

Aus dem Institut/der Klinik für
Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse der genetischen Beziehung
zwischen Albuminurie und Dyslipidämie bei der
salzsensitiven Dahl-Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Victoria Müller
aus Hamburg

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Kreuz

2. Prof. Dr. med. O. Grisk

3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Beige

Datum der Promotion: 07.09.2012

meinen Eltern

Inhalt

1	Einleitung	6
1.1	Die primäre Hypertonie und assoziierte Erkrankungen.....	6
1.2	Die Hypertonie als komplexe genetische Erkrankung.....	9
1.3	Tiermodelle für die Untersuchung von Herz- Kreislaufferkrankungen.....	10
1.4	Quantitative Trait Locus- Charakterisierung.....	11
1.5	Identifizierung krankheitsrelevanter Gene und Genloci	12
1.6	Die Inzuchtstämme SHR und Dahl/SS	15
1.6.1	Der SHR-Stamm.....	16
1.6.2	Der Dahl/SS-Stamm	16
1.7	SS- und SHR-Rattenstämme zur Untersuchung von Hypertonie, Albuminurie und Hyperlipidämie.....	17
1.8	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	Chemikalien und Radionukleotide	20
2.1.2	Puffer, Lösungen und Medien.....	21
2.1.3	Sonstige Materialien und Futtermittel	22
2.1.4	Enzyme.....	22
2.1.5	Geräte.....	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Parentalstamm-Charakterisierung und Zucht	23
2.2.2	Phänotypisierung.....	24
2.2.3	Genom- und Kopplungsanalyse.....	25
2.2.4	Primäre und sekundäre Genomanalyse	29
2.2.5	Statistische Analyse.....	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Parentalstamm-Charakterisierung.....	31

3.1.1	Genotypisierung der Parentalstämme	31
3.1.2	Phänotypisierung der Parentalstämme SS und SHR.....	31
3.2	Kosegregationsanalyse	35
3.2.1	Phänotypisierung der F2-Generation von SHR und SS.....	35
3.3	Korrelationsanalyse	37
3.3.1	Primäre Genomanalyse der Extremtiere der F2-Generation	40
3.3.2	Sekundäre Genomanalyse aller F2-Tiere	45
4	Diskussion	52
4.1	Phänotypische Charakterisierung der Parentalstämme	53
4.2	Kosegregationsanalyse der F2-Generation	55
4.3	Ausblick	60
5	Literatur.....	61
6	Zusammenfassung.....	70
7	Anhang.....	72
7.1	Polymorphe Mikrosatellitenmarker für die Intervallkartierung	72
7.2	Abkürzungsverzeichnis	74
8	Lebenslauf	76
9	Danksagung.....	77
10	Selbstständigkeitserklärung	78

1 Einleitung

Der arterielle Bluthochdruck ist eine Volkskrankheit, die in den industrialisierten Ländern 25% der erwachsenen Bevölkerung betrifft (Burt et al., 1995). Laut WHO ist die arterielle Hypertonie global für ein Drittel aller Todesfälle mitverantwortlich. Der Bluthochdruck betrifft insgesamt 4,5% der Erkrankungen weltweit (WHO/ ISH: statement on management of hypertension, 2003), womit er ein epidemiologisch schwerwiegendes Problem darstellt.

1.1 Die primäre Hypertonie und assoziierte Erkrankungen

Die arterielle Hypertonie wird als chronische Erkrankung zu den wesentlichen kardiovaskulären Risikofaktoren gezählt. Sie kann langfristig zu sekundären Organschäden, besonders am Herzen (Herzinsuffizienz und Herzinfarkt), im ZNS (Apoplex) und an den Nieren (Niereninsuffizienz) führen (Mosterd et al., 1999; Kannel, 2000).

In der klinischen Medizin wird zwischen der primären, häufig als „essentiell“ bezeichneten Hypertonie und der sogenannten sekundären Hypertonie unterschieden. Die sekundäre Hypertonie umfasst diejenigen Krankheitsformen, für die ein ursächlicher pathogenetischer Mechanismus identifiziert werden kann. Diese Mechanismen sind in der Regel mit organischen Veränderungen assoziiert, wie zum Beispiel mit der Nierenarterienstenose. Die primäre Hypertonie, die mit 90% den weitaus größeren Anteil der Bluthochdruckkranken darstellt, ist bislang immer noch eine Ausschlussdiagnose. Wenn mittels klinischer Untersuchungsverfahren keine andere organische Ursache der Hypertonie diagnostiziert werden kann, wird die primäre „essentielle“ Hypertonie attestiert. Eine besondere Problematik des primären Bluthochdrucks ergibt sich bei der Therapie, da die Patienten bisher nur symptomatisch (medikamentös) behandelt werden, nicht aber die eigentliche Ursache bekämpft werden kann. Dafür stehen dem Arzt heute über 70 Medikamente aus 10 verschiedenen Substanzklassen zur Verfügung (Kreutz et al., 2004).

Um in Zukunft eine bessere Prophylaxe und Therapie bei den Erkrankten zu erreichen, ist es unbedingt notwendig, ein besseres Verständnis der komplexen biologischen Ursachen der primären Hypertonie zu gewinnen. Um diesem Ziel näher zu kommen, kann die molekulare Genetik von großer Hilfe sein. Der Zweck der molekularen Untersuchung ist es, den Patienten schließlich mit einer individuell auf ihn abgestimmten und somit effektiveren Therapie zu behandeln, als es im Moment mit den üblichen Kombinationstherapien möglich ist. Wenn die genetischen Faktoren die einzige Ursache der arteriellen Hypertonie darstellten, wäre ihr Auftreten prinzipiell vorhersehbar und es könnten frühzeitig präventive und therapeutische Maßnahmen eingeleitet werden (Kreutz et al., 2004).

Die Niere spielt bei der Pathogenese der Hypertonie eine wesentliche Rolle. Einerseits ist sie durch das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem direkt an der Pathogenese beteiligt, andererseits beeinflussen eine reduzierte Nephronenzahl und eine verminderte Filtrationsoberfläche das Bluthochdruckgeschehen und liefern wichtige pathogene Faktoren, insbesondere bei salzsensitiver Hypertonie-Prädisposition (Kreutz et al., 2000; Brenner et al., 1988), die zum Beispiel bei der afroamerikanischen Bevölkerung in Nordamerika besonders verbreitet ist (Baker et al., 2001). Ein wichtiger Faktor für die Beurteilung der Nierenschädigung bei der primären Hypertonie ist die Mikroalbuminurie (Mann et al., 2001; Ruilope et al., 2001). Sie stellt ein typisches Frühsymptom für die Entwicklung einer hypertensiven Nephropathie dar.

Die Hypertonie kann auch zu anderen Organschäden führen, wie zum Beispiel zu Gefäßschädigungen mit endothelialer Dysfunktion, die wiederum ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Schlaganfällen und koronaren Herzerkrankungen mit sich führen. Klinische Studien zeigten, dass auch eine Mikroalbuminurie eine systemische Dysfunktion des vaskulären Endothels widerspiegeln kann.

Auch Lipidstoffwechselstörungen treten oft gemeinsam mit der arteriellen Hypertonie auf und führen zu einem mehrfach erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Mancia et al., 2007). Das häufig gemeinsame Auftreten von Hypertonie und Dyslipidämie deuten darauf hin, dass diesen bekannten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen verwandte genetische Faktoren unterliegen könnten. Ein Beispiel hierfür ist das metabolische Syndrom. Eine Dyslipidämie, die im Rahmen eines metabolischen Syndroms auftritt, ist durch hohe Triglyzeridwerte, hohe Cholesterinwerte, hohe Konzentrationen von VLDL (very low density lipoproteins) und LDL (low density

lipoproteins) sowie durch niedrige HDL-Konzentrationen (high density lipoproteins) gekennzeichnet.

VLDL, LDL und HDL sind Lipoproteine, die für den Lipidtransport im Serum verantwortlich sind. Lipide werden im Blut in kugelförmigen Molekülkomplexen (Mikroemulsionen) transportiert. Deren „Hülle“ besteht aus amphiphilen Lipiden (Cholesterin), ihr Kern aus stark hydrophoben Lipiden wie den Triglyzeriden und Cholesterin-Ester, der Transport- und Speicherform von Cholesterin. Die Lipoproteine unterscheiden sich nach Größe, Dichte, Lipidzusammensetzung und Bildungsort.

Vor allem erhöhte Werte von Lipoproteinen (Hyperlipoproteinämie) sind Voraussetzung für die meisten Formen der Arteriosklerose (Williams et al., 1993; Herrera et al., 2004). Eine Erhöhung der Blutfette kann sowohl das Cholesterin (Hypercholesterinämie), als auch die Triglyzeride (Hypertriglyzeridämie) betreffen. Bei den meisten Patienten mit Hypercholesterinämie tritt diese zwar familiär gehäuft auf, ihre eigentliche Ursache ist jedoch unbekannt (polygene Hypercholesterinämie). Die Hypercholesterinämie wird allerdings auch durch Übergewicht und Ernährung beeinflusst. Vor allem durch Bevorzugung pflanzlicher Fette (ungesättigte Fettsäuren) kann das LDL-Cholesterin gesenkt werden. Tierische (gesättigte) Fette steigern die Cholesterinsynthese in der Leber und vermindern dort die LDL-Rezeptor-Dichte, so dass sich die cholesterinreichen LDL im Serum erhöhen. Die Folge ist eine vermehrte Bindung von LDL an die Rezeptoren, welche die Einlagerung von Cholesterin in Makrophagen, Haut und Gefäßwände vermittelt. Hypercholesterinämie ist somit ein Risikofaktor für Arteriosklerose und koronare Herzerkrankung.

Die primäre Hypertriglyzeridämie beruht auf einer erhöhten Triglyzerid-Synthese in der Leber oder auf einer seltener auftretenden Abbaustörung von Chylomikronen und VLDL und prädisponiert u.a. zu einer Pankreatitis. Zudem ist das HDL erniedrigt und somit das Arterioskleroserisiko erhöht, da somit der Cholesterin-Abtransport aus der Gefäßwand vermindert wird. (Silbernagl et al.; 1998).

Die häufige Assoziation von Hypertonie und Dyslipidämie kann von Genen beeinflusst sein, die den Blutdruck und den Lipidstoffwechsel regulieren (Bottger et al., 1996). Zusätzlich können ein erhöhter Blutdruck und ein schlecht regulierter Fettstoffwechsel aus Umweltfaktoren des Menschen resultieren, wie zum Beispiel extreme Fettaufnahme oder Adipositas. Ebenso ist ein sekundärer Zusammenhang zwischen arteriellem Hypertonus, Nierenschäden und Dyslipidämie möglich. Ein Glomerulumschaden, der zum Beispiel bei einem nephrotischen Syndrom auftritt, wird durch den Proteinverlust

häufig von einer sekundären reaktiven Hypercholesterinämie und Hypertriglyzeridämie begleitet.

Eine beschleunigte Entwicklung der Arteriosklerose bei polygenetisch vererbter essentieller Hypertonie und Hyperlipidämie wurde beim Menschen ausführlich untersucht. Allerdings verhindert der Mangel an Tiermodellen, die diese humanen Erkrankungen widerspiegeln können, dass der pathogenetische Mechanismus aufgeklärt wird (Herrera et al., 1999). Eine genauere Untersuchung wird zusätzlich durch die polygenetische Vererbung und durch den multifaktoriellen Pathomechanismus der Hyperlipidämie erschwert.

1.2 Die Hypertonie als komplexe genetische Erkrankung

Mehrere Befunde unterstützen die Hypothese, dass die primäre Hypertonie eine genetisch bedingte Erkrankung darstellt. Diese Annahme geht aus Beobachtungen hervor, nach denen eine familiäre Häufung der Hypertonie und eine erhöhte Konkordanz bei eineiigen Zwillingen festgestellt worden sind. In mehreren unabhängigen Studien wurden höhere Korrelationskoeffizienten des Bluthochdrucks bei eineiigen (monozygoten) gegenüber zweieiigen (dizygoten) Zwillingspaaren als wichtiger Hinweis auf die Beteiligung genetischer Faktoren nachgewiesen (Kreutz et al., 2004).

Es finden sich darüber hinaus einige nach den Mendelschen Gesetzen monogen vererbte Hypertonieformen, die allerdings sehr selten sind. Ungeachtet ihrer Seltenheit erbrachte die Aufklärung der molekularen Grundlagen bei diesen monogenen Erkrankungen entscheidende Hinweise. Dies gilt nicht nur für die genetische Beeinflussung der Hypertonie, sondern auch für die genetische Blutdruckregulation per se (Kreutz et al., 2004). Unter diesen Erkrankungen findet sich u.a. das *Liddle-Syndrom* (autosomal-dominant vererbt) oder der glukokortikoid-reagible Aldosteronismus (Lifton et al., 2001). Studien zeigten Genmutationen, die auf eine erhöhte Natriumrückresorption in der Niere als Ursache dieser Krankheit hinweisen. Die genetischen Veränderungen betreffen ausschließlich Genprodukte, die die Netto-Natriumreabsorption in der Niere regulieren und infolgedessen zwangsläufig mit dem Renin-Angiotensin-System (RAS), dem wichtigsten endokrinen System zur Regulation der renalen Natriumexkretion, interagieren.

Im Gegensatz zu den sekundären Hypertonieerkrankungen wird die primäre Hypertonie heute aber als komplexe, polygenetische und multifaktorielle Erkrankung verstanden (Lifton, 1996). Dadurch wird die Analyse der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen erheblich erschwert (Kreutz et al., 1994).

Ein großer Teil der phänotypischen Blutdruckvariation wird als polygenetisches Merkmal vererbt, so dass die Hypertonie als das Produkt kumulierender genetischer Veränderungen anzusehen ist (Kurtz et al., 1993; Lifton, 1996). Es handelt sich beim Bluthochdruck folglich um einen komplexen Phänotyp, dessen Manifestation im Einzelfall durch multiple Interaktionen der verschiedenen genetischen Faktoren mit Umweltvariablen bestimmt wird. Auch der Phänotyp selbst wird signifikant von Umweltfaktoren beeinflusst (Hamet et al., 1996). Das prädisponierende Allel ist hierbei in der Regel nicht selbst die krankheitsauslösende Ursache, sondern begünstigt die Manifestation durch andere genetische oder umweltbedingte Faktoren (Kreutz et al., 2004). So können die Effekte einzelner individueller Genorte unabhängig und somit additiv auf den hypertensiven Phänotyp einwirken. Sie können aber auch durch Epistasie (Geninteraktion, Unterdrückung eines Allels durch ein anderes Gen) oder Pleiotropie (simultaner Effekt eines Gens auf mehrere Phänotypen) bestimmt sein (Schork et al., 1996). Die Komplexität wird dadurch noch erhöht, dass auch intermediäre Phänotypen, wie zum Beispiel Enzym- und Hormonspiegel oder der Gefäßtonus, die einen großen Einfluss auf den Bluthochdruck haben, dem Zusammenspiel mit den genannten Umweltfaktoren unterliegen.

1.3 Tiermodelle für die Untersuchung von Herz-Kreislaufkrankungen

Bei Tiermodellen können exogene Faktoren wie Diät und körperliche Aktivität kontrolliert und gezielt modifiziert werden, was vor allem bei der Untersuchung von erhöhten Blutfettwerten von Bedeutung ist (Herrera et al., 2004).

Die Ratte eignet sich besonders als Versuchstier und wird zu den wichtigsten Tiermodellen zur Erforschung kardiovaskulärer Erkrankungen wie der essentiellen Hypertonie gezählt (Gill et al., 1998). Vor allem ihre gute experimentelle Zugänglichkeit

und einfachen Haltungsbedingungen tragen dazu bei. Ratten weisen eine kurze Generationszeit auf und sind somit schnell verfügbar. Auch ihre Körpergröße eignet sich für viele physiologische und biochemisch aufwendige Untersuchungen.

Um die genetischen Ursachen des heterogenen Krankheitsbildes zu untersuchen, wurden durch eine selektive Bruder-Schwester-Paarung von Tieren mit erhöhtem Blutdruck verschiedene hypertensive Rattenstämme etabliert. Die Tiere entwickelten spontan oder nach Behandlung mit einer Kochsalzdiät einen erhöhten systolischen Blutdruck. Durch fortgesetzte Inzucht wird das genetisch fixierte Material an die nachfolgenden Generationen weitervererbt (Rapp, 2000).

Bei wildtypischen Ratten finden sich blutdruckregulierende Allele, die sich wie beim Menschen gegenseitig beeinflussen (Epistasie) oder mit der Umwelt interagieren (ökogenetische Interaktionen). Diese Parallelität zum Menschen ist ein weiterer Grund, warum sich Ratten besonders für Hypertoniestudien anbieten, da die für den Bluthochdruck dieser Tiere verantwortlichen Gene die genetischen Voraussetzungen der humanen primären Hypertonie widerspiegeln können.

Voraussetzung für die Untersuchung auf eine genetische Kopplung zwischen spezifischen Krankheitsbildern ist eine exakte Beschreibung der Phänotypen der Parentaltiere und ein hoher Inzuchtgrad der verwendeten Rattenstämme, der eine hohe genetische Übereinstimmung ermöglicht. Die durch Inzucht entstandenen Rattenstämme, bei denen ein Krankheitsmerkmal von Generation zu Generation weitervererbt wird, haben den besonderen Vorteil, dass sie genetisch homogen sind. Nach ca. 20 Generationen einer solchen Inzucht sind über 99% aller Genorte homozygot und die Nachkommen dieses Rattenstamms genetisch beinahe identisch (Kurtz et al., 1994; Rapp, 2000).

Dies bildet die Voraussetzung, dass in experimentellen Kreuzungspaarungen nach dem klassischen Mendelschen Vorbild die genetischen Ursachen der Hypertonie dieser Tiere identifiziert werden können.

1.4 Quantitative Trait Locus- Charakterisierung

Verglichen mit den monogenetisch vererbten Krankheiten, bedingt durch einen Gendefekt auf einem Chromosom, verursachen die polygenetisch vererbten Phänotypen

keine rein qualitativen Merkmalsausprägungen im Sinne des „Alles-oder-Nichts“-Prinzips. Ihre Ausprägung ist eher quantitativer Natur, d.h. sie präsentieren sich entweder nur durch einzelne diskrete Ereignisse oder durch kontinuierliche Veränderungen von niedrigen bis zu hohen Werten, die in der Bevölkerung normalverteilt sind (Hamet et al., 1998). Aus der unimodalen Verteilung der Blutdruckwerte in der Bevölkerung lässt sich bereits ein polygenetisches Vererbungsmuster eines quantitativen Merkmals, ähnlich wie für die Körpergröße oder das Körpergewicht, ableiten (Kreutz et al., 2004).

Genorte, die mit einem quantitativen Merkmal gekoppelt sind, werden als *Quantitative Trait Loci* (QTL) bezeichnet (Rapp, 2000).

Tierexperimentelle Untersuchungen bei Inzucht-Rattenstämmen ermöglichen das Auffinden blutdruckregulierender QTL (Rapp, 2000). Durch sogenannte Kosegregations- bzw. Kopplungsanalysen können bei solchen Kreuzungen QTL, die den Phänotyp beeinflussen, identifiziert und kartiert werden. Es wird zum Beispiel die Verbindung eines Allels (Genotyp) mit dem Merkmal Albuminurie, Hyperlipidämie und Hypertonie (Phänotyp) über eine F₂-Generation untersucht, wobei Differenzen in der DNA-Sequenz der gekreuzten Stämme (Polymorphismen) als informative molekulargenetische Marker verwendet werden können (Hübner et al., 1994). Die gewonnenen Ergebnisse können dann durch vergleichende Genomuntersuchungen verifiziert und durch gezielte klinische Untersuchungen beim Menschen überprüft und interpretiert werden.

1.5 Identifizierung krankheitsrelevanter Gene und Genloci

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kosegregationsanalyse als eine Verbindung von klassischen genetischen Kreuzpaarungen und molekulargenetischen Methoden der Intervallkartierung eingesetzt. Mittels Intervallkartierung können diskrete genetische Faktoren, die z. B. den quantitativen Phänotyp Blutdruck beeinflussen, als sogenannte QTL identifiziert werden.

Für diese Form der Kosegregationsanalyse (Abb. 1) können zwei kontrastierende Parental-Rattenstämmen genutzt werden. Es wird eine erste Filialgeneration (F₁-Generation) gezüchtet, die aufgrund der Mendelschen Gesetze heterozygot und somit genetisch und phänotypisch nahezu identisch ist. Die F₁-Tiere werden wiederum zur

Zeugung einer F2-Generation untereinander verpaart. Die Genotypen aller Allele segregieren in der F2-Population dem Mendelschen Gesetz entsprechend in einem 1:2:1 Verhältnis. Der Vorteil der F2-Generation besteht darin, Genotyp-Phänotyp-Verbindungen zu identifizieren, die durch Epistasie und durch den genetischen Hintergrund bedingt sind. So werden Verbindungen erkannt, die anhand der Phänotypen des Parentalstamms oder der F1-Tiere nicht zu erwarten wären (Poyan Mehr et al., 2003).

