

Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Prof. Dr. med. Ralf Stahlmann

Die Genetik der Hypertonie:
Ein neuer blutdruckregulierender QTL auf Chromosom 6 des Hypertoniemodells SHRSP

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

vorgelegt von Karsten Lunze
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Detlev Ganten

Koreferent: Prof. Dr. Norbert Hübner

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am 2. Dezember 2005

Meinen Eltern
als meinen ärztlichen Vorbildern
in Liebe gewidmet

Großer Gott, wir loben Dich,
Herr, wir preisen Deine Stärke,
vor Dir neigt die Erde sich
und bewundert Deine Werke.

Nach dem *Te Deum* aus dem 4. Jahrhundert

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	VIII
VERZEICHNIS DER TABELLEN	IX
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	X
DANKSAGUNG / ACKNOWLEDGMENTS	XI
ABSTRAKT / ABSTRACT	XIII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Hypertonie ist weltweit eine bedeutende Krankheit	1
1.2. Bluthochdruck wird als quantitative Eigenschaft vererbt	2
1.3. Komplexe Eigenschaften der Hypertonie erschweren die Untersuchung ihrer genetischen Ursachen	5
1.4. Verschiedene Konzepte haben die genetische Analyse komplexer Krankheiten möglich gemacht	7
1.5. Tiermodelle sind ein repräsentatives Werkzeug zur genetischen Dissektion der Hypertonie	9
1.6. In der Rattengenetik werden verschiedene Strategien angewandt	12
1.6.1. Intervallkartierung	12
1.6.2. Untersuchung von Kandidatengen in Kopplungsanalysen	13
1.7. Durch die QTL-Kartierung soll der genetische Anteil der Blutdruckvariabilität analysiert werden	13
1.8. Zielsetzung dieser Arbeit	17

2.	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1.	Tierexperimenteller Teil.....	20
2.1.1.	Verwendete Tiere.....	20
2.2.	Bestimmung hämodynamischer Parameter	22
2.2.1.	Intraarterielle Blutdruckmessung	22
2.2.2.	Radiotelemetrische Blutdruckmessung.....	22
2.3.	Gewebeentnahme zur DNA-Extraktion	23
2.4.	Isolierung genomischer DNA.....	23
2.5.	Präparation von DNA-Vorratsplatten	24
2.6.	Synthese und Aufbereitung der Primer.....	24
2.7.	Radioaktive Markierung der Oligonukleotidprimer.....	26
2.8.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
2.9.	Polyacrylamid-Elektrophorese	28
2.10.	Restriktionsverdau und Elektrophorese auf Agarose-Gelen	29
2.11.	Testung der Primer auf Polymorphismen	30
2.12.	Statistische Analyse, Kartierung und Kopplungsanalyse.....	31
3.	ERGEBNISSE	32
3.1.	Identifikation des <i>Cac8I</i>-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus in Exon 3 des Ratten-Kallistatin-Gens durch vergleichendes Sequenzieren in verschiedenen Rattenstämmen	32
3.2.	QTL-Kartierung auf Chromosom 6 in Kohorte A.....	35
3.3.	Phänotypenanalyse in Kohorte A.....	39
3.4.	Erweiterung der Kohorte um 102 Tiere und Verwendung weiterer Marker.....	41
3.5.	Testung der in Datenbanken neu gefundenen SSLP-Marker auf Polymorphismen zwischen WKY und SHRSP	43
3.6.	QTL-Kartierung der Kohorte B.....	45
3.7.	Poweranalyse der Kohorte B	48
3.8.	Phänotypenanalyse der Kohorte B.....	49

3.9.	Identifizierung möglicher Kandidatengene in der Region um <i>D6MGH10</i>	51
4.	DISKUSSION.....	53
4.1.	Unsere Kopplungsanalyse zeigt durch die Erweiterung der ursprünglichen Kohorte einen blutdruckregulierenden QTL.....	53
4.2.	Die Verfügbarkeit, genomische Dichte und vorhandene Polymorphismen von genetischen Markern bestimmt die Genauigkeit unserer Kopplungsanalyse.....	59
4.3.	Die Wahl des Stammes erlaubt die Analyse der Salzabhängigkeit in der Ätiologie der Hypertonie	60
4.4.	Der gezeigte QTL beeinflusst den systolischen Blutdruck, den diastolischen Blutdruck und den Pulsdruck	60
4.5.	Kandidatengene spielen durch die Physiologie ihrer Genprodukte eine mögliche Rolle bei der Entstehung der Hypertonie.....	62
4.6.	Die genetische Dissektion des QTL und der flankierenden Region erschließt weitere Kandidatengene für die Hypertonie.....	64
4.7.	Die salzabhängige Entstehung der Hypertonie ist möglicherweise von einer genetischen Prädisposition abhängig	66
4.8.	Entwicklungseinflüsse bestimmen möglicherweise in ihrem Verlauf die Ausprägung des Blutdrucks	67
4.9.	Ausblick auf die zukünftige Suche nach den molekularbiologischen Ursachen der Hypertonie.....	68
5.	ZUSAMMENFASSUNG	71
6.	LITERATURVERZEICHNIS	73
6.1.	Verzeichnis der verwendeten Internetressourcen.....	73
6.2.	Referenzen.....	73
6.3.	Bücher und Monographien	84
7.	LEBENS LAUF	86
8.	PUBLIKATIONEN	88
9.	VERSICHERUNG	89

