

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

DISSERTATION

Genomweite Analyse von Blutdruck- und Albuminurie-QTL in
einer Kreuzpaarungspopulation zwischen
salzsensitiven SHRSP und salzresistenten Lewis Ratten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Patrick Schulte
aus Münster

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Kreuz
2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. D. N. Müller
3. Priv.-Doz. Dr. med. Beige

Datum der Promotion: 14.06.2009

meiner Familie

1 Einleitung	6
1.1 Epidemiologie der Hypertonie und der damit assoziierten Herz-Kreislauf-Erkrankungen	6
1.2 Pathogenese der arteriellen Hypertonie	7
1.3 Genetische Veranlagung der Hypertonie	9
1.3.1 Monogene Erkrankungen	9
1.3.2 Polygene Erkrankungen	10
1.4 Nierenfunktion und kardiovaskuläre Erkrankungen	10
1.5 Untersuchung komplexer Merkmale und deren Lokalisation im Genom anhand von Tiermodellen	11
1.6 Der SHRSP- Rattenstamm als geeignetes Tiermodell zur Charakterisierung der Hypertonie und Mikroalbuminurie	14
1.7 Ziel der Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien und Radionukleotide	17
2.1.2 Enzyme	18
2.1.3 Puffer und Lösungen	18
2.1.4 Sonstige Materialien und Futtermittel	18
2.1.5 Geräte	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Haltung	20
2.2.2 Parentaltiere SHRSP und Lewis	20
2.2.3 Studiendesign für die SHRSP- und Lewis-Parentaltiere	20
2.2.4 Versuchsaufbau für die F2-Generation SHRSP x Lewis	21
2.3 Phänotypisierung	21
2.3.1 Systolische Blutdruckmessungen	21
2.3.2 Uringewinnung für die Auswertung klinischer Parameter	21
2.3.3 Bestimmung der Albuminurie	22
2.3.4 Tierpräparationen	22
2.4 Genom- und Kopplungsanalyse	23
2.4.1 Polymorphe SSR-Mikrosatellitenmarker	24
2.4.2 DNA-Isolierungen aus der Leber	24
2.4.3 Herstellung von DNA-Stockplatten	25

2.4.4	Markierung der Primer mit [γ - 32 P]ATP	25
2.4.5	Polymerase-Ketten-Reaktion	25
2.4.6	Polyacrylamidgel – Elektrophorese	26
2.4.7	Genotypische Charakterisierung der F ₂ -Generation	26
2.4.8	Statistische Analysen	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Charakterisierung der Parentalstämme SHRSP und Lewis	28
3.2	Kosegregationsanalyse	30
3.2.1	Phänotypisierung der F ₂ Population	30
3.2.2	Korrelationsanalyse zwischen systolischem Blutdruck und Albuminurie	32
3.3	Genotypisierung der F₂-Generation	33
3.3.1	Genotypisierung der Extremtiere	33
3.3.2	Genotypisierung der gesamten F ₂ Generation	35
4	Diskussion	46
4.1	Parentaltierstudie	47
4.2	Ergebnisse der Kosegregationsanalyse	47
4.3	Vergleich mit anderen Studien	51
4.4	Identifizierung von Kandidatengen	55
5	Zusammenfassung	57
6	Abkürzungen	59
7	Literatur	60
8	Anhang	66
8.1	Primer	66
8.2	Danksagung	71
8.3	Lebenslauf	72
8.4	Eidesstattliche Erklärung	73

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Hypertonie und der damit assoziierten Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind eine der Haupttodesursachen weltweit. Es wird geschätzt, dass die Hälfte aller ischämischen Herzkrankheiten und fast zwei Drittel aller zerebrovaskulären Erkrankungen auf einen suboptimalen systolischen Blutdruck zurückzuführen sind. Weltweit betrachtet sterben jedes Jahr schätzungsweise 7,1 Millionen Menschen an den Folgen eines zu hohen systolischen Blutdrucks (WHO, 2002).

Im Jahr 2000 hatten weltweit 26,4 Prozent der erwachsenen Bevölkerung einen arteriellen Hypertonus, wobei dieser durch systolische Blutdruckwerte ≥ 140 mmHg und diastolische Werte ≥ 90 mmHg definiert wird. Schätzungen zufolge wird erwartet, dass im Jahre 2025 die Anzahl der erwachsenen Hypertoniker um 60 Prozent auf ca. 1,56 Milliarden Menschen weltweit ansteigen wird (Kearney et al., 2005).

Allein in Deutschland starben im Jahr 2006 358.953 Menschen an Erkrankungen des Kreislaufsystems (Statistisches Bundesamt, 2007).

Laut einer nordamerikanischen epidemiologischen Studie weist Deutschland im internationalen Vergleich, zusammen mit 5 weiteren europäischen Ländern sowie Kanada und den USA, die höchste alters- und geschlechtsadaptierte Prävalenz für Hypertonie in Höhe von 55,3% auf. Bei der Behandlung von Hypertonikern liegt Deutschland zudem mit einem Anteil von 26% lediglich an 6. Stelle (Wolf-Maier et al., 2003).

1.2 Pathogenese der arteriellen Hypertonie

Angesichts dieser epidemiologischen Bedeutung des hohen Blutdrucks ist die Klärung der Pathogenese dieser Krankheit unerlässlich. Blutdruck ist ein quantitatives Merkmal, welches durch viele verschiedene Systeme im Körper reguliert wird, so dass eine bedarfsgerechte Perfusion der einzelnen Organe und Gewebe gewährleistet ist. Die Nieren, in ihrer Funktion als Regulator des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes, sind das Organsystem mit dem größten Einfluss auf den systemischen Blutdruck (Guyton et al., 1972; Guyton, 1991; Cowley, 1992).

Der arterielle Blutdruck wird an die ständig wechselnden Anforderungen, wie körperliche Anstrengung oder Ruhe angepasst (Abb. 1). Er wird als Produkt aus Herzzeitvolumen (HZV) und totalem peripherem Widerstand aufgefasst. Das HZV wird durch verschiedene Faktoren wie beispielsweise das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen oder das Blutvolumen beeinflusst. Die Niere reguliert vorwiegend durch die Druck-Natriurese den Flüssigkeitshaushalt und damit das HZV. Der totale periphere Widerstand ist abhängig von der Funktion und Beschaffenheit der Gefäße, die einer lokalen Autoregulation unterliegen. Sowohl die Nieren als auch das kardiovaskuläre System werden durch eine Vielzahl von neuroendokrinen Faktoren in ihrer Funktion beeinflusst. Hierzu zählen unter anderem das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, das atriale natriuretische Peptid (ANP), Adiuretin (ADH), Stickstoffmonoxid (NO) und die vasomotorische Steuerung durch sympathisch-adrenerge vasokonstriktorische Neurone. Zur Steuerung der Vorgänge dient das biologische Prinzip der negativen Rückkopplung. Mittels verschiedener Rezeptoren für den arteriellen Blutdruck werden so das kardiovaskuläre, renale und neuroendokrine System kontrolliert und im Gleichgewicht gehalten. Die drei Systeme wiederum unterliegen Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren (Staessen et al., 2003; Cowley, 2006).

Als den Blutdruck negativ beeinflussende Umweltfaktoren wurden unter anderem die erhöhte Salzaufnahme, die nicht ausreichende Aufnahme von Kalium durch den Verzehr von Obst und Gemüse, das Körpergewicht, die unzureichende körperliche Betätigung und der exzessive Konsum von Alkohol identifiziert. Der Salzaufnahme wurde hierbei eine besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Verschiedene Arten von Studien, wie epidemiologische Studien, Migrationsstudien, Interventionsstudien, genetische Studien, Tierstudien und Behandlungsversuche gaben Hinweise, dass zwischen Salzzufuhr und Blutdruckveränderungen eine Verknüpfung besteht (Forte et

al., 1989; Poulter et al., 1990; Denton et al., 1995; Lifton, 1996; He and MacGregor, 2002).

