

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

DISSERTATION

Etablierung, Phänotypisierung und Genotypisierung des
kongenen Rattenstammes SHRSP.WKY-Ace

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Junge

aus Mönchengladbach

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

2. Prof. Dr. med. M. Bader

3. Prof. Dr. med. K. F. Hilgers

Datum der Promotion: 30.01.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Bluthochdruck	6
1.2	Genetische Grundlagen des Blutdrucks	7
1.3	Tiermodelle für die Untersuchung molekulargenetische Faktoren des arteriellen Blutdrucks.....	8
1.3.1	Polygenetische Rattenmodelle.....	9
1.3.2	Das polygenetische Tiermodell des SHRSP-Stammes.....	10
1.4	Molekulargenetische Strategien zur Beschreibung von QTLs bei der Ratte ...	12
1.5	Renin-Angiotensin-Aldosteron System.....	17
1.6	Zielsetzung der Arbeit	24
2	Material und Methoden.....	26
2.1	Tierexperimenteller Teil.....	26
2.1.1	Tierhaltung	26
2.1.2	Parentaltiere und Züchtung des kongenen Stammes	26
2.1.3	Tierpräparation.....	27
2.2	Genetische Untersuchungen	28
2.2.1	Genomanalyse mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker.....	28
2.3	Phänotypische Untersuchungen	32
2.3.1	Systolische Blutdruckmessung.....	32
2.3.2	Bestimmung der ACE-Aktivität im Plasma	32
2.3.3	Bestimmung der ACE-mRNA Expression	34
3	Ergebnisse	40
3.1	Genotypische Charakterisierung des kongenen Stammes.....	40
3.2	Phänotypische Charakterisierung des kongenen Stammes.....	42
3.2.1	Systolischer Blutdruck.....	42
3.2.2	Organveränderungen	43
3.2.3	Bestimmung der ACE-Aktivität im Plasma	44
3.2.4	Bestimmung der ACE-mRNA Expression	45
4	Diskussion	50
5	Zusammenfassung	62
6	Ausblick.....	64
7	Literaturverzeichnis	65
8	Anhang.....	80
8.1	Materialien.....	80
8.1.1	Chemikalien und Radionukleotide.....	80
8.1.2	Enzyme	81
8.1.3	Primer und Sonden für die TaqMan-PCR	81

8.1.4	Kits	81
8.1.5	Puffer, Lösungen und Medien	82
8.1.6	Sonstige Materialien und Futtermittel	83
8.1.7	Geräte	84
8.1.8	Internetseiten	85
8.2	Marker für die Genomanalyse	85
8.2.1	Polymorphe Marker Chromosom 10	85
8.2.2	Alle getesteten Primer für die Fragmentanalyse Chromosom 10.....	86
8.2.3	Polymorphe Marker für die Genomanalyse.....	87
8.2.4	Lokalisation Marker Chromosom 10.....	90
8.3	Gensequenzen	92
8.4	Danksagung	94
8.5	Publikationsverzeichnis	95
8.6	Lebenslauf.....	96
8.7	Erklärung über Selbstständigkeit.....	97

Abkürzungen

[α - ³² P]-CTP	radioaktives Cytidintriphosphat
[α - ³² P]-UTP	radioaktives Uraciltriphosphat
[γ - ³² P]-ATP	radioaktives Adenosintriphosphat
[α - ³² P]-GTP	radioaktives Guanosinphosphat
A, C, G, T, U	Stickstoffbasen Adenosin, Cytidin, Guanosin, Thymin, Uracil
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
ADH	antidiuretisches Hormon = Vasopressin
Agt	Angiotensinogen
Agtr	Angiotensin II Rezeptortypen
Agtr1	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
Agtr2	Angiotensin II Rezeptor Typ 2
AngI	Angiotensin I
AngII	Angiotensin II
ANOVA	Statistische Analyse der Varianz
ANP	Atriales natriuretisches Protein
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
AS	Antisense (-Primer)
bp	Basenpaare (Maßeinheit für die Anzahl von Nukleotiden)
BC	Back cross
<i>BP/SP-1</i>	Blutdruck-QTL auf Chromosom 10 der Ratte, nachgewiesen bei WKY
BNP	Brain natriuretic protein
°C	Grad Celsius
(Ca) _n	Repetitive Dinukleotidsequenz
Ci	Curie
cDNA	kodierende, komplementäre (revers transkribierte) Desoxyribonukleinsäure
CDS	coding sequence (kodierende Sequenz)
cM	centi Morgan (Einheit für die genetische Kartierung)
(d)dATP	(Di)Desoxyadenosintriphosphat
(d)dCTP	(Di)Desoxycytidintriphosphat
(d)dGTP	(Di)Desoxyguanosintriphosphat
(d)dNTPs	(Di)Desoxynukleotidtriphosphate
(d)dTTP	(Di)Desoxythymidintriphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>et al.</i>	<i>et alteres</i>
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
F ₁ -/F ₂ - Generation	erste / zweite Folgegeneration
GenBank	Datenbank aller der Öffentlichkeit zugänglichen Gensequenzen, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
g	Gramm
h	Stunde

HD	von Kolonien an der Universität Heidelberg abstammend
IE	Internationale Einheit
K1/K2	Kreuzung 1 / Kreuzung 2
Kb	Kilobasen (= 1000 bp, Maßeinheit für die Anzahl von Nukleotiden)
kD	Kilodalton (= 1000 Dalton, Maßeinheit für das Molekulargewicht)
L	Liter
LM	Längenmarker, Längenstandard für DNA- und RNA-Moleküle
LOD	Logarithm of the odds
M	Mol, molar
m	Milli
μ	Micro
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Boten- (messenger) Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
N	nano
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickoxyd
NOS (e, i, n)	NO-Synthase (endothelial, induzierbar, neuronal)
OD	optische Dichte
p	Wert für die statistische Signifikanz
P-Generation	Parentalgeneration
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
pmol	picomol
QTL	Quantitative Trait Locus / Loci
RAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rad	radiation absorbed dose, 1 rad ≅ 0,01 Gy (Gray)
Ren	Renin (kodierendes Gen)
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsen	RNA zersetzende Enzyme mit ubiquitärem Vorkommen
RT	reverse Transkription / Transkriptase
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
S	Sense (-Primer)
SBD	systolischer Blutdruck
sec.	Sekunde
Seq.	Sequenzierung
SHR	spontan hypertensive Ratte
SHRSP	zum Schlaganfall neigende spontan hypertensive Ratte
SHRSP _{HD}	SHRSP Stamm gezüchtet in Heidelberg
SNP	single nucleotide polymorphism= Basenpaardifferenzen
SSLP	simple sequence length polymorphism
T	Temperatur
T _a	Annealing-Temperatur

t	Zeit
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TD	touch down (PCR-Programm mit abnehmenden Annealing-Temperaturen)
U	Unit (Maßeinheit für die Enzymaktivität)
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vs.	versus
W	Watt
WKY	Wistar-Kyoto Ratte
WKY-0 _{HD}	Wistar-Kyoto Kolonie gezüchtet in Heidelberg
Xh, Xn	X-chromosomales hypertensives (h) und noromotensives (n) Allel
Yh, Yn	Y-chromosomales hypertensives (h) und noromotensives (n) Allel

1 Einleitung

1.1 Bluthochdruck

Die arterielle Hypertonie ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen des Menschen (Burt, 1995). Sie stellt einen der Hauptrisikofaktoren bei der Morbidität und Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen wie Schlaganfall, koronarer Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), Herzinsuffizienz oder Niereninsuffizienz (Mosterd et al., 1999) dar. Aufgrund der veränderten Bevölkerungsstruktur und der starken Zunahme der Hypertonieprävalenz im Alter auf 40-45% (Kaplan, 1998) zählt die Hypertonie laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zu den bedeutsamsten Erkrankungen und zu der größten medizinischen Herausforderung der westlichen Welt.

Die arterielle Hypertonie kann nach der Ätiologie, der Blutdruckhöhe und dem kardiovaskulären Risiko des Patienten klassifiziert werden (WHO, 1999). Ätiologisch lassen sich die primäre und die sekundäre Hypertonieform voneinander abgrenzen. Während bei der sekundären Hypertonie, die nur in etwa 5-10% der Fälle vorliegt, ein ursächlicher pathogenetischer Mechanismus identifiziert werden kann, ist die Ätiologie bei den restlichen 90% der Fälle unbekannt und wird als primäre oder essentielle Form bezeichnet (Kaplan, 1998). Neben umweltbedingten und demographischen Faktoren spielen genetische Faktoren eine bedeutende Rolle auf die phänotypische Variation der Hypertonie. Ein genetischer Einfluß auf den Blutdruck wurde zuerst von Weitz beschrieben, der im Rahmen von Familienuntersuchungen feststellte, dass der prozentuale Anteil der an hypertoniieerkrankten Nachkommen höher bei betroffenen Familien war als in der Gesamtbevölkerung (Weitz, 1923). In den 60er Jahren vertrat Platt die Hypothese, dass der Blutdruck auf einen einzelnen autosomal-rezessiven Genort zurückzuführen ist und den Regeln des Mendelschen Vererbungsmuster folgt (Platt, 1963). Pickering postulierte 1972 jedoch den Blutdruck als quantitatives Merkmal, dessen Ausprägung nicht nur durch ein Gen, sondern durch eine Vielzahl von Genen determiniert wird und mit der kardiovaskulären Mortalität in quantitativer Beziehung steht (Pickering, 1972). Die quantitative Erfassung des Phänotyps erlaubte rasch die Erkenntnis, dass die Regulation des arteriellen Blutdrucks multifaktoriell ist, d.h. durch die kombinierte Wirkung einer Vielzahl von Genen und äußeren Faktoren determiniert (Mongeau, 1986). Grundlage für diese Erkenntnis waren u.a. in den 50er und 60er Jahren durchgeführte Adoptions-, Geschwister- und Zwillingsstudien. Dabei konnte

gezeigt werden, dass genetische und äußere Einflüsse etwa zu gleichen Teilen zur Genese der Erkrankungen beitragen (Ward, 1990).

1.2 Genetische Grundlagen des Blutdrucks

Im Gegensatz zu monogenetischen Erkrankungen wie die zystische Fibrose (defekte Chloridkanäle auf Epithelzellmembranen, verursacht durch einen Gendefekt auf Chromosom 7), die eine qualitative Merkmalsausprägung im Sinne des „Alles-oder-Nichts“ Prinzips darstellen, präsentiert sich die Hypertonie als quantitatives Merkmal. Die genetischen Ursachen der quantitativen Merkmale liegen oft in den kumulativen Effekten, die mehrere Genorte auf den Phänotyp auslösen können. Die Genorte, die einen Einfluss auf den Phänotyp ausüben, werden als „Quantitative Trait locus (QTL)“ bezeichnet. Ein QTL beschreibt eine breite chromosomale Region, die einen oder mehrere Genorte enthalten kann und ein quantitatives Merkmal bestimmt bzw. an dessen Kontrolle teilnimmt (Rapp, 2000). Ein großer Anteil der Blutdruckvariationen scheint genetisch bedingt zu sein. Die Expression des Phänotyps stellt das Resultat des Zusammenwirkens verschiedener genetischer Veränderungen dar. Berücksichtigt man diverse andere Faktoren wie etwa die Phänomene der Epistasie (interaktiver Effekt von nichtallelen Genen auf einen Phänotyp), die Pleiotropie (simultaner Effekt eines Gens auf mehrere Phänotypen; Schork, 1996) oder diverse exogene Faktoren, die die Auswirkungen der Hypertonie signifikant modulieren können, wird man der Komplexität dieses quantitativen Merkmals erst vollständig gerecht. Die Beeinflussung des Phänotyps durch Umweltfaktoren gilt nicht nur für die Betrachtung des phänotypischen Endzustandes, sondern auch für die intermediären Phänotypen, die auch ihrerseits von diversen exogenen Faktoren beeinflusst werden und so den Ausprägungsgrad des phänotypischen Endzustandes verändern können. Folglich unterliegt die essentielle Hypertonie einer multifaktoriellen Pathogenese, deren klinische Heterogenität sich aus komplexen Interaktionen zwischen genetischen und Umweltfaktoren zusammensetzt. Neben den Interaktionen der einzelnen blutdruckrelevanten QTL kann es auch zu Beeinflussungen der Hypertonie durch chromosomale Regionen kommen, die verwandte pathophysiologische Mechanismen und Endorganschäden, wie kardiale Hypertrophie, Schlaganfall oder renale Erkrankungen, determinieren (Rapp, 2000). So sind zum Beispiel QTL-Regionen entdeckt worden, die das linksventrikuläre Herzgewicht in Abhängigkeit vom Blutdruck

beeinflussen (Innes, 1998). Analog sind in einer Analyse der F₂-Generation aus der Kreuzung von SHRSP und WKY-0 chromosomale Regionen gefunden worden, die eine signifikante Kopplung mit dem Phänotyp Schlaganfall vorweisen, aber nicht einer Region zuzuordnen sind, die als QTL für die Hypertonie beschrieben ist (Ikeda, 1996). Bei der Untersuchung einer F₂-Generation aus der Kreuzung zwischen SHRSP und SHR konnten die blutdruckrelevanten genetischen Unterschiede zwischen den Parentaltieren auf ein Minimum reduziert werden und schlaganfallrelevante QTL in einem hypertensiven Hintergrund untersucht werden (Rubattu, 1996). Bei dieser Kopplungsanalyse konnten drei prädisponierende QTL Regionen identifiziert werden, die unabhängig vom Blutdruck den Phänotyp beeinflussen.

1.3 Tiermodelle für die Untersuchung molekulargenetische Faktoren des arteriellen Blutdrucks

Hypertensive Tiermodelle stellen in der Molekulargenetik eine attraktive Alternative dar, da sie eine reduktionistische Betrachtung komplexer Phänotypen erlauben (Rubattu, 1995). Genetische und exogene Faktoren und deren vielschichtige Interaktionen lassen sich durch Kontrolle der Zucht- und Umweltbedingungen gezielt minimieren. Primär wurden solche Versuche etabliert, um physiologische Mechanismen, die zur Hypertonie führen, eingehender zu untersuchen. Während der letzten beiden Jahrzehnten wurden viele neue Tiermodelle, wie etwa das kongene, transgene oder rekombinante Modell, etabliert, um die Entdeckung hypertonierelevanter Genorte zu forcieren. Viele genetische Studien, insbesondere genomweite Untersuchungen, sind seitdem an verschiedenen Rattenmodellen durchgeführt worden und haben zwar zur Entdeckung mehrerer Genorte geführt, die in der Blutdruckregulation involviert sind (Luft, 1999; Cusi, 1998), jedoch sind die Funktion und die pathophysiologische Bedeutung bezüglich der Hypertonie bei vielen Genen noch nicht eindeutig geklärt. Daher ist es neben der Isolation und Beschreibungen der Kandidatengenregionen auch unerlässlich, ihre Funktion und Bedeutung in der Pathogenese zu klären. Somit ist es notwendig, nach der Entdeckung der Gene und Beschreibung ihrer Funktion in weiteren Schritten diese neu erworbenen Kenntnisse in den humanen Kontext zu übertragen. Mit Hilfe des homologen Konzeptes können so Chromosomenkarten verschiedener Spezies mit den humanen Karten in Verbindung gebracht und die gefundenen Kandidatengenregionen auf den humanen Chromosomensatz extrapoliert werden. Wenn die homologe Region

beim Menschen identifiziert worden ist, müssen Populationsstudien durchgeführt werden, um die Rolle bei der Hypertonie im menschlichen Kontext zu klären (Julier, 1997).

Die Ratte hat sich zum wichtigsten Tiermodell in der kardiovaskulären Forschung etabliert (Gill, 1989; Pinto, 1998), da sie im Vergleich zu anderen Versuchstieren entscheidende Vorteile hat. Neben einer kurzen Generationszeit, optimalen Zucht- und Haltungsbedingungen besitzt die Ratte auch eine adäquate Körpergröße, um neben den genetischen Studien ohne großen Aufwand auch physiologische, biochemische und hämodynamische Studien durchführen zu können. Aufgrund der intensiven genetischen Studien ist es gelungen, das Rattengenom zu entschlüsseln und eine detaillierte Karte mit einer dichten Markeranordnung über das gesamte Rattengenom zu erstellen. Erst durch diese genaue Kartierung ist es möglich geworden, mittels Genomscreening blutdruckrelevante Kandidatengene zu lokalisieren. Zum jetzigen Zeitpunkt sind mit Hilfe der Kosegregationsanalyse zahlreiche QTL auf nahezu allen Chromosomen gefunden worden. Da sie bei unterschiedlichen Rattenmodellen eine Auswirkung auf die Blutdruckregulation haben, liegt die Vermutung nahe, dass ihnen eine generelle Relevanz in der Regulation zuteil kommt.

1.3.1 Polygenetische Rattenmodelle

Durch die Herstellung ingezüchteter homogener Rattenstämme wird das Problem der genetischen Heterogenität vermieden. Die Stämme können so unter kontrollierten Umweltbedingungen untersucht werden. Tiere, die den gewünschten Phänotyp aufweisen, werden selektiv über mehrere Generationen miteinander verpaart. Um die gewünschte genetische Konstellation zu fixieren und eine genetische Homozygotität zu erreichen, werden schließlich Bruder-Schwesterpaarungen konsekutiv über 20 Generationen hinweg durchgeführt. Analog kann zu dem Stamm, der den gewünschten Phänotyp aufweist, ein Referenzstamm gezüchtet werden, der diesen Phänotyp nicht trägt (z.B. hyper- oder normotensiv).

In der experimentellen Blutdruckforschung sind auf diese Art und Weise viele verschiedene Tiermodelle mit unterschiedlichen Kandidatengenregionen und Phänotypen beschrieben worden. Die spontane hypertensive Ratte (SHR) stellt eine der meist untersuchten Tiermodelle in der molekulargenetischen hypertensiven Forschung dar. Dieser Rattenstamm wurde ausgehend von Wistar-Ratten selektiv für die Entwicklung von spontan hohen Blutdruckwerten ingezüchtet (Okamoto, 1963). Dieser

ingezüchtete Stamm entwickelt im postnatalen Verlauf ab der 6. Woche eine arterielle Hypertonie, die ab der 10. Woche manifest wird. Dabei wird ein distinkter geschlechtsabhängiger Dimorphismus mit höheren Blutdruckwerten in der männlichen Population beobachtet. Die hypertensiven Komplikationen im Rattenmodell können mit den humanen hypertensiven Komplikationen verglichen werden. Die hauptsächlich auftretenden pathophysiologischen Mechanismen bestehen in einem erhöhten totalen peripheren Widerstand, verstärkter Sympathikusaktivierung und strukturellen kardiovaskulären Veränderungen wie zum Beispiel Myokardhypertrophie (Volpe, 1994). Die SHR-Population diente im weiteren Verlauf als Ausgangspunkt für die Etablierung weiterer Stämme durch selektive Züchtung. Jeder dieser Unterstämme trägt folglich genetische Faktoren, die für den jeweiligen Phänotyp verantwortlich sind und repräsentiert somit bedeutsame Modelle für das Verständnis pathogenetischer Mechanismen hypertensiver Komplikationen.

1.3.2 Das polygenetische Tiermodell des SHRSP-Stammes

Der SHRSP-Stamm ist durch eine höhere Anfälligkeit für Schlaganfälle charakterisiert. Zur genaueren Untersuchung der Inzidenz dieses Phänotyps wurde ein Unterstamm ingezüchtet und als stroke-prone SHR (SHRSP) bezeichnet (Okamoto, 1974). Die SHRSP-Ratten entwickeln schon sehr früh einen systolischen Blutdruckanstieg mit Werten bis zu 240 mmHg. Die außergewöhnlich hohen Blutdruckwerte werden neben einer gesonderten genetischen Veranlagung (s.u.) für die fast 100%ige Inzidenz an Schlaganfällen verantwortlich gemacht (Yamori, 1994). Diese Folge der malignen Hypertonie konnte pathologisch durch Autopsie des Gehirns bestätigt werden. Grundlagen dieses Phänotyps scheinen eine initiale neurogene Vasokonstriktion mit Anstieg des peripheren Gefäßwiderstandes und nachfolgende strukturelle Gefäßwandveränderung zu sein. Die Überlebenszeit nach Auftreten der initialen Symptomatik eines Schlaganfalls beträgt wenige Tage bis zu 24 Wochen (Okamoto, 1974). Die durchschnittliche Lebenserwartung liegt bei den Männchen bei 33 - 41 Wochen, bei den Weibchen, die dem Insultereignis resistenter gegenüber zu sein scheinen, mehr als 66 Wochen. Die Insultinzidenz, Endorganschäden und der letale Verlauf werden signifikant durch eine Salzbelastung beeinflusst. Vor Auftreten des Insultereignisses zeigen SHRSP-Tiere bei Salzbelastung typische diffuse Gefäßveränderungen (Volpe, 1990). Diverse Faktoren scheinen an der Pathogenese

der vaskulären Komplikationen beteiligt zu sein. Zu diesen Faktoren gehören Veränderungen des extrazellulären Volumens (Möhring, 1972), die erhöhte vaskuläre Ansprechbarkeit auf Druckveränderungen (Lais 1974), endotheliale Dysfunktion (Lüscher 1986), erhöhte Sympathikusaktivität (Dietz 1984), Veränderung der renalen Hämodynamik (Nagaoka 1981) oder Veränderungen in hormonellen Systemen. Als Beispiel sei hier das RAS zu erwähnen.

Die genetische Komponente für die Insultanfälligkeit wurde durch eine Genomuntersuchung einer F₂-Population aus der Kreuzung von SHR und SHRSP Ratten analysiert (Rubattu, 1996). Mit diesem Züchtungsprotokoll ist die Existenz von primären, blutdruckunabhängigen genetischen Faktoren, die für ein Insultgeschehen prädisponieren, nachgewiesen worden. Da die untersuchte Population aus einer Kreuzung von zwei hypertensiven Stämmen, die den gleichen Zucht- und Umweltbedingungen ausgesetzt waren, hervorging, konnten somit zwei bedeutende Faktoren, die die Schlaganfallinzidenz beeinflussen können - die arterielle Hypertonie und diätetische Faktoren - ausgeschlossen werden. In dieser Untersuchung wurden drei QTL-Regionen entdeckt, die beweisend für die Existenz genetischer und von der Hypertonie unabhängiger Faktoren für das Insultgeschehen sind (*STR-1* auf Chromosom 1, *STR-2* auf Chromosom 5 und *STR-3* auf Chromosom X). Die SHRSP-Population weisen aus experimenteller Sicht mehrere Besonderheiten auf. So bieten diese Tiere die einmalige Möglichkeit, vaskuläre Komplikationen der arteriellen Hypertonie in ihrem Verlauf zu beobachten und zugrunde liegende pathophysiologische Mechanismen aufzudecken. Desweiteren können auch die hämodynamischen Effekte einer antihypertensiven pharmakologischen oder diätetischen Therapie beobachtet werden. Somit kann nicht nur ein besseres Verständnis für die kardiovaskulären Mechanismen bei der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie, sondern auch für mögliche Therapieoptionen oder Präventionsmaßnahmen erworben werden.

Sehr häufig werden als normotensive Kontrolltiere Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) verwendet. Obwohl die SHR und SHRSP-Ratten vom selben Wistar Rattenstamm, selektiv ingezüchtet worden sind und so ein hohes Maß an genetischer Verwandtschaft anzunehmen ist, haben verschiedene Studien deutliche genetische Unterschiede zwischen WKY-Ratten aus verschiedenen Kolonien identifiziert (Johnson, 1992; St. Lezin, 1992).

1.4 Molekulargenetische Strategien zur Beschreibung von QTLs bei der Ratte

Trotz großer Fortschritte im Bereich der Molekulargenetik stellt die genetische Analyse der essentiellen Hypertonie noch immer eine große Herausforderung dar. Es ist davon auszugehen, dass ca. 40% der Blutdruckvariationen zwischen den Individuen genetisch determiniert sind (Ward, 1990). Erfolgreiche Versuche zur Identifizierung von kausalen Genregionen sind besonders in der Aufklärung der seltenen Formen der Hypertonie, der ein Mendel-Vererbungsmuster zugrunde liegt, durchgeführt worden. So konnten die Mechanismen bis auf die molekulargenetische Ebene exakt beschrieben werden (Lifton 2001).

Für die Identifizierung der molekulargenetischen Grundlagen genetisch regulierter Erkrankungen sind verschiedene Strategien etabliert worden, wie zum Beispiel die Linkage-Analyse (Kopplungsanalysen) oder die Kandidatengen-Analyse. Zur Beschreibung relevanter Genorte von komplexen polygenetischen Erkrankungen umfasst die experimentelle Strategie zunächst neben der Identifizierung die Kartierung chromosomaler Abschnitte, die ein QTL enthalten. Dies wird mit Hilfe der Kosegregationsanalyse durchgeführt. Im Anschluss daran kann zur weiteren Untersuchung die Isolation eines jeden QTL in einem separaten kongenen Stamm erfolgen.

Die Identifizierung chromosomaler Abschnitte kann mittels Kopplungsanalyse durchgeführt werden. Typischerweise werden dabei zwei Rattenstämme miteinander verpaart, die sich in dem zu untersuchenden Merkmal -hier der Blutdruck- phänotypisch unterscheiden. Die nachfolgende heterozygote F_1 -Generation ist aufgrund der Mendel-Vererbungsregeln phäno- und genotypisch nahezu identisch. In einer weiteren Kreuzung wird diese F_1 -Generation miteinander verpaart. In der nun entstandenen F_2 -Generation kosegregieren blutdruckrelevante Allele mit dem Merkmal, wohingegen vom Phänotyp unabhängige Allele auch unabhängig segregieren.

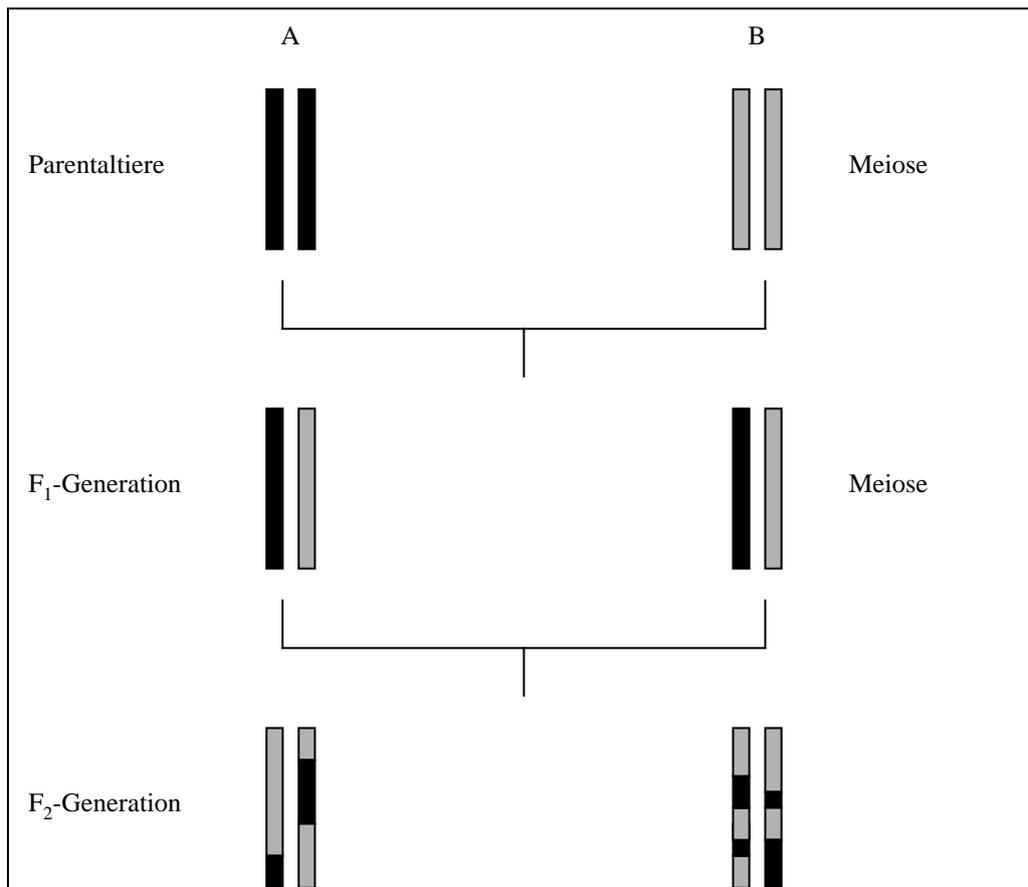


Abbildung 1: Prinzip der meiotischen Rekombination am Beispiel der Kreuzung zweier ingezüchteter Rattenstämme (A und B). Jeder vertikale Balken stellt ein Chromosom dar. Die meiotische Rekombination bleibt bei der Keimzellbildung der Parentaltiere aufgrund ihrer genetischen Homogenität ohne Auswirkung. Erst während der Meiose in der F₁-Generation kann es bei der Paarung mütterlicher (grau) und väterlicher (schwarz) Chromosomen zum Austausch genetischen Materials (Rekombination) durch „Crossing-Over“ kommen. Die Chromosomen der F₂-Tiere enthalten durch die effektive Neuordnung der Allele genetisches Material von der Mutter und vom Vater. Je weiter zwei Genorte voneinander entfernt sind, umso wahrscheinlicher ist es, daß sie während der meiotischen Rekombination voneinander getrennt werden.

