifuge 5402 vorgenommen). Für die Fällung der DNA wurde der Überstand mit 1 ml Isopropanol vermischt und für ca. 50 min auf Eis gestellt. Nach der Inkubation wurde die Probe bei 14.000 Upm für 15 min bei 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Waschen des Pellets mit 500 µl -20° C-kaltem, 70%igem Ethanol erfolgte über einen Zentrifugationsschritt bei 14.000 Upm für 15 min bei 4° C. Das Pellet wurde für 15 min bei RT getrocknet und in 200 µl Aqua bidest. aufgenommen. Zum Auflösen des Pellets wurde die Probe bei 4° C über Nacht gelagert.

Für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA wurde die optische Dichte der 1:20 mit Aqua bidest. verdünnten Probe im Photometer bei der Wellenlänge 260-280 nm gemessen. Die DNA-Konzentration wurde in der Einheit µg/µl berechnet.

Zur Detektion eventueller Tierverwechslungen wurde ein Vergleich der Genotypen vor (Schwanzende) und nach (Milz) der Präparation eines jeden Tieres vorgenommen.

2.2.3.1.3 Herstellung der DNA-Stockplatten

Zur rationellen Durchführung der Genotypisierung der Backcross-Tiere und zur Vermeidung von DNA-Verwechslungen wurden DNA-Stockplatten pipettiert, die 10 ng/µl DNA/Loch enthielten. Aus diesen wurden 5 µl der jeweiligen DNA-Proben in Mikrotiterplatten (ABgene) für die spätere PCR ausplattiert. Alle Platten wurden bei -20° C gelagert.

2.2.3.1.4 Mikrosatellitenmarker

Für die Genom-Analyse wurden zwischen MWF und Lew 209 polymorphe Mikrosatellitenmarker verwendet, die in den Instituten a) Medical College of Wisconsin [(Rat) <http://www.rgd.mcw.edu/>], b) Massachusetts Institute of Technology [(Mit) Cambridge, MA; <http://www.genome.wi.mit.edu>], c) Massachusetts General Hospital [(Mgh) Cambridge, MA; <http://www.genome.wi.mit.edu>], d) National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases [(Arb) San Francisco; <http://www-genome.wi.mit.edu/rat/public/>] entwickelt wurden (s. Anhang, Tab. 20).

2.2.3.1.5 Primer-Kinasierung

Zum Anhängen von radioaktiv markiertem Phosphat (in γ -Stellung) an das 5'-Ende der DNA wurden 0,04 µl 10x Kinasepuffer, 0,0583 µl [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mM) und 0,017 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl) gemischt. Von diesem Ansatz wurden 0,11 µl zu 0,22 µl 6 µM Primer (Endkonzentration 4 µM) gegeben und bei 37° C für 45 min und bei 65° C für 10 min inkubiert. Die Probenaufbewahrung erfolgte bei 4° C.

2.2.3.1.6 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

50 ng genomische DNA wurden mit 1,3 µl 10x PCR-Puffer, 0,78 µl 25 mM Magnesiumchlorid (1,5 mM Endkonzentration), 1,1 µl 2,5 mM dNTPs (0,2 mM Endkonzentration), 0,22 µl 6 µM antisense-Primer (0,1 µM Endkonzentration), der gesamten Kinasierung, 0,07 µl Taq-Polymerase (0,4 U/µl Endkonzentration) und Aqua bidest. zu einem Gesamtvolumen von 10 µl vermischt. Nach einer initialen Denaturierung bei 92° C für 2 min wurde für 30 Zyklen eine PCR bei 92° C für 15 sec, die Primer-spezifische Annealing-Temperatur für 1 min, bei 72° C für 1 min und bei 72° C für 7 min angeschlossen. Einige Primer wurden zur Reduzierung unspezifischer Produkte und zum Erhalt deutlicherer Amplifikate einem „Touchdown-Programm“ unterzogen. Dazu wurde z. B. ein „Touchdown“ von 65° C absteigend bis 60° C folgendermaßen durchgeführt: 94° C für 3 min, 65° C für 45 sec, 72° C für 45 sec, 94° C für 30 sec, 64° C für 45 sec, 72° C für 45 sec, 94° C für 30 sec, 63° C für 45 sec, 72° C für 45 sec, 94° C für 30 sec, 62° C für 45 sec, 72° C für 45 sec, 94° C für 30 sec, 61° C für 45 sec, 72° C für 45 sec, 94° C für 30 sec, 30 Zyklen bei 60° C für 45 sec, bei 72° C für 45 sec, bei 94° C für 30 sec und eine 72° C-Inkubation für 5 min. Die Probenaufbewahrung erfolgte bei 4° C.

2.2.3.1.7 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte aufgrund der 14tägigen Halbwertszeit des [γ -³²P]ATP innerhalb von zwei Wochen nach Durchführen der PCR auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel. Dazu wurde eine 45 cm lange und 35 cm breite Glasplatte mit Ethanol und Aceton gesäubert und eine zweite Glasplatte mit Ethanol gereinigt und mit Acrylease beschichtet. Beide Platten wurden an den Längsseiten durch 0,4 mm dicke Spacer getrennt aufeinandergelegt und verklammert. Für die Herstellung des Polyacrylamidgel-Mixes wurden 31,5 g Harnstoff zur Denaturierung der DNA, 7,0 ml 10x TBE, 10,5 ml Rotiphorese und Aqua bidest. zu einem Gesamtvolumen von 70 ml vereint. Für das Auspolymerisieren des Gelansatzes wurden 40 µl TEMED zur Quervernetzung und 400 µl Ammoniumpersulfat-Lösung (100 mg/ml) zum Starten der Reaktion hinzugefügt. Der Gelmix wurde sofort luftblasenfrei zwischen die beiden Glasplatten gegossen und der Kamm zur Schaffung eines glatten Gelsaumes umgekehrt an der oberen Schmalseite ca. 5 mm in die Gelflüssigkeit geschoben. Nach dem 1½-2stündigen Auspolymerisieren des Gels bei RT wurde der Kamm gezogen und mit den Zinken voran 1-2 mm tief in die Gelmatrix eingeführt.

Die Proben wurden mit 10 µl Formamid-Laufpuffer versetzt und bei 94° C für 5 min denaturiert. 3 µl der jeweiligen Proben wurden mit einer Mehrkanal-Spritze auf das in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer eingespannte Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für ca. 2½ Stunden bei 70 Watt. Nach der Elektrophorese wurde die beschichtete

Glasplatte von der Gelmatrix abgehoben, das Gel auf Gel-Blotting-Papier gezogen, in Verpackungsfolie eingeschlagen und in eine Röntgenkassette gelegt. Die Expositionszeit des Röntgenfilms betrug bei -20°C je nach Stärke der Signale ca. 18 Stunden.

2.2.3.2 Genom-Analyse der Parental- und Backcross-Tiere

Zur Überprüfung der genetischen Homogenität innerhalb der Kolonien und ihrer Stammeszugehörigkeit wurde bei den MWF- und Lew-Parentaltieren eine systematische Genom-Analyse mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern vorgenommen.

Für die Genom-Analyse bei den Lew x MWF-Backcross-Tieren wurde das gesamte Genom im 10 cM-Abstand mit 211 zwischen den Parentalstämmen MWF und Lew polymorphen Mikrosatellitenmarkern untersucht. In einem ersten Schritt erfolgte die Genotypisierung der Extremitäten. Dafür wurden jeweils 23 Tiere mit den höchsten und mit den niedrigsten Albuminurie- und systolischen Blutdruckwerten ausgewählt. Die Genotypisierung aller Tiere wurde für Marker mit einem p-Wert $p < 0,01$ komplementiert, so daß ein Quantitative Trait Loci (QTL)- Mapping vorgenommen werden konnte.