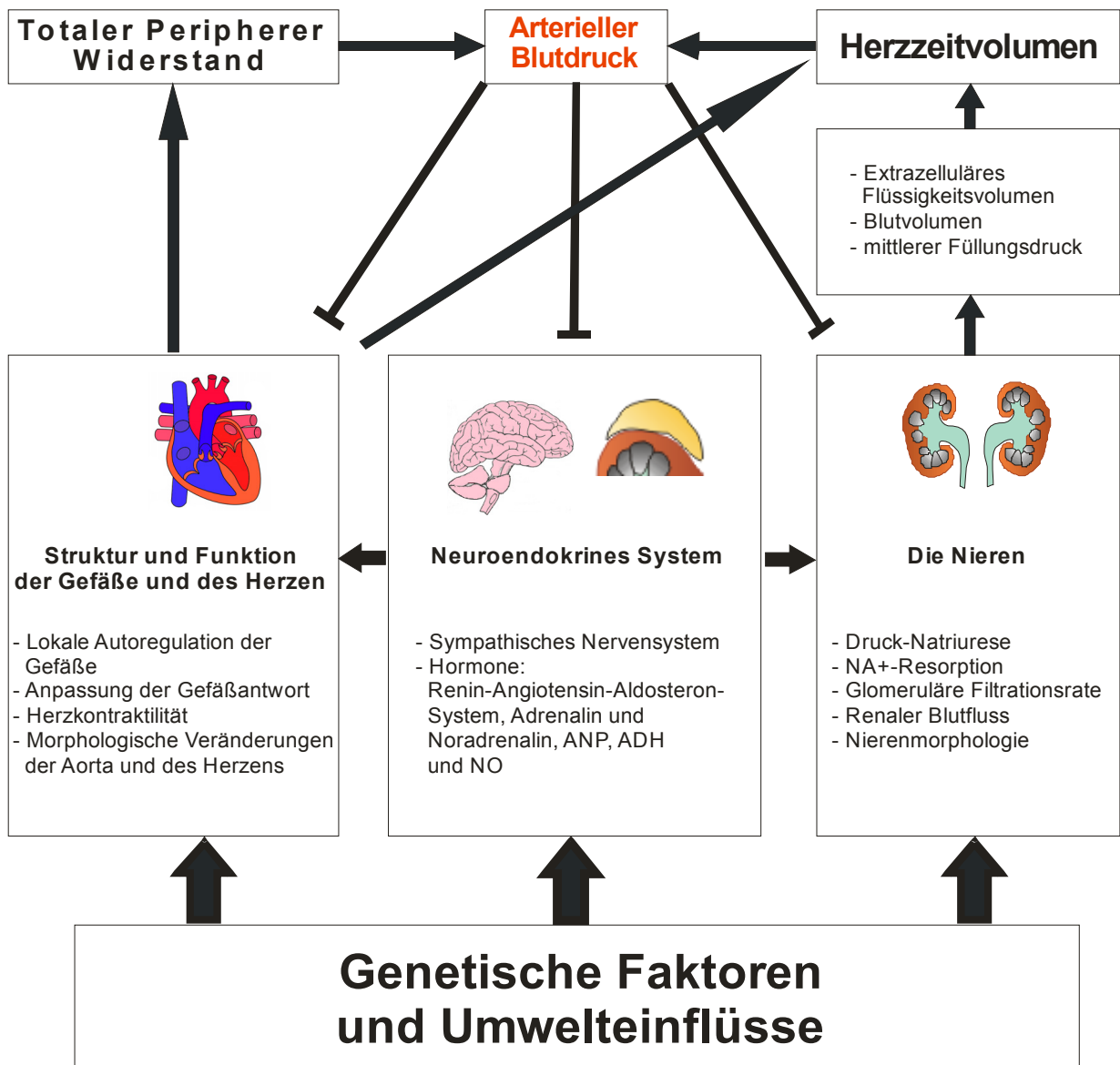


Abbildung 1: Einfluss genetischer, physiologischer und umweltbedingter Faktoren auf den arteriellen Blutdruck (modifiziert nach Cowley 2006).

Die "INTERSALT" und "CARDIAC" Studien haben beispielsweise gezeigt, dass eine positive Assoziation zwischen der 24h-Natriumausscheidung im Urin und dem systolischen Blutdruck besteht. Darüber hinaus konnte eine Beziehung zwischen dem Body-Mass-Index und dem systolischen Blutdruck nachgewiesen werden (Group, 1988; Yamori et al., 1990).

Die heterogene, nicht bei allen Menschen vorkommende Reaktion des Blutdrucks auf eine gesteigerte oder verminderte Aufnahme von Salz wird als Salzsensitivität bezeichnet.

1978 führten Kawasaki et al. eine Studie zur Salzsensitivität an 19 Hypertonikern durch. Sie untersuchten den mittleren arteriellen Blutdruck nach einer normalen (109 mmol/d), einer geringen (9 mmol/d) und einer erhöhten (249 mmol/d) Salzbelastung. Eine Differenz des mittleren arteriellen Blutdrucks von mehr als 10 Prozent zwischen geringer und hoher Salzbelastung wurde als ein Zeichen der Salzsensitivität angesehen. Individuen, bei denen der Unterschied geringer ausfiel, wurden als nicht salzsensitiv klassifiziert (Kawasaki et al., 1978).

Eine weitere von Weinberger et al. 1986 durchgeführte Studie zur Thematik der Salzsensitivität bei Hypertonikern und normotensiven Patienten zeigte, dass 51% der Hypertoniker und 26% der normotensiven Probanden salzsensitiv sind. Die salzsensitiven Probanden waren dabei signifikant älter als die übrigen Probanden. Neben den beeinflussbaren Parametern hat auch die ethnische Herkunft einen Einfluss auf die Salzsensitivität bei Hypertonikern. Weinberger beobachtete, dass 73% der hypertensiven afro-amerikanischen Patienten und 56% der kaukasischen Patienten eine Salzsensitivität aufwiesen. Innerhalb der normotensiven Gruppe gab es nur geringe Unterschiede zwischen den ethnischen Gruppen, hier waren nur 36% der Afro-Amerikaner und 29% der Kaukasier salzsensitiv (Weinberger et al., 1986).

1.3 Genetische Veranlagung der Hypertonie

1.3.1 Monogene Erkrankungen

Unter den genetisch determinierten Hypertonien werden diejenigen als monogen klassifiziert, bei denen ein einzelnes Gen für die Ursache eines arteriellen Hypertonus identifiziert werden kann.

Es wurden bereits mehrere spezifische Mutationen charakterisiert, welche unter anderem die Mineralkortikoidsynthese (Lifton et al., 2001), die Funktion des Mineralkortikoidrezeptors (Geller et al., 2000), den epithelialen Natriumkanal und dessen Regulation durch Kinasen betreffen (Luft, 2004; Gong and Hubner, 2006). Auffällig ist, dass all diese Mutationen die renale Elektrolyt- und Volumenregulation betreffen und damit die physiologisch bedeutsame Rolle der Nieren und Nebennieren bei der Blutdruckregulation untermauern. Die monogenen Formen der Hypertonie, wie beispielsweise das Liddle Syndrom oder der Glukokortikoid sensitive Aldosteronismus

sind für weniger als 1 Prozent der Hypertonien bei Menschen verantwortlich und damit sehr selten (Cowley, 2006).