Durch die Kopplungsanalyse können die QTL, die mit dem Phänotypen assoziiert sind, analysiert werden, da sie mit diesem koregrieren und ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden kann. Voraussetzung für die Analyse eines Kandidatengens ist die Kenntnis über die pathophysiologischen Mechanismen, molekularen Grundlagen und die Bedeutung des Gens für die Regulation der Blutdruckhomöostase. Mit Hilfe der Kopplungsanalyse wird untersucht, ob der Blutdruck mit einem bestimmten Allel des Kandidatengens assoziiert ist. Um noch in der Funktion unbekannte Kandidatengene aufzuspüren, wendet man die Strategie der Intervallkartierung an, bei der mittels polymorpher Marker ein Genomscreening vorgenommen wird. Die als Marker bezeichneten Mikrosatelliten bestehen aus kurzen repetitiven Nukleotidsequenzen variabler Anzahl (Di-, Tri- oder Tetranukleotidrepeats). Man bezeichnet diese ca. 80 bis 250bp langen Abschnitte auch als „simple sequence

repeats“ (SSR), „simple tandem repeats“ (STR) oder „simple sequence length polymorphisms“ (SSLP). Die repetitiven Sequenzen befinden sich häufig in dem nicht kodierenden DNA-Abschnitt und sind gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt. Bei der Detektion krankheitsrelevanter QTL bedient man sich des ubiquitären und häufig vorkommenden Dinukleotids (CA)_n. Dieses Dinukleotid ist hinsichtlich seiner variablen Länge zwischen den Rattenstämmen hochgradig polymorph und kann somit als genetischer Marker unter Anwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden (Stallings *et al.*, 1991; Beckmann *et al.*, 1992). Die Bedeutung einer solchen Analyse ist eng mit dem Angebot und der Dichte der verfügbaren molekulargenetischen Markern verknüpft. So ist es erst mit einer Vielzahl an beschriebenen polymorphen Markern möglich geworden, exaktere genetische Karten zu konstruieren. Somit kann bei der Intervallkartierung das gesamte Rattengenom im Abstand von ca. 10 cM mittels polymorphen Markern auf QTL untersucht werden, die mit dem Phänotyp kosegregieren.

Bei den ersten genomweiten Screenings zur Identifizierung von blutdruckrelevanten QTL 1991 wurden mehrere Kandidatengenregionen beschrieben (Hilbert *et al.* 1991, Jacob *et al.* 1991). Beide Arbeitsgruppen untersuchten die F₂-Generation der Verpaarung von SHRSP und WKY-Ratten mit ca. 240 Mikro- und Minisatellitenmarker und identifizierten Kandidatenregionen auf Chromosom 10, 18 und X.

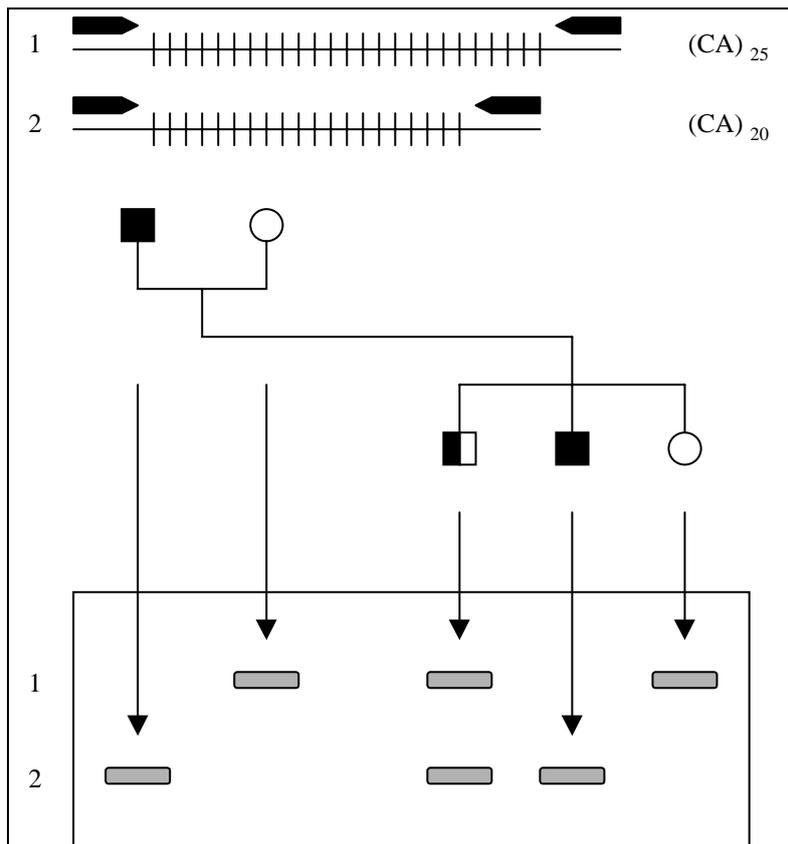


Abbildung 2: Prinzip der Anwendung von polymorphen Mikrosatellitenmarkern zur allelspezifischen Genotypisierung. Die (CA)-Dinukleotidrepeats (vertikale Linien) liegen in variabler Anzahl zwischen den Parentaltieren 1 und 2 vor und spezifizieren so aufgrund der unterschiedlichen „Repeat“-Zahl deren Allel. Flankierende Primer (Pfeilspitzen) umgeben die DNA-Marker, die mittels PCR amplifiziert werden können. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem Gel und anschließende Visualisierung (Kasten) ergibt ein Bandenmuster (graue Balken) entsprechend der von den Parentaltieren vererbten Allele (homozygot 1 oder 2 bzw. heterozygot 1+2).

Nach der Identifizierung größerer chromosomaler Abschnitte, die einen QTL enthalten, können diese zur weiteren Charakterisierung durch gezielte Züchtung in einem kongenen Rattenstamm isoliert und die Region verkleinert werden. Die Anwendung kongener Stämme erfolgte zuerst durch Snell, der das Phänomen der Histokompatibilität untersuchte (Snell 1948). Das klassische Zuchtprotokoll zur Herstellung eines kongenen Stammes besteht aus der seriellen Rückkreuzung zweier Stämme, bei der die QTL-Region selektiv vom Donorstamm auf den Rezeptorstamm transferiert wird. Kongene Stämme können in zwei verschiedene Richtungen gezüchtet werden: Es kann entweder das Allel, das für die Blutdrucksteigerung (Plusallel) verantwortlich ist, von einem hypertensiven auf einen normotensiven Stamm transferiert werden oder das Allel für eine Blutdrucksenkung (Minusallel) von einem normotensiven auf einen hypertensiven Stamm. Zunächst wird die Verpaarung aus einem normotensiven und hypertensiven Rattenstamm vorgenommen und eine F₁-Generation

gezüchtet, die heterozygot ist. Anschliessend erfolgt die Rückkreuzung (Backcross) der F₁-Generation auf den Referenzstamm (bei Übertragung des Plusallels auf den normotensiven Stamm, bzw. bei Übertragung des Minusallels auf den hypertensiven Stamm). In der resultierenden BC₁-Generation können nun mit Hilfe der Genotypisierung die Nachfahren selektiert werden, die den interessanten chromosomalen Abschnitt tragen. Der blutdruckbeeinflussende QTL gilt dann als erfolgreich isoliert, wenn sowohl das QTL als auch der Phänotyp von Donorstamm im kongenen Stamm vorhanden sind. Durch nachfolgende serielle Rückkreuzung auf den jeweiligen Referenzstamm über 8-10 Generationen hinweg wird das genetische Material des Donorstammes im restlichen Genom eliminiert. Durch Genotypisierung in jeder Backcross-Generation wird überprüft, dass innerhalb der selektierten Region das genetische Material vom Donorstamm erhalten bleibt. Zur Fixierung des kongenen Stammes werden Bruder-Schwester Verpaarungen vorgenommen. Ist der kongene Stamm etabliert, kann der übertragende chromosomale Abschnitt durch die Züchtung subkongener Stämme weiter verkleinert werden. Die Grenzen des übertragenen Fragments dienen nun als Startpunkt für die Züchtung neuer subkongener Stämme. Die neue subkongene Tierlinie trägt nun ein Fragment, das kleiner ist als das des kongenen Stammes. Per definitionem kommen alle Gene als mögliche Kandidatengene für den Phänotyp in Frage, die auf dem übertragenden Abschnitt kodiert sind und mit dem Phänotyp kosegregieren. Da aber auch die Regionen der subkongenen Linien in der Regel noch relativ groß sind, kommen mehrere hunderte Gene als potentielle Kandidatengene in Frage (McBride 2003).

Bei der Verwendung von subkongenen Linien ist es möglich, einen kongenen Stamm zu züchten, dessen Kandidatenregion schliesslich kleiner als 1cM ist. Nach Intervallverkleinerung durch subkongene Linien wird eine Analyse der genomischen Sequenz des Donorstammes vorgenommen und diese mit der Sequenz des Rezeptorstammes verglichen. Der so eingegrenzte DNA Abschnitt kann nun kloniert und sequenziert werden. Anhand der ermittelten Sequenz kann das kodierte Protein charakterisiert oder das Gen funktionell analysiert werden. Wenn das genetische Muster und die pathophysiologische Bedeutung hinreichend geklärt worden ist, ist es in einem weiteren Schritt möglich, eine Homologie zum humanen Genom mittels homologer Chromosomenkarten herzustellen und die Bedeutung des jeweiligen Kandidatengens für den Menschen zu klären.

1.5 Renin-Angiotensin-Aldosteron System

RAS-Kaskade

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAS) spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Blutdruck- und Volumenhomöostase. Erstmals wurde das Renin 1898 durch Tigerstedt beschrieben. Das RAS ist eine komplexe Kaskade von verschiedenen Proteasen. Die Renin-Sekretion aus den juxtaglomerulären Zellen der Nierenrinde wird über den Blutdruck reguliert. Renale Barorezeptoren werden bei Blutdruckabfall aktiviert und führen so zu einer Sezernierung von Renin. Ein direkter sympathischer Einfluß wird über sympathische Nervenfasern vermittelt, die im juxtaglomerulären Apparat und an den Vasa afferentia enden. Das aktivierte Renin wird ins Plasma und in den interstitiellen Raum sezerniert. Dort katalysiert es die Spaltung von Angiotensinogen (Agt) zum inaktiven Dekapeptid Angiotensin I (AngI). Anschliessend wird in einem weiteren Schritt die Konversion von AngI zum Oktapeptid Angiotensin II (AngII) durch das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE beim Menschen, Ace bei der Ratte) katalysiert (Bader, 1994). Neben dieser Reaktionskaskade kann die Synthese von AngII auch über alternative Reaktionswege, wie zum Beispiel durch kardiale Chymasen (Morgan, 1994) erfolgen. Die Hauptproduktion des AngII erfolgt jedoch hauptsächlich über die Hydrolyse durch das ACE (Zisman, 1995).

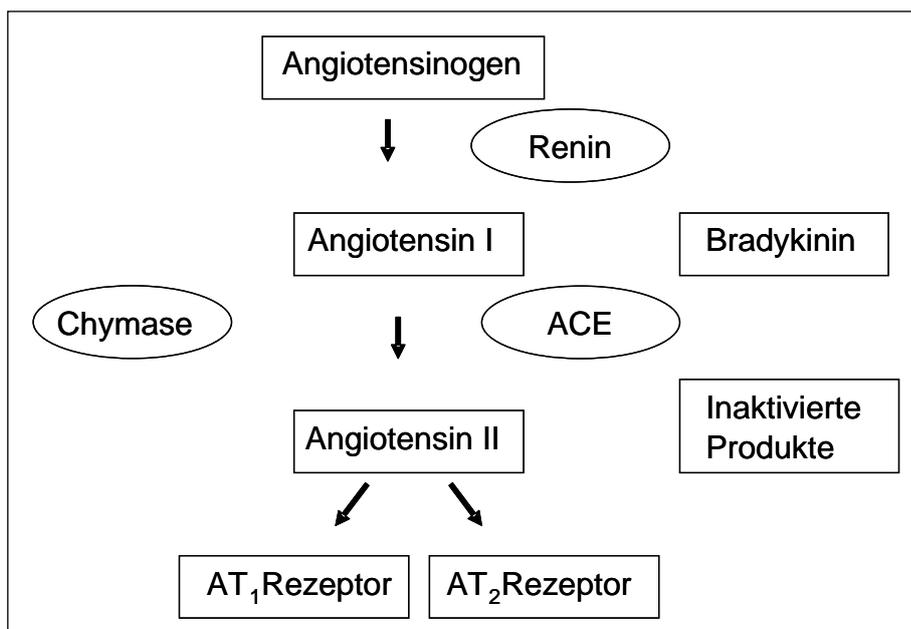


Abbildung 3: Übersicht des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Die Wirkung von AngII wird über spezifische Rezeptoren moduliert (AT₁ und AT₂). Beide Rezeptoren sind kloniert worden und weisen die Konfiguration eines Rezeptors mit sieben transmembranären Domänen auf mit einer auf Proteinebene homologen Übereinstimmung von jedoch nur 30%. Beide Rezeptoren unterscheiden sich sowohl in der Regulation der Expression durch AngII als auch in ihrer Funktion (Wolf, 2003). So wird eine Expression des AT₁ durch Stimuli wie Hypercholesterinämie oder Änderungen in der Osmolarität induziert. Eine Downregulation der renalen Rezeptordichte erfolgt unter hohem AngII Level. Die Expression von AT₂ wird nicht durch die AngII Konzentration, sondern durch Gefäßverletzungen (Gallinat, 2000) moduliert. Die meisten der AngII induzierten Wirkungen, wie Vasokonstriktion, Aldosteronausschüttung, proinflammatorische oder wachstumsstimulierende Effekte, werden über den AT₁ vermittelt. Die Funktion des AT₂ ist jedoch weniger klar. Man vermutet einen antagonisierenden Effekt auf die Mechanismen des AT₁ (Gallinat, 2000). So wurde gezeigt, dass es durch die Aktivierung des AT₂ zu einer Blutdruckabnahme durch NO Freisetzung, zu einer Wachstumsinhibition oder Apoptose kam.

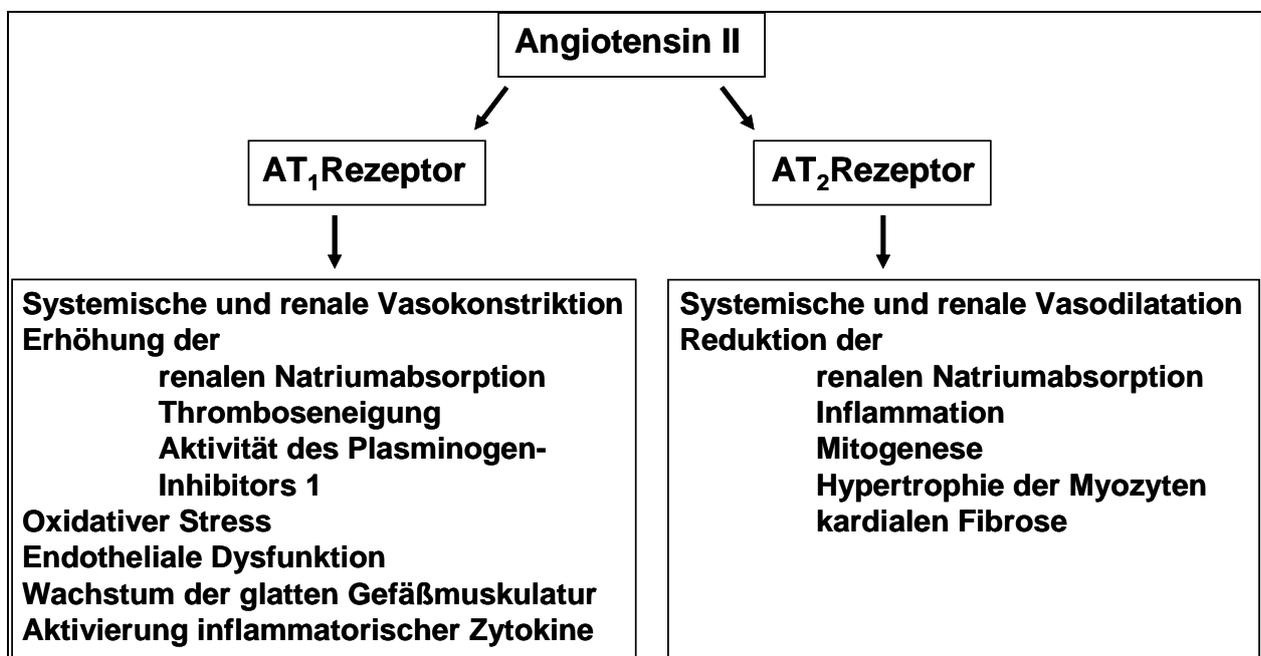


Abbildung 4: Wirkungsmechanismen von Angiotensin II in Abhängigkeit vom Rezeptortyp

Diverse hämodynamische Effekten werden durch AngII ausgelöst. So verursacht AngII eine Konstriktion der efferenten glomerulären Arteriolen. Auch wird peritubulär der kapilläre kolloidosmotische Druck durch einen Abfall des renalen Plasmaflusses und den Anstieg der glomerulären Filtrationsrate erhöht (Toke, 2001). Neben dieser direkten Wirkung beeinflusst AngII die Blutdruck- und Volumenhomöostase auch indirekt. So stimuliert AngII die Synthese und Exkretion von Aldosteron in der Nebenniere und die Freisetzung sowohl von ACTH als auch Vasopressin. Neben den hämodynamisch wirksamen Effekten sind auch viele renale nicht-hämodynamische Effekte beschrieben. So sind renale proliferierende Prozesse, die abhängig vom Zelltyp unterschiedlich ausgeprägt sind, beschrieben worden. Nach akuter oder chronischer Störung kommt es zu adaptativen Umbauprozessen innerhalb der Niere. Während es im glomerulären (Mesangial- und Endothelzellen) und interstitiellen Kompartiment (Fibroblasten) zur Zellproliferation kommt, reagieren Zellpopulationen aus dem tubulären Kompartiment entweder mit einer Hypertrophie (proximale Tubuluszellen) oder Proliferation (medullärer aufsteigender Ast) (Wolf, 2003). Durch die AngII Wirkung kommt es zu einer Freisetzung des Cytokin TGF- β , das zu einer vermehrten Kollagensynthese führt (Wolf, 1998). Im Rahmen einer erhöhten AngII-Exkretion kommt es dadurch zu einer erhöhten glomerulären Permeabilität und somit konsekutiv zu einer Proteinurie. Der Proteinverlust erfolgt durch folgende Mechanismen: Erhöhter intraglomerulärer Druck, Verlust und verminderte Synthese negativ geladener Proteoglykane, vermehrte extrazelluläre Matrixprodukte, Verminderung von Nephrin als wichtiger Bestandteil des Podozytenschlitzdiaphragmas (Remuzzi, 1998; Ruggenenti, 2001). Momentan lassen sich diese nicht-hämodynamischen Effekte nur im Tiermodell oder in der Zellkultur nachweisen; der Nachweis dieser Effekte beim Menschen ist noch nicht eindeutig geklärt.

Bedeutung und Stellung des Angiotensin-Converting Enzyms (ACE)

Das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) ist eine 170kD Zinkmetallopeptidase mit einer kurzen hydrophoben Aminosäuresequenz nahe des C-terminalen Endes, das mit der Plasmalipiddoppelschicht verankert ist (Erdös, 1985). Der größere äußere Anteil besteht aus zwei homologen aktiven Zentren mit unterschiedlichen Funktionen. Während das katalytische Zentrum am C-terminalen Ende für bis zu ca. 75% der AngII formenden Kapazität verantwortlich ist, katalysiert das aktive Zentrum am N-terminalen Ende hauptsächlich den Abbau von Bradykinin, Neurotensin und der Substanz P

(Mayer, 2002). Die ersten wissenschaftlichen Beschreibungen dieses Enzyms gehen auf die fünfziger Jahre zurück. Skeggs beschrieb mit seiner Arbeitsgruppe einen Faktor im Pferdeserum, der das Decapeptid AngI in das Octapeptid AngII spaltet (Skeggs, 1956). Erdös beschäftigte sich in jener Zeit mit dem Metabolismus von Bradykinin und entdeckte eine Kinase-Carboxypeptidase, die Bradykinin durch Abspaltung der Aminosäure Arginin inaktiviert (Erdös, 1962). Später beschrieb er eine weitere Kinase, die sowohl die Pro-Phe Verbindung innerhalb des Bradykinins als auch das C-terminale Phe-Arg spaltet (Erdös, 1967). Vane führte schließlich sowohl die Aktivierung von AngI als auch die Inaktivierung von Bradykinin auf die sequentielle Degradierung durch eine Carboxypeptidase vom N-Typ zurück (Nig et al., 1968). Zunächst wurden für diese beiden Vorgänge jedoch zwei verschiedene Enzyme verantwortlich gemacht (Vane, 1969). Erst nach der synthetischen AngI Gewinnung konnte gezeigt werden, dass die oben beschriebenen Reaktionen nicht von zwei verschiedenen Enzymen katalysiert werden, sondern dass dieses dualistische Reaktionsprinzip ein und demselben Enzym zugesprochen werden kann (Yang, 1970).

Neben der systemisch wirkenden RAS-Kaskade existiert auch eine membrangebundene Aktivierung des Systems (Johnston, 1992). Dieses lokale gewebesabhängige RAS-System entfaltet seine Wirkung unabhängig vom systemischen Gegenpart. Derartig lokale gewebsspezifische RAS-Systeme sind in verschiedenen Geweben beschrieben worden, wie zum Beispiel in der Niere. Die Entdeckung des lokalen RAS basierte auf der Entdeckung einzelner Bestandteile der Kaskade in Gewebstypen, die nicht im direkten Zusammenhang mit der Blutdruckregulation stehen. So konnten einzelne Bestandteile im Gehirn oder in den Fortpflanzungsorganen isoliert werden (Bickerton, 1961; Hagemann, 1994). Aufgrund der Entdeckung des lokal generierten AngII wurde die Hypothese aufgestellt, dass das lokale RAS andere Funktionen wahrnimmt und in andere Regelkreise eingreift als in der Aufrechterhaltung der hämodynamischen Stellgrößen. Diese Hypothese wurde unterstützt durch die Entdeckung neuartiger Reaktionskaskaden, an denen AngII beteiligt ist, wie die Beeinflussung des Zellwachstums oder die Rolle als Mediator bei der Apoptose. Initial wurde kontrovers diskutiert, ob eine Synthese aller einzelnen Komponenten ausschliesslich lokal erfolgen kann oder ob eine Aufnahme einzelner Substrate für die weitere Kaskade aus dem systemischen Regelkreis notwendig ist. So kommt es in Versuchen mit nephrektomierten Tieren zu einer Downregulation des plasmatischen AngII, jedoch nicht zu einer Beeinflussung des im Gehirn oder in der Nebenniere

gebildeten AngII. In anderen Organen wird jedoch eine direkte Abhängigkeit zwischen den beiden Systemen beschrieben. So wird zum Beispiel im Herz das Renin aus der Zirkulation internalisiert und lokal gespeichert, um bei Bedarf lokal AngII bilden zu können (Paul, 2006). Folglich muss von einer Interaktion zwischen beiden Systemen ausgegangen werden. Beide Systeme sind trotz ihrer Diversifikation als Einheit zu betrachten, die als gemeinsame Schnittstelle über das AngII verbunden sind. Diverse Forschungsergebnisse untermauern die Bedeutung des lokalen RAS für die arterielle Hypertonie. So spielt die lokale membrangebundene Generierung von AngII sowohl eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie als auch bei hypertensiven Endorganschäden (Pieruzzi, 1995). Es ist folglich davon auszugehen, dass die plasmatischen Spiegel nicht als ausreichender Indikator für die Aktivität des Gesamtsystems fungieren können, da sie keine Rückschlüsse auf die Aktivität der organspezifischen Systeme erlauben.

Aufgrund seiner Bedeutung im RAS ist das *ACE*-Gen Gegenstand vieler Untersuchungen bei der Erforschung von Kandidatengen für die Hypertonie gewesen. Auslöser für die Überlegung, das *ACE* selbst ein Kandidatengen sein könnte, war die Intervallkartierung bei Ratten aus F_2 -Kreuzungen von SHRSP und WKY (Hilbert, 1991; Jacob, 1991). In der F_2 -Population wurden zwei Genorte beschrieben, die mit dem Phänotyp Blutdruck kosegregieren. Die Region *BP/SP-1* auf Chromosom 10 ist für 20% der Blutdruckvarianz nach Salzbelastung und für 12-17% der Varianz des basalen Druckes verantwortlich. Bei dem Vergleich von Chromosomenkarten der Ratte und des Menschen wurde das *ACE* Gen als mögliches Kandidatengen identifiziert, da es sich innerhalb der *BP/SP-1*-Region befindet. Die Arbeitsgruppe um Nara wies weiterhin eine Kosegregation von *Ace* mit salzinduzierter Hypertonie einer F_2 -Hybridpopulation von SHRSP und WKY nach (Nara, 1991), die den Verdacht des Kandidatengens verstärkte. Neben der Lokalisation des Gens in einer QTL Region sprachen auch physiologische Studien, die eine differentielle ACE Aktivität im Plasma und Geweben zwischen hyper- und normotensiven Stämmen zeigten (Grima, 1991).

Im Rahmen einer Kosegregationsanalyse der F_2 -Population (SHRSP_{HD} x WKY_{HD}) konnte gezeigt werden, dass die ACE-Plasma-Aktivität eine hochsignifikante und geschlechtsunabhängige Kopplung zum *Ace*-Locus aufweist (Kreutz, 1995a). Die genetische Analyse ergab ein kodominantes Vererbungsmuster, wobei der *Ace*-Locus 89% der Gesamtvarianz der ACE Plasma-Aktivität definiert. Auch liess sich keine

Korrelation zwischen der plasmatischen ACE-Aktivität und Blutdruck nachweisen. Die Dissoziation der genetischen Determinanten Blutdruck und ACE Plasma-Aktivität wurde noch eindeutiger in der näheren Charakterisierung der Kandidatengenregion *BP/SP-1* bewiesen. Mit Hilfe der Züchtung eines kongenen Stammes WKY-1_{HD} konnten im *BP/SP-1* Locus mindestens zwei blutdruckregulierende Genorte differenziert werden, die unabhängig voneinander segregieren und zwei verschiedene blutdruckrelevante Phänotypen definieren. Die kongene WKY-1_{HD} Linie, die homolog zu SHRSP_{HD} in der 6cM langen Region *BP/SP-1a* aber identisch mit WKY-0_{HD} im *BP/SP-1b*, der den *Ace* Genlocus beinhaltet, ist, hat einen signifikanten höheren basalen und salzinduzierten Blutdruck als WKY-0_{HD}, jedoch eine identische plasmatische ACE-Aktivität.