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Thorn 1203

Abbildung 2: Die historische Debatte zwischen Lord Platt und Sir Pickering

Abbildung 3: Kreuzungsschema der F₂-Tiere

Abbildung 4: Restriktionskarte der Sequenz des Exons 3 des Ratten-Kallistatin-Gens

Abbildung 5: RFLP für das Exon 3 des Ratten-Kallistatin-Gens

Abbildung 6: Genotypisierung der Marker auf einem 6%-Polyacrylamid-Gel

Abbildung 7: Genotypisierung des Kallistatin-RFLPs auf einem Agarose-Gel

Abbildung 8: Die genetische Kartierung der QTL-Region auf Rattenchromosom 6 für Kohorte A

Abbildung 9: Kopplungsanalyse der Phänotypen für die zuvor kartierten Marker

Abbildung 10: Testung der Marker auf Polymorphismus zwischen SHRSP und WKY

Abbildung 11: Die physikalische Karte der QTL-Region auf Rattenchromosom 6

Abbildung 12: Autoradiographie der Genotypisierung eines Markers auf 6%-Polyacrylamid-Gel

Abbildung 13: Genetische Kartierung der QTL-Region auf Rattenchromosom 6 für Kohorte B

Abbildung 14: Kopplungsanalyse der Phänotypen für die zuvor kartierten Marker in Kohorte B

Verzeichnis der Tabellen

- Tabelle A: Liste der auf Polymorphismen zwischen den Stämmen WKY und SHRSP getesteten Marker
- Tabelle B: Liste der zwischen den Stämmen WKY und SHRSP polymorphen Marker
- Tabelle C: Phänotypenanalyse in der Kohorte A
- Tabelle D: ANOVA der Kohorte A
- Tabelle E: Testung auf Polymorphismen
- Tabelle F: Vergleich LOD-Werte des Markers *D6MGH10* für die Kohorten A und B
- Tabelle G: Phänotypenanalyse in der Kohorte B für den Marker *D6MGH10*
- Tabelle H: ANOVA der erweiterten Kohorte B für den Marker *D6MGH10*
- Tabelle I: Kandidatengene in der Region um *D6MGH10*

Verzeichnis der Abkürzungen

3'UTR	3'-untranslatierte Region
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ANOVA	Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
BKRB2	Bradykininrezeptor B2
BN	Brown-Norway-Ratte
bpm	Schläge pro Minute
DALY	<i>Disability</i> -adjustierte Lebensjahre
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-N-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymimmuntests
F ₁	erste Tochtergeneration
F ₂	zweite Tochtergeneration
γ- ³² P-ATP	Adenosidtriphosphat
GH	Wachstumshormon
GH	Genetisch Hypertensive Ratte
KBP	Kallikrein bindendes Protein
LOD-Wert	<i>Logarithm of the odds</i> -Wert
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NaCl	Kochsalz
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
QTL	Quantitativer Trait Lokus
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SHR	Spontan hypertensive Ratte
SHRSP _{HD}	Spontan hypertensive, zum Schlaganfall neigende Ratte, Stamm Heidelberg
SNP	<i>Single Nucleotide</i> -Polymorphismus
SSLP	<i>Simple Sequence</i> -Längenpolymorphismus
SSR	<i>Simple Sequence</i> -Wiederholungen
STR	<i>Short Tandem</i> -Wiederholungen
T ⁴ PNK	T ⁴ -Polynukleotidkinase
TAE	Tri-Acetat mit EDTA
Taq	<i>Thermo aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat mit EDTA
TEMED	Tetramethylendiamid
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WKY _{HD}	Wistar-Kyoto-Ratte, Stamm Heidelberg

Danksagung / Acknowledgments

Meinem Doktorvater Professor Dr. Detlev Ganten, Vorsitzender des Vorstands der Charité - Universitätsmedizin Berlin, danke ich für seine freundliche Bereitschaft, die Aufsicht über diese Arbeit zu übernehmen. Ich danke ihm für seinen Vertrauensvorschuss und seine stets prompte, weit über die Angelegenheiten dieser Arbeit hinausgehende Unterstützung meiner Anliegen.