Im Falle des Glukokortikoid sensitiven Aldosteronismus konnte nachgewiesen werden, wie ein ungleiches Crossing-Over der Aldosteronsynthese und 11- β -Hydroxylase auf Chromosom 8 zu einer abweichenden Expression der Mineralkortikoidsynthese in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde unter Einfluss von ACTH führt (Lifton et al., 1992).

1.3.2 Polygene Erkrankungen

Im Gegensatz zu den monogenen Formen steht die essentielle Hypertonie, die einen Anteil von bis zu 95% unter den Hypertonikern ausmacht.

Es handelt sich hierbei um eine Erkrankung, die nicht auf einen einzelnen Defekt zurückzuführen ist, sondern vielmehr ein Mosaik aus genetisch bedingten Veränderungen in neuronalen, hormonellen und zellulären Systemen darstellt, welche durch potentielle Gen-Gen-Interaktionen einen erhöhten Blutdruck bewirken. Der Einfluss des Lebensstils und der Umweltfaktoren scheint besonders bei der Pathogenese der essentiellen Hypertonie eine entscheidende Rolle zu spielen. In den letzten Jahren konnten mehrere Gene und deren Polymorphismen mit einer potentiellen Bedeutung für die Entstehung der essentiellen Hypertonie identifiziert werden. Zu Ihnen gehören beispielsweise Komponenten des Renin-Angiotensin–Aldosteron-Systems, Polymorphismen des Angiotensin Converting Enzyms und des Adduzin-Gens, sowie Polymorphismen der beta-Adrenorezeptoren und der G-Protein Untereinheiten. Bislang konnten jedoch keine genetischen Faktoren detektiert werden, die für sich allein genommen einen klinisch relevanten Effekt auf den Blutdruck ausüben (Roskopf et al., 2007).

1.4 Nierenfunktion und kardiovaskuläre Erkrankungen

Besonderes Interesse in der Hypertonieforschung gilt den Nieren, da sie einerseits, wie oben beschrieben, zur Pathogenese der arteriellen Hypertonie beitragen und andererseits zu den Organen zählen, an denen sich ein langjähriger Hypertonus manifestiert. Die Folgen sind arteriosklerotische Veränderungen der afferenten und efferenten Arteriolen, sowie der Glomerula in den Nieren. Konsekutiv kommt es zur

verminderten glomerulären Filtration und einer tubulären Dysfunktion. Merkmale der glomerulären Schädigung sind Proteinurie und Mikrohämaturie (Kasper and Harrison, 2005).

Verschieden Studien zeigten, dass insbesondere die Mikroalbuminurie ein geeigneter Marker für renale Funktionsstörungen bei Hypertonikern ist, als auch einen prädiktiven Wert in Hinblick auf kardiovaskulär bedingte Sterblichkeit besitzt (Volpe et al., 2003; Wachtell et al., 2003; Ibsen et al., 2005).

Ferner zeigt sich, dass eine chronisch eingeschränkte Nierenfunktion untrennbar mit kardiovaskulären Erkrankungen verbunden ist und dadurch das Risiko für kardiovaskuläre Endpunkte, wie Myokardinfarkte oder Apoplexe, erhöht. (Sarnak et al., 2003; Anavekar and Pfeffer, 2004; Go et al., 2004).

Auf Grund der Tatsache, dass die hypertoniebedingte Manifestation der Nierenschädigung weitestgehend auf die Schädigung der renalen Gefäße zurückzuführen ist, lässt sich daraus folgern, dass die Marker für die renale Dysfunktion auch mit dem Fortschreiten der systemischen Gefäßbeteiligung bei Hypertonikern assoziiert sind (Matavelli et al., 2006).

1.5 Untersuchung komplexer Merkmale und deren Lokalisation im Genom anhand von Tiermodellen

Blutdruck und Mikroalbuminurie sind so genannte Quantitative Traits, d.h. Merkmale, die kontinuierliche Variationen von hohen und niedrigen Werten aufweisen und sowohl bei Menschen als auch anderen Mammalia vorkommen. Ihre Häufigkeitsverteilung entspricht einer eingipfeligen Gauß-Kurve. Die Abschnitte des Genoms, in denen ein oder mehrere Gene lokalisiert sind, die ein quantitatives Merkmal beeinflussen, werden als Quantitative Trait Loci (QTL) bezeichnet. Es wird im Allgemeinen angenommen, dass sowohl Gen-Gen-Interaktionen mehrerer Gene als auch exogene Einflüsse zur Ausprägung eines quantitativen Merkmals führen (Rapp, 2000).

Auf Grund der Heterogenität des menschlichen Genoms, der großen Anzahl an verschiedenen Allelen und den individuellen Lebensbedingungen ist es sehr schwierig, mittels einer Kopplungsanalyse QTL zu identifizieren (Lander and Schork, 1994; Lalouel, 2003).

Eine Möglichkeit zur Reduzierung der verschiedenen Variablen und der damit verbundenen Optimierung der Kopplungsanalyse stellte die Verwendung von Tiermodellen dar. In den letzten Jahrzehnten wurden mehrere Inzuchtrattenstämme gezüchtet, die innerhalb des Stammes einen konstant hohen Blutdruck entwickeln (Rapp, 2000). Hierzu gehören unter anderem die spontan hypertensive Ratte (SHR) und die Schlaganfall-prädisponierte spontan hypertensive Ratte (SHRSP).

Durch die kontinuierliche Inzucht dieser Stämme, über mehr als 20 Generationen hinweg, wurde eine genetische Homogenität von über 99% erzielt und das jeweilige Merkmal genetisch fixiert (Ganten et al., 1994). In Ergänzung dazu, können die umweltbedingten Einflüsse durch eine kontrollierte Tierhaltung und standardisierte Untersuchungsverfahren minimiert werden. Zudem ist die invasive Untersuchung der Organe unkompliziert. Ein weiterer Vorteil des Ratten-Tiermodells ist die dichte Generationsfolge der Tiere, die es ermöglicht, innerhalb eines kurzen Zeitraums größere Populationen zur Untersuchung bereitzustellen (Kreutz and Hubner, 2002).

Für die klassische Kopplungsanalyse von quantitativen Merkmalen werden zwei ingezüchtete Stämme mit kontrastierenden Merkmalen (Phänotypen), wie hoher und normaler Blutdruck miteinander verpaart. Die so entstandenen Tiere der F1-Generation erhalten von jedem parentalem Elterntier 50% des genetischen Erbguts. Durch weiterführende Bruder-Schwesterpaarungen dieser Tiere wird die F2-Generation erhalten, bei der die Allele gemäß der Mendelschen Regel im Verhältnis 1:2:1 zueinander stehen, d.h. entweder homozygot für den einen Stamm, heterozygot oder homozygot für den anderen Stamm sind (Abb. 2). Phänotypisch zeigen diese Tiere alle Ausprägungen, die auch zwischen den kontrastierenden, ingezüchteten Parental-Stämmen beobachtet werden können (Lee et al., 2000). Die Phänotypen der F2-Generation lassen keinen Rückschluss auf den zugrunde liegenden Genotyp zu.