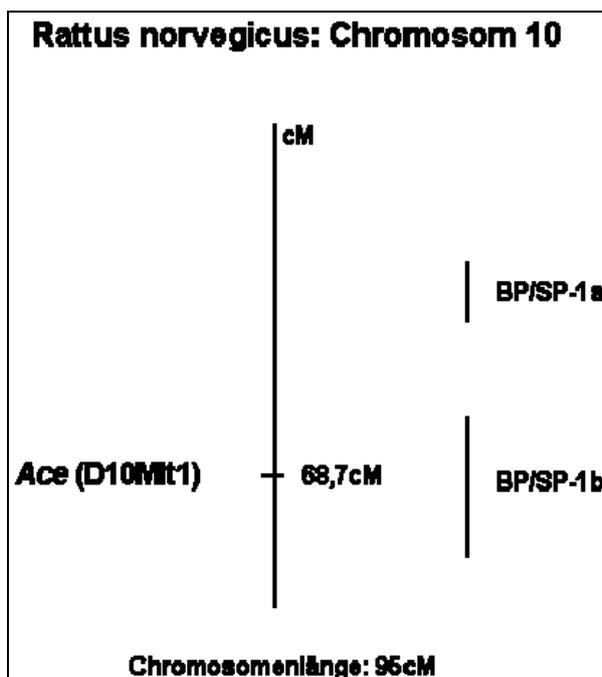


Abbildung 5: Lokalisation des *Ace*-Gens, *BP/SP-1a* und *BP/SP-1b* auf Chromosom 10

Insertions-Deletions Polymorphismus

Diverse Studien, die die Aktivität des zirkulierenden ACE untersucht haben, beschreiben einen großen interindividuellen Aktivitätsunterschied in der Normalpopulation. Dieser Aktivitätsunterschied kann bis zu fünffach höher sein. Der beschriebene große interindividuelle Unterschied ist bemerkenswert in Hinblick auf die bestehende sehr geringe intraindividuelle Variation. Bei wiederholten Untersuchungen der plasmatischen ACE-Aktivität bei einem Probanden wies man stabile Aktivitätslevel

des Enzyms nach. Um die bestehende Hypothese der genetischen Kontrolle der Enzymaktivität zu bekräftigen, wurden sowohl eine Kosegregationsanalyse als auch ein direkter Nachweis eines vorhandenen Polymorphismus durchgeführt. Die Kosegregationsanalyse im Rahmen der Nancy-Studie (Cambien et al., 1988), die mit 87 gesunden Familien durchgeführt wurde, postulierte erstmalig eine Assoziation zwischen der ACE-Aktivität und den genetischen Faktoren. Das familiäre Auftreten der ACE-Plasmakonzentration, das in der Nancy-Studie demonstriert worden ist, lässt sich fast vollständig durch die Übertragung eines Hauptgenlokus, der einem kodominanten Vererbungsmuster unterliegt, erklären. Dabei nimmt der heterozygote Genotyp eine intermediäre Stellung einnimmt. Personen mit einem homozygoten DD-Genotyp weisen annähernd doppelt so hohen Aktivitätslevel auf wie die für den Insertions-Genotyp homozygoten Personen. Im Rahmen dieser Kosegregationsstudie wurde jedoch kein Hinweis auf die entsprechende chromosomale Lokalisation des Gens gefunden. Um die Hypothese des Einflusses einer Allelvariation auf die plasmatische Aktivität zu bestärken, führten Rigat et al. 1990 Assoziationsstudie mit 80 gesunden, nicht verwandten Personen durch. Dabei wurde direkt ein Insertions-Deletions-Polymorphismus in dem *ACE* kodierenden Gen nachgewiesen, der die genetische Determinierung der plasmatischen Aktivität nachweist. Dieser Polymorphismus, der für 14 - 50% der interindividuellen Variation verantwortlich gemacht werden kann, ist durch die Anwesenheit (Insertion) oder Fehlen (Deletion) eines Alu-repeat Fragments im Intron 16 charakterisiert, welches eine Länge von 287 Basenpaaren aufweist.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen zu den bedeutendsten Todesursachen in der industrialisierten Welt und stellen eine Herausforderung an die heutige Medizin dar. Aufgrund der wesentlichen pathophysiologischen Bedeutung des ACE im RAS und der beschriebenen differentiellen Genexpression sowohl beim Menschen (I/D-Polymorphismus) als auch bei unterschiedlichen Rattenstämmen, wird das *Ace*-Gen als potentieller Kandidatengen diskutiert. Bei der genaueren Untersuchung der Hypertonie-Kandidatengenregion *BP/SP-1* auf Chromosom 10 der Ratte konnten zwei unterschiedliche Regionen differenziert werden (*BP/SP-1a* und *BPSP-1b*). Der Locus *BP/SP-1b* ist in der Nähe der *Ace*-Genregion lokalisiert worden (Kreutz et al., 1995). Bei der Untersuchung der differentiellen Genexpression zeigten Kreutz et al. im Rahmen der Kosegregationsanalyse bei der F₂-Generation (WKY-0_{HD} x SHRSP_{HD}) eine hochsignifikante und geschlechtsunabhängige Kopplung zum *Ace*-Lokus, jedoch keine Korrelation zwischen ACE-Plasma Aktivität und Blutdruck (Kreutz et al., 1995). Diese Studie zeigte zum ersten Mal eine Übereinstimmung von Eigenschaften eines QTL des Ratten- und humanen Genom bei einem so komplexen Sachverhalt wie kardiovaskuläre Erkrankungen.

Die bisher erfolgten Untersuchungen führten deshalb zu folgenden Fragestellungen:

Kommt der *Ace*-Genlocus als Kandidatengen für die arterielle Hypertonie in Frage?

Welche Bedeutung spielt die differentielle *Ace*-Genexpression im Rahmen der arteriellen Hypertonie?

Zur Klärung der Fragestellungen wurde in einem kontrollierten tierexperimentellen Versuchsaufbau ein kongener Stamm zwischen den Stämmen WKY-0_{HD} und SHRSP_{HD} etabliert. Dabei galt SHRSP_{HD} als Rezipient und WKY-0_{HD} als Donor des chromosomalen Abschnittes, der den *Ace*-Lokus auf Chromosom 10 trägt.

Nach Etablierung des kongenen Stammes erfolgten die Bestimmung der übertragenden Fragmentlänge und ein Genomscreening zur Überprüfung der Reinheit dieses Stammes. Anschliessend wurde die Phänotypisierung mit Blutdruckmessungen und

Bestimmung der ACE-Konzentration im Plasma und in diversen Organen (Niere, Aorta, linker Ventrikel, Lunge) durchgeführt.

Durch Züchtung des kongenen Stammes sollte ein Tiermodell etabliert werden, dass homolog zu dem humanen Intermediärtyp des I/D Polymorphismus angesehen und somit als Vergleichstamm bei der Untersuchung der Auswirkungen des Polymorphismus auf kardiovaskuläre Folgeerkrankungen herangezogen werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimenteller Teil

2.1.1 Tierhaltung

Die Haltung der Ratten erfolgte am Campus Benjamin Franklin der Charite Berlin (Aktenzeichen der behördlichen Genehmigung: G0368/97). Alle Versuchstiere sind unter strenger Einhaltung der institutionellen Richtlinien gehalten worden. Die Haltung der Ratten erfolgte geschlechtsgetrennt (maximal 6 Tiere) in einem Makrolonkäfig (Typ IV; zu Paarungszwecken Typ III) und erhielten freien Zugang zu normalem Trinkwasser und Standardfutter für Ratten mit einem NaCl-Gehalt von 0,2%. Über eine automatisierte Lichtschaltung wurde der zirkadiane Rhythmus ermöglicht. Die Raumtemperatur wurde konstant auf 22°C gehalten. Die Jungtiere wurden im Alter von ca. 21 Tagen von ihrer Mutter separiert. Alle Tiere sind durch eine Markierung am Ohr eindeutig gekennzeichnet worden.

Es wurden jeweils 12 Männchen und 12 Weibchen beider Parentalstämme (WKY-0 und SHRSP) und des neu etablierten kongenen Stammes untersucht.

2.1.2 Parentaltiere und Züchtung des kongenen Stammes

Für die Etablierung des kongenen Stammes wurden Tiere der normotensiven Wistar-Kyoto (WKY-0) Stammes und des hypertensiven SHRSP (spontaneous hypertensive stroke prone) Rattenstammes miteinander verpaart. Als Ursprungskolonie beider Stämme gelten die Kolonien an der Universität Heidelberg (HD). Sowohl die SHRSP_{HD} Linie, die ein Abkömmling der ursprünglichen Kolonie von Yamori und Aoki etablierten Kolonie (Okamoto et al., 1963; Yamori, 1994) darstellt, als auch die WKY-0_{HD} Linie wurden seit 1974 an der Universität Heidelberg unter strengen Inzuchtkriterien weitergezüchtet.

Die serielle Rückkreuzung dieser beiden Stämme ermöglicht die Herstellung des neuen kongenen Stammes, bei der die chromosomale Region isoliert werden kann. Bei der Züchtung des kongenen Stammes diente als Donor des Fragments auf Chromosom 10 der normotensive WKY-0_{HD} Stamm; als Rezipient der hypertensive SHRSP_{HD} -Stamm. Das übertragende Fragment befindet sich auf Chromosom 10 im Bereich 10q32.1 und beinhaltet das *Ace* kodierende Gen. Die chromosomale Region wurde dabei selektiv

von dem Donorstamm WKY-0 auf den Rezipienten SHRSP übertragen. Durch die serielle Rückkreuzung über mehr als 8 Generationen hinweg wurde das restliche Donorgenom zur mehr als 99% eliminiert. Die Übertragung des zu isolierenden Donor-Abschnitts wurde in jeder Generation mittels Kosegregationsanalyse überprüft. Um den neu etablierten Stamm zu fixieren, sind Bruder-Schwester-Verpaarungen zwischen den Ratten vorgenommen worden. Durch die Genotypisierung der polymorphen Marker konnte die genaue Lokalisation des übertragenden Fragments bestimmt werden.

Der neue kongene Stamm hat den Namen SHRSP.WKY-Ace nach den Nomenklatur-Richtlinien für kongenen Stämme des „Rat Genome Nomenclature Committee“ (RGNC) erhalten. Die Nomenklaturrichtlinien sind auf der Homepage der Rat Genome Database (www.rgd.mcg.edu) beschrieben.

2.1.3 Tierpräparation

Die Organentnahme erfolgte im Alter von 16 Wochen. Die Tiere wurden hierzu mit 85mg/kg Körpergewicht Ketamin und 15mg/kg Körpergewicht Xylazin intrabdominal narkotisiert. Anschliessend wurde mit einem Medianschnitt die Thorax- und Abdominalhöhle eröffnet. Für die spätere ACE-Aktivitätsmessung wurde Blut aus der V. cava inferior entnommen und in ein mit Heparin versetztes (5000IE/ml) gekühltes Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach der Blutentnahme erfolgte die Organentnahme des Herzens (linker und rechter Ventrikel), der Lunge, der Aorta und der Nieren mit Differenzierung in Cortex und Medulla. Das Herz wurde in eine 1 molare Kaliumlösung gegeben. Nach Sistieren der Eigenaktivität wurde der linke Ventrikel isoliert. Die Organe wurden unmittelbar nach Entnahme in ein 2ml Eppendorf Röhrchen überführt und in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Die Gewebeproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Bei der Tierpräparation ist das linksventrikuläre Gewicht als Maß für die durch den erhöhten arteriellen Blutdruck hervorgerufene Hypertrophie bestimmt worden. Nach Bestimmung des relativen linksventrikulären Gewichts (Normierung auf das Körpergewicht), sind die einzelnen Tierstämme auf eine linksventrikuläre Hypertrophie untersucht worden. Untersucht wurden je 12 weiblich und männliche Tiere (SHRSP: 7 weibliche Ratten) im Alter von 16 Wochen.

2.2 Genetische Untersuchungen

2.2.1 Genomanalyse mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker

Mikrosatellitenmarker

Für die Bestimmung der übertragenden Fragmentlänge und der Genomuntersuchung sind diverse Mikrosatellitenmarker eingesetzt worden. Zum überwiegenden Teil sind Marker vom Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, USA (DXRat-Marker; Tab. SSLP der Intervallkartierung/ Anhang) zum Einsatz gekommen. Andere verwendete Marker entstammen dem Whitehead Institute for Biomedical Research Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA (DxyMit-Marker) und dem Cardiovascular Research Center, Massachusetts General Hospital, Charlestown, Massachusetts, USA (DxyMgH-Marker). Die Angaben für polymorphe Mikrosatellitenmarker zwischen den Parentalstämmen WKY und SHRSP sind dem Whitehead Institute for Biomedical Research (www.broad.mit.edu/rat/public) entnommen worden. Für die Lokalisation der einzelnen Mikrosatellitenmarker ist die Chromosomenkarte zwischen den Stämmen SHRSP x BN (Version 7) der Rat Genome Database (www.rgd.mcg.edu) verwendet worden.

Gewinnung und Isolierung genomischer DNA

Im Alter von 3-4 Wochen wurde bei den Versuchstieren mit Hilfe eines Skalpell ein kleines Stück des Schwanzendes für die Gewinnung genomischer DNA abgetrennt. Die zurückbleibende Wunde wurde mit Histoacryl-Gewebekleber versorgt und die Proben in 2ml Eppendorf-Röhrchen überführt und auf Trockeneis gelagert.

Für die Isolierung der genomischen DNA wurde 0,5-1cm Rattenschwanz eingesetzt. Alternativ können auch 20-50 mg Gewebeprobe aus der Leber oder Milz genommen werden. Die Gewebsverdauung erfolgte mit einem Lysis-Puffer und Proteinase K im Hybridisierungsöfen. Der Ansatz wurde mit einer Natriumchloridlösung und nach der anschließenden Zentrifugation mit Isopropanol versetzt, so dass es zur Eiweißausfällung kam. Vor der Pellet-Aufnahme in Aqua bidest erfolgte die Reinigung mit Ethanol (-20°C). Die DNA-Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und Reinheit wurde mit einer photometrischen Messung bestimmt. Die zweimalige Messung der optischen Dichte (OD) der Probe erfolgte im Photometer bei der Wellenlänge 260-280nm.

Zur Durchführung der Genotypisierung wurden DNA-Arbeitsplatten angelegt (ThermoFast®96; 96 x 0,2 ml tube plate). In 93 Feldern wurden je 5µl der zu untersuchenden DNA-Lösung pipettiert. Von den übrigen Feldern dienten als Kontrollen der jeweiligen Parentalstämme mit der gleichen Verdünnung und als Negativkontrolle mit Aqua bidest. Nach Trocknung bei 37°C für 4-6h wurden die Platten bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Protokoll: Isolierung genomischer DNA aus Rattenschwänzen

1. Schritt: Verdauung

0,5-1cm Schwanz (alt. 50-100mg Leber/Milz)
Lysis-Puffer 700µl
Proteinase K (10mg/ml; 32,2U/mg) 40µl

2. Schritt: Inkubation

24h bei 55°C überkoprotierend
5min auf Eis

3. Schritt: Eiweißausfällung

Lysat
Gesättigte 6M NaCl Lösung 300µl
Inkubation auf Eis 5min
Zentrifugation (15min, 4°C, 14.000U/min)
Überführung des klaren Überstandes in 2ml Eppendorf-Röhrchen
Zugabe von 1ml Isopropanol
Inkubation 50min
Zentrifugation (15min, 4°C, 14.000U/min)
Dekantierung Überstand

4. Schritt: Reinigung

Zugabe von 70% Ethanol (-20°C) 500µl
Zentrifugation (15min, 4°C, 10.000U/min)
Trocknung der Pellets bei Raumtemperatur
Resuspension und Aufnahme des Präzipitats in Aqua bidest 200-400µl
Lagerung für 24h bei 4°C

Radioaktive 5' Markierung mit der Polynukleotidkinase

Zum Nachweis des Hybridisierungsproduktes wurden radioaktiv markierte Oligonukleotidsonden für den jeweiligen Primer hergestellt. Die zu markierende Sequenz wird dazu am 5'-Ende dephosphoryliert und anschliessend mit radioaktiv markiertem Phosphat rephosphoryliert. Katalysator des Transfers von [γ -³²P]-ATP an das 5'-Ende ist die T4-Polynukleotidkinase.

Protokoll: Radioaktive 5' Markierung mit der Polynukleotidkinase

1. Schritt: Herstellung des Mastermix (1,5ml Eppendorf-Röhrchen)

10x Kinase Puffer	0,04µl
T4-Polynukleotidkinase (10U/l)	0,017µl
[γ - ³² P]-ATP (3000 Ci/mmol)	0,029µl
Aqua bidest	0,029µl

2. Kinasierung (0,2ml PCR-Röhrchen)

Sense-Primer 6µM	0,22µl
Kinase-Mastermix	0,11µl
Inhalt Reaktionsgemisch: 70 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT (zusammengestellt im 10x Kinase-Puffer) und 0,5 U T4 Polynukleotidkinase	

Programm: NH KIN (45 Min. 37°C, 5 Min. 4°C)

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurden pro Ansatz 50ng genomische DNA eingesetzt und nach unten aufgeführtem Schema durchgeführt.

Protokoll: Polymerasekettenreaktion

1. Schritt: Herstellung des PCR-Mastermix

10x PCR Puffer	1,3µl
25mM MgCl ₂	0,78µl (Endkonzentration 1,5mM)
2,5 Mm dNTPs	1,1µl (Endkonzentration 0,2Mm)
Aqua bidest	2,92µl

2. Erstellung Reaktionsgemisch und PCR

Mastermix	5µl
Kinase-Mix	0,33µl
Anti-Sense Primer 6µM	0,22µl (Endkonzentration 0,1µM)
Taq-Polymerase	0,07µl (Endkonzentration 0,026U/µl)
Template-DNA 10ng/µl	5µl (50ng DNA)

Programm: YONH1 (3 Min. 94°C, 30 Zyklen á: 15 Sek. 94°C, 1Min. Primer-spezifische Annealingtemp., 1Min. 72°C, 7Min. 72°C)

3. Lagerung

Lagerung bei 4°C bis zur weiteren Verwendung

Polyacrylamidgel (PAA)- Elektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Amplifikate wurde mit Hilfe der Elektrophorese in 0,4mm dicken, denaturierenden PAA-Gelen durchgeführt. Nach Reinigung zweier Glasplatten (35 x 45 cm) mit Ethanol und Aceton wurde eine Platte mit wasserabweisender AcrylaseTm imprägniert. Nach der Reinigung wurden beide Platten mit zwei seitlich

eingelegeten, 0,4 mm dicken Kunststoffstreifen zusammengefügt, an den Seiten mit Paketklebeband verklebt und mit Klammern fixiert. Die hergestellte Gelmixtur wurde im flüssigen Zustand zwischen den vorbereiteten Glasplatten gegossen und einem Spacer am oberen Ende des Gels plaziert. Nach Eintritt der Polymerisation (ca.1-2h bei Raumtemperatur) wurden das Klebeband und die Klammern entfernt und der Abstandhalter an der oberen Seite durch einen Kamm ersetzt, dessen Spitzen ca. 1-2ml ins Gel ragten und Geltaschen bildeten. Nach der Platzierung der Gelplatten in die Elektrophoresekammer wurden die Gelkammern mit 1xTBE-Puffer aufgefüllt. Die aufzutragenden DNA-Proben wurden zunächst mit 10µl 2x Formamid-Gelladepuffer versetzt und bei 94°C 3 min im PCR-Gerät denaturiert. Nach Beladung der Geltaschen mit Hilfe einer 8-Kanal-Glaspipette erfolgte die Elektrophorese für 3-4 Stunden bei 60-70 Watt. Anschließend wurde der Puffer abgelassen, die Glasplatte aus der Kammer geholt und die mit AcrylaseTM imprägnierte Glasplatte abgehoben. Das Gel wurde auf ein Gel-Blotting Papier transferiert und mit SaranTM Folie verpackt. Zur Darstellung der radioaktiv markierten DNA-Abschnitte wurde das Gel in eine Röntgenkassette gelegt und darauf Biomax Filme bis zur Entwicklung bei -20°C für 8-16 Stunden je nach Signalstärke exponiert.

Protokoll: Herstellung PAA-Gel

1.Schritt: Herstellung des Gelmix

Harnstoff 8M	31,5g
10xTBE	7ml
Rotiphorese	10,5ml
Aqua bidest	ad 70ml

2.Schritt: Quervernetzung und Auspolymerisation

TEMED	40µl
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	400µl
Zugabe zum Reaktionsgemisch	

3.Schritt: Sofortiges Giessen zwischen 2 Glasplatten

2.3 Phänotypische Untersuchungen

2.3.1 Systolische Blutdruckmessung

Die systolischen Blutdruckmessungen wurden mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt.

Blutdruckmessung mittels Tail-cuff Methode

Die Blutdruckmessung des WKY-0_{HD} Stammes erfolgte nicht invasiv mittels einer computerunterstützten oszillatorischen Methode (TSE Blutdruck-Monitor Mehrkanal-System). Der systolische Blutdruckwert wurde mit Hilfe einer aufblasbaren Manschette am Rattenschwanz (Tail-cuff) registriert und gespeichert. Um vergleichbare Werte zu erhalten, sollten die Messungen unter Berücksichtigung des zirkadianen Rhythmus zur gleichen Zeit durchgeführt werden. Nach einer Trainingsphase wurde unmittelbar an drei aufeinander folgenden Tagen in drei Messdurchgängen je zwei Messungen vorgenommen und der durchschnittliche systolische Blutdruck ermittelt.

Blutdruckmessung mittels Radiotelemetrie

Die systolische Blutdruckmessung der SHRSP_{HD}- und der kongenen Ratten erfolgte mit einer radiotelemetrischen Meßmethode. Dabei wurde ein radiotelemetrischer Druckaufnehmer (Data Science International, Minneapolis, USA) in die Abdominalhöhle der Ratten implantiert. Ein Kapillarschlauch, der mit dem Aufnehmer verbunden ist, wurde in das Lumen der infrarenalen Aorta platziert. Die Blutdruckmessung erfolgte nach einer Anpassungszeit von ca. 10 Tagen im Alter von 16 Wochen. Die Messungen liefen über 10 Tage.

2.3.2 Bestimmung der ACE-Aktivität im Plasma

Grundlage der Aktivitätsmessung ist das spektralphotometrisches Verfahren unter Verwendung des synthetischen Tripeptidsubstrates N-[3-(2-furyl)acryloyl]-L-Phenylalaninyl-Glycyl-Glycin (FAPGG) (Holmquist 1979). Für die Aktivitätsmessung ist das Kit der Firma Sigma Diagnostics verwendet worden. Mit Hilfe des spektralphotometrischen Verfahrens wurde die kinetische Aktivität des ACE bestimmt. Bei diesem Verfahren wirkt ACE als Katalysator für die Hydrolyse des synthetischen Tripeptidsubstrates FAPGG und spaltet es zu Furylacryloyl-Phenylalanin (FAP) und

1 U ACE-Aktivität entspricht der Enzymmenge, die die Bildung bei den o.g. Bedingungen die Bildung von 1 μ mol FAP pro Minute katalysiert
ACE-Aktivität der Kalibrierungsreaktion: 67U/l bei 37°C
Berechnung: $\Delta A: \text{INITIAL A} - \text{FINAL A}$
ACE (U/l): $(\Delta A / \Delta \text{Kalibrierung}) * \text{ACE-Aktivität Kalibrierung (67U/l)}$

2.3.3 Bestimmung der ACE-mRNA Expression

Bestimmung der Gesamt-RNA

Die Gewinnung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe der TRIzolTM-Methode (Chomczynski et al., 1993). Die Gesamt-RNA wurde aus den verschiedenen Organproben (Niere Cortex, Niere Mark, Lunge, Aorta und linker Ventrikel) jeweils mit dem TRIzol Reagenz nach Herstelleranweisungen extrahiert. Die zum Einsatz kommenden Materialien wurden zunächst autoklaviert. Die Reagenzien, die nicht autoklaviert werden konnten, sind mit RNase AWAY[®] und / oder autoklaviertem 0,1% DEPC-H₂O vorbehandelt worden. Zu Beginn wurde das Gewebe mit TRIzol versetzt (je 1ml TRIzol pro 100mg Gewebe). Nach der Homogenisierung mittels Polytron wurde mit der Zugabe von Chloroform die Phasenseparation durchgeführt. Nach der Zentrifugation liessen sich 3 Phasen differenzieren. Aufgrund ihrer Unlöslichkeit in der saueren phenolischen Phase verblieb die RNA in der oberen wässrigen Phase, die für die RNA-Präzipitation abpipettiert wurde. Danach wurde die RNA in einem Eppendorf-Röhrchen (2ml) transferiert und mit Isopropanol versetzt. Nach Fällung wurde das RNA-Pellet mit eiskalter 70%iger Ethanollösung gewaschen. Anschliessend wurde das luftgetrocknete Pellet in 0,1% DEPC-H₂O resuspendiert. Die Konzentration des Isolats wurde über die Bestimmung der optischen Dichte mit einem UV-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm ermittelt. Für die Konzentrationsbestimmung wurden die Proben mit dem Quotienten 1:20 in RNase-freiem Wasser verdünnt. Der errechnete Quotient aus den beiden Absorptionsmaxima A₂₆₀/A₂₈₀ (Verhältnis der RNA zur Protein-Konzentration) war Ausdruck für die Reinheit des Produktes. Die Integrität des isolierten RNA Produktes wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 1% Agarosegel kontrolliert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Protokoll: RNA-Isolierung mittels TRIzol

1. Schritt: Homogenisierung

Kurze Messerreinigung (Ethanol-Aqua bidest-DEPC-Wasser-2xTrizol)
Je 1ml TRIzol mit 100mg bis zuletzt gekühltes Gewebe in ein 20ml Greiner-Zentrifugenröhrchen geben
Homogenisierung auf höchster Stufe mittels Polytron (2x30Sek.)
Homogenisierte Probe in 1,5ml Eppendorf-Röhrchen abpipettieren
Zentrifugation (10Min., 5000 U/min, 4°C)
Separation Überstand und Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde
Lagerung auf Eis (alternative Lagerung bei -80°C für einen Monat)

2. Schritt: Phasenseparation

Zugabe von 200µl Chloroform (Entspr. 1ml TRIzol)
Vortexen 15Sek.
Inkubation bei Raumtemperatur 2-3Min.
Zentrifugation (15Min., 12.000 U/min, 4°C)
3-Phasenzentrifugat: obere durchsichtige Phase (RNA)
weiße Interphase (DNA)
untere rote Phase (Proteine, DNA)
Abtrennung und Verwerfung der mittleren und unteren Phase
Überführung der oberen Phase in ein 2ml Eppendorf-Röhrchen

3. Schritt: RNA-Präzipitation (bei Raumtemperatur)

Mischung Isopropanolol (500µl) mit der RNA-Phase
Inkubation bei Raumtemperatur für 10Min.
Zentrifugation (10Min., 12.00 U/min, 4°C)
Dekantierung Überstand

4. Schritt: Waschen der RNA

Waschen des Pellets mit 1ml 75% -20°C Ethanol
Zentrifugation (10Min., 4.900 U/min, 4°C)
Dekantierung Überstand und Lagerung auf Eis

5. Schritt: Lösen des Pellets

Waschen des Pellets mit 1ml 75% -20°C Ethanol
Zentrifugation (10Min., 4.900 U/min, 4°C)
Dekantierung Überstand und Lufttrocknung der Pellets
Resuspension der Pellets mit Aufnahme in 50µl DEPC-Wasser (0,1%)
Inkubation 5Min. bei 65°C
Lagerung bei -80°C

6. Schritt: Photometrische Messung

Verdünnung der RNA 1:200 in DEPC-Wasser
Doppelbestimmung der Probe bei 260-280nm
Berechnung der RNA-Konzentration:
$$C(\text{RNA}) [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = E(260\text{nm}) \dots (\text{RNA}=40) \dots 200/1000$$

7. Schritt: Qualitätskontrolle RNA mittels Agarosegel

1% Agarosegel (40ml/Gel mit 1µl Etidiumbromid)
Auftragen von 1µl Probe und 1µl 10x Loading buffer

cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Die Untersuchungen der ACE-mRNA Expression in den einzelnen Gewebeproben wurden mit Hilfe der Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Nach der Isolierung der Gesamt-RNA aus dem jeweiligen Organgewebe wurde durch die RT-PCR zu jedem vorhandenen mRNA-Molekül die komplementäre DNA Kopie (engl: complementary DNA oder cDNA) mittels dem Retroviren-Enzym Reverse Transkriptase hergestellt. Diese cDNA diente in der sich anschließenden quantitativen PCR als Matrize. Zur Überprüfung der Qualität wurden gleichzeitig (-) RT Kontrollen hergestellt.

Protokoll: Reverse Transkription mit dem MB1 Fermentas, First Strand cDNA Synthesis Kit

1.Schritt: Annealing RNA

RNA (1µg)	
Random Hexamer	2µl
Deionisiertes Wasser aus Kit	(mit RNA 18µl) 20µl

Programm: HM 70 (5 Min. 70°C, 5 Min. 4°C)

2. Schritt: Überschreiben der RNA in cDNA

Annealte RNA (s.o.)	20µl
5x Reaktionspuffer	8µl
RNase Inhibitor	2µl
DNTP (10mM)	4µl
MM ULV (RT Enzym)	4µl 40µl

Programm: HMRT (10 Min.25°C, 60 Min. 37°C, 10 Min. 70°C, 10 Min. 4°C)

3. Schritt: PCR

cDNA	1µl
10xPuffer (normales PCR Kit)	5µl
dNTP (2,5mM)	4µl
MgCl (25mM)	3µl
Primer sense (6mM)	2,5µl
Primer antisense (6mM)	2,5µl
Taq-Polymerase	1µl
Wasser	31µl 50µl

Programm: DD24 (3 Min. 94°C, 30 Sek. 94°C, 45 Sek. 57°C, 1 Min. 72°C, 6 Min. 72°C, 10 Min. 4°C, insgesamt 39 Zyklen)

4. Schritt: Qualitätskontrolle cDNA mittels Agarosegel

4% Agarosegel
Auftragen von 10µl Probe und 0,5 µl Loading buffer
25bp DNA-Ladder (Gibco, Verdünnung 1:10)

Quantitative Polymerasekettenreaktion (TaqMan PCR)

Sondenauswahl und Design

Der TaqMan PCR Assay basiert auf dem ursprünglichen 5'-Nuclease Assay und verwendet ebenfalls die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der TaqPolymerase. Die eingesetzte Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat; standardmäßig FAM: 6-Carboxy-Fluorescein) markiert ist. Das 3'Ende, das mit einem Phosphatrest blockiert ist, ist mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat; TAMRA: 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) versetzt. Die Sonde wird am 3'Ende chemisch phosphoryliert, um eine Extension des 3'Endes während der PCR zu vermeiden.