Bei den Tieren der F2-Generation, die sowohl phänotypisch als auch genotypisch heterogen sind, bleiben Gene, die in einem QTL liegen, mit dem Phänotyp Bluthochdruck gekoppelt (Kosegregation). Es lässt sich durch nachfolgende phänotypische und genotypische Untersuchungen zeigen, ob ein Allel, das ursprünglich von einem hypertensiven Parentaltier abstammte, in der F2-Generation mit einer Hypertonie assoziiert und somit eine genetische Kopplung vorhanden ist. Vom Phänotyp ungekoppelte Genorte würden dagegen unabhängig segregieren.

F1-Generation:

Parentaltiere	SHR RR	x	Dahl/SS SS
		↓	
F1- Generation	SR	:	SR

F2-Generation:

F1	SR	x	SR		
		↓			
F2	SS	:	SR	:	RR
	1	:	2	:	1

Abb. 1: Züchten einer F2-Generation am Beispiel von SHR x Dahl/SS (S, Dahl/SS -Allel; R, SHR-Allel; F1, Filialgeneration 1; F2, Filialgeneration 2).

Nur diejenigen Genorte sind statistisch signifikant mit dem Phänotyp Bluthochdruck assoziiert, die auch grundlegend an der Ausbildung dieses Merkmals beteiligt sind. So

kann ein Marker durch die genetische Kopplung ein chromosomales Gebiet aufzeigen, in dem ein Hypertonie-Gen lokalisiert ist.

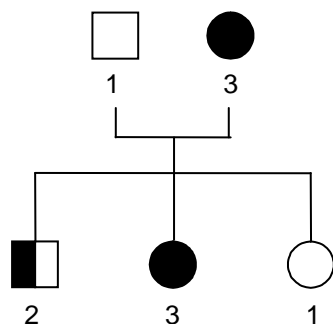
Als besonders hilfreich haben sich für eine Kopplungsanalyse die Mikrosatellitenmarker gezeigt, die aus kurzen repetitiven Nukleotidsequenzen variabler Anzahl bestehen. Die Mikrosatelliten kommen häufig in nicht-kodierender DNA vor, verteilt über das gesamte Genom von Eukaryonten. Sie können in ihrer Länge zwischen den einzelnen Rattenstämmen hochgradig polymorph sein und unter Anwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) sehr einfach genotypisiert werden (Stallings et al., 1991; Beckmann et al., 1992). Über das gesamte Genom, das bei der Ratte aus 20 Autosomen und zwei Geschlechtschromosomen besteht, liegen 80-250 Basenpaar (bp) lange repetitive Sequenzen der Mikrosatelliten-DNA verteilt. Die Mikrosatelliten-DNA (SSRs, simple sequence repeats) bestehen aus Di-, Tri- oder Tetra-Nukleotidrepeats und können physikalisch leicht kartiert werden.

Kosegregationsanalysen verfolgen das Ziel, das gesamte Genom nach Genabschnitten abzusuchen, die gemeinsam mit dem betrachteten Phänotyp vererbt werden. Der Erfolg einer solchen genetischen Studie hängt von der Dichte der molekulargenetischen Marker auf dem jeweils zu untersuchenden Chromosom ab. Je geringer der Abstand zwischen einem polymorphen Marker und einem QTL ist, desto geringer ist die Möglichkeit einer genetischen Rekombination (Crossing-Over) zwischen diesen Loci und desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine echte Kopplung vorliegt. Die Wahrscheinlichkeit wird über den LOD-Score (logarithm of the odds) ermittelt (Rapp, 2000).

Für das Auffinden von QTL wird für die Kopplungsanalyse mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern eine sogenannte Intervallkartierung in einem 10 cM-Abstand angelegt (Rapp, 2000). Um krankheitsrelevante QTL bei der Ratte zu finden, ist vor allem das als genetischer Marker fungierende repetitive CA-Dinukleotidrepeat von Bedeutung. Aufgrund seiner hohen Polymorphismusrate wird ein Mikrosatellitenmarker mit Hilfe der PCR in Verbindung mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung zur Unterscheidung verschiedener Individuen oder Rattenstämmen genutzt (Stallings et al. 1991; Beckmann et al., 1992). Die mit radioaktiv markierten Primern identifizierten DNA-Abschnitte, deren Lokalisation aufgrund von Kartierungsuntersuchungen bekannt sind, können mit Hilfe einer PCR-Maschine vervielfältigt werden. Die Amplifikate stellen sich nach Auftrennung mit einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgrund der Radioaktivität

auf Röntgenfilmen als Bandenmuster dar. Vater- und Mutter-Allel sind homozygot, beide Allele heterozygot.

Parentaltiere und Nachkommen



Banden nach elektrophoretischer Auftrennung

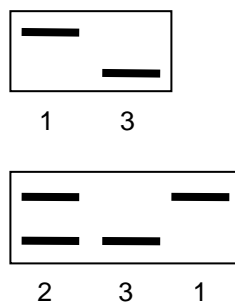


Abb. 2: Prinzip der Anwendung polymorpher Mikrosatellitenmarker zur allelspezifischen Genotypisierung. Die $(CA)_n$ -Dinukleotidrepeats liegen in variabler Anzahl zwischen zwei Inzuchtstämmen 1 und 3 vor und spezifizieren aufgrund der unterschiedlichen Repeat-Zahl deren Allel. Die gelelektrophoretische Auftrennung der in mittels PCR amplifizierten Mikrosatellitenmarker ergibt ein Bandenmuster entsprechend der von den Parentaltieren vererbten Allele (homozygot: 1 oder 3; heterozygot: 2).

Von verschiedenen Laboratorien wurden genomische Bibliotheken von Mikrosatellitenmarkern entwickelt, die im Internet frei einzusehen sind (Jacob 1999): <http://www.genome.wi.mit.edu/rat/public/>; <http://www.rgd.mcw.edu/>. Mit Hilfe dieser Bibliotheken konnte die systematische QTL-Kartierung erleichtert und präzisiert wird.

1.6 Die Inzuchtstämme SHR und Dahl/SS

Es wurden zehn Inzuchtstämme von Ratten selektiv für hohen Blutdruck gezüchtet. Von diesen Stämmen wurden die meisten genetischen Analysen bei der *salzsensitiven Dahl-Ratte Dahl/SS* (SS) und *Spontan Hypertensiven Ratten* (SHR) vorgenommen. Beide Stämme entwickeln mit dem Alter eine progressive spontane Hypertonie, wobei die salzsensitiven SS-Ratten selektiv so gezüchtet wurden, dass sie bei einer konzentrierten Salzdiät einen hohen Blutdruck entwickeln.

1.6.1 Der SHR-Stamm

Der von Okamoto und Aoki 1963 etablierte SHR-Stamm geht aus der normotensiven *Wistar Kyoto-Ratte* hervor und gehört zu den am meisten untersuchten Tiermodellen der primären Hypertonie (Kreutz et al., 2004). Yamori (1984) zeigte, dass dieser Rattenstamm spontan eine Hypertonie im Alter zwischen 7-15 Wochen manifestiert. Er entwickelt Werte von 160 bis 180 mmHg in der 10. Woche (Volpe und Rabattu, 1994) und erreicht mit steigendem Alter ein Blutdruckplateau von über 200 mmHg.

Der SHR-Stamm weist eine funktionelle Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstands auf, der meistens von neurogenen Mechanismen abhängt. Dieser ist wahrscheinlich auf das Ungleichgewicht der zentralen Blutdruck-Regulation zurückzuführen (Yamori Y et al., 1984). Der Blutdruck allein und der angestiegene neurogene Tonus erhöht die kardiovaskuläre Proteinsynthese und induziert strukturelle vaskuläre Veränderungen, die zur Aufrechterhaltung der Hypertonie beim SHR-Stamm beitragen. Bei dem SHR-Rattenstamm, der als Referenzstamm fungieren kann, zeigten sich im Gegensatz zum SS-Rattenstamm weder eine Erhöhung der Blutfettwerte noch Nierenerkrankungen.

1.6.2 Der Dahl/SS-Stamm

Die SS-Ratte stammt aus einer Sprague-Dawley-Kolonie und wurde durch Dahl 1996 (Brookhaven National Laboratories, Upton, New York) etabliert. Bei diesem Stamm, der als klassisches Tiermodell für die salzsensitive Hypertonie gilt, wurden die Tiere gezielt nach Sensibilität für salzinduzierte Hypertonie selektiert. 1997 wurden die aus der Zucht von M & B, Bomholtvej (Dänemark) stammenden SS-Ratten an der Freien Universität Berlin eingeführt.

Bei dem SS-Stamm handelt es sich um einen Rattenstamm, der besonders unter Salzbelastung, aber auch unter Normalfutter einen erhöhten systolischen Blutdruck entwickelt (Kurtz et al., 1985; Sterzel et al., 1988). Die Tiere weisen unter einer Hochsalzdiät darüber hinaus schwere renale vaskuläre und glomeruläre Schäden auf, verbunden mit tubulären Veränderungen (Garrett et al., 2003). Eine renale Dysfunktion manifestiert sich durch eine erhöhte Exkretion hochmolekularer Proteine inklusive Albumin und Immunglobulin (Cowen et al., 1991). Vor allem aber entwickeln die SS-Ratten eine sehr frühe Albuminurie, die unabhängig vom Salzgehalt der Nahrung ist (Poyan Mehr et al., 2003).

Dahl-Ratten sind für ihre sich spontan entwickelnde Hypertonie bekannt. Ihre starke Anfälligkeit für Arteriosklerose, charakterisiert durch eine schwere Hyperlipidämie (Anstieg der Gesamtcholesterin- und Triglyzeridwerte), wurde als erstes bei Dahl-Ratten identifiziert, die transgen für das humane *Cholesteryl Transfer Protein* waren (hCETP) (Herrera et al., 2001, 1999, 2002, 2004). Die stärkere Anfälligkeit für die erhöhten Blutfettwerte der salzsensitiven Dahl-Ratten kann an den höheren Werten von Gesamtcholesterin, LDL und Triglyzeriden im Plasma gesehen werden, die im Vergleich zu nicht-salzsensitiven Dahl-Ratten zwei bis drei mal höher waren (Herrera, 2004). Durch selektive Züchtung wurde ebenso ein zum salzsensitiven Stamm kontrastierender salzresistenter Stamm (Dahl/SR) entwickelt.

Nierentransplantationen zwischen salzsensitiven und salzresistenten Ratten zeigten, dass ein Teil der Sensitivität von der Niere abhängt und salzsensitive Ratten 15% weniger Glomeruli haben als salzresistente Ratten (Vanecková, 2002).

Die Ratten des SS-Stammes haben im Vergleich zum SHR-Stamm einen niedrigeren Blutdruck bei einer Niedrigsalzdiät (0,3%), bei einer hochkonzentrierten Salzdiät weisen sie jedoch einen wesentlich höheren Blutdruck als der SHR-Stamm auf.

1.7 SS- und SHR-Rattenstämme zur Untersuchung von Hypertonie, Albuminurie und Hyperlipidämie

Es wird angenommen, dass beim SS- und der SHR-Stamm unterschiedliche genetische Ursachen zur Hypertonie führen. Der Grund dieser Annahme ist, dass der SS- und der SHR-Stamm aus verschiedenen Kolonien stammen (*Sprague-Dawley* und *Wistar*), und dass der SS-Stamm, im Gegensatz zu SHR, nach anderen Kriterien selektiert wurde. So ist es wahrscheinlich, dass die zwei Stämme unterschiedliche Allele auf verschiedenen Blutdruck-QTL tragen (Garrett et al, 2000). Die salzsensitive Dahl-Ratte entwickelt früh eine Albuminurie, die im Gegensatz zu dem Blutdruck unabhängig vom Salzgehalt der Nahrung ist (Poyan Mehr et al, 2003).

Der SHR-Stamm dagegen ist trotz eines erhöhten Blutdrucks sehr resistent gegen die Entwicklung einer Albuminurie (Rothermund et al., 2001; Garrett et al, 2003).

Die Dahl-Ratte zeigt zudem noch eine andere Vielzahl von Phänotypen, die sich auch bei (salzsensitiven) Menschen widerspiegeln (Yu et al, 2003). Neben der salzsensitiven

Hypertonie und der Hyperlipidämie finden sich Phänotypen wie Insulinresistenz, endotheliale Dysfunktion, Herzinsuffizienz und Glomerulosklerose (Yu et al., 2003). Somit ist auch die Möglichkeit gegeben, Phänotypen wie die renale Albuminexkretion (AE) oder erhöhte Serumlipide zu untersuchen. Eine Kreuzungspaarungsstudie zwischen dem SS- und dem SHR-Stamm für eine genomweite QTL-Analyse nach Kopplung zwischen Bluthochdruck, Albuminurie und Hyperlipidämie ist daher wegen der starken Kontraste gut möglich.

1.8 Ziel der vorliegenden Arbeit

Der arterielle Hypertonus, die Albuminurie und die erhöhten Serumlipide gelten als grundlegende Risikofaktoren bei Nieren- und Herz-Kreislaufkrankungen (Mann et al. 2001; Ruilope et al. 2001), die zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen gezählt werden. Eine Aufdeckung ihrer genetischen Ursachen würde zu deutlichen Fortschritten bei der Bekämpfung dieser Erkrankungen und zu verbesserten Therapiemöglichkeiten führen.

Im Rahmen der Arbeit soll der Zusammenhang zwischen der Hyperlipidämie und der frühzeitigen Nierenschädigung mit Albuminurie bei der SS-Ratte untersucht werden. Dazu wird die SS-Ratte, die sowohl zur Hypertonie als auch zur frühen Albuminurie und erhöhten Blutfettwerten neigt, phänotypisch charakterisiert. Anschließend werden die genetischen Faktoren der Krankheitsbilder untersucht.

Nach der Kreuzung der SS-Ratten mit dem kontrastierenden Parental-Stamm SHR, bei dem eine F2-Generation von 539 Tieren herangezogen wird, erfolgt die Phänotypisierung der F2-Tiere. Schließlich erfolgt eine Genotypisierung der Ratten, um mögliche Assoziationen zwischen den einzelnen Phänotypen ausfindig machen zu können. Die Kopplungsanalyse für die Phänotypen Hypertonie, Albuminurie und Hyperlipidämie wird an männlichen Tieren durchgeführt, da diese schneller einen erhöhten Blutdruck mit nachfolgenden Endorganschäden entwickeln als weibliche Tiere (Rapp, 2000). Um den Einfluss der Salzsensitivität ausschließen zu können, bekommen alle Tiere Normalfutter mit einem niedrigen Kochsalzgehalt (0,2% NaCl).

Zur Durchführung der Genomanalyse wird das Genom der F2-Tiere systematisch mit Mikrosatellitenmarkern untersucht. Die anschließende Kopplungsanalyse der F2-Population ermöglicht die Identifizierung und Kartierung von QTL, die für die genetischen Veränderungen im Tiermodell der SS-Ratte verantwortlich sind und mit den drei Phänotypen Hypertonie, frühe Albuminurie und Hyperlipidämie assoziiert sind. Die Ergebnisse sollen in weiterführenden Studien die Identifizierung von Kandidatengenen bei der SS-Ratte ermöglichen. Über einen Homologievergleich mit dem Menschen können die entsprechenden humanen Krankheitsgene identifiziert werden.

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
10x PCR-Puffer	Rapidozym
10x TBE (Tris-Borat-EDTA-Lösung)	Gibco BRL
Aceton	Baker
Acrylease	Stratagene
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ethanol abs.	Baker
Harnstoff	Roth
Isopropanol	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Proteinase K	Sigma
Rattenserum-Albumin (RSA)	Sigma
Rotiphorese (40% Acrylamid, 2% Bisacrylamid)	Roth
Schwefelsäure (96%)	Merck
Temed (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma

2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer	Bestandteil	Konzentration
Coating solution	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	0,2 mg/ml 0,1 M
Fixativ für die Histologie	Ethanol 80% Pikrinsäure Formaldehyd 37% Essigsäure 100%	150 ml 1 g 60 ml 5 ml
Formamid-Laufpuffer	Bromphenolblau Xylen Cyanol FF Formamid Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	1% 1% 10% 0,5 M
10x Laufpuffer	Glycerin Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat Bromphenolblau Xylen Cyanol FF	50% 10,0 mM, pH 7,0 0,25% 0,25%
Lysis-Puffer	Trizma Base Di-Natrium-EDTA-Dihydrat Natriumchlorid SDS	50 mM, pH 8,0 100 mM, pH 8,0 100 mM 1%
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% 5 g
Rattenserum-Albumin-Stock-Lösung	Rattenserum-Albumin Natriumhydrogencarbonat	1,0 mg/ml 0,1 M

2.1.3 Sonstige Materialien und Futtermittel

Artikel	Firma
Blutdruckmessgerät	TSE
BioMax MR-Röntgenfilme	Kodak
Glasplatten für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse (Normalfutter)	Altromin
Histoacryl-Gewebekleber	Braun
Kämme, Spacer für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Lochzange für Labortiere	Esculap
Mehrkanal-Spritze (8-Kanal)	Hamilton
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,2 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Restrainer	Werkstatt, Charité/CBF
Röntgenkassetten	Amersham
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
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell
ELISA-MRX-Plate-Reader	Dynex

2.1.4 Enzyme

	Enzym	Aktivität	Firma
Polymerasen	Taq-Polymerase	5 U/µl	Rapidozym
Kinasen	T4-Polynukleotidkinase	5 U/µl	Promega

2.1.5 Geräte

Gerät	Firma
Schüttel-Inkubator	Infors AG
377 DNA-Sequencer	ABI Prism
ELISA-MRX-Plate-Reader	Dynex
Hybridisierungs-ofen	Biometra
Mikrotiterplattenschüttler	Roth
Minifuge RF (Zentrifuge)	Heraeus sepatech
PCR-Maschine	MJ Research
Photometer	Shimadzu
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer	Peq Lab
Sono-Stab Polytron	Janke&Kunkel
Szintillations-Zähler	LKB Wallace
Tischzentrifugen 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf
Waage	Sartorius

2.2 Methoden

2.2.1 Parentalstamm-Charakterisierung und Zucht

2.2.1.1 Parentaltiere SS und SHR

Die für diese Studie verwendeten Rattenstämme SS/_{Rkb}- und SHR/_{Rkb}, die aus den 1997 an der Freien Universität Berlin etablierten Kolonien der Arbeitsgruppe von Prof. Reinhold Kreutz stammen, gingen aus den Parentaltieren der Stämme SS und SHR hervor.

2.2.1.2 Zucht der F2-Generation

Für die Kosegregationsanalyse wurden SS-Männchen mit SHR-Weibchen zu einer F1-Generation verpaart, die nach den Mendelschen Gesetzen heterozygot war. Für die Kosegregationsanalyse wurden Bruder-Schwester-Verpaarungen der männlichen Tiere der F1-Generation mit weiblichen Tieren der F1-Generation durchgeführt. Auf diese Weise wurde für die Kreuzungsanalyse eine F2-Population ($SS/R_{kb} \times SHR/R_{kb}$) von 539 Tieren gezüchtet.

2.2.1.3 Haltung und Diät

Die Tiere wurden in einem 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus gehalten, der über automatische Lichtschalter geregelt wurde. Das Raumklima lag konstant bei einer Temperatur von 22°C. Sowohl Parentaltiere als auch F2-Tiere bekamen Standardfutter, das einen Salzgehalt von 0,2% enthielt. Die Tiere hatten Zugang zu Futter und Wasser ad libitum.

Nach dem Absetzen der Tiere erhielten alle Ratten eine laufende Nummer. Diese wurde an der Ratte über eine Ohrmarkierung mit Hilfe einer Lochzange vorgenommen, um Verwechslungen bei den Tieren auszuschließen.

2.2.2 Phänotypisierung

2.2.2.1 Urin- und biochemische Untersuchung Uringewinnung

Alle Ratten wurden in der 8. Woche unter gleichen Bedingungen in Stoffwechselkäfigen gehalten. Dabei wurde kontinuierlich 24-Stunden-Urin gesammelt. Durch Auswiegen des gesammelten Urins (1 g = 1 ml) wurde das Urinvolumen der Tiere bestimmt. Der Urin wurde in Szintillationsgefäße aus Kunststoff gefüllt, damit Albuminablagerungen an den Glaswänden das Ergebnis der späteren Albuminbestimmung nicht verfälschen konnten. Für die Albuminbestimmung wurde 1 ml Urin in ein Eppendorfgefäß gegeben und für 10 min zentrifugiert, um Verunreinigungen zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß dekantiert, der restliche Urin in Weithalsflaschen aus Polyethylen gefüllt und bei -20°C gelagert (Kreutz et al., 2000).

Bestimmung der Albuminurie

Die Albuminkonzentration wurde mit einer direkten kompetitiven ELISA-Technik (*Enzym linked immunosorbent assay*) gemessen (Kreutz et al., 2000). Dazu werden rattenspezifische Antikörper verwendet. Die Albuminexkretion (AE) wurde bei Parentaltieren und bei F2-Tieren in der 8. Woche bestimmt.

Bestimmung der Serumlipide

Zur Bestimmung der Serumlipide (Triglyzeride, Cholesterin) der Parentaltiere und der F2-Tiere wurden die Proben der 8. Woche über Standardmessmethoden entweder im hauseigenen Labor für Klinische Chemie (Charité/CBF) oder im Labor 28 (Mecklenburgische Straße 28, 14197 Berlin) analysiert.

Die Erhebung der Parentaltierbefunde erfolgte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe.