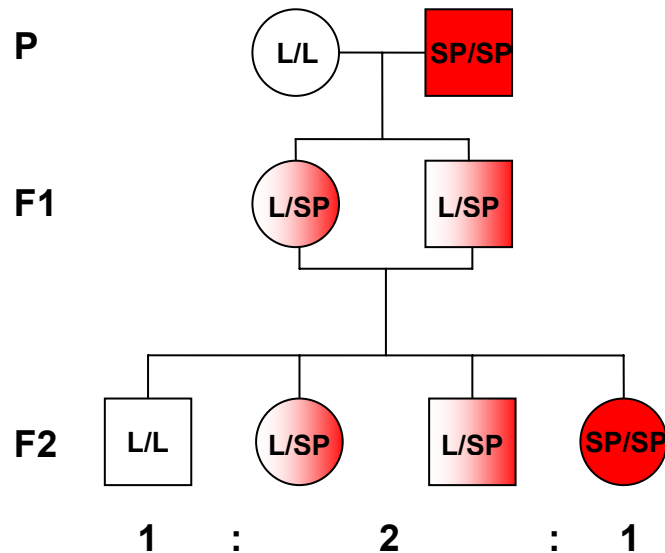


Abbildung 2 : Zucht der F2-Generation am Beispiel der Verpaarung von weiblichen Lewis-Ratten mit männlichen SHRSP-Ratten zu einer F1 Generation und Bruder-Schwester-Verpaarung der F1-Generation zur F2-Generation. SP, SHRSP-Allel; L, Lewis-Allel; P, Parentaltiere; F1, 1. Filialgeneration; F2, 2. Filialgeneration.

Zur Bestimmung des Genotyps werden daher genetische Marker verwendet, welche aus kurzen, sich wiederholenden DNA-Sequenzen von Di-, Tri- oder Tetranukleotiden aufgebaut sind. Diese Marker werden als Mikrosatelliten-Marker, als short tandem repeats (STR) oder auch als simple sequence length polymorphism – Marker (SSLP) bezeichnet.

In der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können diese Mikrosatelliten-Marker mittels flankierender Primer amplifiziert werden (Rapp, 2000).

Mikrosatelliten-Marker machen ca. 3 Prozent des menschlichen Genoms aus und liegen vorwiegend im nicht-kodierenden Bereich. Die gleichmäßige und häufige Verteilung, innerhalb des gesamten Genoms, schätzungsweise ein Mikrosatelliten-Marker pro 2 Kilobasen (kb) DNA, sowie deren möglicher Längenpolymorphismus zwischen den einzelnen Individuen, machen diese Marker zu einem wichtigen Hilfsmittel bei der genomweiten Genotypisierung (Lander et al., 2001).

Für das Rattengenom ist eine große Anzahl an polymorphen Markern erhältlich. Mit Hilfe detaillierter genetischer Karten aus Datenbanken, wie beispielsweise der „Rat Genome Database“ (<http://rgd.mcg.edu>), können diese Marker definierten Regionen auf den Chromosomen zugeordnet werden.

Die so gewonnenen Informationen über Genotyp und Phänotyp stellen die Grundlage der QTL-Analyse dar. Für die QTL-Analyse wird der LOD-Score berechnet. Die

Wahrscheinlichkeit, dass ein Genlocus mit dem Phänotyp assoziiert ist, wird mit der Wahrscheinlichkeit, dass dieses nicht der Fall ist, ins Verhältnis gesetzt. Der Quotient der Wahrscheinlichkeiten wird anschließend logarithmiert und ergibt den LOD-Score. Die einzelnen Ergebnisse werden in einer genetischen Karte in Form eines LOD-Plots dargestellt, der die Lokalisation der QTL zeigt.

Die Verifizierung der gefundenen QTLs kann durch Züchtung so genannter konsomer oder kongener Stämme erfolgen. Hierbei wird das QTL des kontrastierenden Donor-Stamms in den isogenetischen Hintergrund des Rezipienten gezüchtet.

1.6 Der SHRSP- Rattenstamm als geeignetes Tiermodell zur Charakterisierung der Hypertonie und Mikroalbuminurie

1963 etablierten Okamoto und Aoki, ausgehend von Wistar-Kyoto Ratten, den Inzuchtstamm SHR. Das Hauptcharakteristikum dieses Stammes ist die spontan auftretende Hypertonie, die sich schon in den ersten Lebenswochen manifestiert. Die gemessenen Blutdruckwerte steigen proportional mit zunehmendem Alter an, so dass in der 25. Lebenswoche ein durchschnittlicher systolischer Blutdruck von ca. 200 mmHg gemessen werden kann (Okamoto and Aoki, 1963).

Die Teilstämme A1-sb und A3 des SHR-Stammes wurden parallel ingezüchtet und anschließend gekreuzt. Die Tiere, deren Eltern an den Folgen eines Schlaganfalls starben, wurden selektiert und systematisch weiter ingezüchtet. Der neue Stamm wurde als SHRSP/A3N bezeichnet (Okamoto, 1974).

Als besonderes Unterscheidungsmerkmal zu den SHR-Ratten gilt das gehäufte Auftreten von Schlaganfällen bei SHRSP-Tieren. Die Inzidenz für Schlaganfälle bei den männlichen Tieren, die 100 Tage alt sind, beträgt 82 Prozent. Die SHRSP-Tiere entwickeln ebenfalls eine schwere Form der Hypertonie, wobei die Spitzenwerte durchschnittlich 40-50 mmHg höher liegen, als die bei vergleichbaren SHR-Tieren (Yamori, 1984).

Darüber hinaus entwickeln SHRSP-Tiere ausgeprägte hypertonie-induzierte Läsionen der Nierengefäße und des Parenchyms, während die SHR-Ratten relativ resistent oder weniger empfänglich für Nierenschädigungen zu sein scheinen. Dieser Unterschied zwischen SHR und SHRSP kann durch die Verabreichung einer erhöhten Salzdosis mit dem Futter verstärkt werden. Die SHRSP-Tiere entwickeln unter dem Einfluss dieser

speziellen Diät innerhalb von vier bis sechs Wochen eine ausgeprägte sekundär maligne Nephrosklerose, wohingegen die SHR-Tiere nur geringe oder keine Veränderungen aufweisen und damit nicht salzsensitiv sind. Abgesehen von den Nierenschäden entwickelt sich auch der Hypertonus unter dem Einfluss einer höheren Salzbelastung bei den SHRSP Tieren schneller als bei dem SHR-Stamm (Griffin et al., 2001).

Als kontrastierenden Stamm für die Kopplungsanalyse können Lewis Ratten verwendet werden (Rapp, 2000). Die Lewis Ratten sind normotensiv und zeigen durchweg eine physiologische Albuminurie. In Ergänzung dazu konnte gezeigt werden, dass eine Salzbelastung von 4% im Futter zu keiner signifikanten Steigerung des systolischen Blutdrucks führt (Kreutz et al., 2000).

Aufgrund ihrer Eigenschaften sind die SHRSP Ratten ein häufig genutztes Modell zur Erforschung der Hypertonie und seiner Endorganschäden.

1.7 Ziel der Arbeit

Der weit verbreitete essentielle Hypertonus zählt zu den Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen. Besonders in den entwickelten Industrieländern sind Herzkreislauferkrankungen immer noch eine der häufigsten Todesursachen. Obwohl die intensive Forschung auf dem Gebiet der essentiellen Hypertonie in den letzten Jahrzehnten bereits einen Teil der zugrunde liegenden Pathomechanismen aufklären und damit potentielle Therapieansätze zur Prävention und Behandlung liefern konnte, sind noch viele Fragen unbeantwortet. Dass genetische Faktoren jedoch für die Entstehung und Progression der essentiellen Hypertonie verantwortlich sind, ist unbestritten und konnte anhand von Tierstudien demonstriert werden.

In diesem Kontext beschäftigt sich die Arbeit mit den genetischen Grundlagen der salzsensitiven arteriellen Hypertonie und dem Auftreten von hypertoniebedingten Endorganschäden in Form von Nierenschädigungen.