Faktoren für die Sondenauswahl

1. Relative Nähe zwischen 5' und 3'Ende
2. 20-30 Basen, GC-Gehalt 40-60% (kein G am 5'Ende)
3. Keine drei gleichen Basen hintereinander
4. Tm Primer 5-10°C unter dem der Sonde wählen
5. Vermeidung der Komplementarität der Sonden und auffälligen Sekundärstrukturen im Zielbereich
6. Wahl des C-haltigeren Stranges

Primerauswahl

Die Gensequenz, die zur Konstruktion des Primers für den Ace kodierenden Genabschnitt benötigt worden ist, wurde von der Gendatenbank des National Center for Biotechnological Information in den USA (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) bezogen. Um die Spezifität weiter zu überprüfen, wurde ein sogenannter BLAST Search auf dem Server des National Centers for Biotechnological Information durchgeführt. Die Synthese des Primers erfolgte durch die Firma GibcoBRL.

Richtlinien für die Primerherstellung

1. Mindestens 43% GC Gehalt pro Primer
2. Schmelztemperatur zwischen 58° und maximal 62°C
3. Primerlänge mindestens 18 und maximal 22 Basenpaare
4. Amplifikatgröße 75-150 Basenpaare.

Ace Primer Sequenz

Sense Primer: TTGTCTGTCACTGGAGCCTGGA

Antisense Primer: GAAGAATTGCTTTGGGTGTGG

Daten: Intronüberspannend (Exon 15-Intron 16-Exon 16)
Produktlänge:76bp

TaqMan PCR Assay

Mit Hilfe der TaqMan Polymerasekettenreaktion ist eine Methode etabliert worden, die einen sensitiven, reproduzierbaren und spezifischen Nachweis eines Genprodukts ermöglicht. Mit diesem Assay sind die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß möglich. Da dass bei der PCR gebildete Signal strikt sequenzspezifisch ist, kann so eine quantitative Aussage über das amplifizierte Genprodukt gemacht werden. Die Quantifizierung erfolgt dabei über eine fluorogene Sonde, die innerhalb des zu amplifizierenden, von den beiden Primern flankierten cDNA-Bereichs hybridisiert. Bei der intakten Sonde wird die Fluoreszenz des am 5'-Ende befindlichen Reporter-Farbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher-Farbstoff am 3'-Ende der Sonde durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der Elongationsphase der PCR wird die hybridisierte Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase geschnitten und vom Strang verdrängt. Mit der Sondenhydrolyse werden sowohl die räumliche Nähe als auch der FET zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Die Fluoreszenz, des Reporters, die proportional zur Menge der gebildeten PCR-Produkte ansteigt, wird im ABI Prism 7000 Sequence Detection System bei jedem Zyklus gemessen.

Zur Auswertung der TaqMan-Assays wird das Verfahren der relativen Quantifizierung mittels Standardkurven angewendet. Dabei wird der Expressionslevel des untersuchten Gens auf die Expression eines sog. Housekeeping-Gens normiert. Ein Housekeeping-Gen stellt ein Gen dar, welches idealerweise ungeachtet experimenteller Bedingungen in vitro, bei Krankheiten und in vivo im untersuchten Gewebe konstant in der gleichen Menge exprimiert wird. Bei bekannten und häufig eingesetzten Vertretern handelt es sich z.B. um β -Actin, *GAPDH* und *PBGD*. Hier ist das Gen der Porphobilinogen-Desaminase (*PBGD*) als Housekeeping-Gen verwendet worden.

Die Expressionslevel-Bestimmung des untersuchten Gens als auch des Housekeeping-Gens erfolgte über Standardkurven, deren Standards durch sieben serielle 1:10 Verdünnungen hergestellt und bei jedem Lauf als Standard mit bekannter Konzentration mitgeführt wurden. Die relative Expression (rE) des untersuchten Gens wurde wie folgt berechnet:

$$rE_{ACE} = E_{ACE} / E_{PBGD}$$

Jede Probe wurde als Triplikat gemessen. Anschliessend wurde aus den Messungen ein Mittelwert gebildet. Da der erhaltene Quotient einheitslos war, erfolgte die Auswertung, indem der Mittelwert einer Kontrollgruppe als 100% definiert wurde (hier der normotensive WKY-0 Stamm). Alle Mittelwerte der anderen Gruppen wurden relativ dazu gesetzt und als prozentuale Expression zur Kontrolle angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS 11.0. Als Testmethode wurde die Methode einfaktorielle ANOVA mit post-hoc Modifikationen nach Bonferroni angewendet.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypische Charakterisierung des kongenen Stammes

Zur genauen Fragmentbestimmung des übertragenden chromosomalen Abschnitts auf Chromosom 10 wurden insgesamt 62 Marker getestet. Von den 62 Markern waren 34 polymorph. Das übertragende Fragment wird von den Markern D10rat18 (Lokalisation auf Chromosom 10: 66,5cM) und D10rat6 (88,1cM) flankiert und trägt das ACE kodierende Gen (68,7cM). Die nächsten an das übertragende Fragment angrenzenden Marker, die homozygot für SHRSP getestet worden sind, liegen auf der Höhe von 64,3cM (D10rat99) und 91,5cM (D10rat3). Somit kann das Fragment eine maximale Länge von 27,3cM einnehmen.

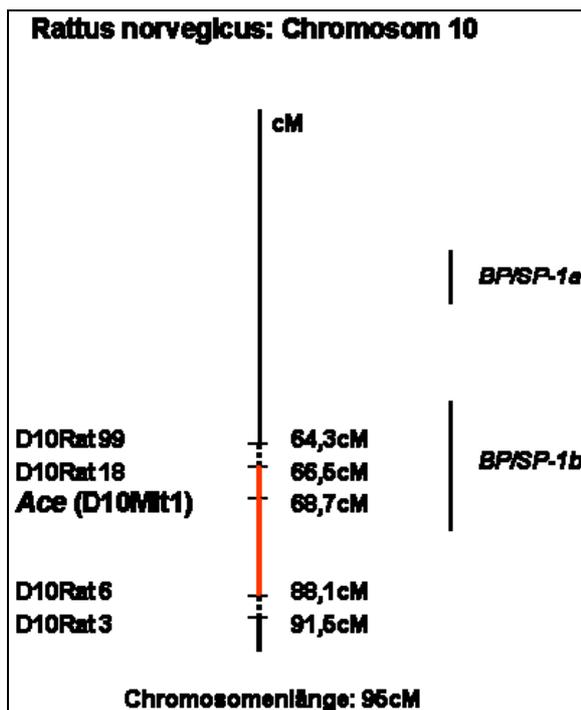


Abbildung 6: Lage des übertragenden Fragments. Flankierung von D10Rat18 und D10Rat6. Maximale Fragmentlänge 27,3cM.

Die Integrität des Modells wurde mit Hilfe des Genomscreenings verifiziert. Dabei sind 155 Mikrosatellitenmarker getestet worden, die polymorph zwischen den Parentaltieren sind. Die Marker sind so ausgewählt worden, dass sie einen Abstand von durchschnittlich 10cM voneinander aufweisen und sich über das gesamte Genom

erstrecken. Die Reinheit des Stammes wurde durch den an allen getesteten Markerpositionen homozygoten SHRSP-Genotyp nachgewiesen und bestätigt.

Tabelle 1: Polymorphe Marker auf Chromosom 10

Primer	Sequenz sense Primer	Sequenz antisense Primer	Annealing Temperatur
D10Rat95	TTACACCTCTCCAACACTGCC	TCATAGGAGGGAATACGGACA	55° C
D10Rat96	CCTTTGGAGACCAGGGTCTT	GACACCTGACATGTTCCCCT	55° C
D10Rat49	CACTGACATACATGCAGACCAA	ATGCTGGGGACTAAAAGCAA	55° C
D10Rat64	TCTAACACCTAAGAAACATGTCCA	TCAAAGGGAAAAAAAAAAGGAGA	55° C
D10Rat46	ATGACGGTTCTGCTTGCAAG	ATCCTTTGGGTTTGAAGGCT	55° C
D10Rat44	AAAAGACATGCACGTAGGCC	CCCAACAGCAACTTCAATGA	55° C
D10Rat43	GCCACAATAATTCAGGTGGTG	CATTTGCACATTGGACCATC	55° C
D10Rat72	CTTCGAGCACCAGTGTTCAA	AACCTTGATGTCTGTGTGTAGACA	55° C
D10Rat35	TGTGTTTTCCCTCATTAGCA	CTAAGCCCCAAACCTTCTCC	55° C
D10Mqh8	AAGCCTGGAGTGTTAGTAAAGGC	AAGAGGCCTGTATGCTGGGT	55° C
D10Mqh6	CCTGCCTAAGTAATACAGTGGTC	CCAGACCTTGTATGCTGGGT	55° C
D10Rat30	TGATAATGTGGTTAGAGGTGTGTG	TCCATTAACCCAATGTCCAAA	55° C
D10Mit2	GAAGTCCCAGCAGCCACATAA	GCTCAAATAAAGGTGGAAGGG	58° C
D10Rat29	TGGTGACAGCTAAGCGTATG	TCCCATGATTTACATGTGG	55° C
D10Rat69	TAAGTGCCTGATGGTTGCAA	AGGGGATCAGATGCTTTTCT	55° C
D10Rat92	ACCCTCAGCCTATGCAAACC	TCCCTTTTCTTCTGGGCTAT	55° C
D10Rat93	TGCCTTAAGCAGAATGCAATT	TCTGACATAAGGTCACCTTTGGAGA	55° C
D10Rat107	GTTTTCTGGGTCTTCCACA	CTTCTTCCCATTATGCCAC	55° C
D10Rat20	AGTGATTGCCATACCTGCCT	GAAATGGCCAGGATAAACCA	55° C
D10Rat99	CCTTTATCCAAAATAGTGTGCTT	ATGAAGTCATTGGGGGTGTG	55° C
D10Rat18	AACTAGACAGGCGGTGCTGT	CTCTGGAGGGTCCACATCAT	55° C
D10Rat84	TTCTGTCTTGTCTCCCACCC	GCTTTATCTCCTTTCTTGGTGG	55° C
D10Mit1	ATAACACCAACATTACCATAGAGG	ATACTCAGTTCAGACTTTTCCACCAAT	55° C
D10Rat17	TCTTTTCTTTGTCTTTGGGCA	CCATTCTCGTGTGTGTGATGTG	55° C
D10Rat13	AGGCAATGGGGACTCTAGGT	GCATAGCAACCCAACATTGA	55° C
D10Rat16	CAGCCCTCAGCCTAAGAGAA	AGAGCCATCCAATCTCTCCA	55° C
D10Rat14	AAATCAACCTTTGGGCCTTC	TAGAGAGTTCAAGGGCTGCC	55° C
D10Mqh3	TATCAGGTTGACAACCACTATGTG	CATTGCCTAACACAAAGATATCAA	55° C
D10mgh1	TTTTGCTTAAGAGAAAACAATCCC	ACACAAGGTGGACATCTCCTG	55° C
D10Rat88	TGTGTGTCTACACATACATGTGCA	GGTGGATATAATCAACATACGCC	55° C
D10Mqh2	TTCTTTTCAGCATCTAATAAGGG	GAGGAACACCACATGCACAC	55° C
D10Rat6	AGCTAGCACTCTAGCCCCTT	CCAGAACTCCAATCCAAGGA	55° C
D10Rat3	GGTTCAAGGTCAACATCAAGC	ACTGTAICTCGGTGTGCATGC	55° C
D10Rat4	TTTCCCCTCACTCCAAGTTCTG	CGAGCTTGTGAGCACGAGT	55° C

3.2 Phänotypische Charakterisierung des kongenen Stammes

3.2.1 Systolischer Blutdruck

Unter normierten Bedingungen zeigten die Messungen bei den hypertensiven Männchen signifikant erhöhte systolische Blutdruckwerte im Vergleich zu den WKY-Männchen (233 +/- 16 mmHg vs. 124 +/- 6 mmHg; $p < 0,001$). Bei den kongenen Männchen konnte kein signifikanter Unterschied zu den SHRSP Männchen (235 +/- 7 mmHg) nachgewiesen werden. Bei den Weibchen zeichnete sich ein gleichartiges Bild ab. So unterschieden sich die kongenen Weibchen in ihren Drücken nicht signifikant von den hypertensiven Parentaltieren (173 +/- 13 mmHg vs. 185 +/- 9 mmHg), jedoch beide Stämme signifikant vom normotensiven Parentalstamm (135 +/- 5 mmHg; $p < 0,001$). Sowohl die kongenen als auch die hypertensiven Männchen wiesen im Vergleich zu den weiblichen Tieren des jeweiligen Stammes signifikant erhöhte systolische Blutdruckwerte auf ($p < 0,05$ vs. männliche Tiere). Dieser Geschlechtsdimorphismus wurde jedoch nicht bei den normotensiven Tieren beobachtet ($p > 0,05$).

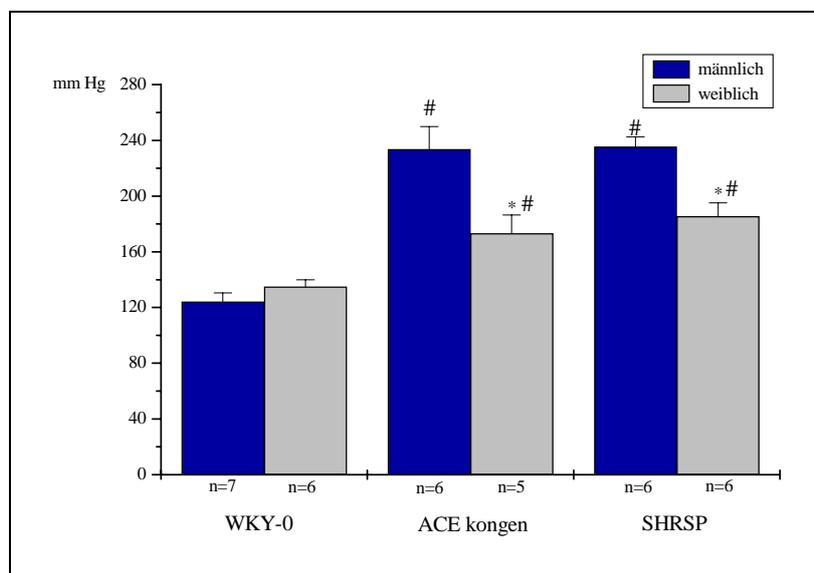


Abbildung 7: Systolischer Blutdruck. # $p < 0,001$ vs. WKY-0; $p < 0,05$ vs. männliche Tiere desselben Stammes

3.2.2 Organveränderungen

Bei den hypertensiven männlichen Parentaltieren war im Vergleich zu den normotensiven Parentaltieren ein erhöhtes relatives linksventrikuläres Gewicht nachweisbar (3,2 +/- 0,2 [mg/g KG] vs. 2,3 +/- 0,1 [mg/g KG]; $p < 0,05$, Abb 8). Bei den weiblichen Tieren zeigten sich ähnliche Befunde (3,1 +/- 0,1 [mg/g KG] vs. 2,4 +/- 0,2 [mg/g KG]; $p < 0,05$). Auch bei den männlichen kongenen Tieren konnte wie bei den hypertensiven Männchen eine signifikante Zunahme des relativen linksventrikulären Gewichts (3,2 +/- 0,4 [mg/g KG]; $p < 0,05$) beobachtet werden. Diese linksventrikuläre Gewichtszunahme unterschied sich jedoch nicht signifikant von den hypertensiven Männchen. Bei den weiblichen Tieren zeigten sich ähnliche Befunde (kongen vs. WKY: 2,9 +/- 0,2 [mg/g KG]; $p < 0,05$). Es konnte kein Geschlechtsdimorphismus nachgewiesen werden.

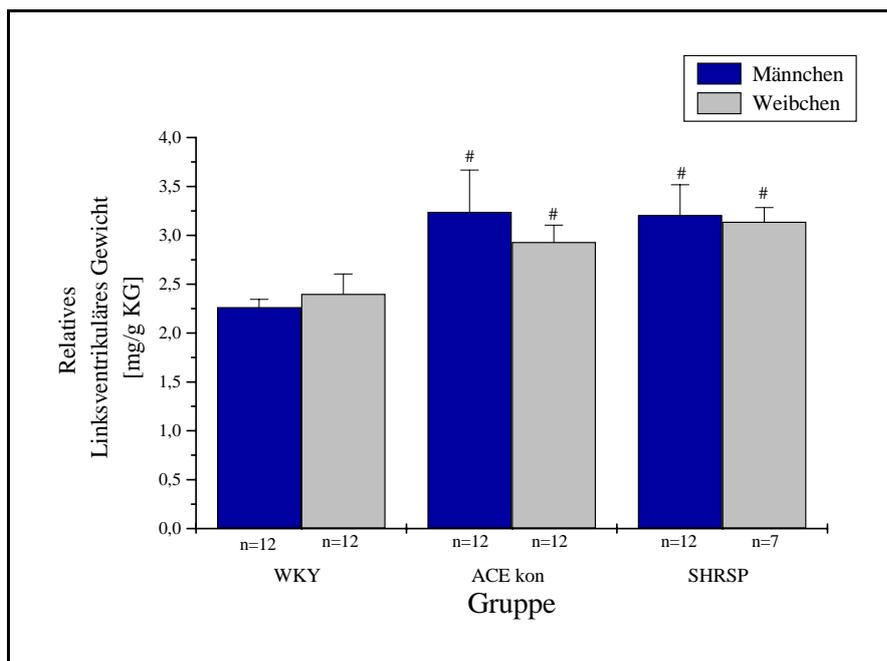


Abbildung 8: Relatives linksventrikuläres Gewicht; # $p < 0,05$ vs. WKY

3.2.3 Bestimmung der ACE-Aktivität im Plasma

Die Bestimmung der ACE-Aktivität im Plasma zeigte im Vergleich zu den männlichen SHRSP-Ratten bei den männlichen WKY-Ratten eine signifikante Erhöhung der Aktivität (89,8 +/- 13,2 U/l vs. 223,5 +/- 46,1 U/l; $p < 0,0001$). Bei den weiblichen Tieren konnten ähnliche Befunde (84,8 +/- 13,2 U/l vs. 208,8 +/- 22 U/l; $p < 0,0001$, Abb. 9) beobachtet werden. Im kongenen Stamm war die ACE-Aktivität im Vergleich zu den SHRSP Tieren ebenfalls signifikant erhöht (198,6 +/- 63,5 U/l; $p < 0,001$) und im Vergleich zu den WKY-Tieren nicht unterschiedlich. Bei allen weiblichen Tieren zeigten sich ähnliche Ergebnisse.

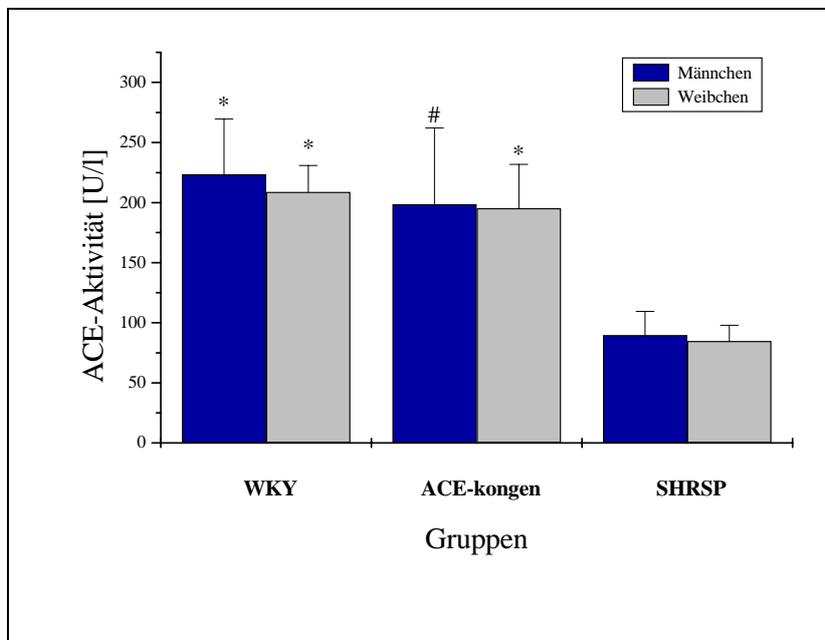


Abbildung 9: ACE-Aktivität im Plasma; * $p < 0,0001$ vs. SHRSP; # $p < 0,001$ vs. SHRSP

3.2.4 Bestimmung der ACE-mRNA Expression

Lunge

Die Bestimmung der ACE-mRNA Expression in der Lunge zeigte bei den männlichen hypertensiven Parentaltieren im Vergleich zu den normotensiven eine signifikant verminderte Expression (31,6 +/- 10,8 vs. 45,4 +/- 11; $p < 0,01$). Auch im kongenen Stamm war die ACE-mRNA Expression im Vergleich zu den SHRSP-Männchen signifikant erhöht (54,9 +/- 6,8; $p < 0,0001$) und entsprach dem Expressionslevel der WKY-0 Männchen ($p > 0,05$). Die weiblichen Tiere wurden bezüglich der ACE-mRNA Expression im Lungengewebe nicht untersucht.

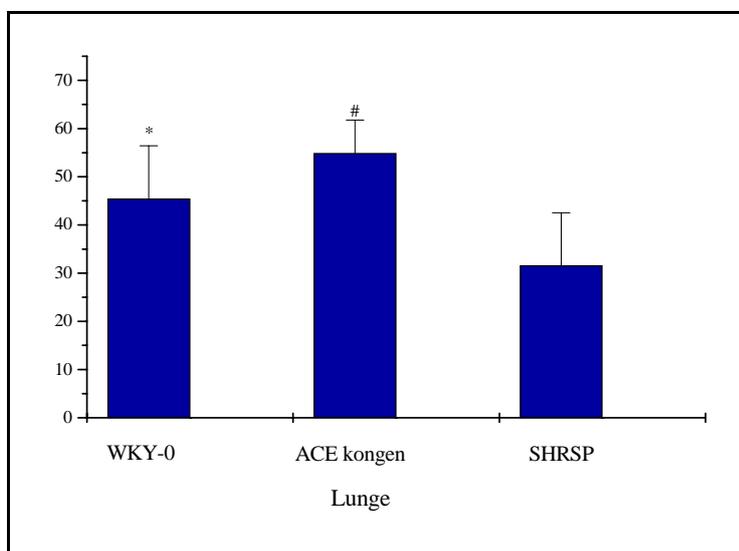


Abbildung 10: ACE-mRNA Expression in der Lunge;
* $p < 0,01$ vs. SHRSP; # $p < 0,0001$ vs. SHRSP

Linker Ventrikel

Die kongenen Männchen wiesen im Vergleich zu den hypertensiven Männchen eine signifikante erhöhte ACE-mRNA Expression auf (0,53 +/- 0,15 vs. 0,29 +/- 0,09; $p < 0,05$; Abb. 11). Die Expression der kongenen Männchen zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zu den normotensiven Männchen (0,49 +/- 0,16). Ein andersartiges Bild konnte bei den weiblichen Tieren beobachtet werden. Dort exprimierten die kongenen Weibchen im linken Ventrikel signifikant weniger ACE-mRNA als die normotensiven Weibchen (0,29 +/- 0,07 vs. 0,59 +/- 0,14; $p < 0,001$). Es liess sich jedoch keinen Unterschied in der Expression zu den hypertensiven Weibchen feststellen (0,24 +/- 0,08; $p > 0,1$). Im Gegensatz zu beiden Parentalstämmen wies der kongene Stamm

einen Geschlechtsdimorphismus auf mit signifikant erhöhter Expression bei den Männchen ($p < 0,05$).

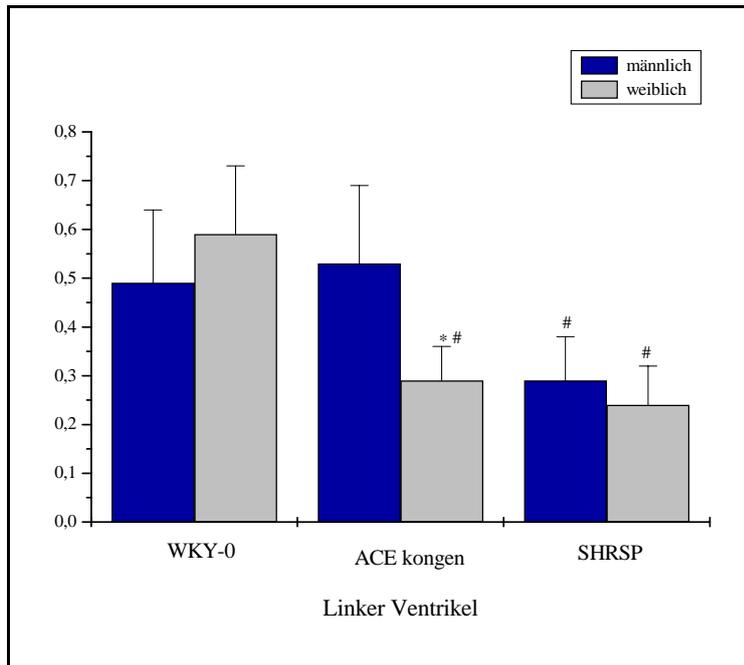


Abbildung 11: ACE-mRNA Expression linker Ventrikel; # $p < 0,05$ vs. WKY-0; * $p < 0,05$ vs. männliche Tiere desselben Stammes

Aorta

Die Untersuchungen der Expressionslevel im aortalen Gewebe zeigten weder ein stammes- noch geschlechtsspezifisches Expressionsmuster. Folglich liessen sich in den drei Stämmen keine signifikanten Unterschiede in der ACE-mRNA Expression feststellen.

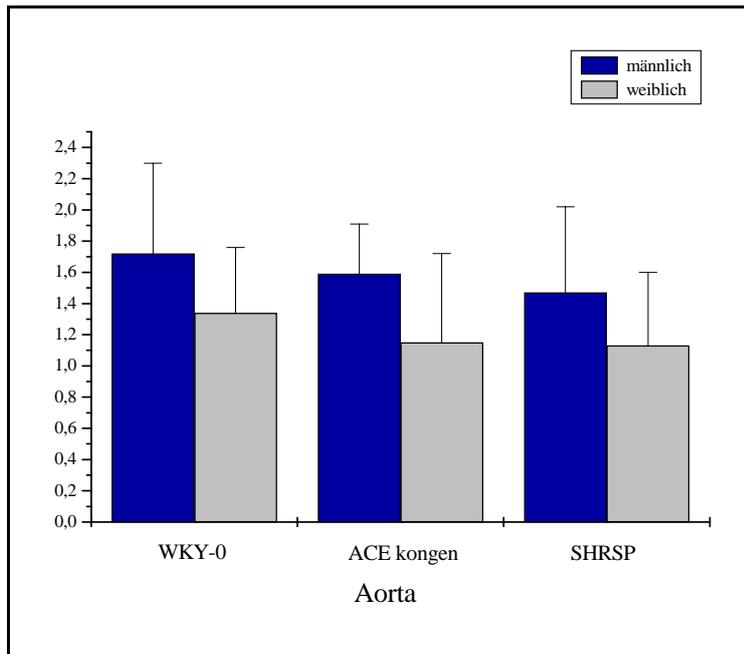


Abbildung 12: ACE-mRNA Expression in der Aorta

Niere: Cortex

Die untersuchten kongenen Männchen unterschieden sich in der Genexpression nicht von den normotensiven Männchen ($0,76 \pm 0,24$ vs. $0,64 \pm 0,2$; $p > 0,05$; Abb.13). Verglichen mit den hypertensiven Männchen wiesen beide Gruppen eine signifikant höhere Expression auf ($0,32 \pm 0,1$; $p < 0,001$). Bei den Weibchen konnte ein andersartiges Expressionsmuster beobachtet werden. Die kongenen Weibchen zeigten auch eine signifikant stärkere Expression als die hypertensiven Weibchen ($1,35 \pm 0,3$ vs. $0,47 \pm 0,2$; $p < 0,001$), jedoch beobachtete man weiterhin eine signifikant verstärkte Expression verglichen mit den normotensiven Weibchen ($0,82 \pm 0,36$; $p < 0,001$). Sowohl beim normotensiven als auch beim hypertensiven Parentalstamm liess sich kein geschlechtsabhängiges Expressionsmuster beobachten. Dieses zeigte sich jedoch bei den kongenen Stämmen mit einer signifikant höheren Expression bei den weiblichen Tieren ($p < 0,001$).