2.2.3 Genom- und Kopplungsanalyse

2.2.3.1 Genom-Analyse mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker

Die Genotypisierung der Ratten erfolgte mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern. Die Marker wurden mit radioaktiv markierten Primern in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Nach der Größenauftrennung der PCR-Produkte in einem elektrischen Feld mittels Polyacrylamidgelelektrophorese ergeben sich Amplifikate, die homozygot für ein Allel oder heterozygot für beide Allele sind.

Die Auftrennung der Produkte ermöglicht die Genotypisierung der zu untersuchenden DNA.

Genomische DNA-Isolierung aus Rattenschwänzen

Unter einer Isofluran-Anästhesie wurde bei den Tieren der Bauchraum eröffnet und das Herz und die Niere entnommen. Für die DNA-Isolierung wurden ca. 0,5 cm Gewebe vom Schwanzende eingesetzt. Das Gewebe wurde in 700 µl Lysis-Puffer und 40 µl Proteinase K (10 mg/ml) für drei Tage bei 55° C über Kopf drehend im

Hybridisierungssofen verdaut. Der Ansatz wurde anschließend für 10 min auf Eis gestellt und zur Eiweißfällung und Reinigung mit 300 µl gesättigter Natriumchloridlösung (6 M) versetzt. Nach 5 min 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. Für die Fällung der DNA wurde der Überstand mit 1 ml Isopropanol vermischt und für ca. 30 - 50 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Probe bei 14.000 Upm für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Waschen der Pellets erfolgte mit 70%igem Ethanol, das eine Temperatur von -20°C aufwies, mittels Zentrifugation 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 der Pellets wurde die Probe bei 37°C für 20-30 min im Schüttler gelöst. Für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA wurde die optische Dichte der Probe, die zuvor 1:20 mit Aqua bidest. verdünnt wurde, im Photometer bei der Wellenlänge 260-280 nm gemessen. Die DNA-Konzentration wurde in der Einheit µg/µl angegeben.

Aufbewahrung und Verarbeitung der DNA-Proben

Zur Vermeidung von DNA-Verwechslungen wurden beschriftete Stockplatten erstellt, die 10 ng/µl DNA pro Gefäß enthielten. Für eine schnelle und saubere Genotypisierung der Tiere sind Mikrotiterplatten pipettiert worden, die für 96 Proben Platz hatten. In die Platte wurde pro Loch jeweils 5 µl DNA-Probe aus der Stockplatte gefüllt. Zwei der pipettierten Proben auf den Mikrotiterplatten waren jeweils Kontrollen der Parentalstämme. Die Stock- und Mikrotiterplatten wurden bei -20°C gelagert.

Mikrosatellitenmarker

Für die Genomanalyse wurden polymorphe Mikrosatellitenmarker verwendet, die in den Instituten

a) Medical College of Wisconsin [(Rat) <http://www.rgd.mcw.edu/>],

b) Massachusetts Institut 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 Fransisco; <http://www.genome.wi.mit.edu/rat/public>]

entwickelt wurden.

Primer-Kinasierung

Die T4-Polynukleotidkinase katalysiert den Transfer von radioaktivem [γ - ^{32}P]-ATP an das 5'-Ende der DNA. Zur Fixierung von radioaktivem Phosphat an das 5'-Ende der DNA, wurden 0,04 μl 10x Kinasepuffer, 0,0583 μl [γ - ^{32}P]-ATP (3000 Ci/mmol) 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.

PCR (Polymerasekettenreaktion)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (1984 von Kary Mullis entwickelt) lassen sich spezifische DNA-Sequenzen in vitro amplifizieren. Ausgangspunkt der PCR ist ein doppelsträngiger DNA-Abschnitt, der die gesuchte Sequenz enthält und als Matrize dient. Zuerst wird der DNA-Doppelstrang durch Erhöhen der Temperatur denaturiert. Nach raschem Abkühlen werden in einem zweiten Reaktionsschritt den Einzelsträngen zwei aus ca. 20-25 Basen bestehende Oligonukleotide (Primer) zugesetzt, die der Sequenz der beiden Einzelstränge an den 5'-Enden komplementär sind. Dabei muss eine für den Primer optimale Temperatur aufrechterhalten werden (Annealing), um unspezifische Hybridisierungen zu vermeiden. Schließlich werden durch den Zusatz einer DNA-Polymerase die beiden Einzelstränge jeweils zu einem Doppelstrang komplementiert, so dass nun zwei Doppelstränge vorhanden sind (Kettenverlängerungsreaktion oder Primerextension). Dazu wird eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) zur Katalyse der 5'-3'-DNA-Synthese zugegeben. Die Reaktionszyklen Denaturierung, Annealing und Polymerisation werden mehrfach wiederholt und ergeben eine nahezu exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA.

In der vorliegenden Arbeit wurden 50 ng genomische DNA 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) 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 primerspezifische Annealing-Temperatur für 1 min, bei 72°C für 1 min und bei 72°C für 7 min angeschlossen.

Einige Primer wurden mit Hilfe eines „Touchdown-Programms“ bearbeitet, um die Zahl der unspezifischen Produkte zu reduzieren und um deutlichere Amplifikate zu erhalten.

Dazu wurde zum Beispiel 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, 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 Aufbewahrung der Proben erfolgte bei 4°C.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese werden PCR-Produkte und DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, um eine Beurteilung zu ermöglichen. Dazu werden die zu untersuchenden Produkte in ein elektrisches Feld gegeben, in dem die negativ geladene DNA zum positiven Pol wandert. Durch ein elektrisches Feld werden die zu untersuchenden Proben entsprechend ihrer Größe relativ zur Porengröße der Gelmatrix aufgetrennt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt wegen der 14tägigen Halbwertszeit des [γ -³²P]-ATP innerhalb von zwei Wochen nach der Kinasierung.

Es wird für die Elektrophorese ein denaturierendes Polyacrylamidgel benötigt. Für dessen Herstellung wurde eine 45 cm lange und 35 cm breite Glasplatte mit Ethanol und Aceton gereinigt. Eine zweite Glasplatte wurde mit Ethanol gesäubert und mit Acrylease beschichtet, damit sich später die Gelschicht vom Glas leichter abtrennen lässt. Beide Glasplatten wurden, nachdem an den Längsseiten 0,4 mm dicke Spacer dazwischengesetzt wurden, aufeinandergelegt und verklammert.

Für die Herstellung des Polyacrylamidgels wurden 31,5 g Harnstoff zur Denaturierung der DNA, 7 ml 10x TBE, 10,5 ml Rotiphorese und Aqua bidest. zu einem Gesamtvolumen von 70 ml vereint. Für die Auspolymerisierung wurden 40 µl TEMED zur Quervernetzung und 400 µl Ammoniumpersulfat-Lösung (100 mg/ml), um die Reaktion in Gang zu setzen, hinzugefügt. Der Gelmix wurde sofort vor dem Auspolymerisieren luftblasenfrei zwischen die beiden verklammerten Glasplatten gegossen. Anschließend wurde ein Kamm umgekehrt an der oberen Schmalseite der Platten ca. 5 mm in die Gelflüssigkeit geschoben, um einen glatten oberen Gelsaum zu schaffen. Nachdem das Gel 1,5–2 Stunden bei RT auspolymerisiert wurde, konnte der Kamm gezogen und mit den Zinken voran 1-2 mm tief in die Gelmatrix geschoben werden. So wurden die einzelnen Taschen für die jeweiligen PCR- Proben geschaffen.

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 Mehrkanalpipette (Hamilton-Pipette) auf das Gel aufgetragen, das in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte

Gelelektrophoresekammer eingespannt war. Die Laufzeit für das Gel betrug 2,5 Stunden bei 70 Watt.

Nach der Elektrophorese wurde die beschichtete Glasplatte von der Gelmatrix abgehoben, das Gel auf Gel-Blotting-Papier gezogen, gegen Austrocknung in Verpackungsfolie eingeschlagen und in eine Röntgenkassette gelegt. Die Expositionszeit nach Auflegen eines Films betrug bei einer Aufbewahrungstemperatur von -20°C , je nach Stärke der Signale, ca. 18 Stunden.

2.2.4 Primäre und sekundäre Genomanalyse

Für die Untersuchung der PCR-Produkte wurde zunächst eine primäre Genomanalyse für Chromosom 1 bis 20 und des Chromosoms X durchgeführt. Für die Auswahl der Extremtiere wurden mit 118 Mikrosatellitenmarkern im ca. 10 cM-Abstand je 23 Tiere mit den höchsten und niedrigsten Phänotypwerten für die Albuminexkretion der F2-Generation ausgewählt (insgesamt 46 Tiere) und mit diesen eine genetische Kopplungsanalyse durchgeführt.

Bei der sekundären Genomanalyse wurde eine genetische Kopplungsanalyse der PCR-Produkte aller 539 Tiere der F2-Generation aus den Stämmen SHR und SS durchgeführt. Die sekundäre Genomanalyse erfolgte bei den Markerpositionen, für die sich in der primären Analyse eine signifikante oder wahrscheinliche Kopplung fand.

Bei der Analyse galt ein LOD-Score von $> 4,3$ als signifikante Kopplung, ein LOD-Score zwischen 2,8 und 4,3 wurde als eine wahrscheinliche Signifikanz definiert (Lander et al., 1995).

2.2.5 Statistische Analyse

Für eine erste chromosomale Lokalisation der QTL und für die Bestimmung der p-Werte wurden die Programme MapMaker QTXb03 und SPSS (Version 12) verwendet. Die letztgültige Lokalisation der QTL und die Bestimmung des LOD-Scores wurden über die Computerprogramme MAPMAKER/EXP und MAPMAKER/QTL 3. Ob vorgenommen. Mit Hilfe dieses Programmes wurden die genetischen Distanzen in centiMorgan (cM) über

Rekombinationsfrequenzen mittels des Kosambi-Algorithmus errechnet (Lander et al., 1987; Lander und Botstein, 1989). Für die Erstellung der Chromosomenkarte und die sich anschließende Kopplungsanalyse der F₂-Generation wurde das Computerprogramm MAPMAKER/QTL verwendet. Die Interpretationen der mit dem MAPMAKER/QTL-Programm erhaltenen LOD-Scores wurden anhand der Empfehlungen von Lander und Kruglyak vorgenommen.

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. Genotyp-Phänotyp-Korrelationen wurden durch lineare Regressionsanalyse untersucht. Als Signifikanzschwelle galt hierbei ein Wert von <0,05.

3 Ergebnisse

3.1 Parentalstamm-Charakterisierung

3.1.1 Genotypisierung der Parentalstämme

Vor der Durchführung der experimentellen Studie zur phänotypischen Charakterisierung der Parentalstämme SS und SHR wurde die genetische Reinheit durch Analysen des Gesamtgenoms ermittelt. Verwendet wurden hierfür Mikrosatellitenmarker, die durchschnittlich in 10 cM-Abstand voneinander über das gesamte Genom lokalisiert sind. Die Reinheit dieser Stämme wurde durch den an allen getesteten Markerpositionen homozygoten Genotyp nachgewiesen und bestätigt.

3.1.2 Phänotypisierung der Parentalstämme SS und SHR

Beide Stämme wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten und erhielten Tiernahrung mit niedrigem Salzgehalt von 0,2 % NaCl.

In der 8. Woche zeigten sich bei den Blutfettwerten erhebliche Unterschiede zwischen dem SS- und dem SHR-Stamm. Der SS-Stamm entwickelte sowohl bei den Cholesterinwerten als auch bei den Triglyzeridwerten signifikant höhere Werte als der SHR-Stamm.

Während beim SHR-Stamm das Cholesterin einen Wert von $1,72 \pm 0,12$ mmol/l aufwies, zeigte sich beim SS-Stamm ein signifikant erhöhter Wert von $2,49 \pm 0,14$ mmol/l ($p < 0,0001$, Abb. 4).

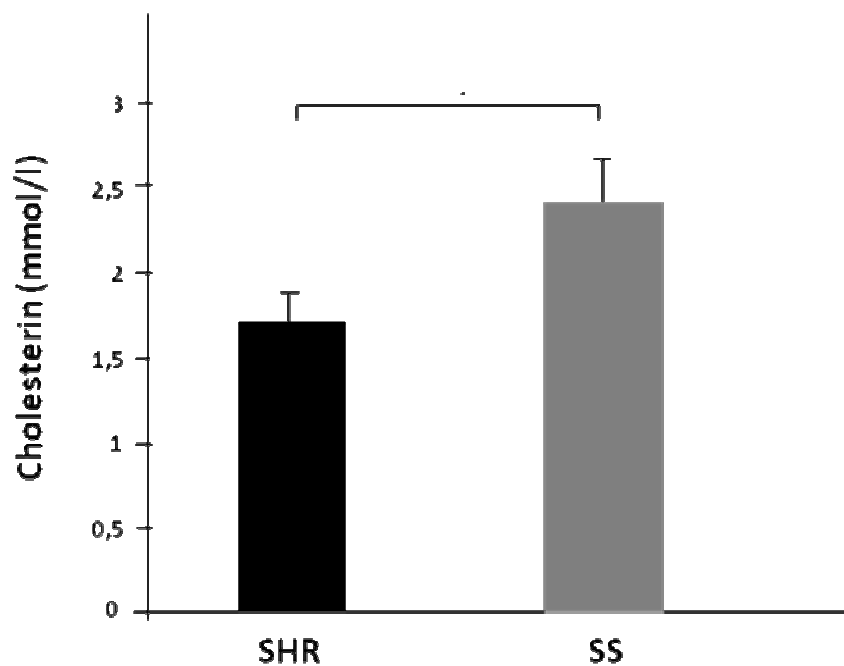


Abb. 4: Cholesterin im Serum bei männlichen SS- und SHR-Parentaltieren in der 8. Lebenswoche * $p < 0,0001$.

Besonders deutlich wird die Diskrepanz zwischen den Parentalstämmen bei den Triglyzeridwerten. In der 8. Lebenswoche zeigten sich beim SHR-Stamm Triglyzeridwerte von $0,83 \pm 0,12$ mmol/l, der SS-Stamm wies mit $2,15 \pm 0,20$ mmol/l ein signifikant höheres Ergebnis auf ($p < 0,0001$, Abb. 5).

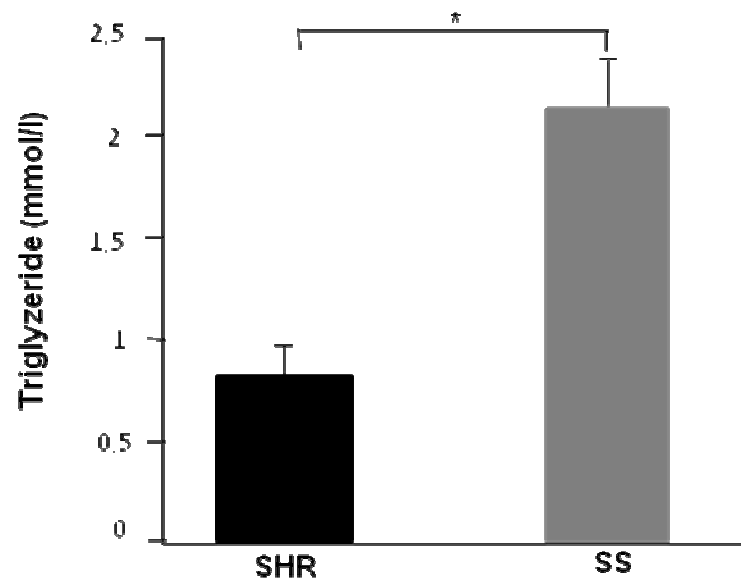


Abb. 5: Triglyzeride im Serum der männlichen SS- und SHR-Parentaltiere in der 8. Lebenswoche *(p < 0,0001).

Zusätzlich entwickelte der SS-Stamm signifikant erhöhte AE-Werte im Vergleich zum SHR-Stamm. In der 8. Woche zeigte der SS-Stamm im Durchschnitt eine AE von $30,70 \text{ mg} \pm 13$, während diese Albuminexkretion beim SHR-Stamm nur $0,15 \pm 0,05 \text{ mg}/24\text{h}$ betrug (p < 0,0001, Abb. 6).

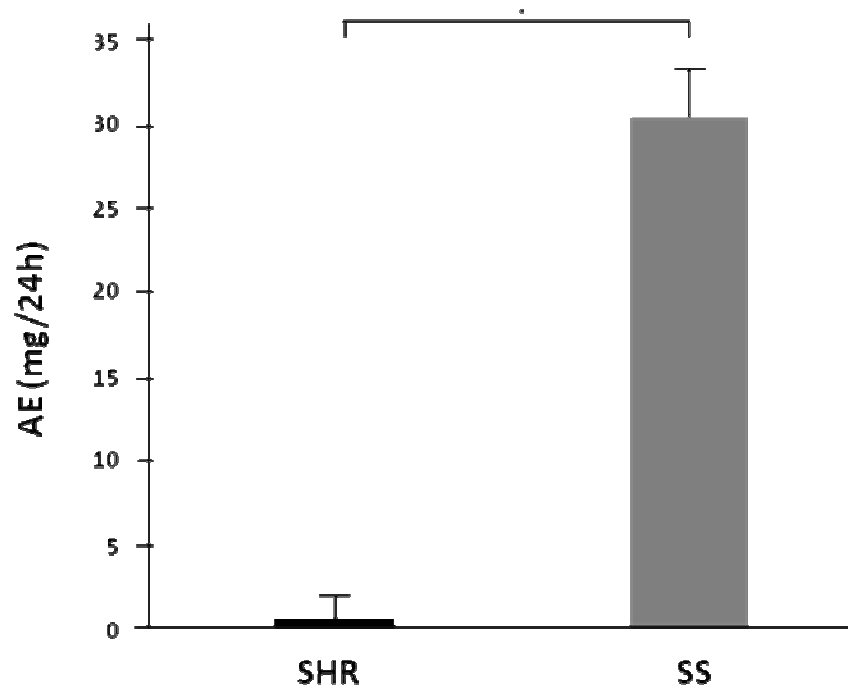


Abb. 6: Albuminexkretion im Urin (AE) der männlichen SS- und SHR-Parentaltiere in der 8. Lebenswoche *($p < 0,0001$).

3.2 Kosegregationsanalyse

3.2.1 Phänotypisierung der F2-Generation von SHR und SS

Bei den Tieren der F2-Generation (n= 539) zeigt sich bei den Blutfettwerten eine unimodale Normalverteilung.

Die Verteilung der Cholesterinwerte lag in der 8. Woche in einem Bereich von 0,81 mmol/l bis 2,83 mmol/l (Abb. 8).

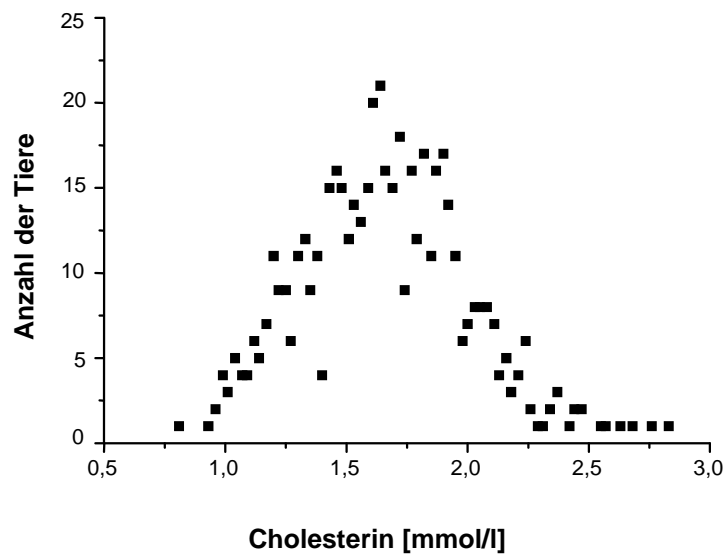


Abb. 8: Verteilung der Cholesterinwerte bei den männlichen Tieren der F2-Generation in der 8. Woche

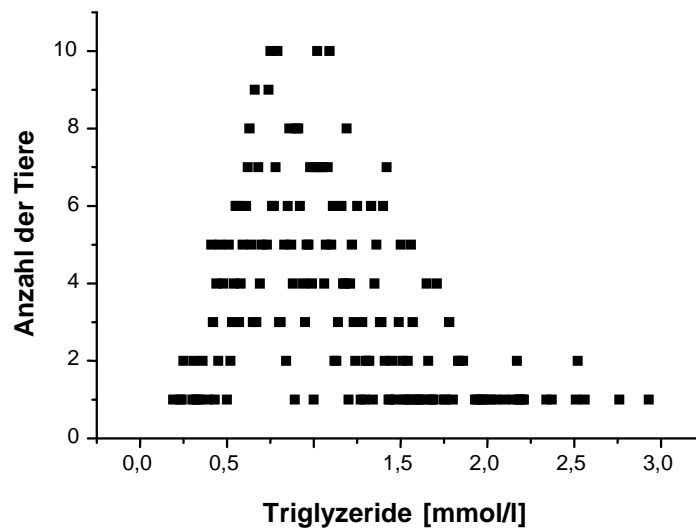


Abb. 9: Verteilung der Triglyzeridwerte bei den männlichen Tieren der F2-Generation in der 8. Woche.

Für die Triglyzeridwerte ergab sich eine Verteilung zwischen 0,19 mmol/l und 2,93 mmol/l (Abb. 9).