Das Tiermodell der SHRSP-Ratte, welches eine salzsensitive Hypertonie und Albuminurie aufweist, erfüllt die erwünschten Charakteristika. Als kontrastierender Referenzstamm werden die salzresistenten normotensiven Lewis-Ratten mit physiologischer Albuminausscheidung verwendet. Ziel ist es, mit Hilfe einer Kosegregations- und Kopplungsanalyse dieser Stämme, verschiedene Genloci zu

identifizieren, die für die spontane salzsensitive Hypertonie verantwortlich sind. Darüber hinaus sollen chromosomale Regionen mit Einfluss auf hypertoniebedingte bzw. unabhängige Nierenschädigungen identifiziert werden. Neben dem systolischen Blutdruck als kontrastierendem Phänotyp wird die Albuminurie als klinisch relevanter Marker zur Quantifizierung der Nierenschädigung erfasst.

Der erste Arbeitsschritt umfasst die Phänotypisierung der beiden Parentalstämme unter dem Einfluss einer normalen (0,2% NaCl im Futter) und erhöhten Salzbelastung (4% NaCl im Futter). Die zusätzliche Salzbelastung soll den Kontrast zwischen den beobachteten Phänotypen verstärken. Es wird neben dem systolischen Blutdruck auch die Albuminurie gemessen. Zur Verifizierung der genetischen Homogenität der beiden Inzuchtstämme erfolgt eine genomweite Analyse mit Mikrosatelliten-Markern.

Im Anschluss daran wird die Zucht einer F2-Kreuzpaarungspopulation aus salzsensitiven SHRSP- und salzresistenten Lewis-Ratten begonnen. Es werden ausschließlich männliche Tiere der F2-Generation in die Studie eingeschlossen. Die Tiere werden auf eine Hochsalzdiät gesetzt, um das Auftreten und die Ausprägung der spontanen Hypertonie, sowie die Progression der Nierenschädigung zu beschleunigen und somit den Kontrast zwischen den Phänotypen zu verstärken. Auf diese Weise soll die Wahrscheinlichkeit, mittels der im Anschluss durchgeführten Kopplungsanalyse Genloci zu detektieren, erhöht werden.

Die genomweite Kopplungsanalyse hat zum Ziel, die für die spontane Hypertonie und Albuminurie verantwortlichen QTLs zu detektieren und auf den Chromosomen zu kartieren.

Abschließend soll eine vergleichende Genomanalyse vorgenommen werden. Mit Hilfe von Homologievergleichen zwischen Ratten- und Humangenom können die bei der Ratte detektierten QTLs den entsprechenden Abschnitten im humanen Genom zugeordnet werden, um nachfolgend beim Menschen Kandidatengene zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Radionukleotide

Substanz	Firma
[γ - ³² P] dATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, wässrige Lösung)	Amersham
10x Kinase Puffer	Promega
10x PCR-Puffer	Rapidozym, Promega
10x TBE (Tris-Borat-EDTA-Lösung)	Gibco BRL
Aceton	J.T. Baker
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40)	Roth
Acrylease	Stratagene
Albumin, Rat; Polyclonal Antibody, Anti-Rat	ICN
Ammoniumpersulfat	Sigma
Bromphenolblau, Natriumsalz	Merk
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	Roth
dNTPs (2,5 mM)	Rapidozym, Promega
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth
Esketaminhydrochlorid (KetanestS®)	Pfizer
Essigsäure (100%)	Merk, Roth
Ethanol abs.	J.T. Baker
Ether	Merck
Formaldehyd (37%)	J.T. Baker
Formamid	Merk
Gel Slik ®	Cambrex Bio Science
Harnstoff	Roth
Isopropanol	J.T. Baker
Magnesiumchlorid (25 mM)	Rapidozym, Promega
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Aldrich
Pikrinsäure	Merck
Primer siehe Anhang	Life Technologies, TIB MOLBIOL, Genset
Rattenserum-Albumin	Sigma
Schwefelsäure (96%)	Merck
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma
Xylazinhydrochlorid (Rompun®)	Bayer
Xylen Cyanol FF	Sigma

2.1.2 Enzyme

Enzym	Firma
Proteinase K (34 U/mg)	Sigma
T4-Polynukleotidkinase (10 U/ μ l)	Promega
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	Rapidozym, Promega

2.1.3 Puffer und Lösungen

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

2.1.4 Sonstige Materialien und Futtermittel

Artikel	Firma
BioMay MR-1- Röntgenfilme (35 x 43)	Kodak
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell
Glasplatten für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse	Altromin
Kämme und Spacer für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Lochzange für Labortiere	Esculap
Makrolonkäfige Typ III und Typ IV	Ebeco
Mehrkanal-Spritze (8-Kanal)	Hamilton
Reaktionsgefäße Safe-Lock in den Größen: 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml.	Eppendorf
Röntgenkassetten Typ G, 35 x 43 cm	Peq Lab
Schweißfolie	Genetix

Fortsetzung sonstige Materialien und Futtermittel

Artikel	Firma
SMR-ZKA 10 mm inklusive 4% NaCl (Spezialfutter)	Ssniff
Standardpipetten	Eppendorf
Standardtips 20 µl, 100 µl und 1000 µl	Eppendorf
Stoffwechselfkäfige für Ratten bis 300 g	Packard
Szintillationsgefäße aus Kunststoff	Packard
Thermo-Fast 96-Mikrotiterplatten	ABgene
Verpackungsfolie	Saran
Weithalsflaschen aus Polyethylen	Roth

2.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
Analyse-Waage BP 610	Satorius
Blutdruckmessgerät	TSE Bad Homburg
Brutschrank Function Line	Heraeus Instruments
ELISA-MRX-Plate-Reader	Dynex
Filmentwickler X-OMAT 5000 RA	Kodak
Folienschweißgerät	MDC
Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf
Magnetrührer mit Heizfunktion	Heidolph
Mikrotiterplattenschüttler	Roth
Minifuge RF	Heraeus sepatech
Multipipette	Eppendorf
PCR-Cycler	MJ Research
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer	Peq Lab
Power Supply für die Elektrophoresekammer	Biometra
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Vortexer VF2	Janke&Kunkell KA Labortechnik

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung

Die Haltung und Zucht, der in der Arbeit verwendeten Rattenstämme, erfolgte in Absprache mit dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (CBF) an der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM). Die Züchtung der Tiere wurde unter der amtlichen Registriernummer G0089/04 angemeldet. Es wurden maximal 4 Ratten nach Geschlecht getrennt in einem Makrolon Käfig Typ IV gehalten. Zur Verpaarung wurden Käfige des Typs III eingesetzt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Ein 12stündiger Tag-Nacht-Rhythmus, sowie eine konstante RT von 22°C wurden gewährleistet. In der vierten Lebenswoche wurden die Jungtiere von der Mutter abgesetzt und erhielten mit Hilfe einer Lochzange eine eindeutige Ohrmarkierung zur späteren Identifizierung.

2.2.2 Parentaltiere SHRSP und Lewis

Die SHRSP-Ratten stammen ursprünglich von der Universität Heidelberg und wurden durch Professor D. Ganten an der Charité, CBF etabliert.

Die normotensiven salzresistenten Lewis-Ratten wurden ursprünglich von M&B, Bomholtey in Dänemark bezogen und in der FEM als eigenständige Kolonie unter dem Namen Lewis/Rkb etabliert (Kreutz et al., 2000). Bei den SHRSP- und Lewis- Stämmen handelt es sich um Inzuchtstämme, die aus einer systematischen Bruder-Schwester-Verpaarung von mehr als 20 Generationen hervorgehen. Die Erhaltungszucht dieser Stämme wurde in der FEM weitergeführt.