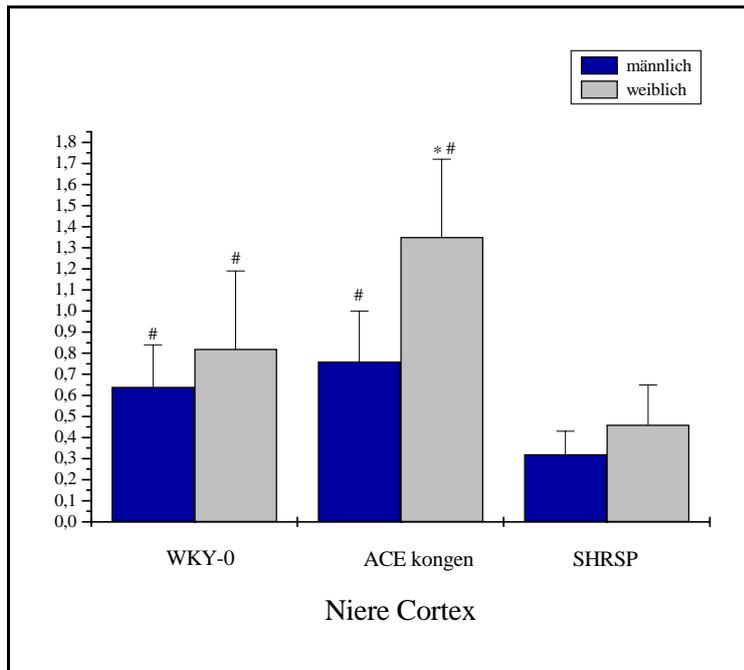


Abbildung 13: ACE-mRNA Expression im Cortex; #p <0,001; *p <0,001 vs. männlich

Niere: Mark

Die ACE-mRNA Expression wies im Gegensatz zum Cortex in keiner der untersuchten Gruppe einen Geschlechtsdimorphismus auf. Bei den männlichen WKY-0 Ratten lag im Vergleich zu den kongenen Männchen keine Signifikanz bezüglich der ACE-mRNA Expression vor (0,63 +/- 0,37 vs. 0,79 +/- 0,33; p>0,05). Ein gleichartiges Bild zeigte die Messung der weiblichen Ratten (0,62 +/- 0,14 vs. 0,76 +/- 0,3; p>0,05). Sowohl die Männchen als auch die Weibchen wiesen eine signifikant verminderte Expression in der hypertensiven Gruppe auf verglichen mit den anderen untersuchten Gruppen (männlich: 0,37 +/- 0,18; p<0,05; weiblich: 0,24 +/- 0,1; p<0,05).

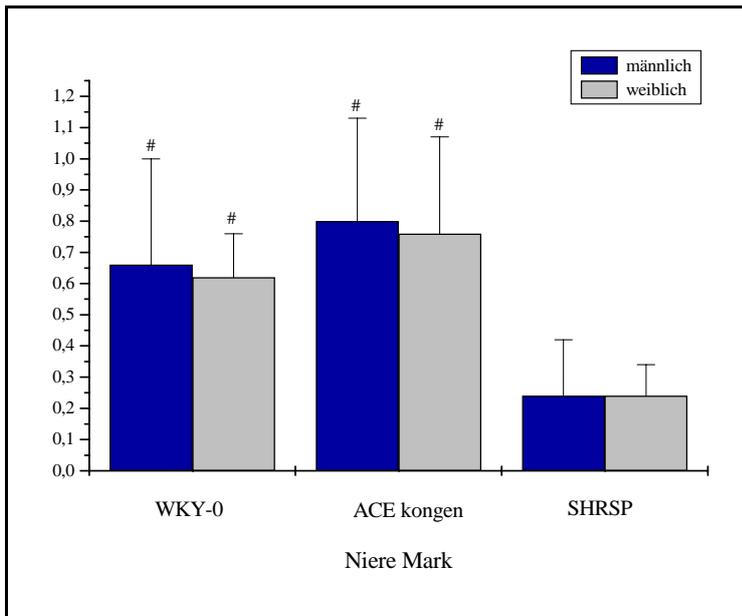


Abbildung 14: ACE-mRNA Expression im Mark; # $p < 0,05$ vs. SHRSP

Organspezifischer Expressionsgrad

Bei der Betrachtung der ACE-mRNA Expression in allen untersuchten Organen zeigte sich eine sehr große Differenz bezogen auf das absolute Expressionslevel. So liess sich zum Beispiel in der Lunge bei allen Stämmen ein bis zu sechzigfach höheres Expressionslevel als im linken Ventrikel nachweisen. Diese organabhängige Expression zeigte sich auch bei den weiblichen Ratten.

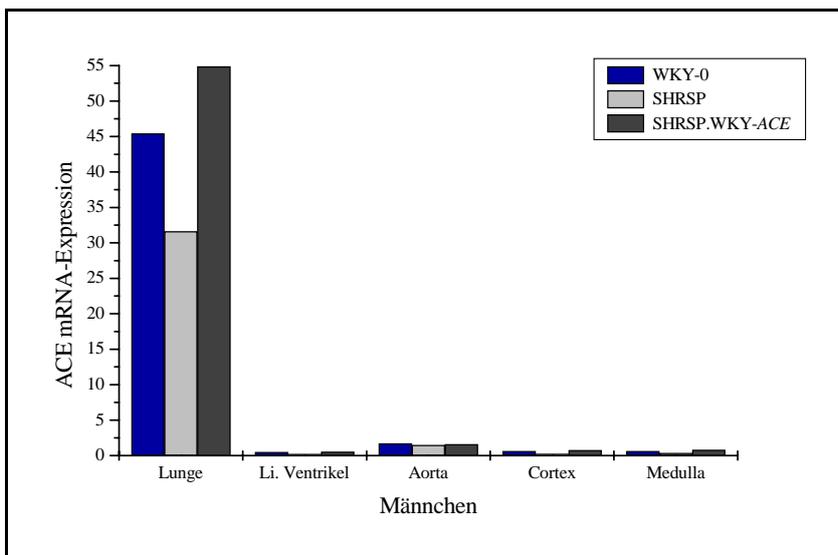


Abbildung 15. Unterschiedliche Expressionslevel der ACE-mRNA bei den männlichen Ratten.

4 Diskussion

Die primäre Hypertonie ist ein komplexes Erkrankungsbild, bei der sowohl genetische, als auch demographische und Umweltfaktoren gemeinsam die Prädisposition bestimmen. Die Beschreibung genetischer Ursachen für den Bluthochdruck ist aufgrund der komplexen Interaktion der einzelnen Faktoren, der genetischen Heterogenität und der nicht bis ins Detail bekannten Pathomechanismen noch nicht weit fortgeschritten. Aufgrund der herausragenden Bedeutung in der Blutdruckhomöostase ist *ACE* zunächst als ein mögliches Kandidatengen in Betracht gezogen worden. Diese Vermutung ist u.a. durch die Entdeckung eines Insertions/Deletions-Polymorphismus des menschlichen *ACE*-Gens (Rigat et al., 1990) erhärtet worden. Dieser Polymorphismus befindet sich in einem Linkage-Disequilibrium mit einer postulierten, jedoch noch nicht identifizierten Mutation, die 44% der Gesamtvariabilität der *ACE*-Plasma-Aktivität bestimmt (Tiret et al., 1992; Keavny et al., 1998). Es konnte jedoch keine Beziehung zwischen der plasmatischen *ACE*-Aktivität, dem *ACE*-Genotyp und dem Blutdruck hergestellt werden. Über die Bedeutung des Polymorphismus bezüglich weiterer kardiovaskulärer Erkrankungen wird kontrovers diskutiert (siehe unten).

Auch im Rahmen von tierexperimentellen Studien ist eine stammesabhängige Variabilität der plasmatischen *ACE*-Aktivität beschrieben worden (Michel et al., 1993; Kreutz et al., 1995). So weist der hypertensive SHRSP-Stamm - verglichen mit dem normotensiven WKY-Stamm- eine zweifach höhere *ACE*-Aktivität im Plasma auf. Der Pathomechanismus für die unterschiedliche Expression ist nicht eindeutig geklärt. Kreutz et al haben bereits gezeigt, dass die plasmatische *ACE*-Aktivität einer hochsignifikanten und geschlechtsunabhängigen Kopplung zum *Ace*-Lokus unterliegt. Im Rahmen der genetischen Analyse konnte ein kodominantes Vererbungsmuster, das für 89% der Gesamtvarianz verantwortlich ist, nachgewiesen werden. Desweiteren konnte aufgezeigt werden, dass keine Korrelation zwischen der *ACE*-Plasma Aktivität und dem Blutdruck bestand. Auch im Rahmen einer Salzbelastung der Tiere zeigte sich keine Veränderung des *Ace*-Expressionslevel oder der Blutdruckwerte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch im Rahmen einer pathophysiologischen Belastung eine differentielle *Ace*-Genexpression keinen Einfluss auf den Blutdruck hat. Diese eindeutige Dissoziation der genetischen Determinanten für den Blutdruck und die *ACE*-Aktivität wurde mit Hilfe der hier durchgeführten Experimente verifiziert. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde mit einem kontrollierten tierexperimentellen

Versuchsaufbau ein neuer kongener Stamm zwischen den Parentaltieren der Stämme WKY-0_{HD} und SHRSP_{HD} etabliert und die von der Arbeitsgruppe Kreuz nachgewiesene blutdruckunabhängige genetische Determinierung der ACE-Aktivität bestätigt. Weiterhin wurde eine detaillierte phänotypische und genotypische Charakterisierung des neu etablierten kongenen Stammes vorgenommen.

Die Züchtung des kongenen Stammes erfolgte nach den gängigen Zuchtprotokollen zur Etablierung kongener Stämme. Die Tiere des kongenen Stammes unterschieden sich von den hypertensiven Tieren lediglich in dem übertragenden Chromosomenabschnitt auf Chromosom 10, die die *Ace* kodierende Region enthielt. Die Kontrolle über den Genotyp des übertragenden Fragments wurde durch die Untersuchung polymorpher Marker und Ausprägung des Phänotyps erreicht. Die mit 34 polymorphen Markern durchgeführte Bestimmung beschreibt ein übertragendes 27,3cM langes Fragment, das sich von D10rat18 (66,5cM) bis D10rat6 (88,1cM) erstreckt. Die *Ace* kodierende Region, die sich auf Höhe von 68,71cM befindet, liegt somit im übertragenden Abschnitt. Die Integrität des Tiermodells wurde mithilfe eines durchgeführten Genomscreenings bestätigt. Mit der Untersuchung von polymorphen Markern, die über das gesamte Genom mit einem Abstand von 10cM verteilt waren, wurde somit eine Verunreinigung des kongenen Stammes durch den Rezipienten ausgeschlossen. Mit der nachgewiesenen Reinheit des kongenen Stammes konnte also eine mögliche Interaktion von anderen chromosomalen Regionen, die den Blutdruck oder die Expression des *Ace* beeinflussen könnten, nicht in Betracht gezogen werden.

Bei den phänotypischen Untersuchungen der drei Rattenstämme konnte bestätigt werden, dass keine Korrelation zwischen der ACE-Plasma Aktivität und dem Blutdruck bestand. Entsprechend des Designs des kongenen Stammes ist dieser durch den hypertensiven Hintergrund charakterisiert. Die Blutdruckmessungen, die mit Hilfe der Radiotelemetrie durchgeführt wurden, bestätigten den arteriellen Hypertonus. Die erhöhten Blutdruckwerte unterschieden sich nicht signifikant von der hypertensiven Kontrollgruppe. Auch zeigten die kongenen Weibchen analog zu den hypertensiven Weibchen eine geschlechtsabhängige Beeinflussung des Blutdrucks. So waren sowohl bei den kongenen als auch bei den hypertensiven Weibchen die systolischen Blutdruckwerte zwar deutlich erhöht im Vergleich zu den normotensiven Tieren, jedoch signifikant niedriger als bei den Männchen der jeweiligen Gruppe.

Die Veränderungen des linken Ventrikels der kongenen Tiere entsprachen den Veränderungen der SHRSP-Ratten. Bei den kongenen Tieren kam es auch zu einer

Zunahme des linksventrikulären Gewichts, die sich nicht signifikant von den hypertensiven Referenztieren unterscheidet. Entscheidend für den Blutdruck und die damit zusammenhängenden Organveränderungen war folglich der hypertensive Hintergrund und nicht die übertragende chromosomale Region. Im Gegensatz dazu konnte eine Beeinflussung der ACE-Aktivität und *Ace*-Genexpression, die auf die übertragende Region zurückzuführen ist, aufgezeigt werden. Die plasmatische ACE-Aktivität des kongenen Stammes, die dem des normotensiven Referenzstammes entspricht und signifikant höher war als die des hypertensiven Stammes, bewies die genetische Determinierung der ACE-Aktivität. Trotz der höheren Blutdruckwerte kam es somit zu keinem veränderten Expressionsmuster der plasmatischen ACE-Aktivität. Da bei den hypertensiven Ratten eine niedrigere plasmatische Aktivität als bei den normotensiven Referenzstämmen vorherrscht, würde als mögliche Ursache eine Downregulation bei erhöhten Blutdruckwerten in Frage kommen. In diesem Fall müsste jedoch der kongene Stamm den gleichen Aktivitätsgrad aufweisen wie die hypertensiven Ratten. Dies liess sich jedoch nicht beobachten. Somit ist eine sekundäre Beeinflussung der plasmatischen ACE-Aktivität durch den Blutdruck ausgeschlossen. Verstärkt wird die These auch durch das Knock-out Modell des *Ace*-Gens, das von der Arbeitsgruppe um Krege (Krege et al., 1997) etabliert worden ist. Um die quantitativen Effekte des *Ace*-Gens zu untersuchen, generierte Krege transgene Mausmodelle mit einer unterschiedlichen *Ace*-Genkopienanzahl (Mäuse mit jeweils einer, zwei oder drei Kopien). Es zeigte sich eine direkte lineare Beziehung zwischen der Kopienanzahl und der Plasmaaktivität, die aber in keinem Zusammenhang mit Blutdruckveränderungen stand. Interessanterweise wiesen auch die Mäuse mit drei Kopien keine signifikanten Blutdruckunterschiede auf.

Nach Beschreibung des I/D-Polymorphismus stellte sich die Frage, ob dieser direkt an der genetischen Regulation der Aktivität beteiligt sein kann oder lediglich ein Marker für das Linkage-Disequilibrium mit einer regulatorischen Variante des *ACE*-Gens darstellt. Eine von Turet et al. (1992) durchgeführte kombinierte Segregation- und Linkage Analyse unterstrich die Hypothese des neutralen Markers. Somit wird der I/D-Polymorphismus nicht selbst als Auslöser oder Regulator für die unterschiedlichen Aktivitätslevel angesehen, sondern ihm wird eher eine Bedeutung als informativer Marker mit hoher Sensitivität und Spezifität zugeschrieben. Außerdem konnte keine Beziehung zwischen der plasmatischen ACE-Aktivität, dem *ACE*-Genotyp und dem Blutdruck hergestellt werden. Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass dem

intronischen Polymorphismus selbst eine krankheitsauslösende Bedeutung zugesprochen werden kann (Lindpaintner et al., 1995). Aufgrund der herausragenden Stellung des ACE in der kardiovaskulären Homöostase wurde jedoch die Vermutung geäußert, dass der Polymorphismus als genetischer Marker zur Identifizierung und Detektion des individuellen Risikos für bestimmte kardiovaskuläre Erkrankungen dienen könnte. Diverse Studien, die die Assoziation untersucht haben, zeigten widersprüchliche Ergebnisse auf. So beschrieben einige Studien eine positive Assoziation des D-Allels mit der Hypertonie, andere hingegen konnten den Zusammenhang nicht bestätigen (Jeunemaitre et al, 1992; Harrap et al. 1993; Schmidt et al. 1993; Higashimori et al 1993; Berge and Berg 1994; Morris et al. 1994). Weitere Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen dem ACE-Genotyp und der salzabhängigen Hypertonie. So zeigte sich, dass Probanden mit dem II-Genotyp ein signifikant höheren Blutdruck nach Salzbelastung hatten als Probanden mit einem ID oder DD-Genotyp (Giner et al, 2000, Poch et al 2001). Neben der Hypertonie sind noch weitere kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht worden, wie Myokardinfarkt, linksventrikuläre Hypertrophie, diabetische oder IgA-Nephropathie. Auch hier wurden kontroverse Ergebnisse beschrieben. Die Assoziationen zwischen Genotyp und kardiovaskulärer Erkrankung wurden inkonsistent, sobald weitere Populationen auf die entdeckte Assoziation untersucht wurden. Somit zeichnet sich bislang keine Studie ab, die mit zunehmender Studiengröße und Populationsdiversifikation eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem ACE-Polymorphismus und verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben hat (Kreutz et al., 1993; Lindpaintner et al., 1995; Singer et al., 1996). Neben der noch fraglichen Bedeutung des Polymorphismus ist auch der Pathomechanismus für die unterschiedliche Expression noch nicht eindeutig geklärt.

Analog zum humanen I/D Polymorphismus ist die Struktur des Ace-Gens der Ratte auf Polymorphismen oder Mutationen untersucht worden. Koike et al untersuchten neben der jeweiligen cDNA auch die enzymatische ACE-Aktivität der beiden Stämme. Im Rahmen eines Vergleiches der primären cDNA Struktur zwischen den Stämmen SHRSP und WKY (Koike, 1994) konnte eine Differenz von fünf Nukleotiden gezeigt werden. Eine dieser Nukleotidveränderungen ist für den Austausch einer Aminosäure zuständig (Lys-207 in WKY; Arg-207 in SHRSP). Neben der Untersuchung der Primärstruktur in den beiden aktiven Zentren des Enzyms, die in beiden Stämmen identisch sind, zeigten auch die in vitro- Untersuchungen zur Enzymkinetik (Km, Vmax,

spezifische Aktivität U/mg) keine signifikanten Stammesunterschiede. Analog zum menschlichen *ACE*-Gen und dessen I/D-Polymorphismus auf Intron 16 ist in einem weiteren Schritt die genomische DNA Struktur untersucht worden. Dieser Polymorphismus, der sich in einem nicht kodierenden Anteil befindet, ist hinweisend auf den Charakter der Mutation. So wird die Mutation nicht als solche für die unterschiedliche Expression verantwortlich sein, sondern ist lediglich, wie bereits vermutet, als neutraler Marker für eine den Regelkreis beeinflussende Mutation anzusehen, deren Pathomechanismus noch nicht bekannt ist. Eine mögliche Mutation in einem nicht kodierenden Bereich könnte auch für den unterschiedlichen Aktivitätslevel bei den einzelnen Rattenstämmen verantwortlich sein. Falls es eine derartige Mutation gibt, die dem humanen I/D-Polymorphismus entspricht, würde dieser auch eher als neutraler Marker anzusehen sein, da mit der Untersuchung der cDNA keine Unterschiede bezüglich der Enzymkinetik nachweisbar sind.

Neben der Untersuchung der differentiellen plasmatischen ACE-Aktivität wurde auch die genetische Expression der mRNA lokal in diversen Geweben, die für den Blutdruck eine entscheidende Bedeutung haben, analysiert mit der Fragestellung, ob es zu einem veränderten Expressionsverhalten auf lokaler Ebene im hypertensiven Hintergrund kommen würde. Als Zielorgane wurden folgende gewählt: Linker Ventrikel, Aorta, Lunge und Niere (Cortex und Mark). In diversen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Gewebsexpression der ACE-mRNA demselben genetischen Einfluss unterliegen wie die ACE-Plasma-Aktivität (Cousterousse et. al., 1999). Die Variabilität zwischen den Stämmen herrschte nicht nur in endothelialen, sondern auch in epithelialen Zellen (Niere) vor

Auch im Rahmen der hier vorliegenden Analysen wurde eine signifikant höhere ACE-mRNA Expression -analog der höheren ACE-Plasmaaktivität- in den normotensiven Tieren nachgewiesen. Beweisend für die genetische Determinierung ist der kongene Stamm, da er den *Ace*-Genotyp der normotensiven Ratte trägt und auch signifikant erhöhte ACE mRNA-Level aufweist.

Die lokalen RAS-Kaskaden scheinen organspezifisch eine unterschiedliche Bedeutung und Funktion zu erfüllen. Abhängig von pathophysiologischen Reizen werden bestimmte Reaktionswege unabhängig von der systemischen RAS-Kaskade angestoßen und lösen lokal unterschiedliche Reaktionsmechanismen aus, die so zu diversen Schäden des Organs führen können. Die Existenz eines organspezifischen

RAS erlaubt eine lokale AngII Synthese, die vom zirkulierenden AngI unabhängig ist und die autokrinen und parakrinen Effekte des AngII erklärt. Das Vorkommen eines systemisch wirkenden und organgebundenen RAS ist sehr bedeutend, da die Synthese von AngII so unter Abwesenheit des zirkulierenden Substrates Agt erfolgen kann. Während das systemische RAS vor allem in der Aufrechterhaltung der hämodynamischen Homöostase einen bedeutenden Stellenwert einnimmt, dominiert das lokale gewebsspezifische RAS besonders als Mediator bei diversen physiologischen Prozessen, die unabhängig von der Hämodynamik zu betrachten sind. Neben der Progression von hypertensiven Endorganschäden könnte somit die chronische Aktivierung des lokalen RAS zur Entstehung von Endorganschäden unabhängig von der arteriellen Hypertension beitragen. So zeigen transgene hypertensive Ratten mit einer erhöhten Reninexpression im Vergleich zu hypertensiven SHR-Ratten eine stärkere kardiale und endotheliale Dysfunktion (Pinto et al., 1997). Möglicherweise spielt das lokal generierte AngII eine Schlüsselrolle für die Progression der Endorganschäden, die zumindest teilweise blutdruckunabhängig zu sein scheint. Somit könnte man davon ausgehen, dass die kongenen Tiere, die aufgrund des genetischen Hintergrundes eine lokal signifikant höhere *Ace*-Expression vorweisen, doch progredientere oder früher Endorganschäden aufweisen als die hypertensiven Referenztiere. Dies wäre dann aber der lokalen Aktivierung und somit den nicht-hämodynamischen Effekten des RAS zuzuschreiben und nicht der Hypertonie. Zur weiteren Differenzierung dieser Hypothese wäre zum Beispiel eine dauerhafte Applikation von ACE-Hemmern oder Agtr1 Antagonisten in einer nicht antihypertensiven Dosis notwendig.

Diese Unterschiede in der differentiellen Expression herrschen nicht nur in der Homöostase vor, sondern sind auch diversen pathophysiologischen Mechanismen unterworfen. In tierexperimentellen Studien kann zum Beispiel eine Aktivierung des lokalen RAS in der Niere und im Herzen bei herzkranken Versuchstieren nachgewiesen werden (Pieruzzi et al., 1995; Schunkert et al., 1993; Pfeifer et al., 1998). Interessanterweise ist der Aktivierungsgrad proportional von der Schwere der Erkrankung abhängig. Auch zeigen die Experimente, dass die lokalen, organspezifischen Systeme ihre Wirkung unabhängig von deren systemisch wirkenden Gegenspieler entfalten. Jedoch scheint die organspezifische Expression in der Tat auch lokalen Einflüssen zu unterliegen, die sich nicht immer gegenseitig beeinflussen und somit auch abhängig vom jeweiligen Organ sind. Somit können zeitgleich

unterschiedliche Expressionslevel und Aktivierungsgrade in den einzelnen Organen vorliegen. So wurde etwa eine erhöhte ACE-mRNA Expression in Ratten mit einer chronischen Herzinsuffizienz- induziert mittels Legierung der Koronarien- nachgewiesen. Diese Erhöhung der mRNA Expression korrelierte mit der kardialen ACE Aktivität, jedoch nicht mit der ACE Aktivität in anderen Organen (Hirsch et al., 1991).

Huang et al. zeigte in der pulmonalen Kaskade einen Abfall der pulmonalen ACE-Aktivität und eine geringere ACE-mRNA Expression bei myokardgeschädigten Tieren als bei gesunden Vergleichstieren (Huang, 1994). Nach Huang könnte die unterschiedliche Ace-Expression durch lokale hämodynamische Faktoren begünstigt werden, die die endotheliale Zellfunktion verändern. Hierzu wurde die ACE-Aktivität und die ACE-mRNA Expression im Lungengewebe bei Ratten mit einer bedeutenden Herzinsuffizienz untersucht, die eine verminderte Expression der mRNA und erniedrigte Aktivitätslevel im Lungenparenchym zeigten. Diese organspezifische Regulation in herzinsuffizienten Tieren stellt einen möglichen Schutzmechanismus dar, um einer vermehrten Expression des Vasokonstriktors AngII entgegenzuwirken. Ähnliche Beobachtungen der organspezifischen Regulation machte die Arbeitsgruppe um Pfeifer (Pfeifer et al., 1998). Bei der Untersuchung der organspezifischen ACE-Aktivität und Expression beschreiben sie ein reziprokes Verhalten der Aktivität im pulmonalen und kardialen Gewebe in herzinsuffizienten Ratten mit pulmonaler Hypertonie. Während es im kardialen Gewebe zu einer verstärkten Aktivität und Expression kommt, wird eine Downregulation im Lungenparenchym beobachtet. Trotz einer stark erhöhten plasmatischen Renin-Aktivität, die durch Gabe des Schleifendiuretikums Furosemid induziert worden ist, kommt es nicht zu einer signifikanten Erhöhung der ACE-Aktivität in der Lunge. Diese autonome organspezifische Regulation des lokalen RAS ermöglicht ein unterschiedliches Expressionsmuster in Abhängigkeit der Hämodynamik und der Pathophysiologie. Während die herzinsuffizienten Ratten mit pulmonaler Hypertonie eine vermehrte systemische und kardiale ACE Expression erfahren und es folglich zu einer verstärkten Bildung des Vasokonstriktors AngII kommt, wird mittels der organspezifischen Regulation im pulmonalen Gewebe das Gegenteil beobachtet. Bei erhöhtem pulmonalem Gefäßwiderstand kommt es zu einer verminderten ACE-Expression und damit konsekutiv zur verminderten Bildung von AngII, einem bedeutenden Vasokonstriktor. Es wird also ein negativer Feedbackmechanismus ausgelöst, um das Organ vor einer weiteren Schädigung zu schützen.