Keine Normalverteilung findet sich bei der Albuminexkretion im Urin (AE). Die Werte der meisten Tiere sind sehr niedrig. Nur 5,75% der 539 Hybriden zeigten eine AE-Rate, die höher als 1 mg/24h war und nur 2,41% zeigten Werte über 4 mg/24h.

Hier verteilten sich die Werte von 0,04 mg/24h bis 96,22 mg/24h (Abb. 10).

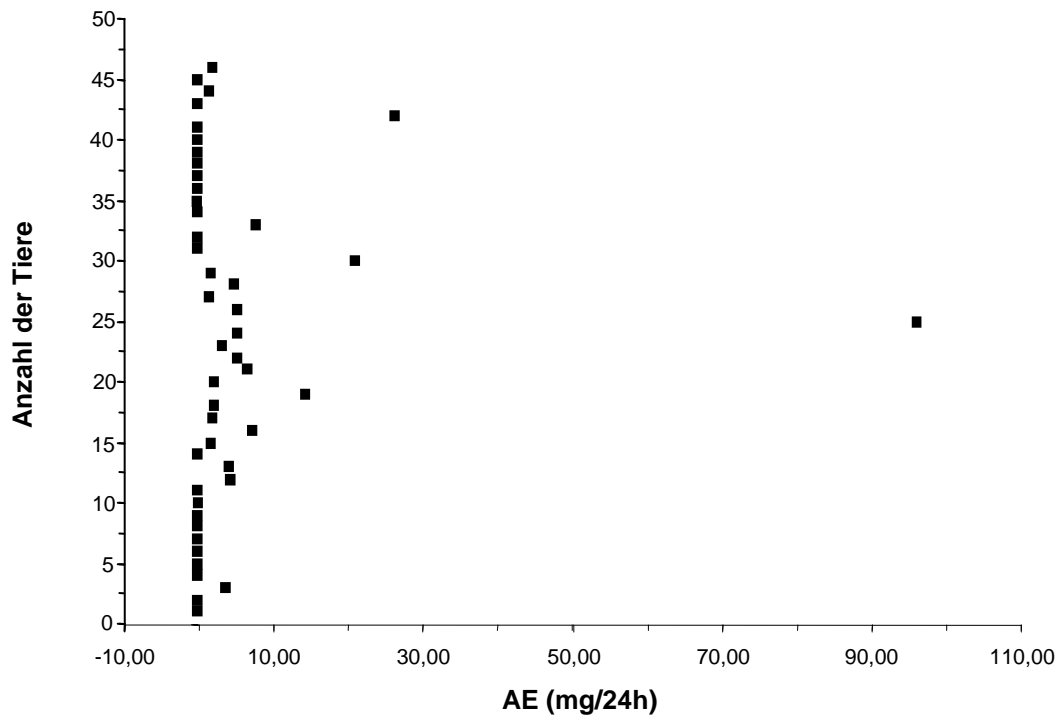


Abb. 10: Verteilung der Werte der Albuminexkretion im Urin bei der F2-Generation in der 8. Woche

3.3 Korrelationsanalyse

Nach der Korrelationsanalyse zwischen den Phänotypen Albuminurie und den Phänotypen Cholesterin ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Parametern. Bei den Korrelationswerten für die Albuminexkretion ergab sich für $r = 0,0788$ und für $p = 0,0718$ (Abb. 11).

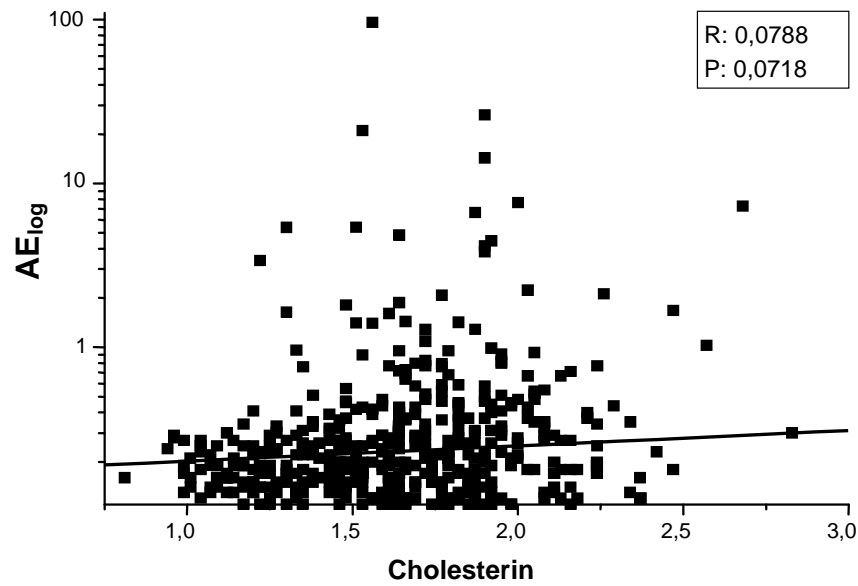


Abb. 11: Korrelation zwischen der Albuminexkretion im Urin (AE) und Cholesterin bei den Extremtieren der F2-Generation in der 8. Woche, $r=0,0788$, $p=0,0718$.

Auch bei der Korrelationsanalyse zwischen der Albuminexkretion im Urin in der 8. Woche und den Triglyzeridwerten konnte keine Korrelation zwischen diesen beiden Parametern festgestellt werden, hier galt für $r = 0,0066$ und für $p = 0,8812$ (Abb. 12).

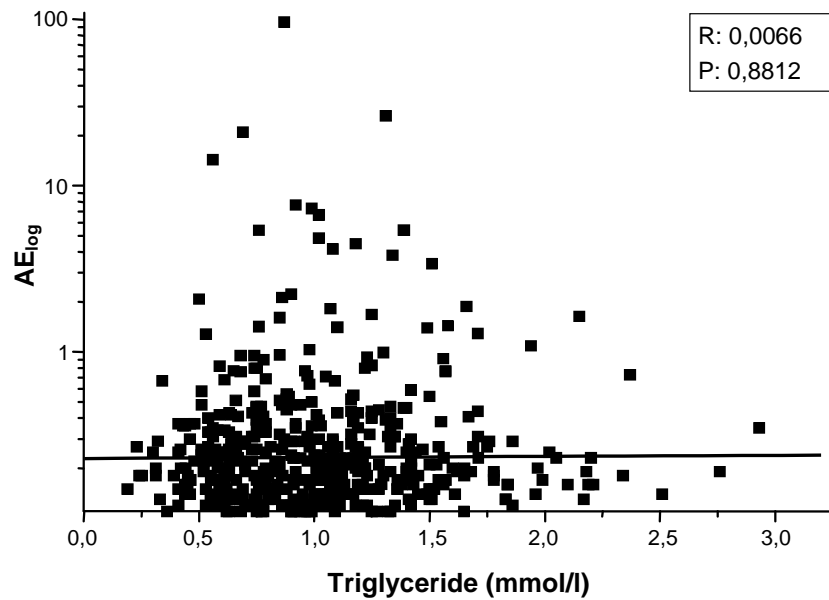


Abb. 12: Korrelation zwischen der Albuminexkretion im Urin (AE) und Triglyceriden bei den Extremtieren der F2-Generation in der 8. Woche, $r=0,0066$, $p=0,8812$.

Kopplungsanalyse und QTL-Kartierung

In der F2-Generation wurde nach Durchführung der Genomanalyse, wie nach Mendel postuliert, eine Aufspaltung der Genomtypen im Verhältnis 1:2:1 beobachtet (Abb. 1 und Abb. 13).

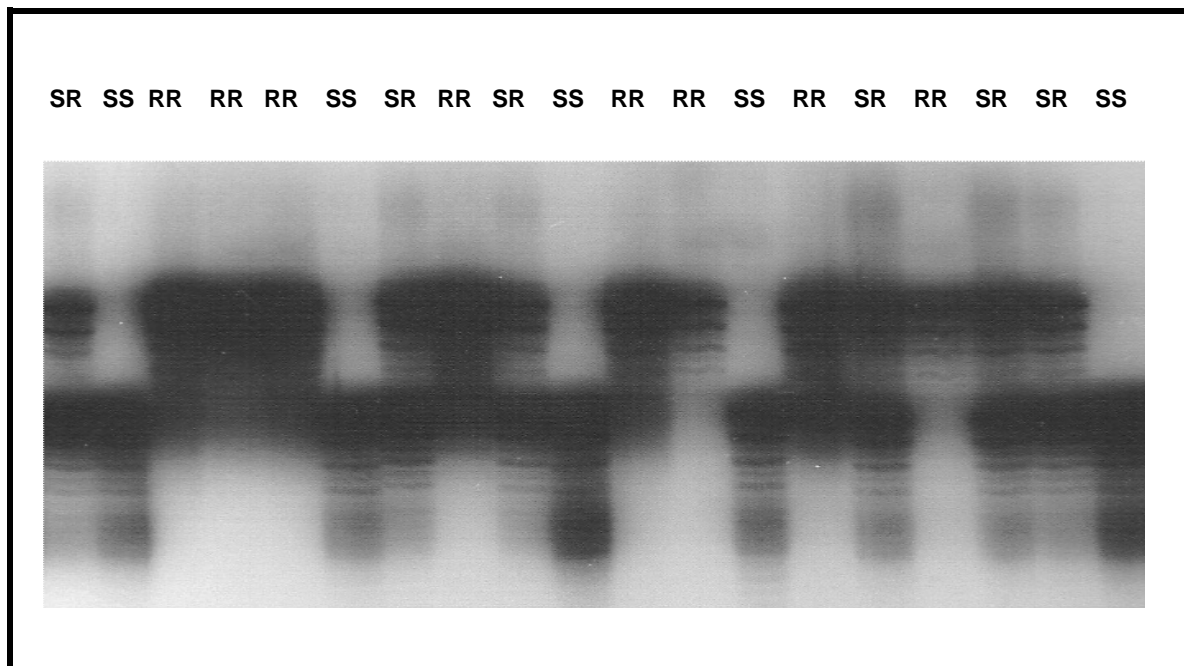


Abb. 13: Beispiel zur Genom-Analyse der F2-Tiere SS x SHR mit dem Mikrosatellitenmarker D4Rat9 (SS, homozygot für das SS-Allel; SR, heterozygot für das SS- und SHR-Allel, RR, homozygot für das SHR-Allel).

3.3.1 Primäre Genomanalyse der Extremtiere der F2-Generation

Für die Berechnung einer QTL-Analyse wird der LOD-Score verwendet, der sogenannte logarithm of the odds, der die Wahrscheinlichkeiten gegenüberstellt, mit der sich ein QTL an einer Position befindet oder nicht befindet (Rapp 2000).

In der LOD-Kurve sich abzeichnende Peaks signalisieren die wahrscheinlichste Lokalisation von QTL auf einem Chromosom. Der Gipfel eines LOD-Plots zeigt die wahrscheinlichste Position eines QTL an. Die Höhe der Spitze ergibt ein Maß für die statistische Signifikanz. Für ein QTL mit geringem Effekt wäre dieses Intervall zu kurz,

deswegen sollte ein LOD-2 bestimmt werden. Diese LOD-1 und LOD-2 Intervalle werden flankierend neben dem QTL im LOD-Plot dargestellt.

Bei der primären Genomanalyse der Extremtiere der F₂-Generation fanden sich für den Phänotyp Hyperlipidämie mehrere wahrscheinliche Kopplungen.

Durch die Untersuchung ergab sich für den Phänotyp Triglyzeride eine wahrscheinliche Kopplung zum Bluthochdruck auf Chromosom 17. Für den Phänotyp Triglyzeride wies Chromosom 17 einen LOD-Score von 3,1 auf. Die anderen Chromosomen zeigten für Triglyzeride keine signifikanten oder wahrscheinlichen Kopplungen (Abb. 15).

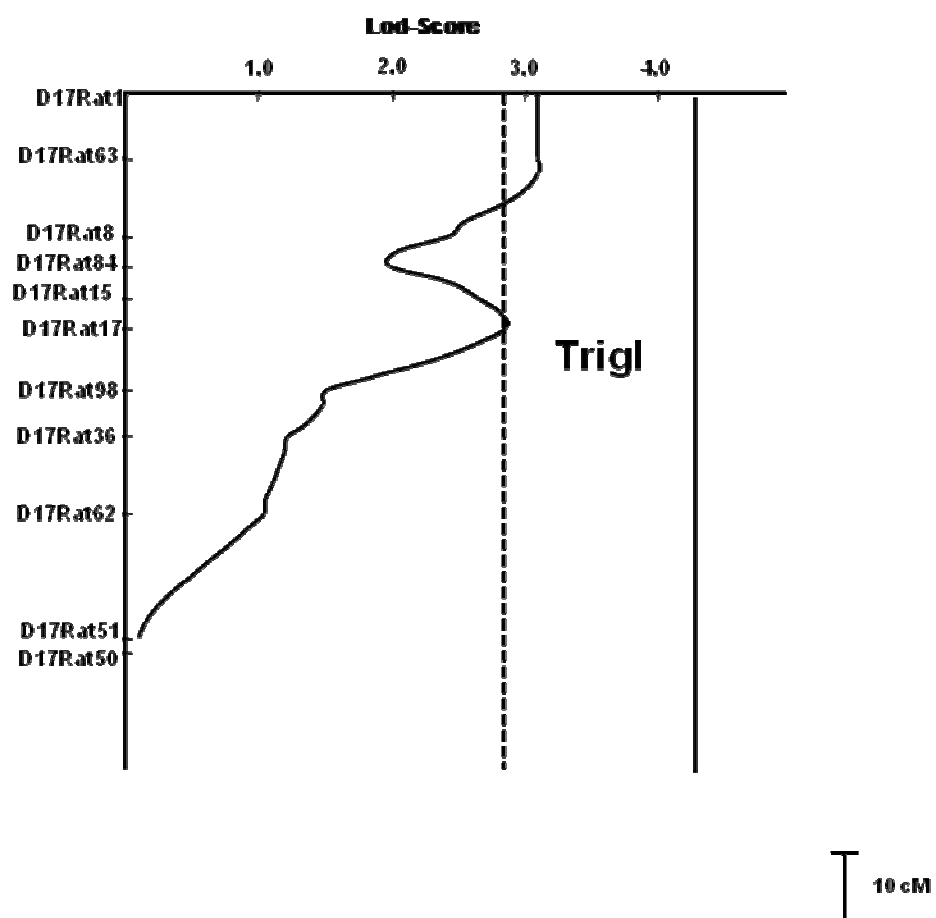


Abb. 14: LOD-Plot für Triglyzeride (Trigl) auf Chromosom 17 der primären Genomanalyse. An der Ordinate stehen die chromosomalen Marker. Ein Abstand von 10 cM ist angezeigt. Die mittlere vertikale gestrichelte Linie bei LOD = 2,8 zeigt die Grenze für eine wahrscheinliche Kopplung an, die schwarze vertikale Linie steht für eine signifikante Kopplung bei LOD=4,3.

Der Phänotyp Albuminurie zeigte sich bei der primären Genomanalyse unauffällig und wies einen LOD-Score für die AE von nur 1,4 für Chromosom 6 auf (Abb. 15).

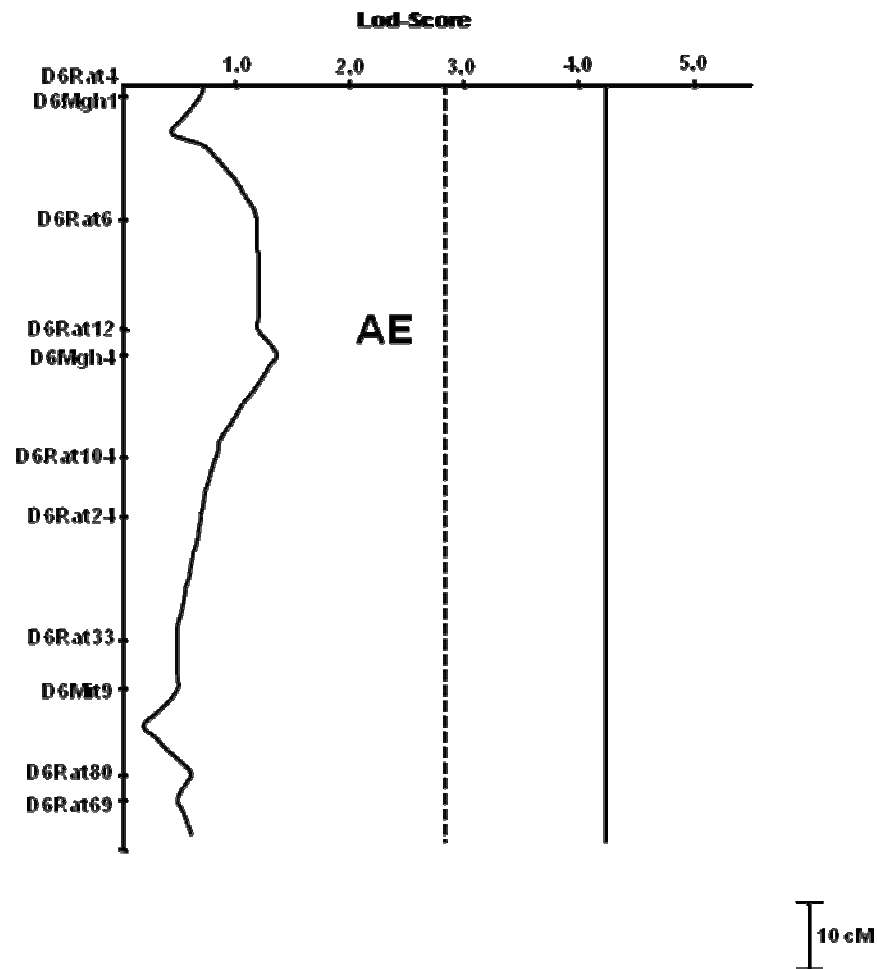


Abb. 15: LOD-Plot für Albuminexkretion im Urin (AE) auf Chromosom 6 der primären Genomanalyse. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 14.

Die Auswertung der Extremtiere der F2-Generation ergab für Chromosom 6 einen Peak mit einem wahrscheinlichen LOD-Score von 2,6 für den Phänotyp Cholesterin, der knapp unter dem wahrscheinlichen LOD-Score von 2,8 für eine wahrscheinliche Kopplung liegt (Abb. 16).

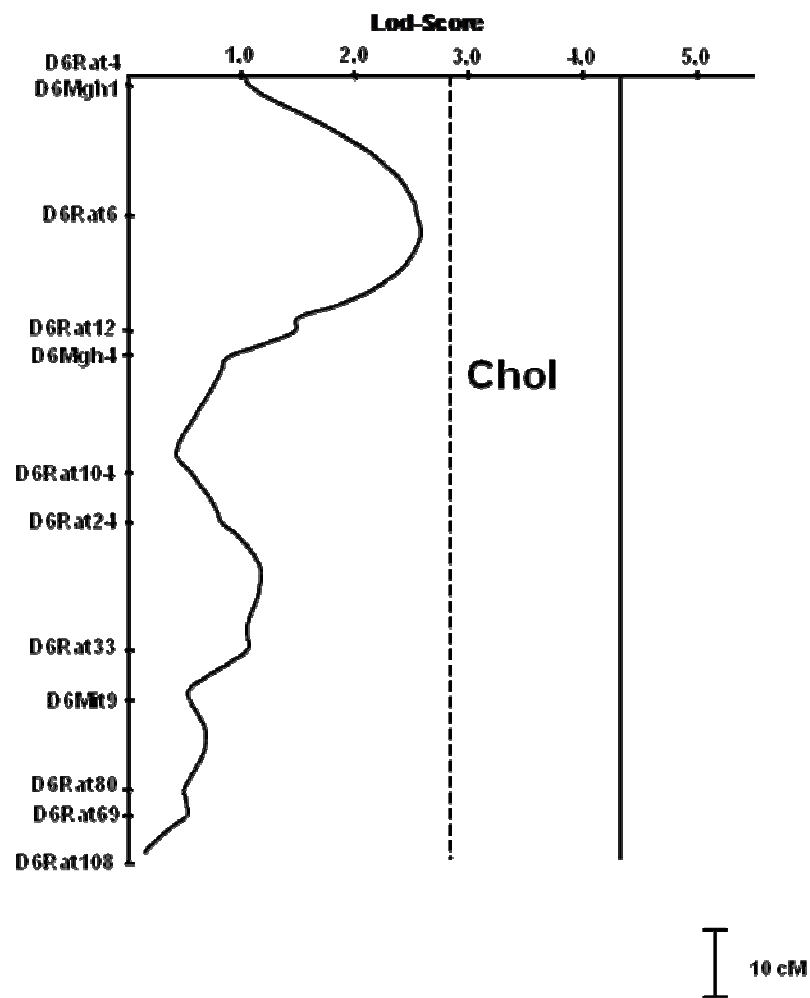


Abb. 16: LOD-Plot für den Phänotyp Cholesterin (Chol) auf Chromosom 6 der primären Genomanalyse. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 14.

Tabelle 1: Ergebnisse des primären Genomanalyse mit 46 Extremtieren für die Phänotypen Albuminexkretion im Urin (AE) und Lipide der F2-Generation des SS-Stamms x SHR-Stamms. S, Dahl/SS-Allel, R, SHR-Allel.