Professor Dr. Klaus Lindpaintner, MPH, FACP, Harvard Medical School und Harvard School of Public Health, Boston, MA, hat es mir möglich gemacht, in seinem Labor tätig zu sein und an einer der berühmtesten Universitäten der Welt studieren zu dürfen. Ich danke ihm besonders für die ihm eigene Großzügigkeit, mit der er mir alle denkbare Freiheit verschafft und gleichzeitig - bei seinen intensiven internationalen Verpflichtungen - stets seine persönliche Begleitung meiner Arbeit geboten hat.



Abbildung 1: Berthold und sein Doktorand im heimatlichen Thorn 1203. Wir haben eine glückliche Zeit in Boston - and beyond!

Meinen größten Dank schulde ich Dr. Berthold Struk, Harvard Medical School und Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin. Von Beginn an, als er mir Schulter an Schulter die ersten Schritte im Labor beigebracht hat, bis heute, nach meinem Eintritt in die klinische ärztliche Tätigkeit, hat Berthold mit seiner menschlich großen Art dafür gesorgt, dass mir die Arbeit im Labor Spaß macht und ich mich dabei ausgesprochen wohl fühle. Seine Hilfe und Unterstützung gehen weit über das Laborleben hinaus. In unzähligen koffeingestützten Nächten hat er vertrauensvoll und unermüdlich seinen wissenschaftlichen und klinischen Erfahrungsschatz mit mir geteilt. Berthold ist der beste akademische Lehrer, den man sich wünschen kann.

The Lindpaintner Lab at the Brigham and Women's Hospital is an inspiring and fascinating place to work - filled with people of great expertise and good fun! I thank everybody from the Lindpaintner Lab for their help and support, particularly

Dr Joon Chung, MS, JD. Living in Boston was a truly happy period of my life. Thank you guys for making my time here such a terrific one!

I am grateful to Dr Claudia Stein, MD, MSc, PhD, MFPHM, from WHO in Geneva, Switzerland, for latest data on and helpful discussion about the global burden of hypertensive disease, for her teaching in statistics - und ihre tolle, bewundernswerte Art, die mir ein Vorbild ist.

I thank Bryony Kelly, Curator of the Royal College of Physicians, London, for providing me sources relevant to the historical debate on the genetics of hypertension in Great Britain.

Herrn Professor Dr. Rainer Kreutz vom Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin danke ich für seine freundliche Unterstützung. Herrn Professor Dr. Norbert Hübner sowie seinen Mitarbeiterinnen Heidemarie Kistel und Anita Müller vom Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch danke ich für die freundliche Bereitstellung der Ressourcen sowie die tatkräftige Hilfe und die herzliche Unterstützung.

Ohne meine Familie und meine Freunde wäre diese Arbeit mit ihren Höhen und Tiefen nicht möglich gewesen. Ich danke Vera Lukaszewicz, MTA, und Ing.-Oec. Regina Lukaszewicz für ihre konkreten Hilfen und ihren Einsatz im Alltag. Vanessa Stahnke danke ich für ihre Zuversicht in Bostoner und Berliner Tagen. Ich bin stolz auf meine Brüder Dipl.-Ing. David Lunze und Dipl.-Jur. Stefan Lunze, J.C.L., denen ich für ihre Hilfe, Unterstützung und unzählige gute Gedanken danke. Meiner Schwägerin, der Meisterin Kathrin Lunze und meinem Neffen Niklas danke ich für die Freude, die sie in unser Leben bringen.

Meiner Freundin Dr. Fatima Dsebissowa danke ich für ihre Liebe und ihre Unterstützung.

Meinen Eltern Lutz und Dr. Ursula Lunze, MPH, danke ich für ihre bedingungslose Liebe. Sie haben mich Anspruch an mich selbst gelehrt. Ihnen ist diese Arbeit in Liebe gewidmet.

Abstrakt

Im Rattenmodell der zum Schlaganfall neigenden spontan hypertensiven Ratte (SHRSP) wurde eine Region mit zwei Kandidatengenen für Hypertonie auf Chromosom 6, Kallistatin und Bradykininrezeptor B2, genotypisiert.