2.2.3 Studiendesign für die SHRSP- und Lewis-Parentaltiere

Es wurden von den SHRSP- und Lewis-Ratten jeweils zwei Gruppen mit acht bis zehn Tieren ausgewählt. Die Selektion der Tiere erfolgte randomisiert. Ab der 6. Lebenswoche wurde das reguläre Futter mit einem Salzgehalt von 0,2% für je eine Gruppe von SHRSP- und Lewis-Tieren durch ein Spezialfutter mit einem Salzgehalt von 4% ersetzt. Die beiden anderen Gruppen wurden weiterhin mit dem regulären Futter ernährt. In der 14. Woche wurden bei allen Tieren die Blutdrücke mit der Tailcuff-

methode gemessen, die Organe gewogen und die biochemischen Parameter ermittelt (siehe unten).

2.2.4 Versuchsaufbau für die F2-Generation SHRSP x Lewis

Für die Kosegregationsanalyse wurden SHRSP-Männchen mit Lewis-Weibchen zu einer F1-Generation verpaart. Durch systematische Bruder-Schwester-Verpaarung der F1-Tiere wurde eine F2-Generation generiert. Für die Kosegregationanalyse wurden ausschließlich 187 Männchen dieser F2-Generation verwendet.

Alle Tiere der F2-Generation erhielten ab der 6. Lebenswoche ein mit 4% NaCl angereichertes Spezialfutter für 8 Wochen. Im Anschluss an diese Diät wurde der Blutdruck gemessen, der 24h-Urin für biochemische Analysen gesammelt und die Organe entnommen (siehe unten).

2.3 Phänotypisierung

2.3.1 Systolische Blutdruckmessungen

Die Bestimmung des systolischen Blutdrucks (SBD) bei der F2-Generation erfolgte in der 14. Woche. Zur Messung wurde die nicht-invasive Tailcuff-Methode verwendet. Dieses Verfahren basiert auf einer automatisierten, computergestützten, oszillatorischen Technik. Nach einer Vorwärmzeit der Tiere in einer Wärmekammer für 15 Minuten bei 32° C wurden die Ratten in wachem Zustand in einen so genannten „Restrainer“ gesetzt. Zur Gewöhnung der Ratten an diese Messmethode, wurden vor der eigentlichen Messung drei Probemessungen durchgeführt und deren Ergebnisse verworfen. Nach Adaptation der Ratten und Kalibrierung des Systems erfolgten die eigentlichen Messungen. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhalten, wurden die Messungen an drei aufeinander folgenden Tagen unter Berücksichtigung zirkadianer Rhythmen zur gleichen Tageszeit und von derselben Person durchgeführt. Das arithmetische Mittel der Einzelwerte ergab den Endwert.

2.3.2 Uringewinnung für die Auswertung klinischer Parameter

In der 14. Woche wurden die Tiere für 24 Stunden einzeln in Stoffwechselkäfige gesetzt, die es erlauben, Urin und Fäzes getrennt zu sammeln. Die sonstigen

Haltungsbedingungen wurden nicht verändert, so dass weiterhin freier Zugang zu Wasser und Futter bestand. Der so erhaltene 24 h-Urin wurde in Weithalsflaschen aus Polyethylen dekantiert und das 24 h-Urinvolumen durch Auswiegen gemessen (1 g \approx 1ml). Für die Albuminbestimmung wurden nach gutem Durchmischen ca. 1 ml Urin in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und anschließend zur Entfernung von Schwebstoffen und Verunreinigungen bei 900 Upm für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß dekantiert. Der verbleibende Urin wurde in ein Szintillationsgefäß aus Kunststoff gefüllt und bei -20°C eingefroren.

2.3.3 Bestimmung der Albuminurie

Die Bestimmung des Albumins erfolgte über einen sensitiven und rattenspezifischen, direkten kompetitiven Albumin-ELISA (enzyme linked immunabsorbent assay), der in der Arbeitsgruppe etabliert wurde (Kreutz et al., 2000). Dieser Test basiert auf einem gereinigten Antigen für Rattenalbumin, welches mit dem Urin versetzt wird. Das Albumin wird gebunden und durch eine weitere enzymkatalysierte Reaktion farblich sichtbar gemacht (blauer Farbkomplex). Nach dem Abstoppen der Reaktion mittels Schwefelsäure (gelber Farbkomplex), erfolgte die Messung der optischen Dichte durch den ELISA-MRX-Plate-Reader. An Hand der zuvor erstellten Eichgeraden wurde die Albuminkonzentration der einzelnen Proben berechnet.

2.3.4 Tierpräparationen

Im Alter von 15 Wochen wurden die Ratten nach vorherigem Wiegen präpariert. Für die Präparation wurden die Tiere mittels einer gewichtsadaptierten, intraperitonealen Applikation von Xylazinhydrochlorid (13 mg/Kg) und Esketaminhydrochlorid (87 mg/Kg) narkotisiert. Nach dem Ausfallen des Kornealreflexes wurden Abdomen und Thorax mit einem medianen Schnitt eröffnet. Aus der Vena cava wurde für die Serum- und Plasmagewinnung Blut mit einer Kanüle abgenommen und bei 4°C bis zur anschließenden Zentrifugation aufbewahrt. Danach wurden das Herz, Teile der Aorta, die Leber und die Nieren entnommen und gewogen. Das Herz wurde in linken Ventrikel, einschließlich Septum, und rechten Ventrikel präpariert und anschließend die Ventrikel einzeln gewogen. In Hinblick auf weitere histologische Untersuchungen in der Arbeitsgruppe wurde ein Horizontalschnitt durch den linken Ventrikel angefertigt. Die Aorta wurde vom umgebenden Gewebe freipräpariert und vermessen. Die rechte Niere

wurde hilusnah, transversal geschnitten und in ein Fixativ gegeben. Danach wurde die linke Niere in Medulla und Cortex geteilt und wie die übrigen Organe in flüssigem Stickstoff bei -80°C schockgefroren. Das Blut wurde bei 8000 Upm für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend bei -80°C eingefroren.

2.4 Genom- und Kopplungsanalyse

Die Untersuchung des Genoms der SHRSP- und Lewis-Ratten erfolgte mittels polymorpher SSR (simple sequence repeats)-Marker, die unter anderem auf dem repetitiven Dinukleotid $(\text{CA})_n$ basierten. Mittels Kinasierung wurden diese marker-flankierenden Primer mit radioaktivem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ markiert. Im Anschluss daran, wurde eine PCR mit den markierten Primern und der zu untersuchenden Ratten-DNA durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese in ihre unterschiedlich langen Fragmente aufgetrennt, so dass an Hand der verschiedenen Bandenmuster zwischen homozygoten Lewis-Allelen, heterozygoten Allelen und homozygoten SHRSP-Allelen unterschieden werden konnte (Abb. 3).

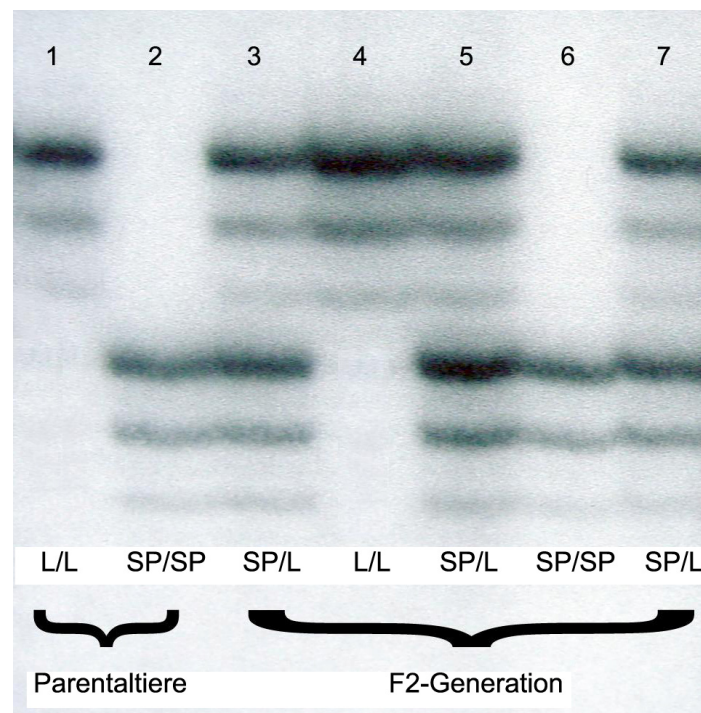


Abbildung 3: Ausschnitt aus der Gelelektrophorese für den Marker D18Rat17. Die Länge des Markers für den SHRSP-Stamm beträgt 146 bp und für den Lewis-Stamm 152 bp. SP, SHRSP-Allel; L, Lewis-Allel; F2, 2. Filialgeneration.