Parameter	Locus	Genotypen			Statistik	
		RR	RS	SS	p-Wert (ANOVA)	LOD-Score
Triglyzeride (mmol/l)	D17Rat8	0,80 ± 0,29	1,12 ± 0,41	1,29 ± 0,26	0,01	2,4
	D17Rat84	0,80 ± 0,32	1,11 ± 0,41	1,29 ± 0,26	0,02	1,9
	D17Rat17	0,76 ± 0,27	1,15 ± 0,40	1,31 ± 0,24	0,00	2,9*
	D17Rat63	0,71 ± 0,21	1,16 ± 0,43	1,20 ± 0,27	0,00	3,1*
Cholesterin (mmol/l)	D6Rat6	1,89 ± 0,41	1,60 ± 0,32	2,11 ± 0,36	0,00	2,6
AE (mg/24h)	D6Rat12	0,78 ± 0,73	0,37 ± 0,96	0,51 ± 0,86	0,00	1,4
	D8Rat46	0,43 ± 0,76	2,96 ± 4,79	11,29 ± 24,54	0,14	1,6
	D10Rat30	0,98 ± 1,92	1,99 ± 3,58	11,75 ± 25,94	0,12	3,2*

* wahrscheinliche Kopplung

3.3.2 Sekundäre Genomanalyse aller F2-Tiere

Bei der sekundären Genomanalyse wurde eine genetische Kopplungsanalyse aller 539 Tiere der F2-Generation aus den Stämmen SHR und SS durchgeführt. Die Untersuchung orientierte sich an den Ergebnissen der Primärstudie und erfolgte bei den Extremtieren, bei denen sich nach einer genetischen Analyse mit zusätzlichen flankierenden Markern eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine genetische Kopplung anzeigte.

In der sekundären Genomanalyse wurden zusätzlich zu den Chromosomen 6, 8 und 17 die Chromosomen 1, 2, 3 und 4 untersucht. Hierdurch ergab sich eine Änderung des Gesamtbildes. Für die Chromosomen 2, 4, 6, 8 und 17 zeigten sich signifikante Kopplungen für den Bluthochdruck und die Phänotypen Triglyzeride, Cholesterin und Albuminurie bei der sekundären Genomanalyse aller Tiere. Hierbei wurden aufgrund der großen Anzahl aller Tiere nur die wichtigsten Marker genotypisiert.

Für den Phänotyp Cholesterin ergaben sich wahrscheinliche Signifikanzen auf Chromosom 2 bei den Markerpositionen D2Rat126 und D2Mgh11 mit einem LOD-Score von 3,6 (Abb. 17).

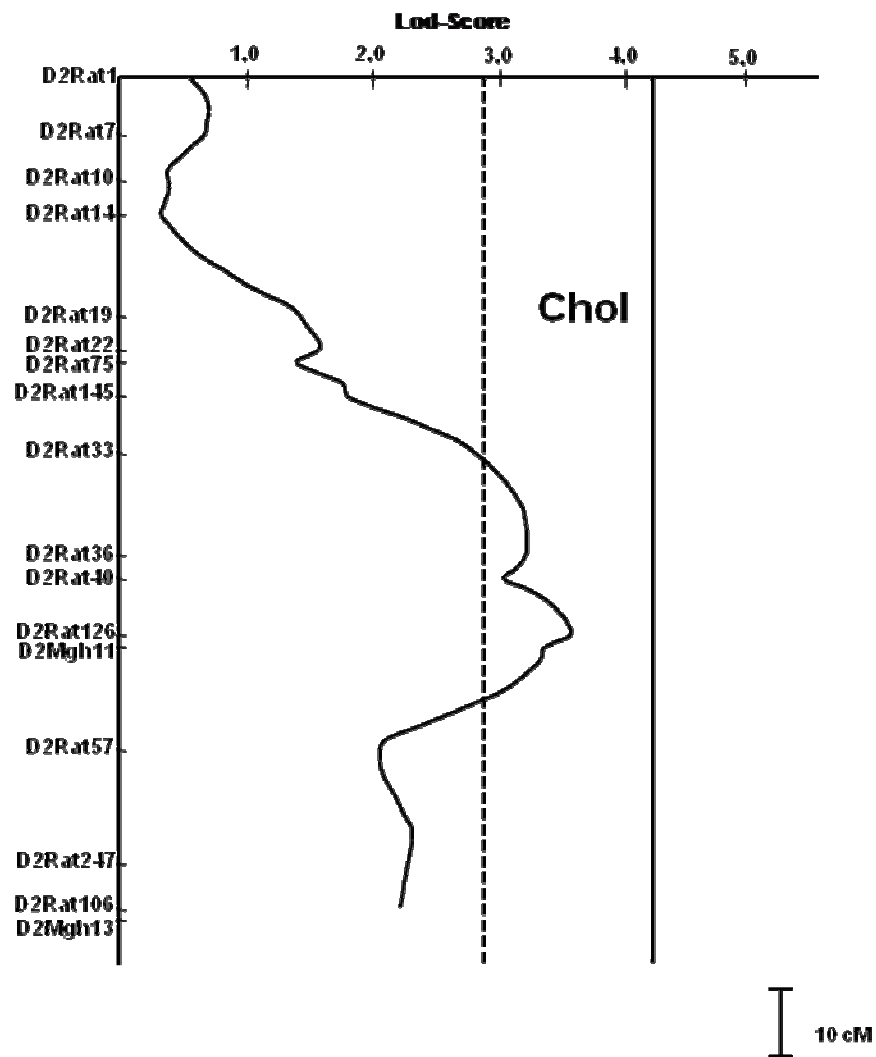


Abb. 17: LOD-Plot für den Phänotyp Cholesterin (Chol) auf Chromosom 2 der sekundären Genomanalyse aller Tiere. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 14.

Eine hoch signifikante Kopplung befindet sich zwischen der Albuminurie und dem Marker D6Rat12 auf Chromosom 6 (max. LOD-Score = 6,5, $p < 0,0001$) für alle Tiere, die sich im Vergleich zur primären Genomanalyse mit den Extremtieren als stabil erwies (Abb. 18).

Das Allel der SS-Ratte führte bei den Ratten zu einer erhöhten Albuminexkretion im Urin.

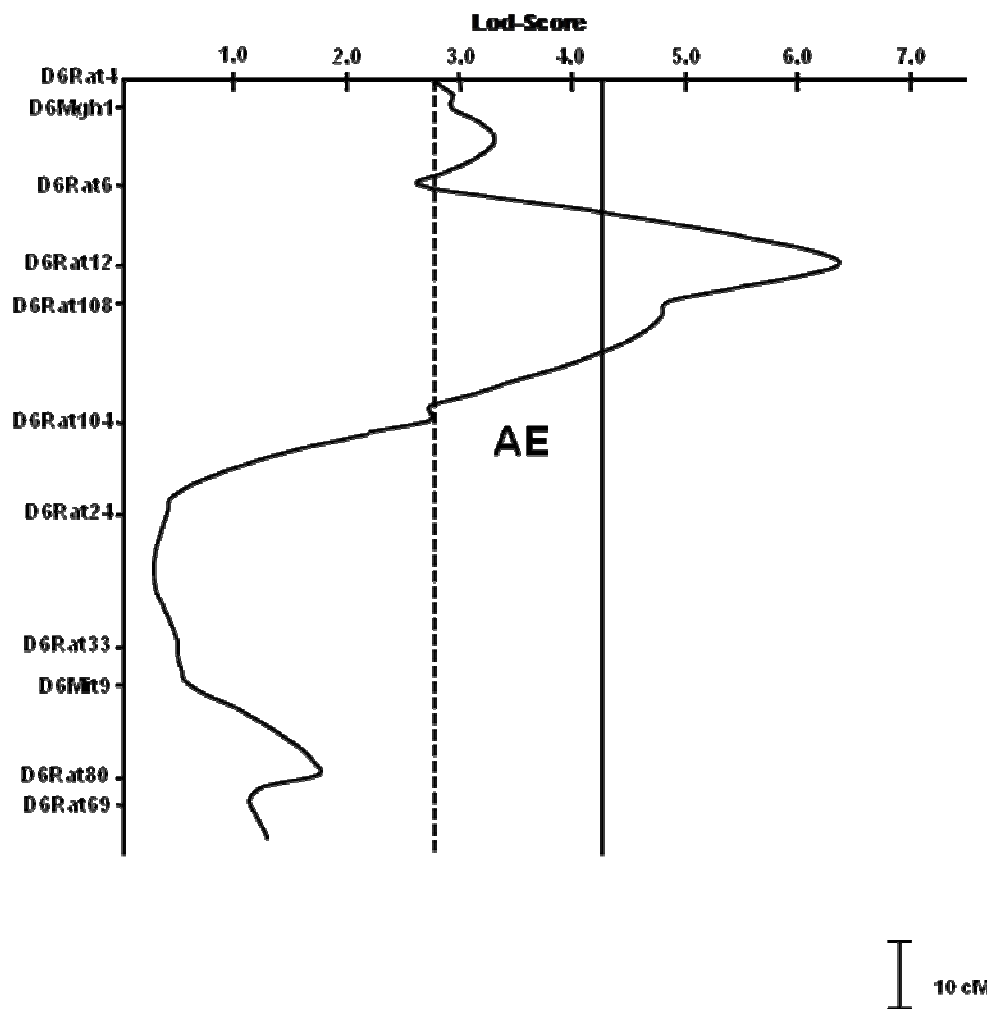


Abb. 18: LOD-Plot für Albuminexkretion im Urin (AE) auf Chromosom 6 der sekundären Genomanalyse aller Tiere. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 14.

Eine Homozygotie für das SS-Allel führt an diesem Locus zu einer Erhöhung der Albuminurie auf 12,10 mg/24h im Vergleich zum SHR-Allel, das nur Werte von 0,76 mg/24h aufweist.

Für die erhöhten Cholesterinwerte und Triglyzeridwerte konnte weder eine signifikante noch eine wahrscheinliche Kopplung auf Chromosom 6 nachgewiesen werden.

Das zuvor bei der primären Genomanalyse unauffällige Chromosom 8 erwies sich beim für Triglyzeride mit einem LOD-Score von 6,2 als hoch signifikant für eine Kopplung (Abb. 19).

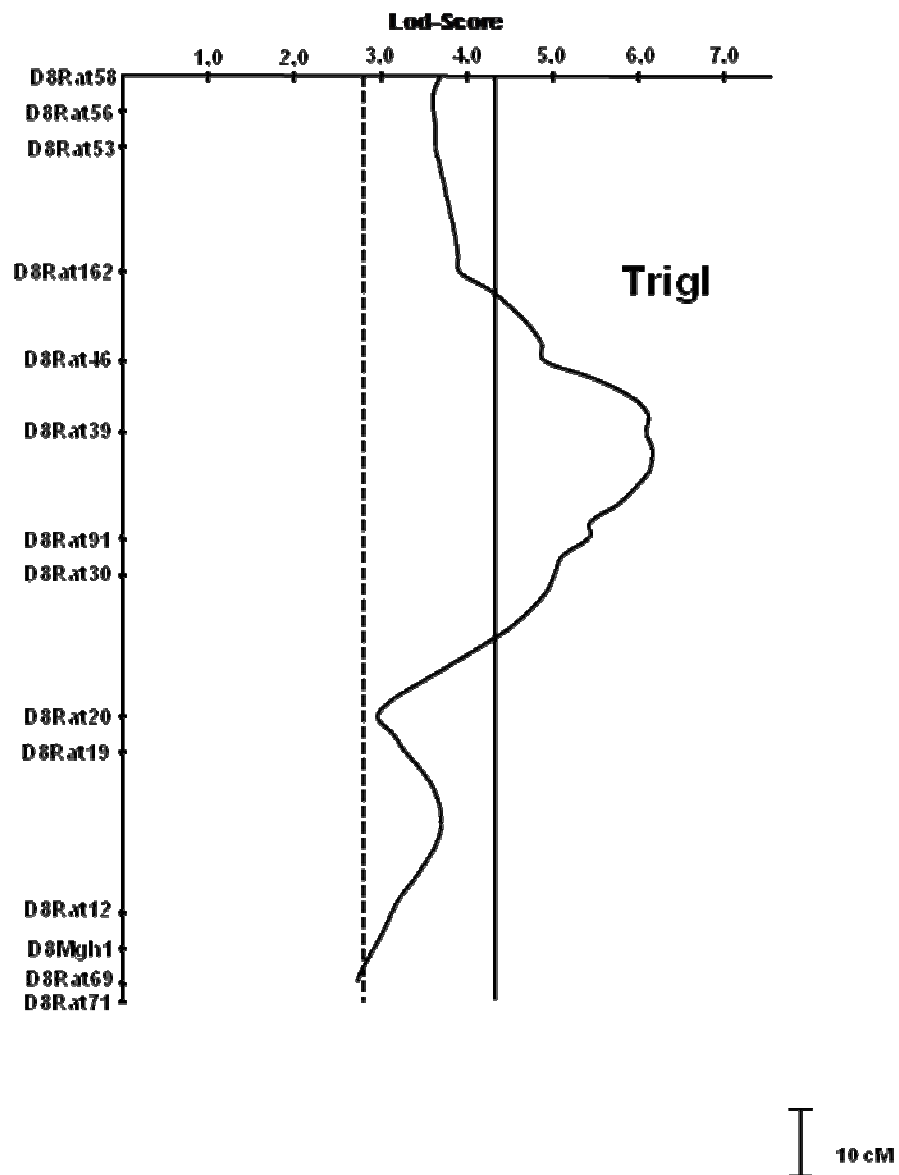


Abb. 19: LOD-Plot für den Phänotyp Triglyzeride (Trigl) auf Chromosom 8 der sekundären Genomanalyse aller Tiere. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 14.

Auch auf Chromosom 10 ergab sich eine signifikante Kopplung zwischen AE und der Markerposition D10Rat30 mit einem LOD-Score von 3,6.

Hierbei zeigte sich mit einem LOD-Score von 5,8 auf Chromosom 17 eine hoch signifikante Kopplung zwischen der Markerposition D17Rat8 und der Erhöhung der Triglyzeride.

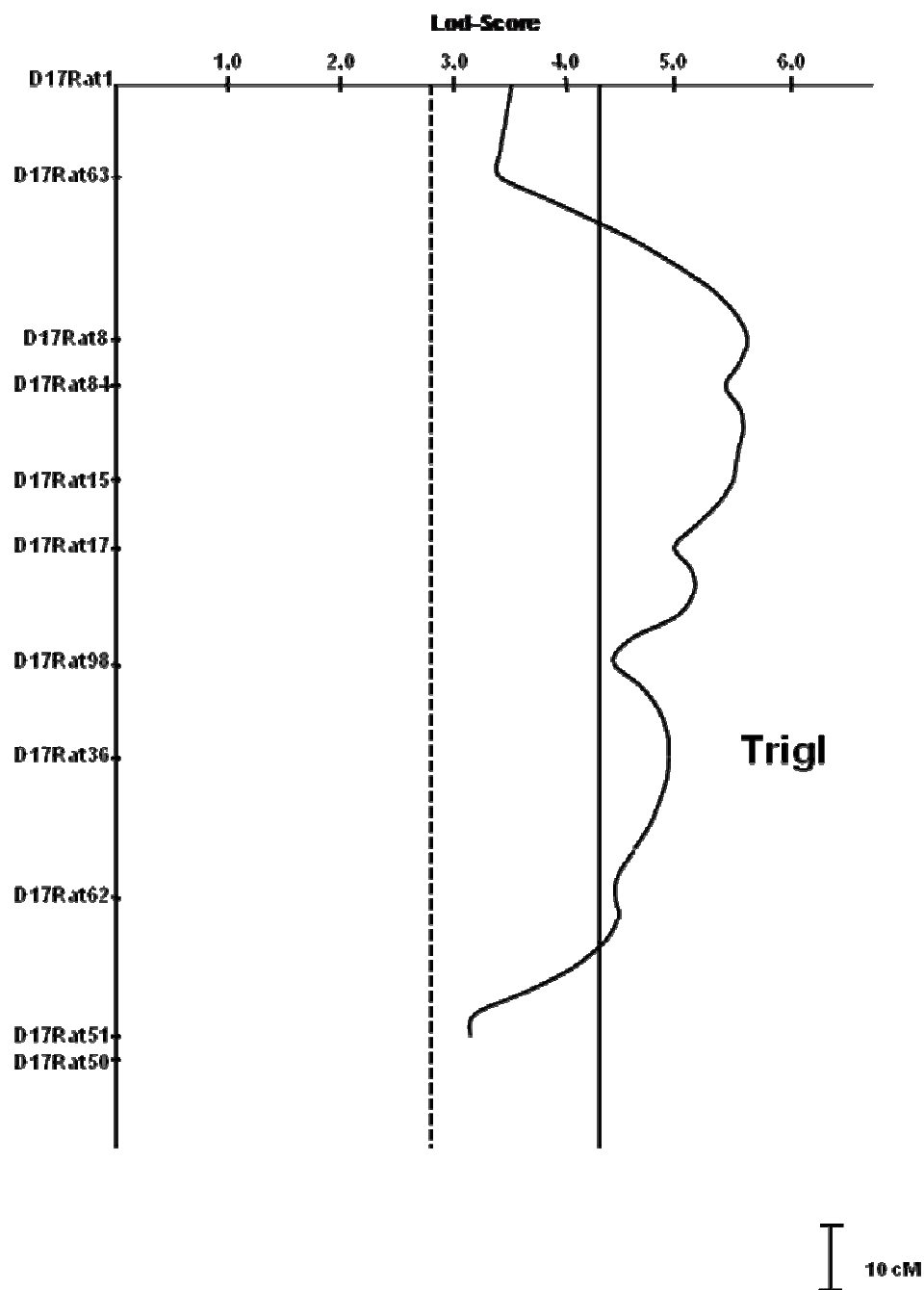


Abb. 20: LOD-Plot für den Phänotyp Triglyzeride (Trigl) auf Chromosom 17 der sekundären Genomanalyse aller Tiere. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 14.

Eine wahrscheinliche Kopplung fand sich auf Chromosom 4 an Position D4Rat9 mit einem LOD-Score von 2,8 für den Phänotyp Triglyzeride (Abb. 21).

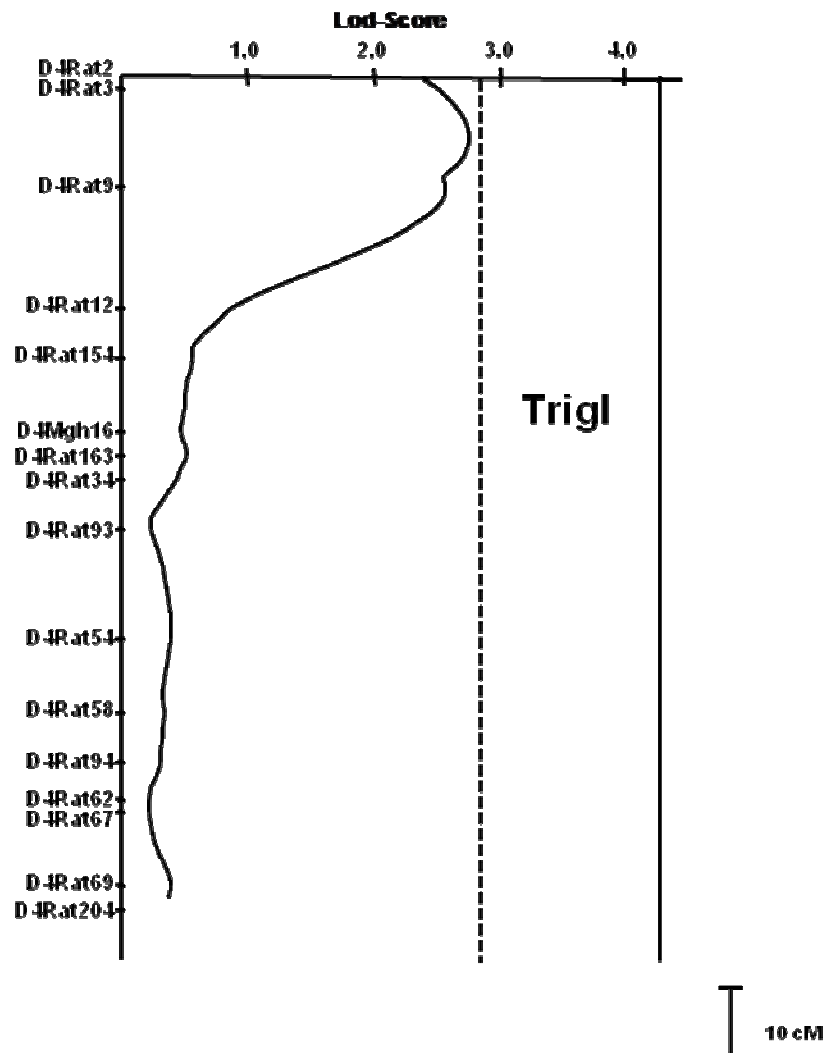


Abb. 21: LOD-Plot für Triglyzeride (Trigl) auf Chromosom 4 der sekundären Genomanalyse aller Tiere. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 14.

Auch für die AE fand sich eine wahrscheinliche Kopplung auf Chromosom 8 an Position D8Rat46 mit einem LOD-Score von 2,9.

Tabelle 2: Die sekundäre Genomanalyse mit allen 539 Tieren der F2-Generation des SS-Stamms und des SHR-Stamms für die Phänotypen Albuminexkretion im Urin (AE) und Lipide.