2.2.3.3 Statistische Analyse

Zur Beurteilung der Einflüsse von Stamm, Geschlecht und Diät auf die Phänotypen erfolgte die statistische Auswertung der Parentalstämmen und der Backcross-Population 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-Scores wurden über die Computerprogramme MAPMAKER/EXP und MAPMAKER/QTL 3.0b vorgenommen. Nach Lander und Kruglyak (1995) besteht eine signifikante Kopplung in einer Backcross-Population bei einem Lod-Score $\geq 3,3$ ($p < 0,0001$) und eine wahrscheinliche Kopplung bei einem Lod-Score $\geq 1,9$ ($p < 0,0034$). Die genetischen Distanzen in centiMorgan (cM) wurden mit Hilfe dieses Programms über die Rekombinationsfrequenzen mittels des Kosambi-Algorithmus errechnet (Lander et al., 1987; Lander und Botstein, 1989).

2.3 Differentielle Genexpressionsanalyse

2.3.1 Zucht und Präparation

Für die differentielle Genexpressionsanalyse wurden jeweils 7 MWF-Männchen und 7 Lew-Männchen gezüchtet. Im Alter von 9 Tagen erfolgte die Präparation der Tiere. Bei allen Ratten wurden beide Nieren und die Leber entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt (Durchführung s. 2.2.2.4).

2.3.2 Genotypisierung

Alle für die differentielle Genexpressionsanalyse eingesetzten Ratten wurden auf ihre Stammeszugehörigkeit und auf ihre genetische Homogenität innerhalb des jeweiligen Stammes überprüft. Dazu wurde aus der bei -80°C eingefrorenen jeweiligen Ratten-Leber genomische DNA isoliert (Durchführung s. 2.2.3.1) und mit dem Mikrosatellitenmarker D13Mit2 in einer Genotypisierung getestet.

2.3.3 cDNA-Subtraktion

2.3.3.1 Prinzip der cDNA-Subtraktion

Die subtraktive Hybridisierung ermöglicht den Vergleich zweier mRNA-Populationen aus unterschiedlichen Zellen, Geweben, Individuen oder Spezies. Mit Hilfe der cDNA-Subtraktion kommt es zur Anreicherung von Genprodukten, die in der einen, nicht aber in der anderen Population differentiell exprimiert werden. Die mRNA-Population der kranken MWF-Ratte wird als Tester definiert und die Referenz-mRNA der gesunden Lew-Ratte als Driver.

Nach der Isolierung der RNA-Populationen aus Tester und Driver über die Trizol-Methode werden diese über das SMART (**S**witching **M**echanism **A**t 5'end of **R**NA **T**emplate) PCR cDNA Synthesis Kit[®] in cDNA umgeschrieben. Dieses Verfahren erlaubt mit Hilfe einer PCR-basierten Methode die Herstellung von Einzelstrang-cDNA mit kompletten 5'-Enden (full-length cDNA) hoher Qualität aus 1 µg Gesamt-RNA. In einem First-Strand-cDNA-Syntheseschritt lagern sich modifizierte Oligo(dT)-Primer an den poly(A)-Schwanz der mRNA an, so daß die cDNA-Synthese von 3'→5' mittels reverser Transkriptase erfolgen kann. Die reverse Transkriptase besitzt am terminalen Ende eine Transferase-Aktivität, die an den Strang

Desoxycytidin-Nukleotide (CCC) anhängt, an die die SMART-Oligonukleotide (5'—GGG) binden und auf diese Weise zur Bildung eines Überhangs führen. Die reverse Transkriptase wechselt das Template und repliziert die fehlenden Basen vom G-Triplett ausgehend bis zum Oligonukleotid-Ende. Die erhaltene cDNA wird mittels einer Long-Distance-PCR amplifiziert und säulenchromatographisch aufgereinigt.

Zur Generierung von kürzeren Doppelstrang-cDNAs mit glatten Enden (blunt-end), die für die Adapter-Ligation und Subtraktion erforderlich sind, wird eine Rsa I-Spaltung durchgeführt. Aufgrund der kürzeren 300-1000 bp großen Fragmente können Sekundärstrukturen während der Hybridisierung vermieden werden.

Die cDNA-Subtraktion wird in zwei Richtungen durchgeführt. In einer Vorwärts-Subtraktion wird die MWF-Ratte als Tester und die Lew-Ratte als Driver definiert und in einer reversen Subtraktion die Lew-Ratte als Tester und die MWF-Ratte als Driver bezeichnet. Diese Methodik ermöglicht den Erhalt differentiell exprimierter Genprodukte aus beiden RNA-Populationen.

Die über Qiaex II aufgereinigte, geschnittene Tester-cDNA wird für die Adapter-Ligation jeweils in zwei cDNA-Populationen aufgeteilt. An die 5'-Enden der cDNA bindet in der einen Population der ds-cDNA-Adapter 1, in der anderen Population der ds-cDNA-Adapter 2R. Da die Enden der Adapter keine Phosphatgruppe aufweisen, wird es nur einem Strang jedes Adapters ermöglicht, an das 5'-Ende der cDNA zu binden. Mit dieser Technik wird zusätzlich eine starke Anreicherung seltener Transkripte erzielt.

In einer ersten Hybridisierung wird ein Überschuß der jeweiligen Driver-cDNA (Lew bzw. MWF) zu beiden Tester-Ansätzen gegeben, so daß eine gleichmäßige Anreicherung von häufigen oder weniger häufigen Sequenzen („high and low abundance sequences“) ermöglicht wird und eine signifikante Anreicherung differentiell exprimierter Sequenzen erfolgt.

In einer zweiten Hybridisierung wird mit Hilfe eines Driver-cDNA-Überschusses die Bildung und Anreicherung von ds-Tester-Molekülen mit verschiedenen ss-Enden (Adapter 1 und 2R) erzielt. Sequenzen, die im Tester als auch im Driver vorliegen (Hybridsequenzen), Sequenzen ohne, mit einem oder mit identischen Adaptern und entstehende Loopbildungen werden bei der cDNA-Subtraktion nicht berücksichtigt. Die verbleibenden, nicht-hybridisierten cDNAs repräsentieren Gene, die entweder im kranken (Vorwärts-Subtraktion) oder im gesunden Organismus (reverse Subtraktion) exprimiert werden. Die selektive Amplifikation dieser differentiell exprimierten Sequenzen wird über zwei PCR-Reaktionen vorgenommen. Die erste PCR dient dem Auffüllen der Adapter-Enden, die für die Amplifizierung benötigt werden, in der zweiten (nested) PCR erfolgt eine Anreicherung der differentiell exprimierten Produkte, sowie eine Reduzierung des Backgrounds.

Die Untersuchung der subtrahierten Bank mit dem PCR-Select Differential Screening Kit[®] ermöglicht es cDNAs zu detektieren, die im Tester als auch im Driver vorliegen und Background darstellen. Die subtrahierte Bank wird mit vorwärts- und revers-subtrahierten cDNA-Proben hybridisiert. Als vorwärts-subtrahierte Probe wird die subtrahierte cDNA eingesetzt, die für die Konstruktion der subtrahierten Bank verwendet wurde. Um die revers-subtrahierte Probe herzustellen, wird eine subtraktive Hybridisierung mit der originalen Tester-cDNA als Driver und der Driver-cDNA als Tester durchgeführt. Wirklich differentiell exprimierte Klone hybridisieren nur mit der vorwärts-subtrahierten Probe. Klone, die mit der revers-subtrahierten Probe hybridisieren, stellen Background dar.