2.4.1 Polymorphe SSR-Mikrosatellitenmarker

Zunächst erfolgte die Prüfung der Mikrosatelliten-Marker hinsichtlich ihres Längenpolymorphismus zwischen SHRSP- und Lewis-Ratten. Insgesamt wurden in Vorarbeiten 181 polymorphe Mikrosatellitenmarker identifiziert und für die Kopplungsanalyse der vorliegenden Arbeit verwendet. Es wurden die Chromosomen 1-20 und das X-Chromosom untersucht. Die Marker waren gleichmäßig über das Genom verteilt und hatten im Durchschnitt einen Abstand von 10 centiMorgan (cM) zueinander. Die Informationen zu den verwendeten Marker wurden von folgenden Instituten bezogen: Medical College of Wisconsin [(Rat) <http://www.rgd.mcw.edu>], Massachusetts Institute of Technology [(Mit) Cambridge, MA; <http://www.genome.wi.mit.edu>] und Massachusetts General Hospital [(Mgh) Cambridge, MA; <http://www.genome.wi.mit.edu>].

2.4.2 DNA-Isolierungen aus der Leber

Für die Isolierung der DNA wurden 50 mg Lebergewebe eingesetzt. Für den Verdau der Zellmembranen wurde das Gewebe in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 700 µl Tail-Puffer und 40 µl Proteinase K (34 U/mg) gegeben. Dieser Ansatz wurde für drei Tage bei 55°C über Kopf drehend inkubiert. Im Anschluß daran, wurde das Eppendorfgefäß für 10 min auf Eis gestellt und der Ansatz zur Eiweißfällung und Reinigung mit 300 µl gesättigter Natriumchlorid-Lösung (6 M) versetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 5 min wurde die Probe bei 14000 Upm für 15 min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 2,0 ml Eppendorfgefäß dekantiert und mit 1 ml Isopropanol versetzt. Dieser Ansatz wurde nach gutem Durchmischen für ca. 30-50 min auf Eis inkubiert. Danach folgte eine weitere Zentrifugation bei 14000 Upm für 15 min und 4°C. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden dem Pellet 500 µl, -20°C kalter, 70%iger Ethanol hinzugefügt. Das Waschen des Pellets erfolgte in einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 14000 Upm für 15 min und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für ca. 10 min bei RT getrocknet und anschließend in 200 µl Aqua bidest. aufgenommen. Die Auflösung des Pellets erfolgte für 20 min bei 37°C im Schüttelinkubator. Die Konzentration und Reinheit wurde photometrisch ermittelt. Dazu wurde eine Verdünnung 1:20 mit Aqua bidest. hergestellt und die Konzentration der Probe bei einer Wellenlänge von 260-280

nm bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde mittels der Extinktionswerte und des Lambert-Beer'schen Gesetzes errechnet. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.4.3 Herstellung von DNA-Stockplatten

Durch die Herstellung von Stockplatten wurde die Effizienz der Genomanalyse gesteigert und die Gefahr von Tierverwechslungen minimiert. Die dafür verwendeten Mikrotiterplatten wurden mit Hilfe einer 8-Kanal Pipette mit $5\ \mu\text{l}$ DNA-Lösung ($10\ \text{ng}/\mu\text{l}$) je Loch bestückt. Anschließend wurden die Proben im Brutschrank bei 55°C für 2 Stunden eingetrocknet. Die Lagerung der Platten erfolgte bei -20°C .

2.4.4 Markierung der Primer mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

Der Transfer des γ -Phosphates auf die 5'-Hydroxylgruppe des sense-Primers erfolgte mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase. Dieses diente der späteren Darstellung der Banden auf einem Röntgenfilm mittels Autoradiographie. Für die Kinasierung wurden pro DNA-Probe in einem $200\ \mu\text{l}$ Eppendorfgefäß $0,04\ \mu\text{l}$ 10x Kinasepuffer, $0,017\ \mu\text{l}$ T4-Polynukleotidkinase, $0,0583\ \mu\text{l}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und $0,22\ \mu\text{l}$ sense Primer ($6\ \mu\text{M}$) gemischt. Der Reaktionsansatz wurde für 45 min bei 37°C und 10 min bei 65°C in einer PCR-Maschine inkubiert.

2.4.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte in vitro. Für die Vervielfältigung wurden $50\ \text{ng}$ genomische DNA mit $1,3\ \mu\text{l}$ 10x PCR-Puffer, $0,39\ \mu\text{l}$ $25\ \text{mM}$ Magnesiumchlorid, $1,1\ \mu\text{l}$ $2,5\ \text{mM}$ dNTPs ($0,2\ \text{mM}$ Endkonzentration), $0,22\ \mu\text{l}$ $6\ \mu\text{M}$ antisense-Primer ($0,1\ \mu\text{M}$ Endkonzentration), dem gesamten Produkt der Kinasierung, $0,07\ \mu\text{l}$ Taq-Polymerase ($0,4\ \text{U}/\mu\text{l}$ Endkonzentration) vermischt und mit Aqua bidest auf ein Gesamtvolumen von $10\ \mu\text{l}$ aufgefüllt. Das Gemisch wurde in einen Thermocycler gegeben und für zwei Minuten bei 92°C denaturiert. Im Anschluss daran wurde eine PCR mit 30 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierung bei 92°C für 15 Sekunden, einem Annealing bei einer primerspezifischen Temperatur für 1 Minute und einer Kettenverlängerung bei 72°C für 1 Minute, durchgeführt. Abschließend wurde das Gemisch bei 72°C für 7 Minuten inkubiert. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei 4°C .

2.4.6 Polyacrylamidgel – Elektrophorese

Für das Gießen des Polyacrylamidgels wurden zwei 45 cm lange und 35 cm breite Glasplatten verwendet. Eine der Glasplatten wurde mit Ethanol und Aceton gereinigt. Die andere Platte wurde nur mit Ethanol gereinigt und mit Gel Slik® beschichtet. Die Platten wurden durch 0,4 mm dicke Spacer an beiden Längsseiten voneinander getrennt und seitlich durch Klammern fixiert. Die untere Seite wurde mit Klebeband abgedichtet. Für das Polyacrylamidgel wurden 31,5 g Harnstoff, 7,0 ml 10x TBE und 10,5 ml Rotiphorese gemischt und auf 70 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt. Zum Starten der Polymerisation des Gels wurden 400 µl Ammoniumpersulfat und 40 µl TEMED dem Gelmix hinzugefügt und dieser zügig und luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Der Kamm wurde mit der glatten Seite ca. 5 mm tief in den oberen Rand des Gels gesteckt. Nach 90 minütigem Auspolymerisieren des Gels bei RT wurde der Kamm gezogen und mit den Zinken 2 mm tief in das Gel eingeführt. Das Gel wurde in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gespannt. Anschließend wurden die Proben jeweils mit 10 µl Formamid-Laufpuffer versetzt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Mittels einer Mehrkanal-Spritze wurden 3 µl einer Probe auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 2 ½ Stunden bei 70 Watt. Nach Beendigung des Gellaufs, wurde die beschichtete Platte abgehoben und das Gel auf Whatmanpapier (34,5 cm x 42,5 cm) überführt, in eine Folie eingeschlagen und mit einem Röntgenfilm zusammen in die Röntgenkassette gelegt. Der Film wurde für ca. 18 Stunden bei -20 °C exponiert.