Parameter	Locus	Genotypen			Statistik	
		RR (SHR: 1)	RS (Hetero: 2)	SS (SS/Jr: 3)	p-Wert (ANOVA)	LOD-Score
Triglyzeride (mmol/l)	D4Rat09	1,06 ± 0,45	1,10 ± 0,44	0,93 ± 0,42	0,00	2,8
	D8Rat39	0,88 ± 0,33	1,05 ± 0,44	1,17 ± 0,46	0,00	6,2**
	D17Rat8	0,80 ± 0,29	1,12 ± 0,41	1,29 ± 0,26	0,01	5,6**
Cholesterin (mmol/l)	D2Rat126	1,55 ± 0,32	1,64 ± 0,33	1,71 ± 0,34	0,00	3,6*
	D2Mgh11	1,69 ± 0,45	1,72 ± 0,29	1,66 ± 0,41	0,88	3,6*
AE (mg/24h)	D6Rat12	0,76 ± 1,45	3,01 ± 5,69	12,10 ± 25,06	0,11	6,5**
	D8Rat46	0,25 ± 0,27	0,48 ± 1,49	1,49 ± 8,63	0,01	2,9*
	D10Rat30	0,30 ± 0,53	0,40 ± 1,11	1,95 ± 9,89	0,00	3,6*

* wahrscheinliche Kopplung; ** signifikante Kopplung

4 Diskussion

Die Hyperlipidämie ist neben der Hypertonie, dem Nikotinabusus und dem Diabetes mellitus ein wesentlicher Risikofaktor für das Auftreten von koronaren Herzerkrankungen und mit einer hohen Morbidität verbunden. Die Hyperlipidämie ist sekundär für das Auftreten vermehrter Plaques in Koronargefäßen mitverantwortlich, die durch erhöhte Blutfettwerte (vor allem LDL) entstehen können. Frühere Studien an Dahl-Ratten zeigten, dass eine endotheliale Dysfunktion und oxidativer Stress wichtige Pathomechanismen in der Makrophageninfiltration und nachfolgenden Entwicklung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose sind (Tian et al., 2007). Hier wird die Relevanz der Cholesterinkonzentration für die Entstehung einer Herzfibrose in diesem Tiermodell und der Einfluss der Makrophagen auf den Phänotyp deutlich. Die häufigste Form der Hyperlipidämie des Menschen wird multifaktoriell vererbt. Viele QTL sind an der Pathogenese beteiligt und interagieren zudem mit Umweltfaktoren (Lifton et al., 2001). In vielen Studien wurden inzwischen QTLs aufgezeigt, die die Cholesterin-, HDL-, LDL- und Triglyzeridwerte beeinflussen. Dennoch ist es immer noch notwendig, ein einheitliches Bild von genetischen Determinanten und Mechanismen zu schaffen, was sich als schwierig erweist (Herrera et al., 2003).

Frühere Studien an Menschen mit extrem erhöhten Blutfettwerten oder auch an Familien mit Erkrankungen, die nach Mendelschem Vererbungsmuster weitergegeben werden und mit einer Hyperlipidämie assoziiert sind, haben die Beteiligung einer großen Anzahl an Genen und entsprechenden Proteinen im Lipidstoffwechsel nachgewiesen (Aulchenko et al., 2009). Die identifizierten Kandidatengenregionen können zum Beispiel mit Geschwisterpaaranalysen oder Fallkontrollstudien bei Patienten eingehend untersucht werden. Somit werden genauere Untersuchungen von Umweltfaktoren und Lebensweisen mit deren Einfluss auf die genetisch determinierte Hyperlipidämie ermöglicht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Kopplungsanalyse mit der SS-Ratte und dem Referenzstamm SHR zur Identifizierung genetischer Faktoren für Hyperlipidämie durchgeführt. Der SS-Rattenstamm ist neben der salzsensitiven Hypertonie, Hyperlipidämie und Albuminurie auch durch eine Insulinresistenz, endotheliale Dysfunktion, Herzinsuffizienz und Glomerulosklerose gekennzeichnet (Yu et al., 2003).

Somit konnten in der Dissertationsschrift die an der Ausbildung der Hyperlipidämie im Zusammenhang mit Albuminurie beteiligten genetischen Faktoren eingehend untersucht werden.

Für die Untersuchung der erhöhten Blutfettwerte und der Albuminurie eignen sich Tiermodelle, die durch das Auftreten dieser Krankheitsbilder gekennzeichnet sind. Allerdings ist der Phänotyp „Gesamtcholesterol“ aufgrund des hohen HDL-Cholesterolanteils im Rattenserum hinsichtlich seiner Aussage zum kardiovaskulären Risiko limitiert.

Ein Rattenstamm, der eindeutig phänotypisch und genotypisch charakterisiert wurde, erleichtert die Untersuchung genetisch bedingter Krankheitsbilder. Somit ist die salzsensitive SS-Ratte aufgrund ihrer genetischen Eigenschaften für die Untersuchung dieser Erkrankungen besonders gut geeignet und kann helfen, die wesentlichen Risikofaktoren für die Ausbildung von Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen aufzuzeigen (Gill et al., 1998). Dabei handelt es sich um wesentliche Krankheitsbilder, die epidemiologisch zu den Haupttodesursachen in den Industrienationen der westlichen Welt gezählt werden.

Im Gegensatz dazu zeichnet sich die SHR-Ratte dadurch aus, dass sie, wie die Dahl-Ratte, zwar auch einen arteriellen Hypertonus entwickelt, aber keine Erhöhung der Blutfettwerte und keine Albuminurie aufweist. Dadurch eignet sie sich besonders als kontrastierender Referenzstamm zur Untersuchung dieser zwei Krankheitsbilder.

4.1 Phänotypische Charakterisierung der Parentalstämme

In mehreren Studien zeigte der SS-Rattenstamm die Krankheitsphänotypen Hyperlipidämie und Albuminurie (Herrera et al., 1999; Herrera et al., 2004). Diese Tatsache lässt vermuten, dass eine genetische Korrelation zwischen beiden Phänotypen vorliegt.

Bei den Lipidwerten ergaben sich bei den Tieren dieser Studie große Unterschiede zwischen dem SS- und dem SHR-Stamm. Während der SHR-Stamm niedrige Werte für Gesamtcholesterin aufwies, zeigte der SS-Stamm in der 8. Lebenswoche signifikant 1,5 mal erhöhte Werte.

Herrera et al. untersuchten ebenfalls in einer Studie (Herrera et al., 2004) Dahl salzsensitive Ratten, allerdings handelt es sich hierbei um Tiere des ursprünglichen Dahl-S-Stamms und es wurden nur die Daten von sechs Monate alten Tieren veröffentlicht. Als Referenzstamm wurden in dieser Studie Dahl salzresistente Ratten (Dahl R) verwendet. Herrera et al. konnten zeigen, dass die Werte für Gesamtcholesterin bei der SS-Ratte in einem Bereich von $1,72 \pm 0,12$ mmol/l liegen (Herrera et al., 2004). Die Gesamtcholesterin-Werte der SS-Ratte der vorliegenden Studie waren dagegen mit $2,49 \pm 0,14$ mmol/l deutlich über diesem Wert. In der 8. Lebenswoche wurden beim SS-Stamm 2,6mal höhere Triglyzerid-Werte gemessen als beim SHR-Stamm. Es zeigten sich signifikante Unterschiede für das Gesamtcholesterin bei älteren Tieren in der 24. Woche für Dahl S von $4,45 \pm 0,18$ mmol/l und für Dahl R Werte von $1,72 \pm 0,12$ mmol/l. Bei den Triglyzeriden fanden sich in der 24. Woche bei Dahl S signifikant unterschiedliche Werte von $1,88 \pm 0,09$ mmol/l und bei Dahl R Werte von $0,93 \pm 0,06$ mmol/l (Herrera et al., 2004). Die Triglyzeride der SS-Tiere der vorliegenden Arbeit zeigten Werte von $2,15 \pm 0,20$ mmol/l in der 8. Lebenswoche und waren damit deutlich früher erhöht als bei Herrera et al. (Herrera et al., 2004). Diese höheren Lipidwerte der Tiere in der vorliegenden Studie können z. B. auf einen Koloniedrift verschiedener Kolonien zurückgeführt werden, auf verschiedene Haltungsbedingungen sowie unterschiedliche klinisch-chemische Nachweisverfahren. Auch kann vermutet werden, dass das frühe Auftreten der Hyperlipidämie in dieser Studie aufgrund anderer genetischer Ursachen bedingt ist als bei Herrera et al.. Die Tendenz des SS-Stamms zu erhöhten Blutfettwerten bestätigte sich auch in einer weiteren Studie, in der dieser Rattenstamm auch durch eine hohe Anfälligkeit für Arteriosklerose gekennzeichnet war (Herrera et al., 2001). In dieser Studie wurde ein möglicher genetischer Zusammenhang zwischen den erhöhten Blutfettwerten und einem erhöhten Risiko für Koronarerkrankungen untersucht.

In der vorliegenden Studie wurden bei der Albuminexkretion im Urin wesentliche Unterschiede zwischen dem SS-Stamm und dem SHR-Stamm festgestellt. Der SS-Stamm wies bei jungen Tieren in der 8. Woche 205mal höhere Werte auf als der SHR-Stamm, der rein physiologische Werte für Albuminurie annahm; die normale physiologische Albuminausscheidung bei der Ratte liegt in einem Bereich unter 1 mg/24h.

In der Arbeitsgruppe wurde darüber hinaus in Vorarbeiten das salzunabhängige Auftreten der Albuminurie bei SS-Ratten demonstriert (Poyan Mehr et al., 2003). Sie zeigten, dass der große Unterschied der Albuminexkretion des SS-Stamms zu dem Referenzstamm SHR durch einen baldigen Anstieg der Albuminurie schon sehr früh bei Jungtieren auftritt. In einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sich bei älteren Tieren die Diskrepanz der Phänotypen zwischen den beiden Rattenstämmen noch erheblich verstärkt. Besonders deutlich wurde dies nach verstärkter Kochsalzgabe von 4% NaCl im Futter (Siegel et al., 2004).

4.2 Kosegrationsanalyse der F2-Generation

In der vorliegenden Studie wurde bei den SSxSHR-F2-Tieren für die Blutfettwerte Cholesterin und Triglyzeride eine Normalverteilung festgestellt. Es zeigte sich bei den Blutfettwerten eine unimodale Verteilung der Phänotypen, die in der Regel mit einem polygenetischen Befund einhergehen (Rapp, 2000).

Die Signifikanz dieser LOD-Scores erhöhte sich nach der Auswertung aller Tiere in der sekundären Genomanalyse. Es hat sich gezeigt, dass auf den Chromosomen 8 und 17 jeweils ein QTL mit einem starken Einfluss auf den Lod-Score für Hypertriglyzeridämie lokalisiert ist. Es kann sich hierbei um bedeutende Kandidatengenregionen handeln, die nachfolgend einer näheren Funktionsanalyse unterzogen werden müssen. Darüber hinaus konnten für den Phänotyp Cholesterin ein QTL mit wahrscheinlicher Assoziation für Chromosom 2 ermittelt werden. Die Befunde belegen den polygenetischen Zusammenhang der Hyperlipidämie. Der recht hohe LOD-Score für die Hyperlipidämie ist ein Hinweis darauf, dass voneinander abhängige genetische Faktoren an der Determination dieses Phänotyps beteiligt sein müssen (Rapp, 2000).

Häufig tritt die Hyperlipidämie aber auch sekundär bei Nierenerkrankungen auf. Bei dem nephrotischen Syndrom, das gekennzeichnet ist durch eine starke Proteinurie (> 3 - 3,5 g/d), Hypoproteinämie, hypalbuminämische Ödeme und Hyperlipoproteinämie (mit Erhöhung der Triglyzeride und Cholesterin), stimuliert die Hypoproteinämie die Bildung von Lipoproteinen in der Leber. Auf diese Weise kommt es zur Hyperlipidämie und damit auch zur Hypercholesterinämie. Eventuell wird dieses Phänomen durch die Proteinurie verursacht, bedingt durch den Lipoproteinlipase-Verlust (Silbernagel et al., 1998). Bei

der SS-Ratte dagegen manifestiert sich die Hyperlipidämie sehr früh vor dem Auftreten des arteriellen Hypertonus und der Proteinurie (Herrera et al., 1999). Dies spricht für eine von der Niere unabhängige Ursache der Hyperlipidämie. So wie die Albuminurie, die ebenfalls vor nachweisbaren strukturellen Schädigungen der Niere auftritt (Poyan Mehr A et al., 2005), könnte die Hyperlipidämie hier nicht als eine sekundäre Folge von strukturellen Schäden der Glomeruli betrachtet werden, sondern genetische Faktoren könnten für das Vorliegen dieser beiden Krankheitsbilder verantwortlich sein.

Die Albuminurie, die vor nachweisbaren Schädigungen der Niere in der 4. Woche auftritt (Poyan Mehr A et al., 2005), ist nicht als eine sekundäre Folge von strukturellen Schäden der Glomeruli zu betrachten. Auch hier müssen genetische Faktoren für das Vorliegen dieses Krankheitsbildes verantwortlich sein.

In einer früheren Studie wurde untersucht, ob es sich bei der Hyperlipidämie bei dem Rattenmodell der hypertensiven Fawn-hooded-Ratte (FHH) um eine primär genetisch determinierte Störung handelt, oder ob sie sekundär durch die für diesen Rattenstamm typische Proteinurie bedingt ist (Verseput et al., 1997). Im Rahmen dieser Studie wurden FHH-Ratten und FH-Ratten untersucht. Die FHH-Ratten sind durch die Entwicklung einer progressiven Hypertonie und einer Proteinurie gekennzeichnet. Die FH-Ratten zeigen im Gegensatz dazu nur einen geringen Blutdruckanstieg und keine renalen Schädigungen. Es wurden die Lipid- und Apolipoproteinwerte mit der Entwicklung der Proteinurie bei beiden Rattenstämmen zwischen der 4. bis zur 40. Lebenswoche verglichen. Dabei wurde bestimmt, ob die Gabe eines ACE-Hemmers (Lisinopril), der die Entwicklung der Proteinurie bei FHH unterdrückte, auch die Lipid- und Apolipoproteinwerte bei FHH normalisieren kann. Es zeigte sich, dass die Erhöhung des Bluthochdrucks, die erhöhte Proteinurie, erhöhte Werte für Cholesterin, Triglyzeride und Apolipoprotein A-I, B und E effektiv durch Lisinopril behandelt werden konnten. Diese Daten lassen annehmen, dass es bei diesen Ratten keine primäre Ursache für den gestörten Lipidstoffwechsel gibt, sondern dass die Veränderungen der Plasmalipide sekundär durch die Proteinurie bedingt sind.

Bei Studien mit der SS-Ratte entwickeln sich metabolische Störungen, vor allem die Hypertriglyzeridämie, erhöhte Werte von Apolipoprotein B und die Insulinresistenz, lange bevor die Albuminurie manifest wird (Ogihara et al., 2002). Dies spricht in diesem Fall eher für eine primäre Ursache der Hyperlipidämie.

In einer weiteren Studie mit SHR und Wistar-Kyoto-Ratten waren die Plasmatriglyzeridwerte beim SHR-Stamm bereits in der 6. bis 7. Lebenswoche leicht

angestiegen (über 1,1 mmol/l), während der systolische Blutdruck sich nur auf 130 mmHg erhöhte (Reaven et al., 1991). Die Wistar-Kyoto-Ratte (WKY) ist gekennzeichnet durch einen normotensiven Blutdruck und wird häufig als Kontrollgruppe verwendet (Alemayehu et al., 2002). Der Vergleichsstamm WKY zeigte Werte von über 0,9 mmol/l und 100 mmHg. Bei diesen Rattenstämmen ging die Hypertriglyzeridämie klar der Entwicklung der Proteinurie voraus, bei der Dahl-Ratte wurde eine Hyperlipidämie sogar vor einer Blutdruckerhöhung registriert. Fraglich ist, ob das gemeinsame Auftreten der beiden Phänotypen genetisch miteinander gekoppelt ist oder ob es eine andere Erklärung dafür gibt.

Isolierte Adipocyten, sowohl von SHR als auch von salzsensitiven Dahl-Ratten zeigten einen Defekt der insulininduzierten Glukoseaufnahme (Reaven et al., 1991). Dies könnte ein Zeichen der Insulinresistenz sein, die eine niedrige Aktivität der Lipoproteinlipase des Fettgewebes verursacht (Sadur et al., 1982) und daher für eine vom arteriellen Hypertonus unabhängige Ursache der Hyperlipidämie sprechen würde.

In einer bereits weiter oben erwähnten Studie wurden Dahl S und Dahl R Rattenstämme miteinander gekreuzt, unter normalen Diätbedingungen gehalten und im Alter von 6 Monaten untersucht (Herrera et al., 2004). Es wurde eine genomweite Untersuchung von 200 Tieren nach QTL durchgeführt, welche die Blutfettwerte der Tiere beeinflussen. In dieser Studie fanden sich keine QTL für Triglyzeride auf Chromosom 3, aber ein wahrscheinlicher QTL für Gesamtcholesterin auf Chromosom 3 mit einem LOD-Score von 2,0. Der Peak-Marker lag bei D3Rat26. Der Peak-Marker in der vorliegenden Arbeit für Triglyzeride liegt bei D3Rat44. Beide Peak-Marker sind 28 cMorgan voneinander entfernt. Hier zeigte sich bei der primären Genomanalyse eine wahrscheinliche Kopplung mit einem LOD-Score von 3,0, der sich aber nach der Auswertung aller Tiere nicht mehr darstellte. Diese beiden QTL könnten kolokalisiert sein, wobei dieses QTL in der vorliegenden Studie sich nicht bestätigt hat.

Zusätzlich wurde in der Studie von Herrera et al. eine signifikante Kopplung für das Gesamtcholesterin auf Chromosom 8 aufgezeigt, bei Marker D8Rat153 mit einem signifikanten LOD-Score von 3,8. Es ergab sich in der vorliegenden Studie auf Chromosom 8 ein signifikanter Wert für den Phänotyp Triglyzeride bei D8Rat39 mit einem LOD-Score von 6,2. Auch in diesem Fall könnte eine Kolokalisation vorliegen. Für Cholesterin ließ sich keine Signifikanz feststellen.

Die zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien können daraus resultieren, dass es sich bei den untersuchten Dahl salzsensitiven Ratten um

unterschiedliche Stämme handelt. In der vorliegenden Arbeit wurde der ingezüchtete Stamm vom Typ SS untersucht, während Herrera et al. den ursprünglichen Stamm vom Typ Dahl S und den dazugehörigen resistenten Stamm Dahl R analysierte. Dadurch können leichte Unterschiede bei der Lokalisation der QTL entstehen. Auch die SHR-Ratte bringt unterschiedliche genetische Eigenschaften mit, die entsprechend den Kolonien den genetischen Kontext verändern können. Bei der Albuminexkretion im Urin fand sich keine Normalverteilung bei der Untersuchung aller 539 F2-Tiere. Es ergaben sich zum größten Teil sehr niedrige Werte. Lediglich 5,8% (31 Tiere) der 539 Hybriden wiesen eine AE-Rate auf, die höher als 1 mg/24h war und nur 2,4% (13 Tiere) zeigten Werte über 4 mg/24h bei den jungen Tieren in der 8. Woche. Insgesamt verteilten sich die Werte zwischen 0,04 mg/24h und 96,22 mg/24h. Dieses bei der AE beobachtete Verteilungsmuster deutet daher auf den in aktuellen Untersuchungen der Arbeitsgruppe und in der Literatur beschriebenen rezessiven Vererbungsmodus dieser Phänotypen hin (Schulz et al., 2002; Murayama et al., 1998, Garrett et al., 2003). Bei den Tieren der F2-Generation wurde darüber hinaus ein QTL für Albuminurie mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf dem Chromosom 6 der SS-Ratte detektiert. Die Bedeutung des Chromosom 6 in Bezug auf QTL für die Albuminurie zeigt sich auch in anderen Studien (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003; Schulz et al., 2006; Schulz et al., 2008; Siegel et al., 2004; Garrett et al., 2003). Auch Chromosom 8 war in der vorliegenden Studie auffällig für die Albuminexkretion mit einem wahrscheinlichen LOD-Score von 2,9. Somit sind in das frühe Auftreten einer Albuminurie bei der salzsensitiven Dahl-Ratte verschiedene Gen-Kombinationen involviert (Poyan-Mehr et al., 2003; Siegel et al., 2004; Garrett et al., 2003).

Die Tatsache, dass unabhängige Studien von zwei verschiedenen Stämmen aus unterschiedlichen Kolonien zu vergleichbaren Ergebnissen führten, hebt die Bedeutung der in den Studien identifizierten QTL für die polygenetische Vererbung der Hyperlipidämie und Albuminexkretion bei SS-Ratten hervor. Das quantitative Merkmal Hyperlipidämie und Albuminexkretion ist das Resultat kumulativer Effekte verschiedener genetischer Faktoren (Kreutz et al., 1994).

Es gibt Studien, die zeigen, dass ein ACE-Hemmer bei der salzsensitiven SS-Ratte eine Reduktion des Blutdrucks, nicht aber der Proteinurie bewirkte (O'Donnell et al., 1992). Dies unterstützte die These, dass die Proteinurie unabhängig vom Blutdruck entsteht und mit der Hyperlipidämie assoziiert ist.