Bei der Untersuchung der aortalen ACE-mRNA Expression konnte kein unterschiedliches Expressionsmuster in den drei untersuchten Rattenstämmen gefunden werden. Auch im Rahmen der veränderten hämodynamischen Bedingungen bei den kongene Ratten ist es zu keiner Änderung des Expressionsmusters gekommen. Für die Betrachtung der Folgen eines Bluthochdrucks und nachfolgender Endorganschäden scheint die lokale ACE-Expression in den großen Gefäßen lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Im Rahmen der renalen Homöostase nimmt AngII eine übergeordnete Rolle ein und greift neben den hämodynamischen Eigenschaften auch noch in nierenspezifische Regelkreise ein. Die Bildung des renalen AngII wird sowohl durch das zirkulierende Aogen und AngI als auch lokal durch die ortsansässigen Enzyme katalysiert. Ein Nachweis der lokalen Generierung ist die absolute Konzentration des AngII, die sowohl im proximalen Tubulus als auch interstitiell und medullär höher ist als die plasmatische Konzentration (Campbell et al., 1991). Auch zeigen Untersuchungen des renalen RAS eine lokale Erhöhung der AngII Syntheseleistung, die unabhängig vom zirkulierenden RAS zu sein scheint (Schunkert et al., 1993). Die bedeutende Rolle des lokalen RAS in der Niere liegt in den Effekten, die AngII unabhängig von der Hämodynamik lokal entfaltet. Eine vermehrte Bildung von AngII ist mit einer progressiven Nierenschädigung assoziiert, so dass zu vermuten ist, dass sowohl die über die Aldosteron-Aktivierung hypertensiven Effekte als auch die auf zellulärer Ebene durch das AngII direkt vermittelten Einflüsse, wie Aktivierung von inflammatorischen Zytokinen, synergistisch wirken und somit die Schädigung des Nierengewebes verstärken. AngII fördert beispielsweise die Produktion von nephrotoxischen Radikalen oder stimuliert die Zellhypertrophie und Proliferation durch Erhöhung der Synthese profibrotischer Cytokine und Wachstumsfaktoren (Luft, 2002). Auch kann es zur Induktion der Apoptose und von profibrotischen Reaktionen oder Entzündungsreaktionen kommen (Wolf et al., 2003). Die Situation wird noch verstärkt, wenn nicht kreislaufgesunde, sondern kompromittierte Tiere einer erhöhten *Ace*-Genaktivierung ausgesetzt werden. Bei der Untersuchung von Ratten mit einer kardialen Schädigung wurden signifikant höhere Reninkonzentrationen im Nierengewebe nachgewiesen, die sich proportional zum Schweregrad der kardialen Beteiligung verhalten (Pieruzzi et al., 1995). Grundsätzlich könnte man davon ausgehen, dass in dieser Situation zunächst das systemische RAS aktiviert worden ist und somit die Auswirkungen im renalen Gewebe erklärt werden können. In diversen Versuchen konnte nachgewiesen werden dass es

mit aktivierter RAS-Kaskade im renalen Gewebe zu einer so starken Schädigung des Nierenparenchym kommt, die jedoch nicht alleine durch die veränderte Hämodynamik zu erklären ist. Somit müssen auch die Prozesse, die durch die lokale RAS-Kaskade angestoßen werden (glomeruläre kapilläre Hypertension, profibrotische Effekte und Proteinurie, etc.) eine Schlüsselfunktion einnehmen (Brewster et al., 2004) und so dass Nierenparenchym irreversibel schädigen (Glomerulosklerose oder tubulointerstitieller Fibrose). Huang et al. zeigte anhand transgener Mäuse, die eine erhöhte Ace-Genaktivität aufwiesen, dass die ACE-Aktivität ein wichtiger Faktor bei der Entstehung der Nephropathie bei Mäusen mit Diabetes mellitus ist (Huang et. al., 2001). Die bedeutende Rolle des lokalen RAS in der Niere liegt in den Effekten, die AngII unabhängig von der Hämodynamik vor Ort entfaltet. Obwohl die hämodynamischen Effekte des AngII sicherlich bedeutend zur renalen Schädigung beitragen, sind die nicht hämodynamischen Faktoren hier wohl entscheidender. Eine vermehrte Expression von Chemokinen, chemotaktischen Faktoren und Zelladhäsionsmolekülen tragen wesentlich zur Entwicklung der Glomerulosklerose und tubulointerstitieller Fibrose bei. Hinsichtlich des etablierten kongenen Stammes sollte daher das Hauptaugenmerk auf die nicht-hämodynamischen Wirkungsmechanismen gelegt werden. Es ist davon auszugehen, dass sowohl die kongenen Tiere als auch die hypertensiven Tiere bei Untersuchungen der Nierenfunktion im Vergleich zu den normotensiven Ratten Funktionseinschränkungen aufweisen werden, die ursächlich in der Hypertonie begründet liegen. Beide Stämme unterscheiden sich jedoch in der ACE-Aktivität auf der Genexpressionsebene. So weist der kongene Stamm eine höhere Aktivität auf als der hypertensive Stamm. In allen Nierenabschnitten entspricht die ACE-mRNA Expression des kongenen Stammes die des normotensiven Stammes, da auch die lokale Ace-Genexpression genetisch determiniert und nicht durch den Blutdruck beeinflusst ist. Es ist anzunehmen, dass aufgrund der lokal verstärkten ACE-Genexpression auch vermehrt AngII gebildet wird. Wenn nun neben der arteriellen Hypertonie als weiterer Faktor eine erhöhte renale AngII-Konzentration besteht, ist zu vermuten, dass die Niere bei den kongenen Tieren stärkeren Schäden ausgesetzt ist, die vorwiegend auf die nicht hämodynamisch wirksamen Eigenschaften des AngII zurückzuführen sind. So könnte der Verlauf der Nierenschädigung fulminanter verlaufen, da neben der Hämodynamik zusätzliche Regelkreise aus dem Gleichgewicht geraten sind. Auch wäre das Auftreten von renalen Folgeschäden zu einem Zeitpunkt möglich, an dem die hypertensiven Ratten nur geringe Beeinträchtigungen der Nierenfunktion aufweisen und

sich noch in einem kompensierten Zustand befinden. Um diese Hypothese zu untermauern, müssten nun in weiteren Versuchen Bedingungen geschaffen werden, die das Hauptaugenmerk auf die Endorganschäden richten und diese zu verschiedenen hämodynamischen Bedingungen untersucht werden. Es ist davon auszugehen, dass die kongene Tieren aufgrund der schon bestehenden vermehrten Expression auf lokaler Ebene die Homöostase nicht so lange aufrechterhalten können, wie es z.B. bei den hypertensiven Tieren der Fall wäre. Neben der genetischen Determinierung der ACE-Aktivität scheinen jedoch geschlechtsspezifische Regulationsmechanismen eine Rolle zu spielen. Im Kortex weisen die kongenen Weibchen eine signifikant höhere Konzentration auf als die kongenen Männchen. Die genauen Mechanismen sind nicht bekannt.

Auch im kardialen Gewebe sind alle Komponenten des RAS vorhanden, so dass sowohl AngI als auch AngII lokal generiert werden können. Neben dem Myokard ist das Enzym in unterschiedlich hohen Konzentrationen auch in den Klappen, Koronarien, Endo- und Epikard nachweisbar (Zhou et al., 1994). Aufgrund der geringen Renin-mRNA Expression ist die Hauptquelle für die lokale Bildung des Angiotensinogens dass von der Zirkulation aufgenommene Renin. Trotz dieses Ineinandergreifens beider Systeme ist anzunehmen, dass die lokale AngII Synthese teilweise ohne Rückkopplung mit den zirkulierenden Komponenten erfolgt. Somit wird unter bestimmten pathologischen Verhältnissen die Renin- und somit Angiotensinogen Produktion im Herzen selbst erfolgen und daher kann die organspezifische Bildung von AngII auch lokal reguliert werden.

Bei der Bildung von AngII werden im Herzgewebe diverse nicht-hämodynamische Prozesse angestoßen, die über die beiden Angiotensinrezeptoren moduliert werden. So kommt es unter anderem zur verstärkten Fibrosierung bei aktivierter Enzymkaskade. Falls diese Reaktionskaskade nicht unterbrochen wird, kann dieser Prozess durch sich selbst aktivierende Mechanismen sogar weiterhin noch verstärkt werden. Durch die Beeinflussung der intrazellulären Calciumhomöostase besitzt AngII einen inotropen Effekt (Hoffmann et al., 2001). Auch löst AngII als Reaktion auf den oxidativen Stress eine Hypertrophie der Myozyten aus. Stellen die kompensatorischen Mechanismen, wie die Myozytenhypertrophie initial eine wirkungsvolle Adaptation an die veränderte Hämodynamik zur Aufrechterhaltung der kardialen Funktion dar, wird der Herzmuskel bei Fortbestehen irreversibel geschädigt und kann seiner Funktion nicht mehr adäquat nachkommen. Was somit zunächst als Kompensationsmechanismus zur

Aufrechterhaltung der kardialen Funktion sinnvoll erscheint, wird bei chronischer Belastungssituation als Hauptrisikofaktor für den plötzlichen Herztod und das Herzversagen bei chronischer Herzinsuffizienz angesehen (Dzau et al., 2001). Die herausragende physiologische Bedeutung des kardialen RAS liegt somit in der Aufrechterhaltung einer adäquaten Homöostase sowohl zwischen der Induktion und Inhibition von Zellwachstum und Proliferation als auch der adaptiven Reaktionen des Myokards auf Schädigungen wie myokardialer Stress durch z.B. Minderperfusion oder oxidativer Stress im Sinne eines Myokardinfarktes.

In diversen Tiermodellen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass AngII seinen Effekt auf das Myokard unabhängig von seinem Einfluss auf den Blutdruck ausübt (Tian et al., 2004). Dieses lokale System scheint auch proportional an der Schwere der Herzinsuffizienz beteiligt zu sein (Pieruzzi et al., 1995). So zeigte Pieruzzi, dass sowohl die *Ace*- als auch die Renin-Genexpression in dekompensierten Tieren um ein Vielfaches höher ist als bei kompensierten Tieren, die auch im Vergleich zu gesunden Tieren bereits eine signifikant höhere Expression aufwiesen. Mehrere Untersuchungen zeigten, dass das lokale System besonders bei Ratten mit einer dekompensierten Herzfunktion aktiviert zu sein scheint. Es konnten sowohl signifikant erhöhte Renin-mRNA- als auch erhöhte ACE-mRNA Level in Tieren in hypertrophiertem Herzgewebe nachgewiesen werden. Somit scheint die Aktivierung des lokalen Systems einen wichtigen Einfluss auf die Pathogenese des klinischen Erscheinungsbildes im Rahmen der Herzinsuffizienz und auf das myokardiale Remodelling zu haben. Neben den Veränderungen in den Myozyten greift das aktivierte RAS auch in anderen Zellreihen in das Geschehen ein und aktiviert diverse Prozesse, sobald die physiologische Homöostase nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Das lokal gebildete AngII löst beispielsweise proliferierende Stimuli aus, so dass es zu einer vermehrten Aktivierung von Fibroblasten kommt und damit zu bindegewebigen Umbauprozessen im Myokard im Sinne des Remodellings (Schelling, 1979 und 1991). Das lokale ACE scheint dabei eine dominierende Rolle in diesem Remodellingprozess einzunehmen, da in diversen Experimenten eine Aktivierung des kardialen ACE bei Tieren mit Myokardinfarkt und nachfolgendem Remodelling ohne Erhöhung der plasmatischen ACE-Aktivität demonstriert werden konnte (Hirsch et al., 1991).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Ratten zeigte sich- determiniert durch den jeweiligen Genotyp- auch eine stammesabhängige *Ace*-Genexpression auf mRNA-Ebene. So weisen die kongenen Männchen und Weibchen eine erhöhte mRNA

Expression auf als der hypertensive Stamm. Diese Vermutung, dass eine erhöhte ACE Expression bei den hypertensiven Ratten in Kombination mit anderen sekundären Faktoren zu einer früheren oder stärkeren Endorganschädigung führt, wird von Untersuchungen am transgenen Rattenmodell von Tian unterstützt. Die Arbeitsgruppe um Tian entwickelte ein transgenes Rattenmodell, das durch eine erhöhte ACE-Expression, vorwiegend im Herzen, charakterisiert ist (Tian et al, 1996). Trotz der erhöhten nachweisbaren ACE Aktivität im Myokard traten zunächst keine morphologischen Veränderungen auf. Wurden diese Tiere jedoch einer erhöhten kardiovaskulären Belastung ausgesetzt, reagierten die transgenen Ratten mit einer signifikant erhöhten Myokardhypertrophie als die Kontrolltiere. Somit scheint es eines zusätzlichen äusseren Reizes zu bedürfen, um die Homöostase nachhaltig zu beeinflussen. Es kann davon ausgegangen werden, dass zusätzliche kardiale Schädigung durch das lokale gebildete AngII verursacht werden, die unabhängig vom Bluthochdruck sind. Somit könnten auch hier, analog zur Niere, aufgrund der verstärkten lokalen Aktivierung bei den kongenen Tieren, Endorganschäden früher oder stärker auftreten als bei den hypertensiven Tieren. Diese Hypothese müsste in entsprechenden Versuchsaufbauten weiter geklärt werden. Interessanterweise zeigen auch hier die Weibchen des kongenen Stammes ein anderes Verhalten in ihrer Genexpression mit einer signifikant verringerten Expression als bei den kongenen Männchen.

5 Zusammenfassung

Die essentielle arterielle Hypertonie zeigt eine hohe Prävalenz und nimmt aufgrund der schwerwiegenden Folgeerkrankungen eine zentrale Rolle für die renale, kardio- und zerebrovaskuläre Morbidität und Mortalität ein. Der Blutdruck wird als komplexes quantitatives Merkmal sowohl über eine polygene Veranlagung als auch über multiple Umweltfaktoren beeinflusst.

Die variable Kombination unterschiedlicher prädisponierender Gene bei verschiedenen Individuen erschwert die genetische Analyse einer Erkrankung wie der Hypertonie. Beim Menschen gestaltet sich die Suche nach diesen Genen besonders kompliziert, da die Regulation des Blutdrucks von nicht kontrollierbaren Umwelteinflüssen modifiziert wird. Zur Erforschung der genetischen Grundlagen des Bluthochdrucks und Bestimmung von potentiellen Kandidatengen wurden deshalb tierexperimentelle Modelle entwickelt, bei denen sowohl die Umweltfaktoren als auch der genetische Hintergrund Steuerungsgrößen darstellen, die sich im experimentellen Versuchsansatz gut vorhersagen lassen.

Bei der vorliegenden tierexperimentellen und molekularbiologischen Arbeit wurde ein kongener Stamm aus der Kreuzung der Rattenmodelle des normotensiven WKY-0_{HD}- und des SHRSP_{HD}-Stammes gezüchtet, der durch die chromosomale *Ace*-tragende Region des normotensiven Stammes im hypertensiven Hintergrund charakterisiert ist. Ziel war die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung des potentiellen Kandidatengens (*Ace*) zu veränderten Umweltbedingungen (Bluthochdruck) in einem kontrollierten tierexperimentellen Versuchsaufbau.

Bei der phänotypischen Untersuchung des kongenen Stammes zeigte sich, dass dieser keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Blutdrucks und der konsekutiven Organveränderungen (linksventrikuläres Gewicht), verglichen mit dem hypertensiven Referenzstamm, aufweist. Im Rahmen der Untersuchung der plasmatischen ACE-Aktivität und der organspezifischen ACE-mRNA Expression wiesen die kongenen Tiere entsprechend ihres genetischen Hintergrundes eine signifikant höhere Expression auf verglichen mit den hypertensiven Tieren. Da der kongene Stamm genotypisch die *Ace*-Region des normotensiven Referenzstammes trägt, ist somit eine Beeinflussung des Bluthochdrucks durch das *Ace*-Gen nicht nachzuweisen. Somit kann der *Ace*-Genlocus nicht als Kandidatengen für die Hypertonie angesehen werden. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Kreutz, die sowohl eine unabhängige Kosegregation der ACE-Plasma

Aktivität und des Blutdrucks als auch eine genetische Determinierung der ACE-Aktivität durch den *Ace*-Genlocus beschrieben, konnten verifiziert werden.

Das lokale gewebspezifische RAS hat neben der bedeutenden Stellung bei der Aufrechterhaltung der Hämodynamik auch eine herausragende Rolle bei nicht-hämodynamischen, organspezifischen Prozessen. Bereits durchgeführte Versuche von diversen Arbeitsgruppen zeigten die besondere, organbezogene Bedeutung des lokalen RAS zu unterschiedlichen Gegebenheiten auf und untersuchten diverse Krankheitsbilder und pathophysiologische Bedingungen. Dabei zeigte sich ein großer Unterschied im Expressionsverhalten auf lokaler Ebene in Abhängigkeit von der kardiovaskulären Situation. Kommt es zu einer Störung der Homöostase und somit zu einer vermehrten Aktivierung des lokalen RAS, werden diverse Reaktionskaskaden ausgelöst, die organspezifisch zu Endorganschäden führen oder diese beschleunigen können. Mit dem hier etablierten kongenen Tiermodell wurde ein Modell gezüchtet, das die herausragende Gelegenheit bietet, das lokale RAS in einem pathophysiologischen Setting zu untersuchen. Die Auswirkungen einer vermehrten lokalen und systemischen ACE-Expression und somit Aktivierung der weiteren Reaktionskaskade in einem hypertensiven Hintergrund können so weiter untersucht werden

6 Ausblick

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Etablierung, Genotypisierung und Phänotypisierung des kongenen Stammes SHRSP.WKY–Ace. Dieser kongene Stamm kann nun als Ausgangspunkt in der weiteren Genidentifizierungsstrategie herangezogen werden. Durch Etablierung subkongener Linien kann so eine Intervallverkleinerung erreicht werden. Mit Hilfe der Intervallverkleinerung können die Einflüsse anderer Gene, die mit übertragen worden sind, auf ein Minimum reduziert werden. Zusätzlich ist es somit möglich, die Fragmentgröße derart einzuschränken, dass eine spätere Klonierung des QTL technisch möglich ist.

Aufgrund des genetischen Designs des kongenen Stammes kann das neu etablierte Modell als Tiermodell für die Intermediärform des I/D-Polymorphismus angesehen werden. Durch weitere Analyse bestehender Homologien zwischen Mensch und Ratte können so nähere Erkenntnisse gewonnen werden, die nützlich sein können in der Deutung des Polymorphismus bezüglich der Assoziation dieses Polymorphismus und kardiovaskuläre Erkrankungen bzw. Risikostratifizierung.

Diese Arbeit versteht sich als eine erste Bestandsaufnahme des kongenen Stammes. In weiteren Versuchen sollten nun die anderen Komponenten des RAS untersucht werden. Auch können nun nach Etablierung des kongenen Stammes Versuche generiert werden, in denen die Ratten unterschiedlichen Umweltbedingungen ausgesetzt und die Folgen für das lokale RAS untersucht werden. Wenn von der Hypothese auszugehen ist, dass mit Dekompensation der Homöostase veränderte Expressionsverhalten der RAS-Komponenten auf lokaler Ebene herrschen, könnte es somit schneller oder verstärkt zu Endorganschäden kommen. In weiteren Schritten wäre eine Behandlung dieser Tiere mit ACE-Hemmern oder AT₁-Antagonisten denkbar, um so zu analysieren, ob in den Prozess der Endorganschäden kausal eingegriffen werden kann und so der Prozess aufgehalten oder zumindest deutlich verzögert werden kann.

7 Literaturverzeichnis

Alhenc-Gelas F, Weare JA, Johnson RL Jr, Erdos EG. Measurement of human converting enzyme level by direct radioimmunoassay. *J Lab Clin Med* 1983; 101: 83

Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Al-Majali KM, Trembling PM, Mann CJ, Shoulders CC, Graf D, St Lezin E, Kurtz TW, Kren V, Pravenec M, Ibrahimi A, Abumrad NA, Stanton LW, Scott J. Identification of CD 36 (fat) as an insulin-resistance gene causing fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rat. *Nature Genet* 1999; 21 (1): 76-8

Arima S, Kohagura K, Abe M, Ito S. Mechanism that control glomerular Hemodynamics. *Clin Exp Nephrol* 2001; 5: 55-61

Bader M, Paul M, Fernandez-Alfonso M, Kaling M, Ganten D. Molecular biology and biochemistry of the renin-angiotensin system. *Textbook of Hypertension*, edited by J.D. Swales. Oxford, UK, Blackwell 1994: 214-232.

Bader M, Peters J, Baltatu O, Müller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue rennin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 2001; 79: 76-110

Beckman JS, Weber JL. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 1992; 12(4): 627-631.

Berge KE, Berg K. No effect of insertion/deletion polymorphism at the ACE locus on normal blood pressure level or variability. *Clin Genet*. 1994 Apr; 45 (4):169-174

Bernstein KE, Sayeski PP, Doan T, Farmer PK, Ali MS. Signal transduction pathways of angiotensin II in the kidney. *Contrib Nephrol* 2001; 135: 16-33

Bickerton R, Buckley JP. Evidence for a central mechanism of angiotensin induced hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961; 106: 834-837.

Brewster U, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med* 2004; 116: 262-272.

Burt VL, Whelton P, Rocella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension* 1995; 25:305-313.

Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rakotovo R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level : the Nancy study. *Am J Hum Genet* 1988 ; 43 : 774-780

Campbell. D, Lawrence A, Towrie A, Kladis A, Valentijn A. Differential regulation of angiotensin peptid levels in plasma and kidney of the rat. *Hypertension* 1991 ; 18 : 763-777

Chidambaram M, Duncan JA, Lai VS, Cattran DC, Floras JS, Scholey JW, miller JA. Variation in the renin angiotensin system throughout the normal menstrual cycle. *J Am Soc Nephrol* 2002 ; 13 : 446-452

Cousterousse O, Lindpaintner K, Paul M, Ganten D, Kreutz R. Interstrain differences in angiotensin I-converting enzyme mRNA and activity levels. Comparison between Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats and Wistar-Kyoto Rats. *Clin. And Exper. Hypertension* 1999; 21 (4): 377-393

Cusi D, Bianchi G. A primer on the genetics of hypertension. *Kidney Int* 1998 ; 54 : 328-342

Danser AH, van Kesteren CA, Bax WA, Tavenier M, Derkx FH, Saxena PR, Schalekamp MA. Prorenin, renin, angiotensinogen and ACE in normal or failing hearts: evidence for renin binding. *Circulation* 1997; 96: 220-226

Darvasi A, Weinreb A, Minke V, Welker JI, Soller M. Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* 1993 ; 134 : 943-951

Dietz R, Shömig A, Rascher W. Pathophysiological aspects of genetically determined hypertension in rats, with special emphasis on stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Handbook of Hypertension* 1984; Vol 4: 256-285

Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlof B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, Van GW, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Luscher T, Mancini J, Minram A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D, Weber M. The relevance of tissue angiotensin converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am J Cardiol* 2001; 88: 1L-20L.

Ellison KE, Ingelfinger JR, Pivor M, Dzau VJ. Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression. *J Clin Invest* 1989; 83: 1941-1945

Erdös EG, Sloane EM. An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidins. *Biochem Pharmacol* 1962; 11: 585-592

Erdös EG, Yang HYT. An enzyme in microsomal fraction of kidney that inactivates bradykinin. *Life Sci* 1967; 6: 569-574

Erdös EG, Skidgel RA. Structure and functions of human angiotensin I converting enzyme (kinase II). *Biochem Soc Transact* 1985; 13: 42-44

Fischer M, Baessler A, Schunkert H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 672-677.

Förster VTh. Zwischenmolekulare Energie-Wanderung und Fluoreszenz. *Anal of Physics (Leipzig)* 1948; 2: 55-75

Freshour JR, Chase SE, Vikstrom KL. Gender differences in cardiac ACE expression are normalized in androgen-deprived male mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1992-H2003.

Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chapell MC, Brosnihan KB. Estrogen regulation of Angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension* 1999; 33: 323-328.

Gallinat S, Busche S, Raizada MK, Sumners C. The angiotensin II type 2 receptor: An enigma with multiple variations. *Am J Physiol* 2000; 278: 357-374

Giner V, Poch E, Bragulat E, Oriola J, Gonzales D, Coca A, de la Sierra A. Renin-angiotensin system genetic polymorphism and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* 2000; 35 [part2]: 512-517

Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 1991; 88: 921-933.

Grima M, Welsch C, Giesen-Crouse EM, Coquard C, Barthelmebs M, Imbs JL. Age-related variations in tissue angiotensin converting enzyme activities: comparison between spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1991; 18(9):649-59.

Hagemann A, Nielsen AH, Poulsen K. The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. *Exp Clin Endocrinol* 1994; 102: 252-261.

Harrap SB, Davidson HR, Connor JM, Soubrier F, Corvol P, Fraser R, Foy CJ, Watt GC. The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension* 1993; Apr 21 (4): 455-460.

Higashimori K, Zhao Y, Higaki J, Kamitani A, Katsya T, Nakura J, Miki T, Mikami H, Ogihara T. Association analysis of a polymorphism of the angiotensin converting enzyme with essential hypertension in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; Mar 15 (2): 399-404.

Hilbert P, Lindpaintner K, Beckham JS, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, Cartwright P, DeGouyon B, Julier C, Takahashi S, Vincent M, Ganten D, Georges M, Lathrop GM. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 1991; 353: 521-529.

Hirsch A, Talsness C, Schunkert H, Paul M, Dzau V. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res* 1991; 69: 475-482.

Hoffmann S, Krause T, van Geel PP, Willenbrock R, Pagel I, Pinto Y, Buikema H, van Gilst WH, Lindschau C, Paul M, Inagami T, Ganten D, Urata H. Overexpression of the human angiotensin II type 1 receptor in the rat heart augments load induced cardiac hypertrophy. *J. Mol. Med.* 2001; 79: 601-608.

Holland PM et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88: 7276-7280.

Hollenberg NK. Pharmacologic interruption of the renin-angiotensin system and the kidney: differential response to angiotensin converting enzyme and renin inhibition. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(suppl): S239-S242.

Holmquist B, Bunning P, Riordan JF. A continuous spectrometric assay for angiotensin converting enzyme. *Anal Biochem* 1979; 95: 540

Huang H, Arnal JF, Ilorens-Cortes C, Challah M, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Michel JB. Discrepancy between plasma and lung angiotensin-converting enzyme activity in experimental congestive heart failure. *Circ Res* 1994; 75: 454-461.

Ikeda K, Nara Y, Matumoto C, Mashimo T, Tamada T, Sawamura M, Nabika T, Yamori Y. The region responsible for stroke on chromosome 4 in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 229: 658-662

Ingelfinger J, Zuo W, Fon E, Ellison K, Dzau V. In situ hybridisation evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. A hypothesis for the intrarenal renin-angiotensin system. *J Clin Invest*, 1990; 85: 417-423.

Innes BA, McLaughlin MG, Kapuscinski MK, Jacob HJ, Harrap SB. Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension. *Hypertension* 1998; 31: 741-746

Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker RK, Mao YP, Ganten D, Dzau VJ, Lander ES. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 1991; 67(1): 213-224.

Jacob HJ, Brown DM, Bunker RK, Daly MJ, Dzau VJ, Goodman A, Koike G, Kren V, Kurtz T, Lernmark A, Levan G, Mao Y, Pettersson A, Pravenec M, Simon JS, Szpirer C, Szpirer J, Troilliet MR, Winer E, Lander ES. A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Nat Genet* 1995; 9: 63-69.

Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat Genet*. 1992; Apr 1 (1): 72-75.

Johnson ML, Ely DL, Turner ME. Genetic divergence between the Wistar-Kyoto rat and the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1992; 19(5): 425-427.

Johnston CI. Renin-Angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *J Hypertens Suppl* 1992; 10 (suppl): S13-S26.

Julier C, Delephine M, Keaveny B, Twenwillinger J, Davis S, Weeks DE, Bui T, Jeunemaitre X, Velho G, Froguel P, Ratcliffe P, Corvol P, Soubrier F, Lathrop GM. Genetic susceptibility for human familial essential hypertension in a region of homology with blood pressure linkage in the rat chromosome 10. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2077-2085

Kaplan NM. Hypertension in the Population at Large. *Clinical Hypertension*, Seventh Edition. Baltimore, Williams & Wilkins 1998: 1-17.

Krege JH, Kim HS, Moyer JS, Jennette JC, Peng L, Hiller SK, Smithies O. Angiotensin-Converting Enzyme gene mutations, blood pressures, and cardiovascular homeostasis. *Hypertension* 1997; 29(2): 150-157

Kreutz R, Lindpaintner K, Pfeffer MA, Stampfer MJ, Gaziano JM, Grodstein F, Buring J, LaMotte F, Hennekens CH, Nadal-Ginard B, Braunwald E. Angiotensin I-converting enzyme genotype and risk for coronary heart disease. *Circulation* 1993; 88: 1-510

Kreutz R, Hubner N, James MR, Bihoreau MT, Gauguier D, Lathrop GM, Ganten D, Lindpaintner K. Dissection of a quantitative trait locus for genetic hypertension on rat chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci* 1995a; 92(19): 8778-8782.

Kreutz R, Hubner N, Ganten D, Lindpaintner K. Genetic linkage of the ACE gene to plasma angiotensin-converting enzyme activity but not to blood pressure. A quantitative trait locus confers identical complex phenotypes in human and rat hypertension. *Circulation* 1995b; 92(9): 2381-2384.

Kreutz R, Hübner N. Congenic rat strains are important tools for the genetic dissection of essential hypertension. *Seminars in Nephrology* 2002; 22(2):135-147

Koike G, Krieger JE, Jacob HJ, Mukoyama M, Pratt RE, Dzau VJ. Angiotensin converting enzyme and genetic hypertension: cloning of rat cDNAs and characterization of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198(1): 380-386.

Lanzillo JJ, Fanburg BL. Development of competitive enzyme immunoassays for human serum angiotensin-1-converting enzyme: A comparison of four assay configurations. *Anal Biochem* 1982; 126: 156

Lais LT, Schaffer RA, Brody MJ. Neurogenic and humoral factors controlling vascular resistance in the spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res* 1974; 35: 764-774

Lee LG et al. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl. Acids. Res.* 1993 ; 21 : 3761-3766

Lee SJ, Qi N, Guarnera RA, Lee SY, Cicala GT. Use of a panel of congeneric strains to evaluate differentially expressed genes as candidate genes for blood pressure quantitative trait locus. *Hypertens Res* 2003 ; 26 : 75-87

Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanism of human hypertension. *Cell* 2001; 104 (4): 545-556.

Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Hennekens CH. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1995; 332: 706-711

Lo M, Liu KL, Lantelme P, Sassard J. Subtype 2 of angiotensin II receptor controls pressure-natriuresis in rats. *J Clin Invest* 1995; 95: 1394-1397

Louis WJ, Howes LG. Genealogy of the spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat strains: implications for studies of inherited hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16 (suppl 7): 1-5

Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent responses to platelets and serotonin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1986; 8(2): 155-160

Luft FC, Mervaala E, Muller DN, et al. Hypertension-induced end-organ damage: A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension* 1997; 15: 1041-1048

Luft FC. Proinflammatory effects of angiotensin II and endothelin: targets for progression of cardiovascular and renal diseases. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11: 59-66

Mayer G. ACE genotype and ACE inhibitor response in kidney disease: a perspective. *Am J Kidney Diseases* 2002; 2: 227-235

Mc Bride MW, Charchar FJ, Graham D, Miller WH, Strahorn P, Carr FJ, Dominiczak AF. Functional genomics in rodent models of hypertension. *J. Physiol* 2003; 554 (1): 56-63

Möhring J, Möhring B. Evaluation of sodium and potassium balance in rats. *J Appl. Physiol* 1972; 33: 688

Morgan K. Diverse factors influencing angiotensin metabolism during ACE inhibition: Insights from molecular biology and genetic studies. *Br Heart J* 1994; 72 (suppl): 3-10

Morris BJ, Zee RY, Schrader AP. Different frequencies of angiotensin-converting enzyme genotypes in older hypertensive individuals. *Journal of Clinical Invest.* 1994; 94: 1085-1089

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

Nagaoka A, Kakihana M, Suno M, Hamayo K. Renal hemodynamics and sodium excretion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1981; 241: F244-F249

Nara Y, Nabika T, Ikeda K, Sawamura M, Endo J, Yamori Y. Blood pressure cosegregates with a microsatellite of angiotensin I converting enzyme (ACE) in F2 generation from a cross between original normotensive Wistar-Kyoto rat (WKY) and stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181(3): 941-946.

Nig KKF, Vane JR. Fate of angiotensin I in the circulation. *Nature* 1968; 218: 144-150

Nickenig G, Laufs U, Schnabel P, Knorr A, Paul M, Bohm MP. Down-regulation of aortic and cardiac AT1 receptor gene expression in transgenic (mRen-2) 27 rats. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 134-140

Okamoto K, Aiko K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; 27: 282-293

Okamoto K, Yamori Y, Nagaoka A. Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Circ Res* 1974; 34(Suppl.I): 143-153.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006 ; 86: 747-803.

Pfeifer M, Bruckschlegel G, Holmer SR, Paul M, Riegger AJ, Schunkert H. Reciprocal regulation of pulmonary and cardiac angiotensin-converting enzyme in the rats with severe left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 1998, 38 (1) :125-32

Pickering G. Hypertension. Definitions, natural histories and consequences. *Am J Med* 1972; 52(5): 570-583.

Pieruzzi F, Abassi ZA, Keiser HR. Expression of renin-angiotensin system components in the heart, kidneys and lungs of rats with experimental heart failure. *Circulation* 1995; 92: 3105-3112.

Pinto YM, Buikema H, van Gilst WH, Scholtens E, van Geel PP, de Graeff PA, Wagner J, Paul M. Cardiovascular and-organ damage in Ren-2 transgenic rats compared to spontaneously hypertensive rats. *J Mol Med* 1997; 75: 371-377.

Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 77-88

Platt R. Heredity in Hypertension. *Lancet* 1963; 1: 899-904.

Poch E, Gonzales D, Giner V, Bragulat E, Coca A, de la Sierra A. Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. *Hypertension* 2001; 38: 1204-1209

Rapp J. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev* 2000; 80 (1): 135-172

Remuzzi G, Bertanin T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998; 339: 1448-1456

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990 ; 86 : 1343-1346

Rothermund L, Pinto YM, Hocher B, Vetter R, Herfort N, Kossmehl P, Neumayer HH, Paul M, Kreutz R. Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling in hypertensive transgenic rats overexpressing the Ren2 gene. *J Hypertens* 2001 ; 19 : 1465-1472.

Rubattu S, Struk B, Kreutz R, Volpe M, Lindpaintner K. Animal Models of genetic Hypertension: What can we learn from Hypertension? *Clin Exp Pharm Phys* 1995; Suppl 2: 000-000

Rubattu S, Volpe M, Kreutz R, Ganten U, Ganten D, Lindpaintner K. Chromosomal mapping of quantitative trait loci contributing to stroke in a rat model of complex human disease. *Nature Genet* 1996; 13: 429-434

Ruggeneti P, Schieppati A, Remuzzi G. Progression, remission, regression of chronic renal diseases. *Lancet* 2001; 357: 1601-1608

Satoh M, Kashihara N, Yamasaki Y, Maruyama K, Okamoto K, Maeshima Y, Sugiyama H, Sugaya T, Murakami K, Makino H. Renal interstitial fibrosis is reduced in angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 317-325.

Schelling P, Ganten D, Speck G, Fischer H. Effects of angiotensin II and angiotensin II antagonist saralasin on cell growth and renin 3T3 and SV3T3 cells. *J Cell Physiol* 1979; 98: 503-514.

Schelling P, Fischer H, Ganten D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens* 1991; 9:3-15.

Schmidt S, van Hooft IMS, Grobbee DE, Ganten D, Ritz E. Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: A Dutch hypertension and offspring study; *Journal of Hypertension* 1993; 11: 345-348

Schork NJ, Nath SP, Lindpaintner K, Jacob HJ. Extensions to quantitative trait locus mapping in experimental organisms. *Hypertension* 1996; 28(6): 1104-1111.

Schulz W, Hagler H, Buja L, Erdos E. Ultrastructural localization of angiotensin-I-converting enzyme an neutral metalloproteinase in the proximal tubule of the human kidney. *Lab Invest* 1988; 59: 789-797.

Schunkert H, Tang SS, Litwin SE, Diamant D, Riegner G, Dzau VJ, Ingelfinger JR. Regulation of intrarenal and circulating renin-angiotensin systems in severe heart failure in the rat. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 731-735.

Seikaly MG, Arant BS, Seney FD. Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest* 1990; 86: 1352-1357.

Singer DRJ, Morris CG, Jeffrey S. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. What to do all about the confusion?. *Circulation* 1996; 94: 236-239.

Skeggs, LT Jr, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertension-converting enzyme. *Am J Physiol* 1956; 103: 295-299

Snell GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genetics* 1948; 49: 87-108

Stallings RL, Ford AF, Nelson D, Torney DC, Hildebrand CE, Moyzis RK. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 1991; 10(3): 807-815

St Lezin E, Simonet L, Pravence M, Kurtz TW. Hypertensive strains and normotensive control strains: how closely are they related? *Hypertension* 1992; 19: 480-482

Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 651-657

Sun Y, Ratajska A, Zhou G, Weber KT. Angiotensin-converting enzyme and myokardial fibrosis in the rat receiving angiotensin II or aldosterone. *J Lab Clin Med* 1993; 122: 395-403.

Tian XL, Pinto YM, Costerousse O, Franz WM, Lippoldt A, Hoffmann S, Unger T, Paul M. Over-expression of angiotensin-converting enzyme-1 augments cardiac hypertrophy in transgenic rats. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1441-1450

Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F. Evidence from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 197-205

Toke M, Meyer TW. Hemodynamic effects of angiotensin II in the kidney. *Contrib Nephrol. Basel Karger* 2001; 135: 34-46

Uber A, Rettig R. Pathogenesis of primary hypertension- lessons from renal transplantation studies. *Kidney Int Suppl* 1996; 55: 42-45

Vane JR. The release and fate of vaso-active hormones in the circulation. *Br J Pharmacol* 1969; 35: 209-242

Volpe M, Camargo WJ, Campbell WG Jr, Sealey JE, Mueller FB, Timmermanns PB, Laragh HJ. Relation of plasma renin to end organ damage and to protection of K⁺ feeding in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1990; 15(3): 318-326.

Volpe M, Rubattu S. Pathophysiological aspects of genetically determined hypertension in rats, with special emphasis on stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Handbook of Hypertension* 1994; Vol 16: 365-394

Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. *Hypertension: Pathology, Diagnosis and Management* 1990; Laragh JH & Brenner BM; Raven Press NY: 811-1000

Weitz W. Zur Ätiologie der genuinen oder vaskulären Hypertension. *Z. Klin. Med* 1923; 96:151-183

Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II as renal growth factor. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3: 1531-1540.

Wolf G, Ziyadeh FN, Zahner G, Stahl RAK. Angiotensin II is mitogenic for cultured rat glomerular endothelial cells. *Hypertension* 1996; 27: 897-905

Wolf G. Link between angiotensin II and TGF- β in the kidney. *Miner Electrolyte Metab.* 1998; 24: 174-180

Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 2003; 93: 3-13

Yang HYT, Erdös EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochem Biophys Acta* 1970; 214: 374-376

Yagil Y, Yagil C. Candidate genes, association studies and haplotype analysis in the search for the genetic basis of hypertension. *J Hypertens* 2004; 22(7): 1255-1258

Yamori Y, Ohta K, Horie R, Ohtaka M, Nara Y, Ooshima A. A new model for cerebral thrombosis and the pathogenesis. *Jpn Heart J* 1977; 22 (suppl 1): 343-345

Yamori Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR), the stroke-prone SHR (SHRSP) and their various substrain models for hypertension-related

cardiovascular diseases. Handbook of Hypertension, Vol. 16: Experimental and Genetic Models of Hypertension. Ganten D and de Jong W, editors. Amsterdam, Elsevier Science B.V. 1994: 346-364

Zhou J, Allen AM, Yamada H, Sun Y, Mendelsohn FAO. Localization and properties of angiotensin converting enzyme and angiotensin receptors in the heart. In: Lindpaintner K, Ganten D. Eds The Cardia-Renin Angiotensin System. Amonk, NY: Futura Publishing Co Inc; 1994: 63-88

8 Anhang

8.1 Materialien

8.1.1 Chemikalien und Radionukleotide

Substanz	Firma
[γ - ³² P]dATP (1 mCi, 3000 Ci/mmol, wässrige Lösung)	Amersham
[α - ³² P]dCTP (50 μ Ci, 3000 Ci/mmol, wässrige Lösung)	Amersham
10x PCR-Puffer	Rapidozym, Promega
10x TBE (Tris-Borat-EDTA-Lösung)	Gibco BRL
Aceton	Baker
Acrylease	Stratagene
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40)	Roth
Agarose zur DNA/RNA Elektrophorese	Roth
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma
Bromphenolblau	Merck
n-Butanol	Sigma
Century™ Marker Template (RNA-Längenmarker)	Ambion
Chloroform	Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
Diethylmalonsäure (98%, w/w)	Aldrich
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat (Titrierkomplex III, MG=372,24)	Roth
dNTPs (2,5 mM)	Rapidozym, Promega
dNTPs, Ultrapure Solution (10 mM dATP, dCTP, dGTP,	Pharmacia Biotech
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat (Titrierkomplex III, MG=372,24)	Roth
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth
Ethanol	Baker
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Merck
Formamid (HCONH ₂)	Merck
Formaldehyd (37%, v/v)	Baker
Harnstoff	Roth
Isopropanol	Sigma
Magnesiumchlorid (1,5 mM)	Rapidozym, Promega
Molekulargewichtsstandard Längenmarker 100 bp	Life Technologies
Molekulargewichtsstandard Längenmarker 1 kb	Life Technologies
Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Aldrich
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Merck
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v/v)	Sigma
Primer und Sonden	Life Technologies, TIB MOLBIOL, Genset Oligos
Proteinase K	Sigma
Rotiphorese (40% Acrylamid, 2% Bisacrylamid)	Roth
Salzsäure (HCl, 37%, v/v)	Merck
Schwefelsäure (96%, v/v)	Merck
SDS (Lauryl Sulfate)	Sigma
Szintillationsflüssigkeit	Packard

TaqMan 2x Universal PCR MasterMix	Applied Biosystems
Temed (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	Merck
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Gibco BRL
Trizol	Sigma
Wasserstoffperoxid (30%, v/v)	Promega
10x Kinase Puffer	Promega
10x PCR-Puffer	Sigma

8.1.2 Enzyme

Enzym	Aktivität	Hersteller
AmpliTaq® DNA-Polymerase	5 U/l	Perkin Elmer
Angiotensin Converting Enzyme		Sigma
ACE-Kalibrator	67U/l (37°C)	Sigma
Proteinase K	32,2 U/mg	Sigma
Taq-Polymerase	5 U/µl	Rapidozym, Promega
T4-Polynukleotidkinase	5 U/µl	Promega

8.1.3 Primer und Sonden für die TaqMan-PCR

Gen	Name	Sequenz
ACE	ACE-F	TTGTCTGTCACTGGAGCCTGGA
	ACE-R	GAAGAATTGCTTTGGGTGTGG
	ACE Sonde	FAM-TGACAAATATAATGGCCACGTCCCGGT-TAMRA
PBGD	PBGD-F	TGAAAACCTTGTACCCTGGCATA
	PBGD-R	TCCAATCTTAGAGAGTGCAGTATCAAGA
	PBGD-Sonde	FAM-TTGAAATCATTGCTATGTCCACCACAGG-TAMRA

8.1.4 Kits

Kit	Firma
Advantage cDNA Polymerase Mix	Clontech
Bio-Rad DC Protein Assay Kit	Bio Rad
DNA Sequencing Kit®	Applied Biosystems
PCR-Select cDNA Subtraction Kit®	Clontech
PCR-Select Differential Screening Kit®	Clontech
Qiaex II	Qiagen
Rat Radiation-Hybrid-Panel	Research Genetics
Sigma ACE-Kit	Sigma
SMART PCR cDNA Synthesis Kit®	Clontech

8.1.5 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer	Bestandteil	Konzentration
Denaturierungslösung	Natriumhydroxid Natriumchlorid	0,5 M 1,5 M
DEPC-Wasser	DEPC	0,1% (w/v)
Formamid-Laufpuffer	Bromphenolblau Xylen Cyanol FF Formamid Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	1% (w/v) 1% (w/v) 10% (v/v) 0,5 M
Gelladepuffer für Agarosegele	Glycerol EDTA (0,5 M, pH 8,0) Bromphenolblau <i>Aqua bidest.</i>	25 ml 100 µl 125 mg auf 50 ml auffüllen
Homogenisierungspuffer für Membranfraktionen	Natriumhydrogenphosphat Sucrose MgCl ₂ -Hexahydrat Aqua bidest	20mM 250mM 5mM Ad 900ml,pH auf 7,5 Titrieren,ad 1l autoklavieren
Lysis-Puffer	Trizma Base Di-Natrium-EDTA-Dihydrat Natriumchlorid SDS	50 mM, pH 8,0 100 mM, pH 8,0 100 mM 1% (w/v)
Neutralisierungslösung	Tris-HCl Natriumchlorid	0,5 M, pH 7,5 1,5 M
Puffer A	Diethylmalonsäure Natriumchlorid Di-Natrium-EDTA-Dihydrat 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 5g
Substrat	3,3',5,5' TMB Aqua bidest. Puffer A Wasserstoffperoxid 30% (v/v)	2 Tabletten 10 ml 10 ml 4 µl
PBS Puffer	CHAPS PBS	8mM ad100ml
TE-Puffer	Trizma Base Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	10 mM, pH 7,6 1 mM, pH 7,6
10x Kinase Puffer	Tris-HCl (pH 7,6) MgCl ₂ DTT	700 mM 100 mM 50 mM
10x PCR-Puffer	Tris-HCl (pH 9,0) KCl Triton®X-100	100 mM 500 mM 1%

10x TAE Puffer	Tris Eisessig EDTA (0,5 M, pH 8,0) Aqua bidest.	48,4 g 11,4 ml 20 ml auf 1 l auffüllen
10x TBE Puffer	Tris Borsäure EDTA (0,5 M, pH 8,0) Aqua bidest.	108 g 55 g 40 ml auf 1 l auffüllen
10x Transkriptions Puffer	Tris (pH 8,3) KCl	100 mM 500 mM
30x Formamid-Gelladepuffer	Bromphenolblau Xylencyanol EDTA (0,5 M, pH 8,0) Formamid	100 mg 100 mg 200 µl auf 10 ml auffüllen

8.1.6 Sonstige Materialien und Futtermittel

Artikel	Firma
12 ml-Greiner-Röhrchen	Sarstedt
BioMax MR-Röntgenfilme	Kodak
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell
Gelschlitten, Dichtungen, Kämmen, Agarosegele	Biometra
Glasplatten für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse (Normalfutter)	Altromin
Histoacryl-Gewebekleber	Braun
Hybond N-Membranen	Amersham/Pharmacia
Kämmen, Spacer für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Ketamin	Pfizer
Lochzange für Labortiere	Esculap
Makrolonkäfige Typ III und Typ IV	Ebeco
Mehrkanal-Spritze (8-Kanal)	Hamilton
Micro Amp Reaction Tube with Cap (0,2 ml, dünnwandig)	Perkin Elmer GeneAmp
Phosphoimagerplatten	Raytest
Polystyrene Immulon microplates, flat-bottomed, Immunosorp	Nunc Maxisorp, F96
Quick Spin-Säulen	Boehringer
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Restrainer	Werkstatt UKBF
RNAse AWAY®	MβP – Molecular Bio-Products
Röntgenkassetten Hypercassette™	Amersham Pharmacia Biotech
Rundboden-Röhrchen aus Polypropylen	Falcon
Saran™ Plastikfolie	DOW Chemical Company

Schweißfolie	GENETIX
Selbstklebende Plastikfolie Thermowell™	Costar
Standartips 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Sterilfilter Tips 0,5-10 µl ART20E	Fisher Scientific
Sterilfilter Tips 100-1000 µl ART20E	Fisher Scientific
Sterilfilter Tips 10-100 µl ART100E	Fisher Scientific
Stoffwechselfäfige für Ratten bis 300 g	Ehret
Thermo-Fast 96-Mikrotiterplatten (ohne Rand)	ABgene
Watman Papier	3M
Weithalsflaschen aus Polyethylen	Roth

8.1.7 Geräte

Gerät	Firma
ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Agarosegelkammer	Bio Rad
Autoklav Varioclav®	H+P Labortechnik
Blutdruckmeßgerät	TSE
Brutschrank	Heraeus Instruments
Brutschüttler	Infors AG
377 DNA Sequencer	ABI Prism
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Biometra
Elektrophoresekammer für große PAA-Gele	Stratagene, PEQLAB
ELISA Reader MRX II	MRX
Folienschweißgerät	MDC
Hybridisierungssofen	Biometra
Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf
Magnetrührer MR2002	Heidolph
Mikrotiterplattenschüttler	Roth
Minifuge RF (Zentrifuge)	Heraeus sepatech
PCR-Maschine	MJ Research
pH-Meter	Knick
Phosphoimager	Raytest
Photometer UV-1202	Shimadzu
Polytron Homogenisator Ultra-Turrax T25	Janke&KunkellKA Labortechnik
Schüttelwasserbad	Köttermann
Stromversorgungsgeräte für Elektrophoresekammern	Biometra, Life Technologies
Szintillations-Zähler	LKB Wallace
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf
UV-Stratalinker	Stratagene
Vortex VF2	Janke&KunkellKA Labortechnik

Waage	Sartorius
Wasserbad	GFL
³² P-Counter 1219 Rackbeta	LKB Wallac

8.1.8 Internetseiten

Internetseite	Anwendung
http://ratmap.gen.gu.se/	genetische Marker / Karten Rattengenom
http://rgd.mcw.edu/	genetische Marker / Karten Rattengenom
http://www.genome.wi.mit.edu/rat/public/	genetische Marker / Karten Rattengenom
http://www.informatics.jax.org/rat/	genetische Marker / Karten Rattengenom
http://www.invitrogen.com/vectors/	Produktinformation: Gensequenz der Vektoren
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/	National Library of Medicine, Literatur
http://www.niams.nih.gov/rtbc/ratgbase/index.htm	genetische Marker / Karten Rattengenom
http://www.nih.gov/niams/scientific/ratgbase/	genetische Marker / Karten Rattengenom
http://www.well.ox.ac.uk/rat_mapping_resources/	genetische Marker / Karten Rattengenom

8.2 Marker für die Genomanalyse

8.2.1 Polymorphe Marker Chromosom 10

Primer	Sequenz sense Primer	Sequenz antisense Primer	Annealing Temperatur
D10Rat95	TTACACCTCTCCAACACTGCC	TCATAGGAGGGAATACGGACA	55° C
D10Rat96	CCTTTGGAGACCAGGGTCTT	GACACCTGACATGTTCCCCT	55° C
D10Rat49	CACTGACATACATGCAGACCAA	ATGCTGGGGACTAAAAGCAA	55° C
D10Rat64	TCTAACACCTAAGAAACATGTCCA	TCAAAGGGAAAAAAAAAAGGAGA	55° C
D10Rat46	ATGACGGTTCTGCTTGCAG	ATCCTTTGGGTTTGAAGGCT	55° C
D10Rat44	AAAAGACATGCACGTAGGCC	CCCAACAGCAACTTCAATGA	55° C
D10Rat43	GCCACAATAATTCAGTGGTG	CATTTGCATTGGACCATC	55° C
D10Rat72	CTTCGAGCACCAGTGTCAA	AACCTTGATGTCTGTGTAGACA	55° C
D10Rat35	TGTGTTTCCCCTCATTAGCA	CTAAGCCCCAAACCTTCTCC	55° C
D10Mgh8	AAGCCTGGAGTGTTAGTAAAGGC	AAGAGGCCTGTATGCTGGGT	55° C
D10Mgh6	CCTGCCTAAGTAATACAGTGGTC	CCAGACCTTGTATGCTGGGT	55° C
D10Rat30	TGATAATGTGGTTAGAGGTGTGTG	TCCATTAACCCAATGTCCAAA	55° C
D10Mit2	GAAGTCCC GAAGCCACATAA	GCTCAAATAAAGGTGGAAGGG	58° C
D10Rat29	TGGTGACAGCTAAGCGTATG	TCCCATGATTTACATGTGG	55° C
D10Rat69	TAAGTGCCTGATGGTTGCAA	AGGGGATCAGATGCTTTTCT	55° C
D10Rat92	ACCCTCAGCCTATGCAAACC	TCCCCTTTCTTCTGGGCTAT	55° C
D10Rat93	TGCCTTAAGCAGAATGCAATT	TCTGACATAAGGTCACCTTGGAGA	55° C
D10Rat107	GTTTTCTGGGTCTTCCACA	CTTCTTCCATTATGCCAC	55° C
D10Rat20	AGTGATTGCCATACCTGCCT	GAAATGGCCAGGATAAACCA	55° C
D10Rat99	CCTTTATCCAAAAATAGTGTGCTT	ATGAAGTCATTGGGGGTGTG	55° C
D10Rat18	AACTAGACAGGCGGTGCTGT	CTCTGGAGGGTCCACATCAT	55° C
D10Rat84	TTCTGTCTTGTCTCCCACCC	GCTTTATCTCCTTTCTTGGTGG	55° C
D10Mit1	ATAACACCAACATTACCATAGAGGG	ATACTCAGTTCAGACTTTTCCCAATTT	55° C
D10Rat17	TCTTTTCTTTGTCTTTGGGCA	CCATTCTCGTGTGTGATGTG	55° C
D10Rat13	AGGCAATGGGGACTCTAGGT	GCATAGCAACCCAACATTGA	55° C
D10Rat16	CAGCCCTCAGCCTAAGAGAA	AGAGCCATCCAATCTCTCCA	55° C
D10Rat14	AAATCAACCTTTGGGCCTTC	TAGAGAGTTCAAGGGCTGCC	55° C

D10Mgh3	TATCAGGTTGACAACCACTATGTG	CATTGCCTAACACAAAGATATCAA	55° C
D10mgh1	TTTTGCTTAAGAGAAAACAATCCC	ACACAAGGTGGACATCTCCTG	55° C
D10Rat88	TGTGTGTCTACACATACATGTGCAC	GGTGGATATAATCAACATACGCC	55° C
D10Mgh2	ITCCTTTTACAGCATCTAAATAAGGG	GAGGAACACCACATGCACAC	55° C
D10Rat6	AGCTAGCACTCTAGCCCCTT	CCAGAACTCCAATCCAAGGA	55° C
D10Rat3	GGTTCAAGGTCAACATCAAGC	ACTGTACTCGGTGTGCATGC	55° C
D10Rat4	TTTCCCCACTCCAAGTTCTG	CGAGCTTGTGAGCACGAGT	55° C

8.2.2 Alle getesteten Primer für die Fragmentanalyse Chromosom 10

Primer	Sequenz sense Primer	Sequenz antisense Primer	Annealing Temperatur
D10Rat95	TTACACCTCTCCAACACTGCC	TCATAGGAGGGAATACGGACA	55° C
D10Rat96	CCTTTGGAGACCAGGGTCTT	GACACCTGACATGTTCCCCT	55° C
D10Rat49	CACTGACATACATGCAGACCAA	ATGCTGGGGACTAAAAGCAA	55° C
D10Rat121	CTAAGATTTCGGAGGAGTGGG	CCCACAAACATGTGCATATACA	55° C
D10Rat64	TCTAACACCTAAGAAAACATGTCCA	TCAAAGGGAAAAAAAAAAGGAGA	55° C
D10Rat46	ATGACGGTTCTGCTTGCAG	ATCCTTTGGGTTTGAAGGCT	55° C
D10Rat44	AAAAGACATGCACGTAGGCC	CCCAACAGCAACTTCAATGA	55° C
D10Rat43	GCCACAATAATTCAGGTGGTG	CATTTGCACATTGGACCATC	55° C
D10mit3	GTCCAATGTGATGTAGGAAGAGG	TTCCAAAAACATAATGCACACA	55° C
D10Rat72	CTTCGAGCACCAGTGTTC	AACCTTGATGTCTGTGTAGACAA	55° C
D10Rat35	TGTGTTTCCCCTCATTAGCA	CTAAGCCCCAACCTTCTCC	55° C
D10Rat38	AATGAAGTCCACTTCCAGG	GGGTGTCTGTAGGCTCATCC	55° C
D10Rat36	CCGAGCTGCAGAAGTTACCT	TGCTCACACAGAGATGTGCA	55° C
D10Rat73	CCTGTGCTCATAAGCACAC	GGTCTGCAAGGATTTTACGC	55° C
D10Rat63	CCAGGAACCTGAAACAGGG	AAGGTAGACATTACACATGCACA	55° C
D10Rat85	CAAACCTGGGCATGAAGTTA	GATTCGGGGTGAATTC	55° C
D10Mgh8	AAGCCTGGAGTGTTAGTAAAGGC	AAGAGCCTGTATGCTGGGT	55° C
D10Rat116	ATGTACATGTGTGCCATGC	GGGCTGGTTCTTTAGAGGA	55° C
D10Mgh6	CCTGCCTAAGTAATACAGTGGTC	CCAGACCTTGTATGCTGGGT	55° C
D10Rat30	TGATAATGTGGTTAGAGGTGTGTG	TCCATTAACCCAATGTCCAAA	55° C
D10Mit8	CCTTGCTCTTCTCTAGGGCT	ACCCAACAGGGAAATAGCTT	55° C
D10Mit2	GAAGTCCCGAAGCCACATAA	GCTCAAATAAAGGTGGAAGGG	58° C
D10Rat29	TGGTGACAGCTAAGCGTATG	TCCCATGATTTACATGTGG	55° C
D10Rat69	TAAGTGCCTGATGGTTGCAA	AGGGGATCAGATGCTTTCCCT	55° C
D10Rat28	TGCACACACAAACATAGAGAGAGA	ATGGGCTGATGCATAGCTGT	55° C
D10Rat70	GGGGTCTGTCTCTCTGTTTCTC	GCCTGTATCAGCACAAATGTG	55° C
D10Rat98	GAAGAATCAGTGTGCCACA	ATTCCATCTGGCAGATCCTG	55° C
D10Rat123	TCCTTCTTCTAGTGCAGTGC	ACAGACCTTGACTTGGCAT	55° C
D10Rat27	TCCTTCTCCTAATGGGCATG	ATTGTATTGGTTGCTTGGGG	55° C
D10Rat25	CAGGGCACATGAGACAGTTG	AAATGGGCTGGAGTAACACG	55° C
D10Rat26	CGCGCATACCTTATACACCA	CCTTGCATTGTTCTCCCTGT	55° C
D10Rat92	ACCCTCAGCCTATGCAAACC	TCCCCTTTCTTCTGGGCTAT	55° C
D10Rat93	TGCCTTAAGCAGAATGCAATT	TCTGACATAAGGTCACCTTGGAGA	55° C
D10Rat124	AGCGTCTGGGATTGGATTTA	AGAAAGCAGGAAATGGCTGA	55° C
D10Rat107	GTTTTCTGGGTCTTCCACA	CTTCTTCCCATTATGCCAC	55° C
D10Rat20	AGTGATTGCCATACCTGCCT	GAAATGGCCAGGATAAACCA	55° C
D10Rat99	CCTTTATCCAAAAATAGTGTGCTT	ATGAAGTCATTGGGGGTGTG	55° C
D10Rat18	AACAGACAGGCGGTGCTGT	CTCTGGAGGGTCCACATCAT	55° C
D10Mit7	CAAGGCTACCCAGGGATACA	CTCCTCCGAAGCCAGTTTC	55° C
D10Rat84	TTCTGTCTTGTCTCCACCC	GCTTTATCTCCTTTCTTGGTGG	55° C
D10Mit1	ATAACACCAACATTACCATAGAGG	ATACTCAGTTCAGACTTTTACCAAT	55° C
D10Rat17	TCTTTTCTTTGTCTTTGGGCA	CCATTCTCGTGTGTGATGTG	55° C
D10Rat13	AGGCAATGGGGACTCTAGGT	GCATAGCAACCCAACATTGA	55° C
D10Rat16	CAGCCCTCAGCCTAAGAGAA	AGAGCCATCCAATCTCTCCA	55° C
D10Rat14	AAATCAACCTTTGGGCCTTC	TAGAGAGTTCAAGGGCTGCC	55° C
D10Rat12	CCTTGATTTTGTCTTTCTTTTCC	CGTCTTGAGGAAACCATTGGA	55° C
D10Rat10	AGTGCCACAGCATATAGGG	CGAAGTAAAGCCCTGAAACG	55° C
D10Mgh3	TATCAGGTTGACAACCACTATGTG	CATTGCCTAACACAAAGATATCAA	55° C
D10Rat132	GGGGCATGAAACACCATTAG	CCCTTGTCTTCTAGCCTTAGTGA	55° C