2.3.3.2 Methode

2.3.3.2.1 RNA-Isolierung über Trizol

Gesamt-RNA aus bei -80° C tiefgefrorenem Nierengewebe wurde über die Trizol-Methode isoliert. Dazu wurden 100 mg Gewebe in 1 ml eisgekühltem Trizol ca. 2x 30 sec mit dem Sono-Stab Polytron auf Eis homogenisiert und bei 5.000 Upm für 10 min bei 4° C zur Entfernung grober Partikel zentrifugiert. (Alle Zentrifugationsschritte erfolgten mit der Eppendorf Tischzentrifuge 5402). Der abpipettierte Überstand wurde zur kompletten Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe für ca. 1 Stunde bei RT gelagert und zur Phasenseparation mit 200 µl Chloroform/1 ml Trizol vermischt, für 2-3 min bei RT inkubiert und bei 12.000 Upm für 15 min bei 4° C zentrifugiert. Die RNA, die sich in der oberen durchsichtigen Phase befand, wurde mit 500 µl Isopropanol/1 ml Trizol präzipitiert und für 10 min bei RT gelagert. Anschließend wurde die RNA bei 12.000 Upm für 10 min bei 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml 75%igem, -20° C kaltem Ethanol/1 ml Trizol gewaschen und bei 4.900 Upm für 10 min bei 4° C zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet 5 min luftgetrocknet und in 50 µl DEPC-H₂O bei 60° C in 5 min gelöst. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte über eine 1:200-Verdünnung mit DEPC-H₂O im Photometer bei 260-280 nm. Zur Überprüfung der Integrität der RNA wurden 1 µl (ca. 500 ng) der RNA und 0,5 µl Laufpuffer in einem Gesamtvolumen von 6 µl auf ein 1%iges Agarose/Ethidiumbromid-Gel, bestehend aus 30 ml 1x TAE und 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml), aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von ca. 5 V/cm Elektrodenabstand und einer Stromstärke von ca. 200 mA über ungefähr 35 min.

2.3.3.2.2 cDNA-Synthese

Zur Durchführung der cDNA-Synthese mit dem SMART PCR cDNA Synthesis Kit[®] wurden drei verschiedene Gruppen eingesetzt. Die erste wurde als Tester definiert und beinhaltete

die gepoolte RNA aus zwei 9 Tage alten Nieren kranker MWF-Ratten, die zweite wurde als Driver bezeichnet und wies die gepoolte RNA aus zwei 9 Tage alten Nieren gesunder Lew-Ratten auf. Als dritter Ansatz wurde die im PCR-Select cDNA Subtraction Kit[®] enthaltende Kontroll-polyA⁺-RNA aus humanem Skelettmuskel mitgeführt.

Im First-Strand-cDNA-Synthesis-Schritt wurden jeweils zu 1 µg Tester-, Driver- und Kontroll-RNA 1 µl cDNA-Synthese (CDS)-Primer (10 µM), 1 µl SMART II Oligonukleotide (10 µM) und Aqua bidest. zu einem Gesamtvolumen von 5 µl gegeben. Nach dem Mischen und dem Abzentrifugieren der Proben erfolgte eine Inkubation bei 70°C für 2 min und eine zweiminütige Abkühlungszeit auf Eis. (Alle Zentrifugationsschritte wurden mit der Eppendorf Tischzentrifuge 5415C durchgeführt). Die Proben wurden abzentrifugiert und zu jedem Ansatz 2 µl 5x First-Strand-Puffer, 1 µl DTT (20 mM), 1 µl dNTP (10 mM) und 1 µl Superscript II (200 U/µl) hinzugefügt. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt, abzentrifugiert und bei 42°C für eine Stunde inkubiert. Zu jeder Probe wurden 40 µl TE-Puffer und zur Kontrolle 450 µl TE-Puffer gegeben und bei 72°C für 7 min inkubiert. Für die cDNA-Amplifizierung mittels einer Long-Distance-PCR wurden die Proben und die Kontrolle jeweils in drei 10 µl-Ansätze geteilt. Zu jedem Ansatz wurden 74 µl Aqua bidest., 10 µl 10x cDNA-PCR-Reaktions-Puffer, 2 µl dNTP (10 mM), 2 µl PCR-Primer (10 µM) und 2 µl 50x Advantage cDNA Polymerase-Mix zu einem Endvolumen von 90 µl vereint. Die Proben wurden in die auf 95°C vorgeheizte PCR-Maschine gestellt und für 1 min inkubiert. Die cDNA-Amplifikation erfolgte über 12 Zyklen bei 95°C für 15 sec, bei 65°C für 30 sec und bei 68°C für 6 min. Zwei Ansätze jeder Probe und der Kontrolle wurden bei 4°C gelagert. Der dritte Ansatz diente jeweils zur Ermittlung der optimalen PCR-Zyklusanzahl zur Vermeidung unspezifischer Produkte. Dazu wurden jeweils 15 µl für eine Agarosegel-Analyse abgenommen und die restlichen 85 µl-Ansätze für drei weitere PCR-Zyklen den o. g. Bedingungen unterzogen. Diese letztgenannte Vorgehensweise wurde bis zum Erreichen der 24. Zyklusanzahl wiederholt. Zur Analyse der aus den Zyklusanzahlen 12, 15, 18, 21 und 24 stammenden PCR-Produkte wurden jeweils 5 µl-Proben auf ein 1,2%iges Agarose/Ethidiumbromid-Gel aufgetragen. Als DNA-Größenstandard wurden 0,5 µg einer 1 kb-Leiter (1 µg/µl) verwendet.

Nach 15 Zyklen konnte der Ertrag in der PCR nicht mehr gesteigert werden, so daß die optimale Zyklusanzahl 14 betrug, also um einen Zyklus kleiner war als die nach Erreichen der Sättigungsphase (Plateauphase). Die ersten beiden Ansätze wurden daher für zwei weitere Zyklen den o. g. PCR-Bedingungen unterzogen und 5 µl des Amplifikats auf einem 1,2%igem Agarose/Ethidiumbromid-Gel überprüft. Für eine später durchzuführende Säulenchromatographie-Analyse wurden 7 µl-Proben bei -20°C bereitgestellt.

Die cDNA-Aufreinigung wurde säulenchromatographisch vorgenommen. Die beiden Ansätze jeder Probe und der Kontrolle wurden jeweils vereint und mit 1 Vol.

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und zur Phasenseparation bei 13.000 Upm für 10 min bei RT zentrifugiert. Die das PCR-Produkt enthaltende obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 700 µl n-Butanol auf ca. 55 µl durch Wasserentzug eingengt. Nach der Zentrifugation bei 13.000 Upm für 1 min bei RT wurde die obere Phase verworfen. Für die Säulenchromatographie wurden CHROMA SPIN-1000-Säulen zum Resuspendieren der Gelmatrix und zum Eliminieren von Luftblasen mehrere Male gedreht, die oberen und die unteren Kappen entfernt und der auslaufende Säulenpuffer verworfen. Auf jede Säule wurde 1,5 ml 1x TNE-Puffer gegeben und der Puffer so lange durch die Säule geschickt bis die Säulenmatrix die 0,75 ml-Marke erreichte. Der Probenauftrag erfolgte mittig auf das Gelbett. Anschließend wurden 25 µl 1x TNE-Puffer und nach vollständigem Durchlauf weitere 150 µl 1x TNE-Puffer auf die Säulen gegeben. Nach erneutem, vollständigem Durchlauf wurden 320 µl 1x TNE-Puffer auf die Säulen pipettiert und das jeweilige Eluat, das die gereinigte cDNA der ersten Fraktion enthielt, aufgefangen. Auf die Säulen wurden weitere 75 µl 1x TNE-Puffer gegeben und zur Gewinnung der zweiten cDNA-Fraktion die jeweiligen Eluate gesammelt. 10 µl beider Fraktionen, 7 µl des ungereinigten PCR-Produktes und 0,1 µg einer 1 kb-Leiter wurden zum Vergleich und zur Überprüfung ihres cDNA-Gehalts nach der Säulenaufreinigung auf ein 1,2%iges Agarose/Ethidiumbromid-Gel aufgetragen. Für eine spätere Agarosegel-Analyse wurden 10 µl der aufgereinigten Doppelstrang-cDNA der Proben und der Kontrolle abgenommen und bei -20° C aufbewahrt.