In einer vergleichenden Genomanalyse zwischen Mensch und Maus wurden zu den meisten QTLs des Menschen auch konkordante QTLs bei der Maus gezeigt, die auf homologen Regionen platziert sind (Wang et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass viele Gene, die bei der Maus identifiziert wurden, auch dieselben Merkmale beim Menschen regulieren können. Neue Fortschritte, basierend auf kürzlich entwickelte Gen- und Bioinformatik-Technologien sollten die Untersuchungen erleichtern. Einige dieser Gene könnten mögliche therapeutische Ziele gegen die Hyperlipidämie und damit auch gegen die Arteriosklerose sein (Wang et al., 2005). Beim Menschen wurden bereits in einer Studie deutliche Hinweise für das Vorhandensein von QTL auf Chromosom 19 mit einem starken Einfluss auf das LDL-Cholesterin-Plasmakonzentration bei Kaukasiern gefunden (Beekmann et al., 2003).

Aulchenko et al. haben die erste genomweite Analyse für die Phänotypen LDL, HDL, Cholesterin und Triglyzeride durchgeführt. Diese Studie zeigt, dass die Genregion um LPL beim Menschen mit der auf Rattenchromosom 8 der SS-Ratte identifizierten kolokalisiert ist. (Aulchenko et al. 2009). LPL kodiert für die Lipoproteinlipase, die im Herz, im Muskel und Fettzellen exprimiert wird. Des weiteren wirkt LPL als ein Homodimer und hat eine doppelte Funktion als Triglyzeridhydrolase und Ligand für rezeptorvermittelte Lipoproteinaufnahme. Mutationen, die einen LPL-Mangel verursachen, enden in einer Störung des Lipoproteinstoffwechsels und bewirken zum Beispiel eine Typ 1 Hyperlipoproteinämie. Zusammenfassend lässt sich in der Studie von Aulchenko et al. erkennen, dass die QTL für Gesamtcholesterin die stärkste Vorhersagekraft für koronare Herzerkrankungen neben dem BMI, Alter und Geschlecht haben.

In einer anderen Studie manifestierten sich verschiedene signifikante Effekte durch das Geschlecht. Es ist bekannt, dass Blutfettwerte für männliche und weibliche Organismen variieren, so wie auch die Prävalenz der kardiovaskulären Erkrankungen. Die zwei Loci, die den stärksten Effekt auf den geschlechtsabhängigen Unterschied haben, sind HMGCR (3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase) und NCAN (Neurocan). HMGCR ist ein Enzym, das an der Cholesterinsynthese beteiligt ist und ein Angriffsziel für die Medikation mit Statinen darstellt. Es wird vor allem für die Behandlung von hohen LDL-Werten verwendet. Varianten des HMGCR haben zu einer geringeren Wirksamkeit von Pravastatin geführt (Aulchenko et al., 2009).

4.3 Ausblick

Aus den ermittelten Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Phänotypen Hyperlipidämie und Albuminurie bei der SS-Ratte keine Kolo-kalisation aufweisen und wahrscheinlich unabhängig voneinander genetisch determiniert sind.

Eine Theorie besagt, dass die Hyperlipidämie zusätzlich sekundär durch andere Faktoren wie der Insulinresistenz bedingt sein kann (Feldt et al., 1977). Die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge müssen noch in weiteren Studien näher untersucht werden.

In dieser Studie wird deutlich, dass es mögliche Kandidatengenregionen für die Hypertriglyzeridämie auf den Chromosomen 8 und 17 gibt. Zusätzlich hat sich für die Albuminurie ein QTL auf Chromosom 6 manifestiert. Hierbei kann es sich um bedeutende Kandidatengenregionen handeln, die nachfolgend einer näheren Funktionsanalyse unterzogen werden müssen.

Fortschritte in der Forschung auf dem Gebiet der genetischen Mechanismen des arteriellen Hypertonus, der Insulin-Resistenz und der Fettstoffwechselstörung liefern neue Möglichkeiten, diejenige Genexpression zu kontrollieren, die relevant für die Pathogenese der Hyperlipidämie und mit ihr verbundener kardiovaskulärer Erkrankungen ist (Kurtz et al., 1998). Die neuen Erkenntnisse werden die Pharmakogenetik befähigen, Risikopatienten frühzeitig zu erkennen. Hierdurch können neue Medikamente oder Therapien zur Prävention und Bekämpfung der essentiellen Hypertonie, renaler Erkrankungen und Fettstoffwechselerkrankungen entwickelt werden, die gezielt an den krankheitsverursachenden genetischen Faktoren ansetzen. Damit wird eine bessere individuelle Pharmakotherapie erreicht.

5 Literatur

Alemayehu A, Breen L, Printz MP (2002): A new inbred Wistar-Kyoto rat substrain exhibiting apparent salt sensitivity and borderline hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1181-90.

Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, Boomsma D et al. (2009): Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet* 41: 5-6.

Baker EH, Ireson NJ, Carney C, Markandu ND, MacGregor GA (2001): Transepithelial Sodium Absorption Is Increased In People of African Origin. *Hypertension* 38: 76-80.

Beckmann JS, Weber JL (1992): Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12: 627-631.

Beekman M, Heijmans BT, Martin NG, Whitfield JB et al. (2003): Evidence for a QTL on chromosome 19 influencing LDL cholesterol levels in the general population. *Eur J Hum Genet* 11: 845–850.

Borch- Johnson K, Feldt- Rasmussen B, Strandgaard S, Schroll M and Jensen JS (1999): Urinary albumin excretion. An independent predictor of ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1992-1997.

Bottger A, van Lith HA, Kren V, Krenova D, Bila V, Vorlicek J, Zidek V, Musilova A, Zdobinska M, Wang JM, van Zutphen BFM, Kurtz TW, Pravenec M (1996): Quantitative Trait Loci Influencing Cholesterol and Phospholipid Phenotypes Map to Chromosomes That Contain Genes Regulating Blood Pressure in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Clin Invest* 98: 856-862.

Brenner BM, Garcia DL, Anderson S (1988): Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1: 335-47.

Burt DW, Bumstead N, Bitgood JJ, Ponce de Leon FA, Crittenden LB (1995): Chicken genome mapping: a new era in avian genetics. *Trends Genet.* 11: 190-4. Review.

Clausen P, Jensen JS, Jensen G, Borch- Johnsen K, Feldt- Rasmussen B (2001): Elevated urinary albumin excretion is associated with impaired arterial dilatory capacity in clinical healthy subjects. *Circulation* 103: 1869- 1874.

Cowen LA, Harold MR, Chen CM, Abbott RE, Schachter D (1991): Immunoglobulin and renal abnormalities in Dahl genetically hypertensive rat. *Am J Physiol* 1991: 261: H1895-902.

Deckert T, Feldt- Rasmussen B, Borch- Johnson K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A (1989): Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. *Diabetologia* 32: 219- 26.

Feldstein A, Krier JP, Sarafow MH, Lerman A, Best PJ, Wilson SH, Lerman LO (1999): In vivo renal vascular and tubular function in experimental hypercholesterolemia. *Hypertension* 34: 859- 64.

Feldt LG, Van Liew JB, Galaske RG, Boylan JW (1977): Selectivity of renal injury in the spontaneously hypertensiv rat. *Kidney Int* 12: 332- 343.

Ferrari P, Bianchi G (2000): Genetic Mapping and Tailored Antihypertensive Therapy. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 2000 14: 387-395.

Garrett M R, Saad Y, Dene H, Rapp JP (2000): Blood pressure QTL that differentiate Dahl salt-sensitive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol Genomics* 3: 33-38.

Garrett M R, Dene H, Rapp JP (2003): Time-Course Genetic Analysis of Albuminuria in Dahl Salt-Sensitive Rats on Low-Salt Diet. *J Am Soc Nephrol* 14: 1175-1187.

Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, Halle JP, Young J, Rashkow A, Joyce C, Nawaz S and Yusuf S (2001): Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *Jama* 286: 421-6.

Gill K, Deslauniers N, Desjardins P, and Lake K (1998): Alcohol preference in AXB/BXA recombinant inbred mice: gender differences and gender-specific quantitative trait loci. *Mamm Genome* 9: 929-935.

Green NJ, Howie AJ, Rayner HC, Walls J (1992): Effect of cholesterol on the position of segmental Lesions in unilaterally nephrectomized rats. *J Pathol* 168: 331- 4.

Hamet P, Kaiser MA, Sun Y, Page V, Vincent M, Kren V; Pravenec M, Kunes J, Tremblay J, Samani NJ (1996): HSP27 locus cosegregates with left ventricular mass independently of blood pressure. *Hypertension* 28: 1112-1117.

Hamet P, Pausova Z, Adarichev V, Adaricheva K, Tremblay J (1998): Hypertension: genes and environment. *J Hypertens.* 16: 397-418. Review.

Herrera VLM, Makrides SC, Xie HX, Adari H, Krauss RM, Ryan US, Ruiz-Opazo N (1999): Spontaneous Combined Hyperlipidemia, Coronary Heart Disease And Decreased Survival In Dahl Salt-Sensitive Rats Transgenic For Human Cholysteryl Ester Transfer Protein. *Nature Medicine* 5: 1383-9.

Herrera VLM, Didishvili T, Lopez LV, Zander K, Traverse S, Gantz D, Herscovitz H, Ruiz-Opazo N (2001): Hypertension exacerbates coronary heart disease in transgenic hyperlipidemic Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Mol Med* 7: 831-844.

Herrera VLM, Didishvili T, Lopez LV, Ruiz-Opazo N (2002): Differential regulation of functional gene clusters in overt coronary artery disease in a transgenic atherosclerosis-hypertensive rat model. *Mol Med* 8: 367-375.

Herrera VLM, Didishvili T, Lopez LV, Myers RH, Ruiz-Opazo N (2004): Genome-Wide scan identifies novel QTLs for cholesterol and LDL Levels in F2 [Dahl RxS]-intercross rats. *Circulation Research* 5: 446-52.

Hübner N, Kreutz R, Lindpaintner K. (1994): Strategies for the identification of chromosomal loci associated with hypertension in hereditary hypertensiv rats. In: Ganten D and de Jong W, ed. Handbook of Hypertension; *Elsevier Science B. V.* 16: 173-185.

lordache BE, Imberti O, Foglieni C, Remuzzi G, Bertani T, Remuzzi A (1994): Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular capillary wall ultrastructure in MWF/ Ztm rats. *J Am Soc Nephrol* 5: 1378-1384.

Jensen JS, Feldt- Rasmussen B, Strandgaard S, Schroll M, Borch- Johnsen K (2000): Arterial hypertension, microalbuminuria and risk of ischemic heart disease. *Hypertension* 35: 898-903.

Kannel WB (2000): Elevated systolic bloodpressure as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 85: 251-255.

Kasiske BL, O'Donnell MP, Schmitz PG, Kim Y, Keane WF (1990): renal injury of diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Kidney Int* 37: 880- 91.

Kreutz R, Hübner N, Ganten D, Lindpaintner K: Bluthochdruck. Die beteiligten Gene und ihre Bedeutung, in Fischer EP, Geissler E (1994): *Wieviel Genetik braucht der Mensch. Die alten Träume der Genetiker und ihre heutigen Methoden.* Konstanz, *Konstanzer Bibliothek*: 239-252.

Kreutz R, Paul M, Ganten D (2000): Hypertonie. In: Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H: *Die Innere Medizin.* Stuttgart, 10. Aufl., Stuttgart, New York: *Schattauer*, Kap. 6.10: 377-399.

Kreutz R, Kovasevic L, Schulz A, Rothermund L, Ketteler M, Paul M (2000). Effect of high diet on spontaneous hypertension in a genetic rat model with reduced nephron number. *J Hypertens* 18: 777-782.

Kreutz R, Siegel A-K, Schulz A, Ganten D (2004): Genetische Faktoren, in Rosenthal J, Kolloch R (Hrsg): *Arterielle Hypertonie*. 4. Aufl., Heidelberg; Berlin: Springer, Kap. II. 2.

Kurtz TW, Morris RCJ (1985): Hypertension in the recently weaned Dahl salt-sensitive rat despite diet deficient in sodium chloride. *Science* 230: 808-810.

Kurtz TW, St Lezin EM, Pravenec (1994): M. Genetic Models of Hypertension. Development of Hypertension Strains. Textbook of Hypertension, edited by J.D. Swales. Oxford, UK, Blackwell: 441-447.

Kurtz TW, Spence MA (1993): Genetics of essential hypertension. *Am J Med* 94: 77-84. Review.

Kurtz TW, Gardner DG (1998): Transcription-modulating drugs: a new frontier in the treatment of essential hypertension; *Hypertension* 32: 380-6. Review

Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) : MAPMAKER. An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.

Lander ES, Botstein D (1989): Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-99. Erratum in: *Genetics* 136: 705.

Lander ES, Schork NJ (1994): Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-48. Review. Erratum in: *Science* 266: 353.

Lander E, Kruglyak L (1995): Genetic dissection of complex traits: guidelines of interpreting and reporting linkage results. *Nature Genet* 11: 241-247.

Lifton PR, Gharavi AG, Geller DS (2001): Molecular Mechanisms of Human Hypertension. *Cell* 104: 545-556.

Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R et al. (2007); Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension; European Society of Cardiology. *J Hyperten* 25: 1105-87.

Mann J, Oddou P (2001): Ongoing clinical trials in systemic hypertension. *Expert Opin Investig Drugs* 10: 2031-7 Review.

Macconi D, Ghilardi M, Bonassi ME, Mohammed EI, Abbate M, Colombi F, Remuzzi G, Remuzzi A (2000): Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats; *J Am Soc Nephrol* 11: 477-489.

Mosterd A, d'Agostino RB, Silbershatz H, Sytkowski PA, Kannel WB, Grobbee DE, Levy D (1999): Trends in prevalence of hypertension, antihypertensive therapy, and left ventricular hypertrophy from 1950 to 1989. *N Eng J Med* 340: 1221-1227.

Murayama S, Yagu S, Higo K, Ye C, Mizuno T, Oyabu A, Ito M, Morita H, Maeda K, Serikawa T, Matsuyama M (1998). A genetic locus susceptible to overt proteinuria in BUF/Mna rat. *Mamm Genome* 9: 886-888.

O'Donnell MP, Kasiske BL, Katz SA, Schmitz PG, Keane WF (1992): Lovastatin but not enalapril reduces glomerular injury in Dahl salt-sensitive rats; *Hypertension* 20: 401-410.

Ogihara T, Asano T, Ando K, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Onishi Y, Fujishiro M, Abe M, Fukushima Y, Kikuchi M, Fujita T (2002): High-salt diet enhances insulin signaling and induces insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats; *Hypertension* 40: 83-9.

Pedrinelli R, Dell'Omo G, Penno G and Mariani M (2001): Non-diabetic microalbuminuria, endothelial dysfunction and cardiovascular disease; *Vasc Med* 6: 257-64.

Poyan Mehr A, Siegel AK, Schulz A, Plehm R, de Brujin JA, de Heer E, Kreutz R (2003): Early onset albuminuria in Dahl rats is a polygenetic trait that is independent from salt loading. *Physiol Genomics* 14: 209-216.

Tolins JP, Stone BG, Raji L (1992): Interactions of hypercholesterolemia and hypertension in initiation of glomerular injury; *Kidney Int* 41: 1254- 61.

Rapp PJ (2000): Genetic Analysis of Inherited Hypertension in the Rat. *Physiol Rev* 80: 135-172.

RatMap: The Rat Genome Database; Rat Strains-Details; SHR/ SS; (<http://ratmap.org/ShowStrainDetails.html>).

Reaven GM, Twersky J, Chang H (1991): Abnormalities of carbohydrate and lipid metabolism in Dahl rats; *Hypertension* 18: 630- 635.

Reaven GM, Chang H (1991): Relationship between blood pressure, plasma insulin and triglyceride concentration, and insulin action in spontaneous hypertension and Wistar-Kyoto rats; *Am J Hypertens* 4: 34- 38.

Rothermund L, Luckert S, Kossmehl P, Paul M, Kreutz R (2001): Renal endothelin ET(A)/ET(B) receptor imbalance differentiates salt-sensitive from salt-resistant spontaneous hypertension. *Hypertension* 37: 275-80.

Ruilope LM, Rodicio JL (2001): Renal participation in cardiovascular risk in essential hypertension. *Blood Press.* 10: 322-6.Review.

Schork NJ, Nath SP, Lindpaintner K, Jacob HJ (1996): Extensions to quantitative trait locus mapping in experimental organisms. *Hypertension* 28: 1104-11.Review.

Schulz A, Standke D, Kovacevic L, Mostler M, Kossmehl P, Stoll M, Kreutz R (2003): A major gene locus links early onset albuminuria with renal interstitial fibrosis in the MWF rat with polygenetic albuminuria; *J Am Soc Nephrol* 14: 3081-9.

Schulz A, Schlesener M, Weiss J, Hansch J, Wendt N, Kossmehl P et al. (2008): Protective effect of female gender on the development of albuminuria in a polygenetic rat model is enhanced further by replacement of a major autosomal QTL. *Clin Sci (Lond)* 1144: 305-311.

Siegel AK, Kossmehl P, Planert M, Schulz A, Plehm R, de Bruijn JA, de Heer E, Kreutz R (2003): Early onset albuminuria in Dahl rats is a polygenetic trait that is independent from salt loading. *Physiol Genomics* 15: 209-16.

Silbernagl S, Lang F; Taschenatlas der Pathophysiologie (1998); *edited by Thieme-Verlag ISBN 3-13-102191-8*.

Stallings RL, Ford AF, Nelson D, Torney DC, Hildebrand CE, Moyzis RK (1991). Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10: 807-815.

Sterzel RB, Luft FC, Gao Y, Schnermann J, Briggs JP, Ganten D, Waldherr R, Schnabel E, Kritz W (1988): Renal disease and the development of hypertension in salt-sensitive Dahl rats. *Kidney Int* 33: 1119-1129.

Tian N, Moore RS, Braddy S, Rose RA, Gu JW, Hughson MD et al.: Interactions between oxidative stress and inflammation in salt-sensitive hypertension (2007): *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2936: H3388-H3395.

Vanecková I (2002): Function of the isolated perfused kidney in young and adult spontaneously hypertensive and Dahl salt-sensitive rats. *Kidney Blood Press Res* 25: 315-321.

Verseput GH, Provoost AP, van Tol A, Koomans HA, Joles JA (1997): Hyperlipidemia is secondary to proteinuria and is completely normalized by angiotensin-converting enzyme inhibition in hypertensive fawn-hooded rats. *Nephron* 77: 346-352.

Wang X, Ishimori N, Korstanje R, Rollins J, Paigen B (2005): Identifying novel genes for atherosclerosis through mouse-human comparative genetics. *Am J Hum Genet* 77: 1-15.

Wendt N, Schulz A, Qadri F, Bolbrinker J, Kossmehl P, Winkler K et al. (2008): Genetic analysis of salt-sensitive hypertension in Dahl rats reveals a link between cardiac fibrosis and high cholesterol. *Cardiovasc Res* 81:618-26.

Williams RR, Hunt SC, Hopkins PN, Wu LL, Hasstedt SJ, Berry TD, Barlow GK, Stults BM, Schumacher MC, Ludwig EH, et al. (1993): Genetic basis of familial dyslipidemia and hypertension: 15-year results from Utah. *Am J Hypertens* 6: 319S-327S.

World Health Organization (WHO)/ International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension 2003; *Journal of Hypertension* 21: 6.

Yamori Y, Igawa T, Tagami M, Kanbe T, Nara Y, Kihara M, Horie R (1984) : Humoral trophic influence on cardiovascular structural changes in hypertension. *Hypertension* 6: III27-32.

Yu M, Moreno C, Hoagland KM, Dahly A, Ditter K, Mistry M, Roman RJ (2003): antihypertensive effect of glucagon-like peptide 1 in Dahl salt-sensitive rats; *Journal of Hypertension* 6: 8.

Yudkin JS, Forrester RD, Jackson CA (1988): Microalbuminuria as predictor of vascular disease in non- diabetic subjects; Islington Diabetes Survey. *Lancet* 2: 530- 533

Zürcher H (2003): Charakterisierung eines bludruckregulierenden Genortes auf Chromosom X bei der Ratte. Dissertation, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie Berlin, Charité-Universitätsmedizin Berlin

6 Zusammenfassung

Die Fettstoffwechselerkrankungen stellen wesentliche Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Sie können heute zu den Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen gezählt werden und nehmen wegen ihres verstärkten Auftretens einen hohen medizinischen und gesundheitspolitischen Stellenwert ein. Die Hyperlipidämie ist Resultat verschiedener genetischer Faktoren, die miteinander interagieren, aber auch von Umweltfaktoren beeinflusst werden. Kennzeichnend ist das häufig gemeinsame Auftreten dieses Krankheitsbildes mit der essentiellen Hypertonie und der Albuminurie.

Um zu klären, ob es einen genetischen Zusammenhang zwischen Albuminurie und Fettstoffwechselstörungen gibt, wurden die zwei durch einen arteriellen Hypertonus gekennzeichneten Rattenstämme SS und SHR miteinander verglichen. Eine F₂-Population der beiden hinsichtlich der Albuminurie und Fettstoffwechsel kontrastierenden Rattenstämme von 539 Tieren wurde phänotypisch und genotypisch charakterisiert.