D10mgh1	TTTTGCTTAAGAGAAAACAATCCC	ACACAAGGTGGACATCTCCTG	55° C
D10Rat88	TGTGTGTCTACACATACATGTGCC	GGTGGATATAATCAACATACGCC	55° C
D10Rat7	AACGTAAAGGTGGTAGGGTTTTTC	GAGCCAAGTTGTCCAAGACC	55° C
D10Mgh2	TTCCTTTTACAGCATCTAAATAAGGG	GAGGAACACCACATGCACAC	55° C
D10Rat6	AGCTAGCACTCTAGCCCCTT	CCAGAACTCCAATCCAAGGA	55° C
D10Rat3	GGTTCAAGGTCAACATCAAGC	ACTGTACTCGGTGTGCATGC	55° C
D10Rat4	TTTCCCCACTCCAAGTTCTG	CGAGCTTGTGAGCACGAGT	55° C

8.2.3 Polymorphe Marker für die Genomanalyse

Primer	Sequenz sense Primer	Sequenz antisense Primer	Annealing Temperatur
D1Rat1	GCAATGCCATGGGTTACTC	AAAAGTTATCCCCTTCCCC	55° C
D1Rat13	AACAATGCTTGGAAATGGGTC	TTCCACAGGAACCTGAGCTT	55° C
D1Rat20	GGCCCTCACACTGTCTTCTT	GTTCGGAGGACAAACCAGAA	55° C
D1Rat261	TTGGTCTTGAGCAGGAGTGA	TTCTCGCCGAACAAGAATCT	55° C
D1Rat37	AGGGCAATAGGGGCAGTATC	TGATTCCCCTCATGGATCAT	55° C
D1Rat40	TGCACATGGTGCACATACAT	GGTGGAGATTGGACTTCTCG	55° C
D1Rat51	CCCTCAGTTCAAGAGTAACCTCA	TTGCCTGAGAGACTGTGCC	55° C
D1Rat68	TTCTGCAATGGGTCAGACAA	TTCGGAAATGTAACCGCTTT	55° C
D1Rat71	TCTCTCCTTCTTCTTACTGCCA	GTACACCGGTCAGGTCAGGT	55° C
D1Rat75	GCAGTTTGTCTTGTGATGAATAA	TGTTTCCAAATTTGAATACACTGA	55° C
D1Rat90	AACCTAAGGTGAAGGGAGGC	AATTAACCTTCTCAGAAGTAAGGG	55° C
D2Rat1	AGAATCTGGTCACTGGGTGG	ATGTTCTCTAGCCGCCACAT	55° C
D2Rat191	CAGCAGCTGCTGTTTTCACT	AGAGTCATGGACGATCTGGC	55° C
D2Rat6	CCTGGGCCTTTAAACCTTT	TTTCCCAACCCTAAAATGGTC	55° C
D2Rat10	CGTGGCACACCTACCACTAC	CATCCCAGGCCTTTTTAAA	55° C
D2Rat17	TATCCTGAAAGGGCAACACC	TCACACACACTCAGGCTCGT	55° C
D2Rat75	TGCATGTTTCTATCTGCCCA	GGTGGGTGGATGAATGGATA	55° C
D2Rat33	TCTAAACTGGTTAGCAGCCA	CATCAGAAATGCCCTTCAT	55° C
D2Rat115	GAGCGAACTGCCATAGGATT	CAAGTTTTGGGGAATTCTTCC	55° C
D2Rat126	GGCAGTTTCTACGGTTTGA	CACCCTTTTCTTGCATCCAT	55° C
D2Rat55	AAAGGGTAGGGCTTAGGTGG	TTCTGTTACCTGCTTGGCAA	55° C
D2Rat106	CCTTTTTAGGTCCTAGACTGAACC	TCTGGAGTTTATGTTATCCGTCA	55° C
D2Rat70	CATGGGAACATAAACGCACA	TGCTACTGGAAAATCTGGCA	55° C
D3Rat47	CACATACGCACACACACAGAA	ACAAGTAGCACAGTGTGCC	55° C
D3Rat110	GGAGGAAACTGCATGCTTT	CCCAAATGGCTCCTCTTTCT	55° C
D3Rat38	TGCTTCCAGTTACAGCAGTGA	AGGCGCTCAATACCAGATAGA	55° C
D3Rat35	GTAAGTGGCTCCAGTTTGGG	CCTGGGTTTCGATTCTAACA	55° C
D4Rat3	GGATGTGGACTATGGTTGGG	TTGTGACTGACAGCCTCAGG	55° C
D4Rat125	AGAATACTTTTGAATAGGGCTTTCT	TGTCACCTCTGTGTCTCGCT	55° C
D4Rat11	CTGTCTTCTCTGAACCCCA	TGCAATACTGTTTCAGTGAAGGA	55° C
D4Rat154	TGCGTATCCAAGTAGACTGG	TCAACAAGTAAATTTCTCTCAAGGC	55° C
D4Rat33	GACACAAGAGAGCCTGCCTC	TGATTGTTTTAACAATGACGATTTG	55° C
D4Rat34	CCCTGTAGTTTAATTCTCCAAATGA	AAGAGCATAAGCACGTGCG	55° C
D4Rat54	GAGCCCCTCATGTGAGGATA	CAGGCCAGACGTCTAAGATG	55° C
D4Rat60	TTTTCGAACTAATCCCAGGC	CTCTGCCTTAGAGTTTGTGCA	55° C
D4Rat67	GTCTGAGCCATCTCCTCAGC	AACCACCAGTTTCACATGCA	55° C
D4Rat71	CCTCAAAGACACTAAAGGATGAA	AGAAGGCTCCTTCTTTTGC	
D5Rat116	TCTGTTGATGGACTTGGGTG	GGGAATAGTCTGGTGGTCTTAAAA	
D5mgh1	TCTAGACCAACCCTAGCTTTGC	TGAGTATGGAACCTTCTTTAGGGG	
D5Rat189	CATGGGCTCAAGAAATCAAA	CCAAAATCCTCAGAGAAGGC	
D5Rat4	TCTGAGCATTGAGGGTTATTGTT	AACACAAGACCTCAGGAGCG	
D5Rat154	CAACTGTCTCCAATTCGCA	CCAACTGCGATCCCTTAAA	
D5Rat35	CAGCCAGAGAAAAAGCCAAG	GTGTGGGAGGGACTGAGAGA	55° C

D5Rat43	AGCCCTTAAGCTGAGCTACAGA	GGCACCAGGCATACTCATG	55° C
D5Rat204	GACTCCCTCAGGAAGATCCC	TTTCCAATCCATCCCTTTT	55° C
D5Rat49	AAAATGACAGCAGCCAAAGG	CCCACCTTAACCCTTTGCAA	55° C
D6Rat36	ACCTGAACATCCCCTCCC	CTGATGGCATTTC AAGCAGA	55° C
D6Rat30	TCTCAGATGTCAGATGATAGTGCA	TATTGGCACAGGTCAGCTTG	55° C
D6Rat24	CAGCAGGAGTCATACTCACCC	GTCTTCTTCTCTCCACCC	55° C
D6Rat63	CCAAGTGGACCAATAGGCAC	TGCACCATTTTAACCCCTTC	55° C
D6Rat9	GGTACAGCATATCCCTTCTGC	ACCAGCACACTGCTGTGAAC	55° C
D6Rat4	CTAATTTCCCTTCTTAGACACC	TTCCACCCACCTCTATCTGG	55° C
D7Rat63	TTGCATAACACCAGTTACAGGG	CCAAGCCATGGGTAGCTAAC	55° C
D7Rat29	CTCCTCCATTTGTGGAAAGG	GCCATAAGGATATGGTTTGAA	55° C
D7Rat103	GTGTCAAACCTGTGGGGATCC	CTGGTGCTTTTGGGTCTGTT	55° C
D7Rat145	CCATAGACAAATGCTACTCTCAGC	ATGTCTTCCAGATTCACCGC	55° C
D7Rat86	AAAGACACTTTTCAATCCCC	TGTAGAAATCCTTCACAACTTGAA	55° C
D7Rat15	AACCCACTTGTCTAGAGACAAA	TTTGACACATGGCAATTCCA	55° C
D7Rat118	CATGAGTGAGAAGAGAGAGAGAGT	TGACAAGTTCAGGGATAGTGAAGA	55° C
D7Rat94	GCCTTATTTAACTTTTTGCTTCTC	AACTTATGAGGGCATTGCG	55° C
D8Rat53	TCCCAGGATGCTAATGAAGG	CGCACAGGTAGGTATGCACA	55° C
D8Rat162	TCACTGGCAGCAATTTACCA	TCTGAGACCTCTTCAACTCTGTTG	55° C
D8Rat157	AGCCAGCACAGCACTAAACC	CCAAGATGAATCTCCCCAAA	55° C
D8Rat30	CCTCCAGAGTCTCCAGTGCT	TCCTCACCATGTGATCCAGA	55° C
D9Rat29	TTTTTGTACTAGGGTGGGGG	AACATCACATTAACCCATGGC	55° C
D9Rat57	TGGGTACAAACTGACAGGCA	TGTGCACGCATGTAGAGGTT	55° C
D9Rat26	ACTCGTGACCAAAGTCCCAG	AACCTGCAGACAAGCACCTC	55° C
D9Rat65	CTAGCAGGTCAGCTGCCTTT	CCCTGGGTTCAATAACCTGT	55° C
D9Rat4	TTGCTGCTGTCTAGTTCCA	GTCCAAACCTATGCAGGCAT	55° C
D9Rat109	GCCTGGAAATTAGCTTGACG	CAAGGCTTTCAATGGGTACA	55° C
D9Rat1	AACTGTGGGTCAGAAATTCTGTT	GATCTCACAAACATGCACGC	55° C

D11Rat22	CCATTCTACTTAAGAAGCACACAG	AGGTTGAGAAACCTCCAGGG	55° C
D11Rat17	GCATATGGGAGTTTTGCCTG	CCAGTTGCAGATGATTTCCA	55° C
D11Rat44	GGTCTACTTCAATCTAAAAAGGGC	TCCGTTGTACTGTCTCATGGA	55° C
D11Rat7	ACATGGAGGACACATGATGG	GTGTACCAGGAAGCCGAGTG	55° C
D11Rat47	GTGCAGCCATACCATTTCAA	TCTGGGGATTTGAAAGATGC	55° C
D11Rat37	GGCATAAGGCCAAGCACATA	TTTTATCCTGCCTTAGGAGATACAT	55° C
D11Rat32	GGTGGCTCTTCATCCTAGCA	ACTCTGAGACTCTTGACTGTGGG	55° C
D11Rat33	TGGGGTCTTGGTCTTTGATA	CAGCAATTTTCAGACCTTTCC	55° C
D12Rat89	GCAGTGAGAGACAGATGTGCA	CCTTGAAATTGGTTCTTGCC	55° C
D12Rat7	GGCGACTCTGCTTCAATAGG	CACATTTTCTGCAACTCTGGG	55° C
D12mit4	TGTGTGAGACTGTATGCATGTG	GGCTCCAGAGGAATGACATC	55° C
D12Rat23	TTTCTGAATCATTCTGGAGAA	CTAAGACTTCTGCATGGGG	55° C
D12rat55	CGTCTTGAGTTGGAGGACTATG	CACAGCAGCAATCAAGGGTA	55° C
D13Rat2	TGTTACTCAGTGGGAAGCCC	AAGACACAAGCACATGCACG	55° C
D13Rat37	CAATCTTCGAGGGACTCTGC	CAAACACAAATACACAGATGCA	55° C
D13Rat87	CATGGTGAGGCAAACCTCTT	TTCAAGTGTGGAAGTCTGG	55° C
D13Rat88	TACAGCAAAAAGGGTTGAGG	AGCAAGGTGTGAAGCCTGAT	55° C
D13Rat30	TGCACGAATCAGGTTGATGT	CCAGGCTGGTCTTGATTGAT	55° C
D13Rat63	CACCTTGATGTGTGTATGCATG	CGGGGTGACATTAAGGTT	55° C
D13Rat131	TATCGACTTGCCATTGTTCCG	CAGAATCTTGTGCCTCCTGA	55° C
D13Rat132	TACCTCCCCACACAGCTCTC	CTGTCATACATGTGCATGCG	55° C

D13Rat133	AAAGACAACCTGCCAGATGGG	TCTTAACCACTGAGCCATTTTT	55° C
D13Rat54	CTTAGATGTGAAGGCCCTGG	TTGAGGGCATGTATAAGGGG	55° C
D13Rat50	GGATGCAGCCTCCCTACATA	GGACATTCTGAGGAACCTGC	55° C
D14Rat1	CAGTCCCTGGGTTTTACAT	CTCCAAGACACAAAACGATCA	55° C
D14Rat75	GCACACTGCAGTGAGACAAAA	TGACCC TTCAGTTGCAAATTC	55° C
D14Rat6	CAGGAACCAACTCATTTGCA	TTGTCTTGATGTTCTGTCAGG	55° C
D14arb4	GTGTGTTTCGCCGAGAAGCAC	ACTAATCTTTCAAAGTCCCC	55° C
D14Rat55	GCAAAATTTTGATGGGTTTG	CACAAATTTCAACCTTGGGC	55° C
D14Rat16	AGAGCTGCAGAGATTTTCCA	GTGTGAAAACCATAATCTAAAGGAC	55° C
D14Rat90	CCTGGGAATGTTAGGTCAATTC	TGACAGTTTTTCCCCTGCA	55° C
D15Rat2	GGGGAGGGGAAGAGAAAAA	TGCAGAGTTCAGGACACACA	55° C
D15Rat5	GCTTCGTGTGTATTCTTCCTGA	GCCTATTGATCGGAGTTCCA	55° C
D15Rat30	GAAGGTTGGTTGGTAGCCAA	AATACCACTGTCTGCCAGAGAA	55° C
D15Rat13	AAGAAGGTCATATCCCCTCTCA	TCCAGTGTACCCTGTTTCAAAA	55° C
D15Rat21	TTGGTGGTCAAAGCTCTCCT	TGCCAAGAAGTGGATATCAGG	55° C
D15Rat29	TGACCTATTTGCATTTGGCA	AGAGGTGATGCCAAGTGCTT	55° C
D15Rat103	TCAGTCCCATTTCAGGGTCTC	AGAGGGATTGAGGACACCAG	55° C
D16Rat31	CTTTTAATACCTGGTAGAAAACGTG	TTTTCTGGCAAAGTCAGTGAA	55° C
D16Rat70	ACCCTGGTCCTAGCCATTTT	CCTCTGGCTTCTCCACAGTC	55° C
D16Rat18	GTTGTGACATGCCTGGTTTG	TAGCCCAAGAGAACGCTTGT	55° C
D16Rat64	CCAGCCAGAGAAAGTTTGTG	TGCTGGTGGGACACTGTCTA	55° C
D16Rat58	CCCTGCTGTTGTGTTAAACCT	TGCTCTTACCTGCCTTTCC	55° C
D17Rat4	AGCTGAAGATCACAATGGGC	GCCTAATTCTTGACAGGGA	55° C
D17Rat5	TACAGGTATGGGGCCTCAAC	AGAAAACCTGGGAAGGAAGG	55° C
D17Rat17	GGTCACATGTACCTGCTTGAGA	TTGAGGCTCCAGCATATGTG	55° C
D17Rat36	ATTGCCTTGCTACTCGGTGT	AGCCAATGTGGATGCATGTA	55° C
D17Rat133	CAGAATAACCAACAACAGGGAA	AGTACTGTATCCCCACAACCG	55° C
D17Rat85	TTGCAGGTGAGTTCTCAGACA	CCCTAGGTTTAATCTCCTGTACCA	55° C
D17Rat49	GCCATTGATAAGCACCTTTT	GCACAGAGACAGACCCAGGT	55° C
D18Rat48	GCCCAGAATGAAGTTTATTCATT	CTGGCCTTCATGATGTCTACA	55° C
D18Rat24	TCCTTCAAACAACCTGGCTTTG	GCACTGAAGTAAAATTCATAAAGGC	55° C
D18Rat17	GCCAAGGCATTTTAAAATTAACC	ACTCCTTTGGTTCTTGCAA	55° C
D18Rat41	TGGTACTTCGACCTCCAGT	TGTGAAGTCTGTGAGATTAACGTTT	55° C
D18Rat13	CCCATTTTCCCAGTCCAGTA	AGGAAGGAAGGAAGGAAGGA	55° C
D18Rat12	TGAGGTCCTGCTACAGTGGC	TTACTCACTGCCCCACAACA	55° C
D19Rat19	TGAGAGCGCTCTGCTTTTAA	ACCACTGACCTTCACATGCA	55° C
D19Rat15	GGTCTCACTGTGCTTTTCCC	GCTGAGGCTGAGAAAAAGGA	55° C
D19Rat41	TGCTGGTTCAGAAATCAACG	GTCTGCACATACATGCCTGC	55° C
D19Rat70	AAGCTGGACAACCTGCTTTG	TGTGTAGGTCAGAGGACAACCT	50° C
D19Rat6	TGTGAGCATACAAGGAAACTGG	ACTGGTAGAAAGCAGGGGGT	55° C
D19Rat59	GTCTTGACCAATGCAGGGT	GGTTTGAATTTCTTGGCTGG	55° C
D20Rat1	CATTCTTTCCTCCTCCCTTTT	CATTCTTTCCTCCTCCCTTTT	55° C
D20Rat49	TCACTGATTTAAGGTCCATCCC	GTAGGGTGCAAGGGTAGGGT	55° C
D20Rat22	GCAGGAAAATACGAGCCCTT	CCCTGTGAAAGTAGGAGGCA	55° C
D20Rat39	GAAACACATCATTTACCCAC	ATGGCGTGATGCAGAAC	55° C
D20Rat38	CTCAGGCAGTGAGGAAGAGC	TGATGCTAAGAGTCATCGGCT	55° C
D20Rat19	TGGTTTTCTTGAGCACAGCA	CCAGGCTGTCAGCCTTAGTT	55° C
Dxwox17	ACCATGTAACCCCTCTCATG	TGGAGGATAGACTCCCCTAGG	55° C
Dxwox27	CTGACTCCAGAAAGTTGTCCTC	GATCTTTCAGTTTAAAGTG	55° C
Dxmit4	ACTCCAACACCCAGTCAACC	GCCAAAGCATCTCCCTATCA	55° C
Dxwox28	GTCGCGGATAGCATAGGC	TCACTGGGGCCTCTAGTGC	55° C

8.2.4 Lokalisation Marker Chromosom 10

Marker	Polymorph	Position	cM Abstand
D10Rat95	J	0,04	
D10Rat96	J	0,08	0,04
D10Rat49	J	5,71	5,63
D10Rat121	N	9,18	3,47
D10Rat64	J	11,40	2,22
D10Rat46	J	20,45	9,05
D10Rat44	J	27,23	6,78
D10Rat43	J	27,27	0,04
D10mit3	N	33,00	5,73
D10Rat72	J	31,76	4,49
D10Rat35	J	34,04	2,28
D10Rat38	N	34,04	0,00
D10Rat36	N	36,30	2,26
D10Rat73	N	41,90	5,60
D10Rat63	N	41,90	0,00
D10Rat85	N	41,90	0,00
D10Mgh8	J	44,19	2,29
D10Rat116	N	45,38	1,19
D10Mgh6	J	45,54	0,16
D10Rat30	J	46,57	1,03
D10Mit8	N	46,57	0,00
D10Mit2	J	46,57	0,00
D10Rat29	J	46,57	0,00
D10Rat69	J	46,57	0,00
D10Rat28	N	47,61	1,04
D10Rat70	N	47,61	0,00
D10Rat98	N	47,61	0,00
D10Rat123	N	49,50	1,89
D10Rat27	N	51,00	1,50
D10Rat25	N	51,00	0,00
D10Rat25	N	51,00	0,00
D10Rat26	N	51,03	0,03
D10Rat92	J	52	1,46
D10Rat93	J	57,43	4,94
D10Rat124	N	58,54	1,11
D10Rat107	J	58,54	0,00
D10Rat20	J	58,54	0,00
D10Rat99	J	64,27	5,73
D10Rat18	J	66,5	2,23
D10Mit7	N	66,5	0,00
D10Rat84	J	67,6	1,10
D10Mit1 (Ace)	J	68,71	1,11
D10Rat17	J	69,01	0,30
D10Rat13	J	73,35	4,34
D10Rat16	J	73,35	0,00
D10Rat14	J	73,37	0,02
D10Rat12	N	76,13	2,76
D10Rat10	N	77,15	1,02
D10Mgh3	J	77,15	0,00

D10Rat132	N	78,96	1,81
D10mgh1	J	83,01	4,05
D10Rat88	J	83,69	0,68
D10Rat7	N	87	3,31
D10Mgh2	J	87,04	0,04
D10Rat6	J	88,11	1,07
D10Rat3	J	91,53	1,63
D10Rat4	J	95	3,87

8.3 Gensequenzen

Gensequenz Ratten-ACE

5' **Exon1**→
1 cgccgcaccgcgcgcaccgcgcatgggggcccgcgtccggccagcggggcggtggccgt 60
61 tgtcaccgcgcgctcttgatgctgtcgctgctgctgctgctgctgctgctgcccgcgctcgcccg 120
121 ccccggcgcttgaccctggattgcagccgggcaacttttccgcggacgaggcagggggcgc 18
181 agctcttcgctgacagctataactcgagtgcgaggtggatggtccagagcaccgcag 240
241 ccagctgggcgacgacaccaacatcacggaggagaatgcgcggctccagg 291

Exon2→
288 caggaggaagcggccctgatcaaccaggagtttgagaggtctggggcaagaaggccaag 347
348 gagctgtatgagtccatctggcagaacttcaactgaccaaagctgcaaggatcatcgga 407
408 tccgtacagaccctaggacctgccaacctgcccctgaccagcggctgcag 458

Exon3→
455 gcagtacaactctctgctaagcaacatgagcagaatctactccaccggcaaggctctgctt 514
515 cccaacaagactgccacctgctggctccctggaccag 552

Exon4→
550 cagagctcaccaacatcctggcttcctcacgaaactatgccaaaggctgctgtttgcctggg 609
610 aaggctggcatgatgctgtgggtatcccactgaagcccctctatcaggactttactgccc 669
670 tcagtaatgaagcctacagacaagatgg 697

Exon5→
696 ggcttctcagacacaggagcctactggcgctcctggatgagtccccctcctttgaagag 755
756 agtttggagcatctctaccaccaagtcgagcccctctacctgaacctccatgcctttgtc 815
816 cgtcgcgactgcaccgcccgtatggggacaaatacatcaatctcagaggtcctattccc 87
876 gtcctctgctggg 889

Exon6→
888 ggagacatgtgggcgagagctgggagaacatttacgacatggtagtgcctttcccggac 947
948 aaaccaacctcgatgtcaccagtacaatggtacagaagg 987

Exon7→
985 agggctggaatgccacgcacatgttccgggtcgcagaggaattctttacctcgctggggc 1044
1045 tctccccatgcctccagagttctgggaggagtcgatgctggagaaaccagctgatggac 1104
1105 gggaggtggtgtgccatgcctctgctggtggacttctacaacaggaaggacttcagg 1160

Exon8→
1157 caggattaagcagtgacgcgggtcacgatggaccagctgtccacagtacaccacgagat 1216
1217 gggccacgtgcagtaactatctccagtaaaaggacctgcacgtctctctgctgcaggtgc 1276
1277 caacctggcttccacgaggccatcggggatgtactcgtctctctgtctctaccaccagc 1336
1337 acatctgcacaaaattggcctgctagaccgtggtgccaatgacatag 1383

Exon9→
1382 agaaagtgacatcaattacttgcataaagatggccctagagaaaattgccttcttgcctt 1441
1442 tggttacctgggtggaccagtggcgctggggggtcttcagtggacgtaccccacctctcg 1501
1502 ctacaactacgactgggtggtatcttcg 1528

Exon10→
1528 gaaccaagtatcaggggatctgcccaccagttgctcggaatgaaaccattttgacgctg 1587
1588 gggccaagtttccatcccagcgtgacaccatacatcaggta 1630

Exon11→
1625 caggtaactttgtgagtttcgtgctacagttccagttccatcaagcgtgtgcaaggaggc 1684
1685 aggccaccaggtccactacaccagtgtagatctaccagttccaccaaggcaggggcca 1744
1745 gctcca 1750

Exon12→
1751 acaggtgctgcaggctggctgctccaggccctggcaggaggtgctgaaggacctgggtggg 1810
1811 ttcagatgcgctggatgccagtgcgtaaatggagtaacttccaaccagtaagccagtggt 1870
1871 gcaggagcagaatcagcggaatggcgaggtcctaggctggccggagtatcagtggtgctcc 1930
1931 accgttaccagacaactatccagaggggaattg 1962

Exon13→
1962 gacctagagactgatgaagccaaggctaacaggttcgtggaggagtatgaccggacagcc 2021
2022 aagggtgttggaacgaatacgcagaggccaactggcattataacaccaacattaccata 2081
2082 gagggcagcaagatcctg 2099

8.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Klinische Pharmakologie, an der Charite Berlin, Campus Benjamin Franklin erstellt.

Ich danke sehr herzlich für die Aufnahme in das Institut und die Möglichkeit zur Durchführung der Dissertation.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz für die Bereitstellung des spannenden Themas und die gute Betreuung meiner Arbeit.

Für die Unterstützung des praktischen Teils danke ich besonders Heidelinde Müller, Gabriele Siebert, Markus Wehland-von-Trebra und Angela Schulz.

Für die Durchführung und Betreuung der Rattenzuchten an der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM/FU) und die tatkräftige Unterstützung danke ich herzlich Claudia Kretschmer und Bettina Lack.

Darüber hinaus gilt mein Dank Sibylle Rademacher, Ali Poyan Mehr, Martin Mostler, Jacqueline Schönfelder und Juliane Bolbrinker für die stetige Hilfsbereitschaft, die große Diskussionsfreudigkeit und Motivationsfähigkeit.

Ganz besonders herzlichst möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich in der Durchführung der Arbeit sehr unterstützt haben und mir den Weg, den ich eingeschlagen habe, stets rückhaltlos ermöglicht haben.

8.5 Publikationsverzeichnis

Publikation

- 2008 Nassar I., Schulz A., Bernardy C., Garrelds I.M., Plehm R., Huber M., Danser A.H. J., Kreutz R. A twofold genetic increase of Ace Expression has no effect on the development of spontaneous hypertension. Am J Hypertens 2008; Feb; 21(2): 200-5.

Poster

- 2004 Bernardy C., Plehm R., Zürcher H., Schulz A., Kreutz R. Die ACE-Plasma Aktivität wird genetisch determiniert und ist unabhängig von der arteriellen Hypertonie. 28. wissenschaftlicher Kongress der deutschen Hochdruckliga, Hannover.
- 2005 Nassar I., Bolbrinker J., Schulz A., Bernardy C., Wehland M., Kreutz R. Renale ACE-2 Expression und Aktivität im hypertensiven SHRSP Rattenmodell. 29. wissenschaftlicher Kongress der deutschen Hochdruckliga, Berlin.
- 2007 Nassar I., Schulz A., Bernardy C., Garrelds I.M., Plehm R., Huber M., Danser A.H. J., Kreutz R. A twofold genetic increase of Ace Expression has no effect on the development of spontaneous hypertension: Evidence from a congenic rat model. Joint meeting of the Danish and German Pharmacology Societies, Kopenhagen.

Preise

- 2004 Young Investigator Award
28. wissenschaftlicher Kongress der deutschen Hochdruckliga; Hannover

8.6 Lebenslauf

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

8.7 Erklärung über Selbstständigkeit

„Ich, Claudia Junge, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Etablierung, Phänotypisierung und Genotypisierung des kongenen Rattenstammes SHRSP.WKY-Ace“ 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

Unterschrift