2.3.3.2.3 Rsa I-Spaltung

Zur Generierung von kürzeren Doppelstrang-cDNAs mit glatten Enden (blunt-end), die für die Adapter-Ligation und Subtraktion nötig sind, wurden zu ca. 310 µl der gereinigten und vereinten cDNA-Fraktionen jeweils 36,0 µl NEB1-Puffer und 1,5 µl des Restriktionsenzym Rsa I (10 U) pipettiert und nach dem Vortexen bei 37° C für 3 Stunden inkubiert. Zur Überprüfung des Rsa I-Verdau wurden auf ein 1,5%iges Agarose/Ethidiumbromid-Gel 10 µl ungeschnittene Doppelstrang-cDNA, 10 µl geschnittene Doppelstrang-cDNA und 0,1 µg einer 1 kb-Leiter aufgetragen. 10 µl der jeweils verdauten cDNAs wurden bei -20° C für eine spätere Agarosegel-Analyse aufbewahrt.

Die Aufreinigung der geschnittenen cDNA erfolgte über Qiaex II. Dazu wurde die geschnittene cDNA mit 0,9 ml QX1 und mit 30 µl des resuspendierten Qiaex II versetzt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 50° C für 10 min, während der die Proben alle 2 min gemischt wurden. Nach der Zentrifugation bei 13.000 Upm für 30 sec bei RT wurden die Überstände abpipettiert und verworfen. (Alle Zentrifugationsschritte beziehen sich auf die Eppendorf Tischzentrifuge 5415C). Die jeweiligen Pellets wurden mit 0,5 ml QX1 vermischt und bei 13.000 Upm für 30 sec bei RT zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und

die Pellets mit 0,5 ml PE-Puffer gemischt und bei 13.000 Upm für 30 sec bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände erneut verworfen und zu den Pellets 0,5 ml PE-Puffer pipettiert. Die Proben wurden wiederum bei 13.000 Upm für 30 sec bei RT zentrifugiert. Nach dem Abpipettieren der Überstände wurden die Pellets für 30 min luftgetrocknet, in 20 µl Aqua bidest. durch Vortexen resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Die Zentrifugation der Proben erfolgte bei 13.000 Upm für 30 sec bei RT. Der die DNA enthaltende Überstand wurde abpipettiert. Für eine Konzentrationsüberprüfung wurden 10 µl geschnittene und nicht aufgereinigte cDNA, 1 µl der gereinigten und geschnittenen cDNA in 19 µl Aqua bidest. verdünnt und 0,1 µg einer 1 kb-Leiter auf ein 1%iges Agarose/Ethidiumbromid-Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde die DNA-Konzentration über die Bestimmung der optischen Dichte ermittelt. Dazu wurde die DNA 1:20 mit Aqua bidest. verdünnt und photometrisch gemessen.

1 µl der geschnittenen cDNA wurde für das weitere Vorgehen mit 5 µl Aqua bidest. verdünnt.

2.3.3.2.4 Adapter-Ligation an die Tester-cDNA (PCR-Select cDNA Subtraction Kit®)

Für die Adapter-Ligation wurde eine Kontroll-Skelettmuskel-Tester-cDNA verwendet. Dazu wurden 2 µl einer Kontroll-DNA, die aus einem Hae III-Verdau von ϕ X174/Hae III-DNA (3 ng/µl) bestand, mit 38 µl Aqua bidest. auf eine Konzentration von 150 ng/ml verdünnt und davon 5 µl ϕ X174/Hae III-DNA mit 1 µl geschnittener Kontroll-Skelettmuskel-cDNA versetzt. Dieser Kontrollansatz wurde als Kontroll-Skelettmuskel-Tester-cDNA bezeichnet.

Zur Herstellung der Adapter-ligierten Tester-cDNA und der Adapter-ligierten Kontroll-Skelettmuskel-Tester-cDNA wurde die verdünnte cDNA von Tester und Driver bzw. der Kontrolle für jeden der beiden Adapter in einen 2 µl-Ansatz aufgeteilt (Tester 1-1 und 1-2 (bisherige Tester-cDNA), Tester 2-1 und 2-2 (bisherige Driver-cDNA), Kontrolle 3-1 und 3-2 (bisherige Kontroll-cDNA)). Zu jedem Ansatz wurden 3 µl Aqua bidest., 2 µl 5x Ligase-Puffer, 1 µl T4 DNA-Ligase (400 U/µl) und 2 µl von Adapter 1 (10 µM) oder 2R (10 µM) zu einem Gesamtvolumen von 10 µl hinzugefügt. Für den weiteren Versuchsablauf wurden drei Kontrollansätze hergestellt:

- 1) nicht-subtrahierte Tester-Kontrolle 1-c: 2 µl Tester 1-1 plus 2 µl Tester 1-2
- 2) nicht-subtrahierte Tester-Kontrolle 2-c: 2 µl Tester 2-1 plus 2 µl Tester 2-2
- 3) nicht-subtrahierte Tester-Kontrolle 3-c: 2 µl Tester 3-1 plus 2 µl Tester 3-2.

Die Proben wurden bei 16° C über Nacht inkubiert, mit 1 µl EDTA/Glykogen-Mix gemischt und bei 72° C für 5 min zur Inaktivierung der Ligase inkubiert. 1 µl jeder nicht-subtrahierten Tester-Kontrolle 1-c, 2-c und 3-c wurde mit 1 ml Aqua bidest. gemischt und für die spätere PCR bei -20° C aufbewahrt.

Zur Analyse der Ligationseffizienz (mindestens 25% der cDNAs sollten beide Adapter aufweisen) wurde 1 µl jeder ligierten cDNA mit 100 µl Aqua bidest. verdünnt. Davon wurden 10 µl der Ansätze Tester 1-1, 2-1 und 3-1 mit 1 µl G3PDH 3'-Primer (10 µM) und 1 µl PCR-Primer 1 (10 µM) und 10 µl der Ansätze Tester 1-2, 2-2 und 3-2 mit 1 µl G3PDH 5'-Primer (10 µM) und 1 µl G3PDH 3'-Primer gemischt. Zu jedem Ansatz wurden 9,5 µl Aqua bidest., 2,5 µl 10x PCR-Reaktions-Puffer, 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM) und 0,5 µl 50x Advantage cDNA Polymerase-Mix zu einem Endvolumen von 25 µl addiert und bei 75° C für 5 min zum Auffüllen der Adapter inkubiert. Daraufhin wurde umgehend eine PCR mit den Bedingungen 94° C für 30 sec und für 20 Zyklen 94° C für 10 sec, 65° C für 30 sec und 68° C für 2 min und 30 sec angeschlossen. 5 µl jedes Reaktionsansatzes wurden zusammen mit 0,4 µg des DNA-Größenstandards ϕ X174 DNA/Hae III-Verdau (0,5 µg/µl) auf ein 2,0%iges Agarose/Ethidiumbromid-Gel aufgetragen.