Die Kopplungsanalyse einer Kohorte A von 112 Tieren der zweiten Tochtergeneration (F_2) aus einer Kreuzung zwischen hypertensiven SHRSP- und normotensiven WKY-Ratten zeigte eine grenzwertige Kopplung des anonymen Markers *D6MGH10* an den systolischen Blutdruck mit einem LOD-Wert von 2,4 sowie an den Pulsdruck mit einem LOD-Wert von 2,9 und an die Herzfrequenz nach übermäßiger Salzaufnahme mit der Nahrung („Salzbelastung“) mit einem LOD-Wert von 2,5. Die Marker für Kallistatin und für den Bradykininrezeptor B2 zeigten lediglich LOD-Werte von jeweils 1,4 bzw. 1,5 für den basalen Pulsdruck.

Um dieses Ergebnis zu validieren, wurden zusätzlich weitere 102 Tiere untersucht, die nach dem gleichen Schema und von genetisch identischen Ausgangsstämmen gezüchtet worden waren. In der erweiterten Kohorte B ($n = 214$) war eine signifikante Kopplung sowohl des basalen systolischen Blutdrucks mit einem LOD-Wert von 4,8 als auch des basalen Pulsdrucks mit einem LOD-Wert von 4,4 an den Marker *D6MGH10* nachzuweisen. Dies bestätigte die vorherigen Ergebnisse und reflektierte die gesteigerte statistische Power der größeren Kohorte.

Die Marker der beiden in der Nähe von *D6MGH10* kartierten Kandidatengene, nämlich der für Kallistatin und für den Bradykininrezeptor B2, zeigten in der erweiterten Kohorte keine Kopplung. Unser Experiment vermochte bei dem gegebenen $\alpha = 0,05$ mit einer statistischen Power von 80% einen Unterschied im basalen systolischen Blutdruck von ca. 7 mmHg oder höher und im Pulsdruck von ca. 2 mmHg oder höher zwischen den Genotypgruppen in Bezug auf den Allelstatus an den Markern für Kallistatin und den Bradykininrezeptor B2 zu detektieren.

Diese Studie konnte die Existenz eines rezessiven QTL auf Chromosom 6 am oder in der Nähe des Markers *D6MGH10* für basalen systolischen Blutdruck und Pulsdruck nachweisen. Die Marker der beiden in der Nähe von *D6MGH10* kartierten Kandidatengene, für Kallistatin und für den Bradykininrezeptor B2, zeigten in der erweiterten Kohorte keine Kopplung. Ein größerer Einfluss der beiden Kandidatengene auf die Blutdruckregulation konnte aufgrund der fehlenden Kopplung und der Power unserer Studie weitgehend ausgeschlossen werden.

Abstract**Genetics of hypertension: A novel blood pressure regulating QTL on chromosome 6 of the hypertension model SHRSP**

A region on chromosome 6 containing two candidate genes for hypertension, kallistatin and bradykinin receptor B2, was genotyped in the Stroke Prone Spontaneously Hypertensive Rat (SHRSP), a rat model for stroke.

Linkage analysis in a cohort A of 112 F₂ animals derived from an intercross between SHRSP and a normotensive stroke-resistant reference strain, the Wistar Kyoto rat (WKY), revealed border-line linkage of the anonymous marker, *D6MGH10*, to systolic blood pressure with a LOD score of 2.4, to pulse pressure with a LOD score of 2.9, and to heart rate after excess dietary salt consumption (“salt loading”) with a LOD score of 2.5. Markers for kallistatin and bradykinin receptor B2 showed LOD scores of 1.4 and 1.5, respectively, for pulse pressure.

To validate these findings, an additional 102 animals, bred according to an identical breeding scheme, were analysed. Linkage analysis in the enlarged cohort B (n = 214) showed significant linkages for *D6MGH10* to both systolic blood pressure with a LOD score of 4.8 and to pulse pressure with a LOD score of 4.4, confirming the previous findings and reflecting the enhanced statistical power of the enlarged cohort.

However, no linkage was demonstrated in the enlarged cohort B for the two candidate genes that map to the vicinity of *D6MGH10*, namely those coding for kallistatin and the bradykinin receptor B2. The experiment provided, at an $\alpha = 0.05$, 80% power to detect an across-genotype-groups difference in basal systolic blood pressure of about 7 mmHg or larger, and in pulse pressure of about 2 mmHg or larger, respectively, with regard to allelic status at the kallistatin and bradykinin receptor B2 markers.

This study suggests the presence of a recessively acting QTL for systolic blood pressure and for pulse pressure on chromosome 6 at or in the vicinity of the marker, *D6MGH10*. However, no linkage was demonstrated for the two candidate genes that map to the vicinity of *D6MGH10*, those coding for kallistatin and the bradykinin receptor B2. Lack of linkage in and the power of our experiment ruled out a major impact of the candidate genes on blood pressure regulation.