Aus den ermittelten Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Phänotypen Albuminurie und Hyperlipidämie bei der SS-Ratte keine Korrelation aufweisen und unabhängig voneinander genetisch determiniert sind. Diese Studie zeigt, dass der Phänotyp Hyperlipidämie in der genetischen Kopplungsanalyse mögliche Kandidatengenregionen auf den Chromosomen 2, 4, 8 und 17 besitzt. Es hat sich gezeigt, dass auf den Chromosomen 8 und 17 jeweils ein QTL mit einem starken Einfluss auf den Lod-Score für Hypertriglyzeridämie lokalisiert ist. Bei den Tieren der F₂-Generation wurde ein QTL für Albuminurie mit sehr hoher Signifikanz auf dem Chromosom 6 der SS-Ratte detektiert. Darüber hinaus wurde auf Chromosom 2 ein QTL mit wahrscheinlicher Assoziation zur Serum-Cholesterinkonzentration ermittelt.

Die identifizierten Kandidatengenregionen müssen nachfolgend einer näheren Funktionsanalyse unterzogen werden.

Fortschritte in der Forschung auf dem Gebiet der genetischen Mechanismen der Fettstoffwechselstörung liefern neue Möglichkeiten, diejenige Genexpression zu kontrollieren, die relevant für die Pathogenese der kardiovaskulären Erkrankungen und des essentiellen Hypertonus ist. Die neuen Erkenntnisse können in der

Pharmakogenetik hilfreich sein, Risikopatienten frühzeitig zu erkennen und somit eine bessere individuelle Pharmakotherapie zu ermöglichen.

7 Anhang

7.1 Polymorphe Mikrosatellitenmarker für die Intervallkartierung

Tabelle 3: Polymorphe Mikrosatellitenmarker für die Intervallkartierung bei Dahl/SS und SHR-Ratten

Primer	Sequenz Sense Primer	Sequenz antisense Primer	Annealing Temperatur
D1Rat5	TGGAAATCCACTGAGAGGTCTT	CTCCCTTCCTCCTAACCCC	55°C
D1Rat4	GCATAATTGTTTCATGGATTTGC	GTACACATGCACATGCGAGA	55°C
D1Rat167	GGCAGTTGCCTCTATTCCCTG	CCAGATCCTCGGATGAAAGA	55°C
D1Rat141	CATGCAGAAAATGCCTCTCA	CGGATGTCATAAGTTCTACTTCTGG	55°C
D1Rat150	ATCCAGTGTCAACCTTTGGC	AGAGGCAATGAAGTCCCTGA	55°C
D1Rat7	TCCCAACATCTTCCTCTTGC	GGGTGCTGGTATGTGTGTGT	55°C
D1Rat9	TTGAAAAGGGAAACAGGGTG	AGCCTCATCCTGGGATTTTT	55°C
D1Rat13	AACAATGCTTGAATGGGTC	TTCCACAGGAACCTGAGCTT	55°C
D1Rat18	CCTTCCTGGTACGTTGGGTA	CATGTCTGATGTCAGTAGGTATGG	55°C
D1Rat20	GGCCCTCACACTGTCTTCTT	GTTCCGAGGACAAAACCAGAA	55°C
D1Rat335	AGGCAAATCCCAAGAACTGA	GGCACTGGAACATAAATGCC	55°C
D1Mgh5	CCTTTGCTCTGAGCCTGG	AGAGAAAAAGAAAAGGGAAAAACG	55°C
D1Mgh6	TGCATGCCACAGTACACAT	CCAAGCACACTAATGCCTGA	TD 55-50°C
D1Rat30	AATTTCTGTCCACATTTCCC	TTCCAGGGACAAGCTACCTG	55°C
D1Mgh7	CCACACTATGTCCATGTGTACAA	GGAACTCAAAGGTAGACAAAACA	TD 55-50°C
D1Rat183	CAGAAGCAAGCACACCAGTC	TGTATTGGCTGGGAAGTTGG	55°C
D1Rat43	TCCAGTGAGTAAGCTGTGAGCT	CATCATGGAAGTGGAGCCTCC	55°C
D1Rat48	ACTCTCAGTGCTGTGGCATG	GGAGATAAATGTTAGGGTATGTGGA	55°C
D1Rat51	CCCTCAGTTCAAGAGTAACCTCA	TTGCCTGAGAGACTGTGCC	55°C
D1Rat55	TCATGTGGAAGATCAAGCCA	ATACATCCCAGCCAACTTG	55°C
D1Rat61	GTGCACATGTGTGTGCCAA	AGGTCCCATCAGGTTGACAA	55°C
D1Rat287	GGGCGTGACCAGTTACTTA	GTGCTATGGTGGGCAAGTTT	55°C
D1Rat68	TTCTGCAATGGGTCAGACAA	TTCCGAAATGTAACCGCTTT	55°C
D1Rat144	CCTCCATAATCAACAGACCCA	TTAGTAGGAAGGGCAGCACC	55°C
D1Rat71	GTACACCGGTCAGGTCAGGT	TCTCTCCTTCTTCTTTACTGCCA	55°C
D1Rat73	TGCTGGAACAACCTCTCATCCT	TCCACATGCATCTTAACCCA	55°C
D1Rat77	GCAGAGCTAAGCATGGTGGT	GATACACATACAGGCAGCGC	55°C
D1Mgh12	GCTTGCTGTACAAACCTCAGG	CAGCACGGAAGATACAAGCA	55°C
D1Rat86	AATACATGATGCTGTGGATTGG	ACCCATTCCCACACCTGTAC	55°C
D2Rat1	AGAATCTGGTCACTGGGTGG	ATGTTCTCTAGCCGCCACAT	55°C
D2Rat7	TAGACCTGTGTGCTGTTGCC	TCAGATTAGAGGGGCATTGAG	55°C
D2Rat10	CGTGGCACACCTACCACTAC	CATCCCAGGCCTCTTTTAAA	55°C
D2Rat 14	AAACCAAAGTCTGTGGCTCC	GCTAAATGGGACACCTGGAA	55°C
D2Rat19	TTTATATTCTCTCCCCGCC	CTGAGGATGTAGCTCAGCGA	55°C
D2Rat22	TAGAAGCCCATAAGCACACTCA	CCATTGGAACCTAAGCTCCACAA	55°C
D2Rat145	AGGGTGGAGTGGGAGGATAG	GTTCCAGCCAGGCTTTTCAGAC	55°C
D2Rat33	TCTAAACTGGGTTAGCAGCCA	CATCAGAAATGCCCTTCAT	55°C
D2Rat36	TGCAACACTTTCTGAAGGCA	GAGGCAGAAAATGAGCAAGC	55°C
D2Rat40	TTGGCTTTGTGAGTGAGAGTG	TGGAACCCCTAACATCGAGG	55°C
D2Rat126	GGCAGTTTTCTACGTTTTGA	CACCCTTTTCTTGCATCCAT	55°C
D2Mgh11	ACAGCACAGTGTAAAGCTCCTAGG	TCTCGTCCAACCTACAGATGG	55°C
D2Rat57	AAGCATGGGAACACACACAA	AGGCAAGTGCCTACTGAGCT	55°C
D2Rat247	GTGCAAACTCACAAAGCATCG	TGCTCTCTCACCTCCACACA	55°C

D2Rat106	CCTTTTTAGGTCCTAGACTGAACC	TCTGGAGTTTATGTTATCCGTCA	55°C
D2Mgh13	TCTGGCTGTCTATCCTGCG	AAGAGACTCCTGCGAATCTCC	55°C
D3Rat2	CCAGGAGCTTCACCTAGGGTT	TGTCCTGACAGATGATCTAAAGC	55°C
D3Rat137	AACGGGGGAGTTAAAGTTGG	CCAAGGGGTTTCTACACAA	55°C
D3Rat107	TCTGGAGCATCCAAACCAG	CAGATCCACACCGTGCAG	55°C
D3Rat78	ACGCCCCCATTCTACTTCT	GTCGGCTCAGGTTTTCTCAG	55°C
D3Mit14	CTGGACTCAACCTCCAGCAT	CTGCTGACTGACGAGCTGAG	TD 63-58°C
D3Mit13	TCCTCTTAGTAAAATTGCACGC	TCAGCCCTTCTCCTGTCTA	TD 63-58°C
D3Rat27	AAGACCCACATTCATCACGC	CCTGAAACTCACTAATTTGGCT	55°C
D3Rat173	TGACAAGCCTGACAACCTGA	AATCCAGGCCTTGCACTTAA	55°C
D3Rat75	CAGATGCTTTTTGGCTGTTG	CATGATCCAAGCCTACACCC	55°C
D3Rat44	TCACGTGGCTTCATGTTTTC	GCCTGGTGATCTACTTTGCC	55°C
D3Mgh7	CACACAGACATGTGCACAACA	GCAGGCAGTCATCCAAGAAT	TD 55-50°C
D3Rat47	CACATACGCACACACACAGAA	ACAAGTAGCACAGTGTGCC	55°C
D3Rat53	TTGTCTCTGGTTCCAGGTCC	GCTGGAAGGTACCTGTGGAA	55°C
D3Mgh9	AGTATCTCTTATTCTGTGGGCTGG	CCCCTATGAGTTTTAATGATCCC	TD 55-50°C
D4Rat2	CAAGGCTCAAAATGTGTTCCA	TAGGATGAGAATGCCCAAGG	55°C
D4Rat3	GGATGTGGACTATGGTTGGG	TTGTGACTGACAGCCTCAGG	55°C
D4Rat9	TTTATGGTTTAAATTGGTGTCTTTG	CCTTGGAAAAGTTTGACCA	55°C
D4Rat12	AAGGTCCCTGTATGACTATGGTT	AAATTGGGAAATGTTTGCTTTT	55°C
D4Rat154	TCAACAAGTAAATTTCTCTCAAGGC	TGCGTATCCAAGTAGACACTGG	55°C
D4Mgh16	CAGGAGCTGTCTGGGACTTC	GAACACTAGAGAACTAGGCAGGC	TD 60-55°C
D4Rat163	AAATGGAATGCCTTTTGCTG	TGACTGAATGCAAACCTTAGTCAA	55°C
D4Rat34	CCCTGTAGTTTAAATCTCCAAATGA	AAGAGCATAAGCACGTGCG	55°C
D4Rat39	TGGAGGCTTTTTTTTCCAA	AACCTGTGGTGAAGGAGTG	55°
D4Rat54	GAGCCCTCATGTGAGGATA	CAGGCCAGACGTCTAAGATG	55°C
D4Rat58	AGCAGCAACGGAGACAATCT	AGCAGCAACGGAGACAATCT	55°C
D4Rat62	TGGAGTCCAGTGTGGGTGTA	AGAAAAGGCAATGGGAGTGA	55°C
D4Rat67	GTCTGAGCCATCTCCTCAGC	AACCACCAGTTTCACATGCA	55°C
D4Rat69	GAGTCTCAACCCAGCCAGAG	ACTGAGCACTTGAAGGCAT	55°C
D4Rat39	TGGAGGCTTTTTTTTCCAA	AACCTGTGGTGAAGGAGTG	55°C
D4Rat94	AGCCTTTGTTCTTCAGCTGG	ACACACATGAGTACCT	55°C
D4Rat204	CACAAAATTGGTGTGCCTTG	GCACTGAAGTCAGCTTTCCC	55°C
D6Rat4	CTAATTTCCCTTCCTTAGACACC	TTCCACCCACCTCTATCTGG	55°C
D6Mgh1	TTGTTGATGTCTATGGATACCCC	ACAAAACCAGCAAATAAATGAGC	TD 55-50°C
D6Rat6	CATGGTCAACCAACTCAG	AAGGTTTGTGCTTGAGAACCA	55°C
D6Rat12	TCAAATAGAAGAGTGGGGGC	GCAAACCTCCTGATCCTCTG	55°C
D6Mgh4	CTCTGAAAGCCATAATTCCTTTAA	TTGGGACTCGTATGAACGTG	TD55-50°C
D6Rat104	TGACAAATCAAGAGAGGATCTACAA	TGACTTCTCTAGAGTTTCCAAATCA	55°C
D6Rat24	CAGCAGGAGTCATACTCACCC	GTCTTCTTCTCCTCCTCACCC	55°C
D6Rat33	GGGAAACCGACTCCCTAAAG	TGGAATGGCATAAGTGCAGA	55°C
D6Mit9	AGAGTCAGCGAAAGGCTGG	TTAATTACAATAGGGAACATTTGT	TD 58-53°C
D6Rat80	GCACCTGCATTCTATGGTT	TGTTGGCTTGAACCTTTTCA	55°C
D6Rat69	GGCGCATACCAGGATTAGTC	AGGTGTCATAGGTGCCAAGG	55°C
D6Rat108	CCAACCCGCTTTTTACCTGA	GGCAATATTCATGAATCAACTTG	55°C
D8Rat58	TTTCTAAGGTTCCAGCAAGAGTG	CCTCCCTCCTTCTTCTCCTG	55°C
D8Rat56	TTGGAAAAAAAACCCCTTCC	TGTAATAATTGCTTTGATATTGAATG	55°C
D8Rat53	TCCAGGATGCTAATGAAGG	CGCACAGGTAGGTATGCACA	55°C
D8Rat162	TCACTGGCAGCAATTTACCA	TCTGAGACCTCTCAACTCTGTTG	55°C
D8Rat46	TCCGTCTGCTGATTGAACTG	AGAGCAGCCAAAGCTTTCAA	55°C
D8Rat39	TGGGGGAGTTCTGAGTTGTT	ACAGAGCCTGTCAGCCAATT	55°C
D8Rat91	CATCTACATTCACACTCTCTCTC	TTGACCCTTGAGTGCTGATG	55°C
D8Rat30	CCTCCAGAGTCTCCAGTGCT	TCCTCACCATGTGATCCAGA	55°C
D8Rat20	CCAACCCCTCAAGGAACAAG	AAACCTCAAATGGAGGGGAC	55°C
D8Rat19	ATAACGGGTGCTGAACCATC	GGGGATGCATTTAGGACTGA	55°C
D8Rat12	TATGCATGGGAGGAAGAAGG	ACTGTAGCCGGGTGGTGAC	55°C
D8Mgh1	TTGTCTGTAAGTATGCACATGTGG	GATGAGCAGGGGCATGTC	TD 55-50°C
D8Rat69	TCAAGAGAGCAAAGGCAACA	TGGTTTCTGTGGCTTCAG	55°C

D8Rat71	TAGGGACTGCCTGTGTAGGG	GGCTTTAGTGGGTGGACAAA	55°C
D10Rat96	CCTTTGGAGACCAGGGTCTT	GACACCTGACATGTTCCCCT	55°C
D4Rat58	AGCAGCAACGGAGACAATCT	ACAGCGGCAAACAACAGTTT	55°C
D4Rat94	AGCCTTTGTTCTTCAGCTGG	ACACACATGAGTACCTGCGC	55°C
D10Rat121	CTAAGATTCCGGAGGAGTGGG	CCCACAAACATGTGCATATACA	55°C
D10Rat46	ATGACGGTTCTGCTTGCGAG	ATCCTTTGGGTTTGAAGGCT	55°C
D10Rat43	GCCACAATAATTCAGGTGGTG	CATTTGCACATTGGACCATC	55°C
D10Mit4	AGCTTGCTGCTGTCTTGACC	CTGTGGTCTGCTGGAGATAGC	TD 55-50°C
D10Rat36	CCGAGCTGCAGAAGTTACCT	TGCTCACACAGAGATGTGCA	55°C
D10Rat30	TGATAATGTGGTTAGAGGTGTGTG	TCCATTAACCCAATGTCCAAA	55°C
D10Rat29	TGGTGACAGCTAAGCGTCTG	TCCCATGATTTACATGTGG	55°C
D10Rat98	GAAGAATCAGTGTGCCACA	ATTCCATCTGGCAGATCCTG	55°C
D10Rat70	GGGGTCTGTCTCTGTTTCTC	GCCTGTATCAGCACAAATGTG	55°C
D10Rat93	TGCCTTAAGCAGAATGCAATT	TCTGACATAAGGTCACTTTGGAGA	55°C
D10Rat106	CCATTGAATCGTGGCTCTT	TGTGTAACATCTGGTGTGGG	55°C
D10Rat124	AGCGTCTGGGATTGGATTTA	AGAAAGCAGGAAATGGCTGA	55°C
D10Rat107	GTTTTCTGGGCTTCCACA	CTTCTTCCCATTATGCCAC	55°C
D10Rat99	ATGAAGTCATTGGGGGTGTG	CCTTTATCCAAAAATAGTGTGCTT	55°C
D10Mgh4	CTTCACCCTGACCCAGGTTA	ACACTGGAGACACTTTGGGG	55°C
D10Rat132	CCCTTGTCTTCTTAGCCTTAGTGA	GGGGCATGAAACACCATTAG	55°C
D10Rat6	AGCTAGCACTCTAGCCCCTT	CCAGAACTCCAATCCAAGGA	55°C
D10Rat134	TCTGCCAAGGGTTAACTGCT	CTACCGGCTCTCTGTGGAAG	55°C
D10Mgh2	TTCTTTTCAGCATCTAATAAGGG	GAGGAACACCACATGCACAC	55°C
D17Rat1	GTGGTTAGGCTCAGCCAGAG	CTTTTACTGTTCTGGGGCCA	55°C
D17Rat63	AGCATGGGATGTCAACTCAA	ATCTGGCTGTGCGCTTTGACT	55°C
D17Rat8	TTCTCTGAGGGCTCTGGAAA	GAAGCATTGCCAGACAACAC	55°C
D17Rat84	CCAATCCAAGTCTCCAGAG	TCGTCAGCCAGACTCCCTAT	55°C
D17Rat15	GACAATCAACTGTCACCCGA	CGGGGAGTGTGATGTATGTG	55°C
D17Rat17	GGTCACATGTACCTGCTTGAGA	TTGAGGCTCCAGCATATGTG	55°C
D17Rat98	TCTCATGCAATCTCTGTGTG	GCAATTTCCAAGGGAAAAAT	55°C
D17Rat36	AGCCAATGTGGATGCATGTA	ATTGCCTTGCTACTCGGTGT	55°C
D17Rat62	TCCACAGGCTCACTGCTACT	GAAAGGATGGCAGGTTTTTG	55°C
D17Rat51	ACATGCAGACAGAACATTCCT	TCCCCTGGTCAATCCATTT	55°C
D17Rat50	TGCCCCATGGTATTTTTGTT	CCTCAAAGGAGAGCAACAGG	55°C

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AE	Albuminexkretion
ANOVA	Statistische Varianzanalyse
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
[γ - ³² P]dATP	Radioaktives Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
cM	centi Morgan (Einheit für genetische Distanzen)
Chr.	Chromosom
DNA	Desoxyribonucleinsäure

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym linked immunosorbent assay
et al.	et alia
FU	Freie Universität
h	Stunde
hCETP	Cholesteryl Transfer Protein
HDL	High Density Lipoprotein
LDL	Low Density Lipoprotein
log	Logarithmus
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
μ	micro
p	p-Wert, Wert für die statistische Signifikanz
r	r-Wert, Korrelationskoeffizient
RAS	Renin-Angiotensin-System
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TD	Touch Down, PCR-Programm mit abnehmender Annealing-Temperatur
Temed	Tetramethylethylendiamin
Upm	Umdrehungen pro Minute
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WHO	World Health Organisation

8 Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

9 Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde im Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie des Campus Benjamin Franklin der Charité-Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

Für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas und der ausgezeichneten Betreuung der Arbeit danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz. Trotz hoher Arbeitsbelastung nahm er sich stets Zeit für fachliche und persönliche Fragen. Unter seiner Leitung besteht eine angenehme, kollegiale und kooperative Atmosphäre in der Arbeitsgruppe, die wesentlich zum Abschluss der Dissertation beigetragen hatte.

Mein besonderer Dank gilt vor allem Frau Dr. rer. medic. Angela Schulz, die mich sehr gut in die Grundlagen der Molekulargenetik eingeführt hat und mir immer hilfsbereit bei technischen oder fachlichen Fragen und Problemen zur Seite stand. Ich möchte mich bei ihr auch herzlich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der großen Menge ermittelter Daten bedanken. Die ausgezeichnete Betreuung von Frau Dr. Schulz hat grundlegend zur erfolgreichen Vollendung der Dissertationsarbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Ali Poyan Mehr, der mit seiner wissenschaftlichen Arbeit wesentliche Grundlagen für mein Dissertationsthema geschaffen hat.

Ich möchte mich bei Sabine Wunderlich herzlich bedanken, die mir stets freundlich und hilfsbereit bei technischen Fragen Hilfestellung gab.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. rer. medic. Anja-Kristin Siegel und Dr. rer. medic. Silke Kain danke ich für die Zusammenarbeit sowie das angenehme Arbeitsklima. Dr. rer. nat. Markus Wehland von Trebra danke ich herzlich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mir in schwierigen Zeiten zur Seite standen und auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen konnte.

10 Selbstständigkeitserklärung

Erklärung

„Ich, Victoria Müller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse der genetischen Beziehung zwischen Albuminurie und Dyslipidämie bei der salzsensitiven Dahl-Ratte“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

07.08.2012

Unterschrift