2.3.3.2.5 Erste und zweite Hybridisierung

In der ersten Hybridisierung wurden zu 1,5 µl jeder Tester-cDNA 1,5 µl Driver-cDNA im Überschuß und 1,0 µl 4x Hybridisierungspuffer gegeben und bei 98° C für 1 min und 30 sec und anschließend bei 68° C für 12 Stunden inkubiert. Die zweite Hybridisierung wurde sofort an die erste Hybridisierung angeschlossen. Es wurden für jeweils drei Ansätze 1 µl geschnittene Driver-cDNA, 1 µl 4x Hybridisierungspuffer und 2 µl Aqua bidest. vereint. Von diesen Ansätzen wurde 1 µl bei 98° C für 1 min und 30 sec denaturiert. Der frisch denaturierte Driver wurde jeweils gleichzeitig mit den beiden jeweiligen Hybridisierungsproben (Vorwärts-Subtraktion: Tester 1-1 und 1-2, reverse Subtraktion: Tester 2-1 und 2-2, Kontroll-Subtraktion: Tester 3-1 und 3-2) aus der ersten Hybridisierung gemischt. Die zweite Hybridisierung erfolgte bei 68° C über Nacht. Nach der Hybridisierung wurden die Proben mit 200 µl Dilution-Puffer verdünnt und bei 68° C für 7 min inkubiert.

2.3.3.2.6 Erste und zweite PCR-Amplifikation

Für die erste und zweite PCR wurden 8 Ansätze hergestellt:

1. Vorwärts subtrahierte cDNA
2. Nicht-subtrahierte Tester-Kontrolle 1-c
3. Revers subtrahierte cDNA
4. Nicht-subtrahierte Tester-Kontrolle für die reverse Subtraktion 2-c
5. Subtrahierte Skelettmuskel-cDNA-Kontrolle
6. Nicht-subtrahierte Tester-Kontrolle für die Kontroll-Subtraktion 3-c
7. PCR-Kontrolle: subtrahierte cDNA (aus dem Kit)
8. PCR-Negativ-Kontrolle (ohne DNA)

In der ersten PCR wurden zu 1 µl aus jedem der 8 Ansätze 19,5 µl Aqua bidest., 2,5 µl 10x PCR-Reaktions-Puffer, 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), 1,0 µl PCR-Primer 1 (10 µM) und 0,5 µl 50x Advantage cDNA Polymerase-Mix zu einem Endvolumen von 24 µl gegeben. Die cDNA der Proben wurde bei 75° C für 5 min zum Auffüllen der Adapter inkubiert und in der PCR bei 94° C für 25 sec denaturiert und für 27 Zyklen bei 94° C für 10 sec, bei 66° C für 30 sec und bei 72° C für 1 min und 30 sec amplifiziert. 8 µl jedes Ansatzes wurden zusammen mit 0,4 µg des Markers ϕ X174 DNA/Hae III-Verdau auf einem 2,0%igen Agarose/Ethidiumbromid-Gel analysiert.

In einer zweiten (nested) PCR wurden 3 µl jedes Ansatzes aus der ersten PCR mit 27 µl Aqua bidest. verdünnt. Zu jeder Verdünnung wurden 18,5 µl Aqua bidest., 2,5 µl 10x PCR-Reaktions-Puffer, 1,0 µl Nested PCR-Primer 1 (10 µM), 1,0 µl Nested PCR-Primer 2R (10 µM), 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM) und 0,5 µl 50x Advantage cDNA Polymerase-Mix zu einem Gesamtvolumen von 24 µl pipettiert. Die cDNA-Amplifikation erfolgte über 12 Zyklen bei 94° C für 10 sec, bei 68° C für 30 sec und bei 72° C für 1 min und 30 sec. Die Überprüfung der PCR-Produkte wurde über ein 2,0%iges Agarose/Ethidiumbromid-Gel, auf das 8 µl Probe zusammen mit 0,4 µg des Markers ϕ X174 DNA/Hae III-Verdau aufgetragen wurden, vorgenommen.

2.3.3.2.7 Subtraktionseffizienz-Test

Um die Subtraktionseffizienz zu überprüfen, wurden die subtrahierten und die nicht-subtrahierten (nicht-subtrahierte Tester-Kontrolle 1-c und 2-c) Produkte aus der zweiten PCR 10fach mit Aqua bidest. verdünnt und davon jeweils 1 µl mit 1,2 µl G3PDH 3'-Primer (10 µM), 1,2 µl G3PDH 5'-Primer (10 µM), 22,4 µl Aqua bidest., 3,0 µl 10x PCR-Reaktions-Puffer, 0,6 µl dNTP-Mix (10 mM) und 0,6 µl 50x Advantage cDNA Polymerase-Mix zu einem Gesamtvolumen von 30 µl pipettiert. Die PCR erfolgte über 18 Zyklen bei 94° C für 30 sec, bei 60° C für 30 sec und bei 68° C für 2 min. 5 µl jedes Reaktionsansatzes wurden für eine Agarosegel-Analyse abgenommen und die restlichen Ansätze für 5 weitere Zyklen den o. g. PCR-Bedingungen unterzogen. Diese Vorgehensweise wurde für 28 und 33 Zyklen wiederholt. Die Probenanalyse erfolgte auf einem 2,0%igem Agarose/Ethidiumbromid-Gel, auf das die 5 µl-Proben und 0,4 µg des Markers ϕ X174 DNA/Hae III-Verdau aufgetragen wurden.

2.3.3.3 Differentielles Screening der Produkte aus der cDNA-Subtraktion

5 µl der Negativkontrolle 1R (5 µg/ml) und 5 µl der Negativkontrolle 2R (5 µg/ml) aus dem PCR-Select Differential Screening Kit[®] wurden jeweils mit 3 µl Aqua bidest. versetzt, bei 96° C für 5 min denaturiert und auf Eis gestellt. Zu jeweils 1 µl der Negativkontrolle 1R, der Negativkontrolle 2R, des ersten PCR-Produkts der vorwärts-subtrahierten cDNA, des ersten PCR-Produkts der nicht-subtrahierten Tester-Kontrolle der Vorwärts-Subtraktion, des ersten PCR-Produkts der revers-subtrahierten cDNA und des ersten PCR-Produkts der nicht-subtrahierten Tester-Kontrolle der reversen Subtraktion wurden 18,5 µl Aqua bidest., 1,0 µl Nested Primer 1 (10 µM), 1,0 µl Nested Primer 2R (10 µM), 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM) und 0,5 µl 50x PCR-Enzym-Mix zu einem Gesamtvolumen von 24,0 µl gegeben. Die PCR erfolgte über 11 Zyklen bei 94° C für 10 sec, bei 68° C für 30 sec und bei 72° C für 1 min und 30 sec. Die Primerextension wurde bei 72° C nach 5 min beendet. 8 µl jedes PCR-Produktes wurden zusammen mit 0,4 µg des Markers ϕ 174 DNA/Hae III-Verdau und 0,5 µg der 1 kb-Leiter (1 µg/µl) auf ein 2,0%iges Agarose/Ethidiumbromid-Gel aufgetragen.

Die PCR-Produkte wurden über das QIAquick PCR Purification Kit[®] aufgereinigt. Bei der auf einer Silicagelabsorption basierenden Methode wurde jeweils 1 Vol. Probe mit 5 Vol. Puffer PB gemischt, auf das jeweilige Säulenbett aufgetragen und die Säulen bei 13.000 Upm für 30-60 sec zentrifugiert. (Alle Zentrifugationsschritte wurden mit Hilfe der Eppendorf Tischzentrifuge 5415C vorgenommen). Anschließend wurden jeweils 750 µl Puffer PE auf die Säulen pipettiert und diese bei 13.000 Upm für 30-60 sec zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Puffer-Eluats wurden die Säulen erneut bei 13.000 Upm für 1 min zentrifugiert. Die Elution der Proben erfolgte mit 50 µl Aqua bidest., die Elution der Kontrollen mit 50 µl Puffer EB bei gleichen Zentrifugationsbedingungen. Die Konzentrationen der aufgereinigten Proben wurden, 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt, über die Bestimmung der optischen Dichte ermittelt.

2.3.3.3.1 Klonierung der Genprodukte aus der cDNA-Subtraktion

Unter Verwendung des T/A-Cloning Kits[®] wurden für die Ligation 10 ng des zweiten PCR-Produkts der Vorwärts-Subtraktion mit 1 µl 10x Ligationspuffer, 2 µl pCR 2.1-Vektor (25 ng/µl), 4 µl Aqua bidest. und 1 µl T4 DNA-Ligase (4,0 Weiss Units) in einem 10 µl-Gesamtansatz bei 14° C über Nacht inkubiert.

In der Transformation fungierten kompetente DH5 α -Zellen als Rezipienten. Zu 50 µl DH5 α -Zellen wurden 2 µl des Ligationsansatzes gegeben, der Gesamtansatz 30 min auf Eis gestellt und zur Aufnahme der DNA bei 37° C für 20 sec hitzeschockbehandelt. Nach einer zweiminütigen Abkühlungszeit auf Eis erfolgte die Zugabe von 950 µl LB-Medium und eine

einstündige Inkubation bei 37° C im Brutschüttler. Anschließend wurden die Transformationsansätze abzentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl LB-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf LB-Agar mit 50 µg/µl Ampicillin-Natriumsalz-Lösung, 200 µl LB-Medium und 25 µl 40 mg/ml x-Gal ausgestrichen und bei 37° C über Nacht inkubiert.

2.3.3.3.2 Anzucht der Klone

Jeweils eine zufällig gepickte Einzelkolonie wurde in 5 ml LB-Medium und in einer Ampicillin-Natriumsalz-Lösung mit einer Konzentration von 50 µg/µl, in Aqua bidest. gelöst, bei 37° C über Nacht im Brutschüttler angezogen.

2.3.3.3.3 Plasmidisolierung mit der Standard-Plasmid-Minipräparation (Qiagen)

Eine 5 ml-Bakterienkultur wurde bei 2.500 Upm für 10 min bei 4° C abzentrifugiert und das Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. (Alle Zentrifugationsschritte wurden mit der Eppendorf Tischzentrifuge 5402 durchgeführt). Danach erfolgte zum Lysieren der Bakterienzellen durch Natriumdodecylsulfat und zur Denaturierung der DNA durch Natriumhydroxid die Zugabe von 250 µl Puffer P2. Nach dem Mischen des Ansatzes wurden zur Neutralisierung 350 µl Puffer N3 hinzugesetzt, erneut gemischt und bei 14.000 Upm für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Säule transferiert, die bei 14.000 Upm für 30-60 sec bei RT zentrifugiert wurde. Nacheinander wurden 500 µl Puffer PB und 750 µl Puffer PE auf die Säule pipettiert; nach beiden Schritten wurde die Säule bei 14.000 Upm für 30-60 sec bei RT zentrifugiert. Die jeweiligen Eluate, die RNA, zelluläre Proteine, Metaboliten und Salze enthielten, wurden verworfen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde erneut bei 14.000 Upm für 1 min bei RT zentrifugiert, um den restlichen PE-Puffer aus der Säule zu entfernen. Anschließend wurde die DNA mit 50 µl Puffer EB für 1 min bei RT inkubiert und unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen eluiert. Die DNA-Konzentration wurde in einer 1:20-Verdünnung über die optische Dichte im Photometer bei 260-280 nm gemessen.

2.3.3.3.4 Restriktionsverdau

Zur Überprüfung des Inserteinbaus wurden in einem Restriktionsverdau 500 ng Plasmid-DNA in 1 µl 10x H-Puffer mit 1 µl EcoR I und Aqua bidest. in einem 10 µl-Ansatz geschnitten und bei 37° C für 1 Stunde inkubiert. Der gesamte Ansatz des jeweiligen Restriktionsverdau wurde auf ein 1%iges Agarose/Ethidiumbromid-Gel geladen. Als DNA-Größenstandard fungierten 0,5 µg der 1 kb-Leiter.

2.3.3.3.5 Insertamplifizierung

Alle aus der cDNA-Subtraktion potentiell differentiell exprimierten Klone wurden in 500 µl LB-Medium mit 0,5 µl einer zu 50 µg/µl konzentrierten Ampicillin-Natriumsalz-Lösung bei 37° C über Nacht im Brutschüttler angezogen. Für die Insert-Amplifizierung wurden als Template jeweils 1 µl Bakteriensuspension, 2,0 µl 10x PCR-Reaktions-Puffer, 0,6 µl Nested Primer 1, 0,6 µl Nested Primer 2R, 0,4 µl dNTP-Mix (10 mM), 15,2 µl Aqua bidest. und 0,2 µl 50x Advantage Polymerase Mix zu einem Gesamtvolumen von 19 µl vereint. In der PCR wurden die Proben bei 94° C für 30 sec denaturiert und über 23 Zyklen bei 95° C für 10 sec und bei 68° C für 3 min amplifiziert. Auf einem 2,0%igem Agarose/Ethidiumbromid-Gel wurden jeweils 5 µl PCR-Produkt und 0,5 µg der 1 kb-Leiter aufgetragen.

2.3.3.3.6 cDNA-Dot Blots

Zur Denaturierung der DNA wurden in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte 5 µl PCR-Produkt aus der Insertamplifizierung und 5 µl der Negativ-Kontrollen 1R und 2R aus der ersten PCR mit 5 µl einer frisch angesetzten 0,6 N Natriumhydroxid-Lösung gemischt. Für die Hybridisierung mit subtrahierten und nicht-subtrahierten Proben wurden 4 identische Blots (vorwärts-subtrahiert, revers-subtrahiert, nicht-subtrahierter Tester, nicht-subtrahierter Driver) hergestellt. Dazu wurden 1,5 µl jedes Ansatzes mit Hilfe einer Mikropipette jeweils auf vier Nylonmembranen gespottet. Zur besseren Beurteilung der Resultate wurden Doppelspots aufgetragen. Die Membranen wurden 3 min in 0,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) neutralisiert und in Aqua bidest. gewaschen. Das Fixieren der DNA auf den Membranen erfolgte über ein Crosslinken durch UV-Bestrahlung mit einem UV-Stratalinker bei 120 mJ für ca. 90 sec.

2.3.3.3.7 Random Primer Labeling der cDNA-Proben

Für die Herstellung der Hybridisierungsproben wurden 20-90 ng der vorwärts-subtrahierten cDNA, der revers-subtrahierten cDNA, der nicht-subtrahierten Tester-Kontroll-cDNA und der nicht-subtrahierten Driver-Kontroll-cDNA mit Aqua bidest. zu einem Gesamtvolumen von 9 µl vermischt und die Proben bei 95° C für 8 min denaturiert und auf Eis gestellt. Zu jedem Ansatz wurden 3 µl Reaktions-Puffer (-dCTP), 2 µl Random Primer-Mix, 5 µl [α -³²P]dCTP und 1 µl Klenow-Enzym (exo⁻) pipettiert und die Proben bei 37° C für 30 min inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 5 µl Stop-Solution. Die Aufreinigung der Proben wurde über Quick Spin-Säulen vorgenommen. Dazu wurden die Gelmatrizes der Säulen mehrere Male durch vorsichtiges Wenden resuspendiert, die obere und untere Kappe entfernt und der auslaufende Säulenpuffer verworfen. Die Säulen wurden bei 1.100 Upm (Heraeus sepatech Minifuge RF) für 2 min zentrifugiert und die DNA-Proben nach dem Verwerfen des Puffer-Eluats jeweils mittig auf das Säulenbett aufgetragen. Während des Zentrifugierens der

Säulen bei 1.100 Upm für 4 min wurden die die aufgereinigten DNAs enthaltenden Eluate aufgefangen.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden in ein Szintillationsröhrchen 3 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt und diese mit jeweils 1 µl der radioaktiven Hybridisierungsproben versetzt. Die spezifische Aktivität wurde mit einem Szintillations-Zähler gemessen, der cpm1-Wert und der Gesamtcount ermittelt.

2.3.3.3.8 Prähybridisierung und Hybridisierung

Für die Herstellung der Hybridisierungslösung wurden zum Abdecken der Adaptersequenzen für jede Membran 50 µl 20x SSC und 50 µl Blocking Solution gemischt, für 5 min gekocht und auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 ml Hybridisierungslösung. Zur Prähybridisierung wurde jede Membran in ein Hybridisierungsbehältnis gelegt, die Hybridisierungslösung hinzugegeben und bei 72° C für 50 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Jeweils ca. 20 µl der aufgereinigten Hybridisierungsproben wurden mit 50 µl 20x SSC und 50 µl Blocking Solution gemischt, diese bei 100° C für 5 min erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Für die Hybridisierung wurden die Hybridisierungsproben in die jeweiligen Hybridisierungsbehältnisse gegeben und bei 72° C über Nacht im Schüttelwasserbad inkubiert. Das Waschen der Membranen erfolgte mit einer Low-stringency-Waschlösung bei 68° C für 4x 20 min und mit einer High-stringency-Waschlösung bei 68° C für 2x 20 min.

2.3.3.3.9 Exponieren der Röntgenfilme

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die Röntgenfilme bei -20° C für 2 Stunden, bei -80° C über Nacht oder über Phoshoimagerplatten exponiert.

2.3.4 Analyse der Genprodukte aus der cDNA-Subtraktion

Alle über das differentielle Screening bestätigten Genfragmente wurden sequenziert, ihr differentielles Genexpressionsmuster mittels einer Northern Blot-Analyse überprüft und die chromosomale Lokalisation einiger interessanter Genprodukte über eine standardisierte somatische Zellhybrid- und Radiation Hybrid-Analyse vorgenommen.

2.3.4.1 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mittels der Kettenabbruchmethode nach der Didesoxy-Methode von Sanger (Sanger et al., 1977) auf dem 377 DNA ABI Sequencer. Für die Sequenzierungen wurden für Plasmid-DNA aus der cDNA-Subtraktion 300 ng bzw. für PCR-Produkte 10 ng/100 bp und ein 10 pM Primer in eine 8 µl-Reaktion eingesetzt. Die Fluoreszenzmarkierung basiert auf dem Prinzip der dye-Terminator-Reaktion. Zu nicht-markierten Primern werden Fluoreszenz-markierte ddNTPs gegeben. Die Auswertung erfolgte mit der Sequenzanalyse-Software ABI Prism Gene Scan 2.0.2 und mit Sequencing Analysis 3.4.

Mögliche Homologien zu bereits bekannten Genprodukten wurden mit dem BLAST-Programm unter der Internetadresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> detektiert. Bei Klonen mit unbekanntem Homologien wurde unter demselben Programm eine Analyse potentieller offener Leserahmen vorgenommen.

2.3.4.2 Genexpressionsanalyse mit der Northern Blot-Technik

Zur Durchführung der Genexpressionsanalyse mit der Northern Blot-Technik wurden jeweils 5 MWF- und Lew-Männchen postnatal am Tag 2, 3, 4 und 5 und jeweils drei Männchen am Tag 6, 7, 9, 12 und 40 präpariert. Bei allen Präparationen wurden beide Nieren und die Leber der Tiere entnommen. Die Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C asserviert.

Die für die Northern Blot-Analysen verwendeten Membranen enthielten ca. 20 µg Gesamt-RNA aus Nieren der 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12 und 40 Tage alten MWF- und Lew-Ratten. Die Hybridisierungen der Membranen wurden jeweils mit 2,5-25 ng der aus dem differentiellen Screening der cDNA-Subtraktion erhaltenen Klone der Vorwärts-Subtraktion 9.40, 9.68, 9.70, 9.71, 9.73, 9.107, 9.139, 9.407, 9.420 und 9.439 und der Klone der reversen Subtraktion 9.191, 9.193, 9.237, 9.249, 9.282, 9.306, 9.315, 9.330, 9.333, 9.352 und 9.383 durchgeführt.

2.3.4.3 Somatische Zellhybrid-Analyse

Über eine Kooperation mit Prof. Claude Szpirer, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgien, wurde die chromosomale Lokalisation der in Tab. 1 aufgeführten Genprodukte mit einem standardisierten somatischen Zellhybrid-Panel vorgenommen. Die Klone der Zellhybrid-Linie enthalten miteinander fusionierte Zellen aus Ratte und Maus.

Tab. 1: Genprodukte und Primer für die somatische Zellhybrid-Analyse.

Genprodukt	Primername	Sequenz	Annealing-temperatur	Produktgröße
9.71	9.71Fish2	TTCACGATGATGAGAATCTCCACGTAGA GACTGAGCCAGGAGTTGCCGTATC	59° C	329 bp
	9.71Fish3	GCCTGAGAGGGCAGGTGCATCT TTTTTACTTTGGATGGCTTCCAATGAC	68° C	358 bp
9.407	9.407Fish2	GCCATCTCCGAGTGGTGCAGTGT AGTGGGTTGCCGCCAGTCTAT	59° C	379 bp
	9.407Fish3	GCCCGAAAAATTGCCCAAACACT GCCAGCCCAGCAGGCACTCT	77° C	435 bp
9.420	9.420Fish2	GACCCAGCACGCTTCCACTGACAT GTTCTGGGTCCCCTGGTGGCTGTC	58° C	435 bp

2.3.4.4 Radiation Hybrid-Mapping

2.3.4.4.1 Prinzip

Das Radiation Hybrid-Mapping (RH-Mapping) ermöglicht die exakte chromosomale Lokalisation von Genen. Für die Hybridgenerierung der 106 Radiation Hybrid-Klone wurde im Labor Peter Goodfellow, Cambridge University, Großbritannien, eine diploide Fibroblastenzelllinie (RatFr), die aus der Hautbiopsie einer fetalen Sprague-Dawley-Ratte stammt und als Donorzelllinie fungiert, mit 3000 rad bestrahlt und mit einem Thymidinkinase-mangel (TK)-Rezipienten einer nicht bestrahlten Hamsterzelllinie fusioniert. Der Anteil des Rattengenoms beträgt in jedem Hybrid ca. 27%. Die genetische Distanz wird beim RH-Mapping in der Einheit centiRay (cR) definiert. Die Größe 1 cR variiert unter den Chromosomen und ist darüber hinaus abhängig von der Intensität der Röntgenstrahlung. 1 cR₃₀₀₀ entsprechen ca. 106 kb (Watanabe et al., 1999), 1 cM entsprechen ca. 12,6 cR (Rapp et al., 1995).

Mit genspezifischen Primern der Ratte ist es möglich, gezielt ein ca. 100-500 bp großes Genfragment aus dem Panel in einer PCR-Reaktion zu amplifizieren. Dabei dürfen nur die entsprechenden Genprodukte bei der Ratte amplifiziert werden, so daß bei der Primerauswahl darauf zu achten ist, daß die genspezifischen Primer zwar das jeweilige Rattengen, aber nicht das Hamstergen amplifizieren.

2.3.4.4.2 Methode

Da einige Klone nur einen geringen DNA-Gehalt an Hybrid-DNA enthalten, wurden nur folgende Hybrid-Klone beim Radiation Hybrid-Mapping berücksichtigt: Klon-Nr. 2-10, 12-14, 16-19, 21-34, 36-37, 39-50, 52-53, 55-59, 61-89, 91-106 (RH-Panel-Version T55v3/96).

50 ng DNA der jeweiligen Hybrid-Klone des Ratten-Hamster-Radiation-Hybrid-Panels wurden mit 10x PCR-Puffer, 1,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM dNTPs, 0,1 µM sense-Primer und 0,1 µM antisense-Primer (Tab. 2), 0,4 U/l Taq-Polymerase und Aqua bidest. zu einem Gesamtvolumen von 10 µl in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte gemischt. Nach einer initialen Denaturierung bei 92° C für 2 min wurde für 30 Zyklen eine PCR bei 92° C für 15 sec, die Primer-spezifische Annealing-Temperatur für 1 min, 72° C für 1 min und 72° C für 7 min angeschlossen. Die PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarose/Ethidiumbromid-Gel aufgetragen. Die Auswertung erfolgte über eine Zwei-Punkt-Linkage-Analyse unter den Internetadressen <http://www.rgd.mcw.edu/RHMAPSERVER/>, <http://www.ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html> und http://curatools.curagen.com/curamap_portal/index.htm.

Eine „1“ erhielt jeder Klon, der ein Amplifikat aufwies, eine „0“ erhielt jeder Klon ohne Amplifikat und eine „2“ erhielten Klone mit sehr schwachen bzw. zweifelhaften Amplifikaten. Der Lod-Score wurde für die Zwei-Punkt-Linkage-Analyse auf 15,0 gesetzt.

Das jeweils mit Hilfe der Ratten-Kontrolle (RatFr) generierte PCR-Produkt wurde zu seiner Konfirmierung sequenziert und über eine BLAST-Analyse mit der Ausgangssequenz verglichen (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tab. 2: Genprodukte und Primer für das RH-Mapping.

Genprodukt	Primername	Sequenz	Annealing-temperatur	Produktgröße
9.139 (VS)	9.139RH	CCTTGTGGGTGCTGGGAATGTAAC AAGCGGAAAGGAAGGGAGGGTAGA	68° C	480 bp
9.333 (rS)	9.333PAC	CTTGCCACACATTGCAAAGGTCAC GAGCATAGCCCAGCACATGGACAC	58° C	177 bp
9.352 (rS)	9.352RH	ACTCCGCAGCACTACCCGGAGAC GCTGGTTCGCTGGAACAGGACTA	59° C	101 bp
9.420 (VS)	9.420FISH2	GACCCAGCACGCTTCCACTGACAT GTTCTGGGTCCCCTGGTGGCTGTC	59° C	435 bp

2.4 Mikroarray-Technik

Parallel zur cDNA-Subtraktion wurde mittels der Affymetrix-Chip-Technologie (Fodor et al., 1993; Lockhart et al., 1996) eine differentielle Genexpressionsanalyse über eine Kooperation mit Dr. Norbert Hübner, MDC, Berlin-Buch, durchgeführt. Für die Hybridisierung der drei Chips (Ratten Genom U34A GeneChips, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), die insgesamt ca. 24.000 Gene aufweisen, wurde RNA mittels der Trizol-Methode von jeweils 5 MWF- und Lew-Ratten isoliert. Die RNA wurde zuerst in cDNA (Standardprotokoll Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) und anschließend mittels der in-vitro-Transkription in cRNA umgeschrieben. Nach einer Biotin-Markierung wurde die RNA über Hitzedenaturierung und Salzeinwirkung fragmentiert und auf jeweils einen Affymetrix-Chip hybridisiert. Die verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten wurden über einen Scanner erfaßt. Die Auswertung der Affymetrix-Chips erfolgte mittels eines T-Testes, das Signifikanzniveau für differentiell exprimierte Gene wurde auf einen p-Wert $p=0,001$ definiert.

2.5 Ermittlung von Ko-Lokalisationen krankheitsrelevanter Gene und Genloci

2.5.1 Die Kandidatengene Nephtrin, α -Aktinin-4, Zonula occludens-1 und Renin

Zeitgleich zur Kosegregationsanalyse und zur differentiellen Genexpressionsanalyse wurden die bereits in der Literatur bekannten Kandidatengene Nephtrin (Nphs1) und α -Aktinin-4 (Actn4) über eine FISH-Analyse in der Ratte chromosomal lokalisiert. Die FISH-Analysen wurden über eine Kooperation mit Prof. Claude Szpirer, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgien, durchgeführt. Die dafür verwendeten Primer sind in Tab. 3 aufgeführt. Alle cDNA-Primeramplifikate wurden über eine reverse Transkription generiert und über eine Sequenzierung auf ihre Authentizität überprüft.

Für die FISH-Analyse wurde eine 583 bp große Region zwischen 889-1451 bp der in der Literatur bekannten Nphs1-RNA-Sequenz mit der GenBank-Accession-Nr. AF161715 der Ratte und eine 713 bp große Region zwischen 1971-2662 bp der Actn4-RNA mit der GenBank-Accession-Nr. AF190909 über eine reverse Transkription generiert. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt und mit dem ISIS Imaging System (MetaSystems,

Althusheim, Deutschland) analysiert. Für die Auswertung wurden bei Nphs1 18 Zellen und bei Actn4 10 Zellen untersucht.

Tab. 3: Genprodukte und Primer für die FISH-Analyse.

Genprodukt	Primername	Sequenz	Annealing-temperatur	Produktgröße
Nphs1	AF161715-889 AF161715-1451	GACCTGGGTAGCTGGGCAGGAGTA GGCGCTTGGGGGAAAGGTGAC	63° C	583 bp
Actn4	AF190909-1971 AF190909-2662	CAATGAGCACCTTCGCCGACAGT CCATGCGGGCGATGCAATACTC	59° C	713 bp

Die chromosomale Lokalisation von Nphs1, Actn4 und Zonula occludens-1 (Zo-1) wurde darüber hinaus über das RH-Mapping mit den in Tab. 4 aufgeführten Primern und Bedingungen vorgenommen (Durchführung s. 2.3.4.4).

Tab. 4: Genprodukte und Primer für das RH-Mapping.

Genprodukt	Primername	Sequenz	Annealing-temperatur	Produktgröße
Nphs1	AF161715-4414 AF161715-4623	GGGGATGAGCCCAGTGGGAGTC CGGGTCCTCTGCAAGAGCAGTGAC	60° C	233 bp
Actn4	AF190909-2705 AF190909-2872	CTGCTCCAGGCGCCCTTGACTA CCTCCCTGCCTGACCCCTAGA	63° C	189 bp
Zo-1	NM009386-1915 NM009386-2190	GGACGTTTATCGCCGCATTGTAGA ACCTCCAGAAGTCTGCCCGATCAC	64° C	299 bp

Zusätzlich wurde das Expressionsmuster des literaturbekannten Kandidatengens Renin (Ren) in einer Northern Blot-Analyse bei den Parentaltieren MWF und Lew charakterisiert.

2.5.2 Ko-Lokalisationen

Die Gene Nphs1, Actn4, Zo-1, Ren, antinatriuretisches Peptid (Anf), Kallikrein 1, die einzelnen Komponenten des Endothelinsystems Endothelin 1 (ET-1), Endothelin 2 (ET-2), Endothelin 3 (ET-3), ET_A-Rezeptor (ET_A), ET_B-Rezeptor (ET_B) und Endothelin-Converting-Enzym (ECE-1), die Genprodukte aus der cDNA-Subtraktion und die QTL der Kosegregationsanalyse wurden auf Ko-Lokalisationen untersucht.