Die Auswertung der Genotypen auf den Röntgenfilmen erfolgte durch zwei verschiedene Untersucher.

2.4.7 Genotypische Charakterisierung der F2-Generation

Für die Genotypisierung der F2-Population SHRSP x Lewis, bestehend aus 187 Tieren, wurden 181 polymorphe Mikrosatellitenmarker mit einem Abstand von ca. 10 cM zueinander verwendet. Zunächst wurden die Extremtiere untersucht. Diese Gruppe bestand aus jeweils 23 Tieren mit den höchsten bzw. niedrigsten Werten für systolischen Blutdruck und Albuminurie. Im Anschluss daran erfolgte die Genotypisierung aller Tiere mit Markern, die einen Lod-Score $\geq 2,4$ aufwiesen. Nach Komplettierung dieses Schrittes wurde eine QTL-Kartierung durchgeführt.

2.4.8 Statistische Analysen

Die erhobenen Phänotypen der F₂-Generation wurden vor der Kopplungsanalyse auf eine Normalverteilung geprüft und gegebenenfalls logarithmiert. Darüber hinaus wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt und der Korrelationskoeffizient ermittelt. Mit Hilfe der von Lander entwickelten Programme MAPMAKER/EXP und MAPMAKER/QTL 3.0b wurden, basierend auf den Daten von Phäno- und Genotypisierung, die Chromosomenkarten erstellt und die LOD-Scores berechnet, sowie die Lokalisation des QTLs auf dem jeweiligen Chromosom bestimmt. Die genetischen Distanzen wurden über die Rekombinationshäufigkeit mit Hilfe des Kosambi-Algorithmus errechnet und in cM angegeben. Für die Interpretation der LOD-Scores wurden die Empfehlungen von Lander und Kruglyak berücksichtigt, wonach bei einer F₂-Generation ein LOD-Score $\geq 4,3$ einer signifikanten, ein LOD-Score $\geq 2,8$ einer wahrscheinlichen Kopplung entspricht. Das 95% Konfidenzintervall oder auch 1 LOD-Intervall wurde definiert als Intervall mit 1 LOD-Abstand zu beiden Seiten des Peak-Markers, d.h. dem Marker mit dem höchsten LOD-Score. Innerhalb dieses Intervalls befindet sich der QTL mit einer Wahrscheinlichkeit von 95%. Zusätzlich wurde das 2 LOD-Intervall bestimmt mit einem Konfidenzintervall von 99%. Dieses erhöht die Wahrscheinlichkeit den QTL zu erfassen (Lander and Kruglyak, 1995).

Für die Untersuchung des genetischen Einflusses der SHRSP- und Lewis-Allele auf den Phänotyp wurde eine Genotyp-Phänotyp-Analyse durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch eine Einweg-Varianzanalyse (ANOVA). Die konventionellen statistischen Analysen wurden mit dem Computerprogramm SPSS Version 11.5 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Parentalstämme SHRSP und Lewis

Die Charakterisierung der beiden Stämme SHRSP und Lewis beinhaltete die genotypische und phänotypische Untersuchung der Parentaltiere. Zur Verifizierung der genetischen Homogenität der einzelnen Stämme wurde mittels Mikrosatellitenmarker das jeweilige Genom untersucht. Der Abstand zwischen den gleichmäßig über das gesamte Genom verteilten Markern betrug im Mittel 10 cM. Die genetische Homogenität der einzelnen Tiere eines Stammes wurde für beide Stämme bestätigt.

Ziel der phänotypischen Charakterisierung der Parentaltiere war die Beurteilung der Auswirkungen einer übermäßigen Salzzufuhr auf das Herz-Kreislaufsystem und die Nieren und damit die Auswirkung der Salzsensitivität auf die Phänotypen. Es wurden inter- und intraspezifische Unterschiede der beiden Stämme untersucht (Tab. 1).

In der 14. Woche wurde bei allen Tieren der systolische Blutdruck gemessen und die Albuminurie im 24h-Urin (U_{Alb}) bestimmt (Abb. 4 und 5). Nach Salzbelastung konnte bei den Lewis-Ratten keine signifikante Veränderung des durchschnittlichen systolischen Blutdrucks für Salz- vs. nicht-Salzdiät beobachtet werden ($121,8 \pm 8,0$ mmHg vs. $122,4 \pm 10,8$ mmHg). Die U_{Alb} der Lewis-Tiere zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede für Salz- vs. nicht-Salzdiät ($0,34 \pm 0,13$ mg/24h vs. $0,35 \pm 0,22$ mg/24h).

Die Hochsalzdiät bei den SHRSP-Ratten bewirkte sowohl eine hoch signifikante Zunahme des SBD ($172,0 \pm 13,2$ mmHg vs. $262,1 \pm 22,8$ mmHg; $p < 0,00001$) als auch eine hoch signifikant verstärkte U_{Alb} ($0,72 \pm 0,46$ mg/24h vs. $146,47 \pm 55,37$ mg/24h; $p < 0,00001$).

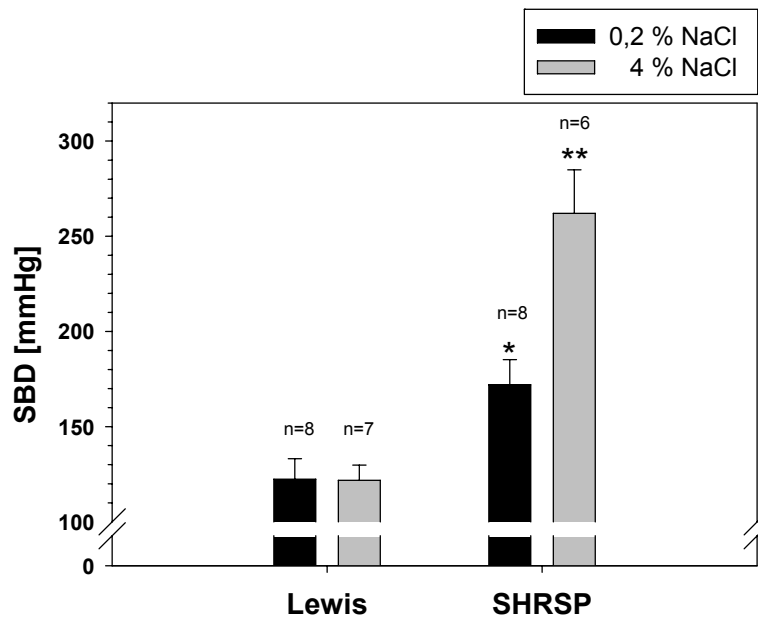


Abbildung 4: Systolischer Blutdruck (SBD) männlicher Lewis- und SHRSP- Ratten in der 14. Woche unter 0,2% NaCl und nach 8-wöchiger Salzbelastung mit 4% NaCl. * $p < 0,00001$ vs. Lewis gesamt und SHRSP-4% NaCl; ** $p < 0,00001$ vs. Lewis gesamt und SHRSP-0,2 % NaCl; n, Anzahl der Tiere.

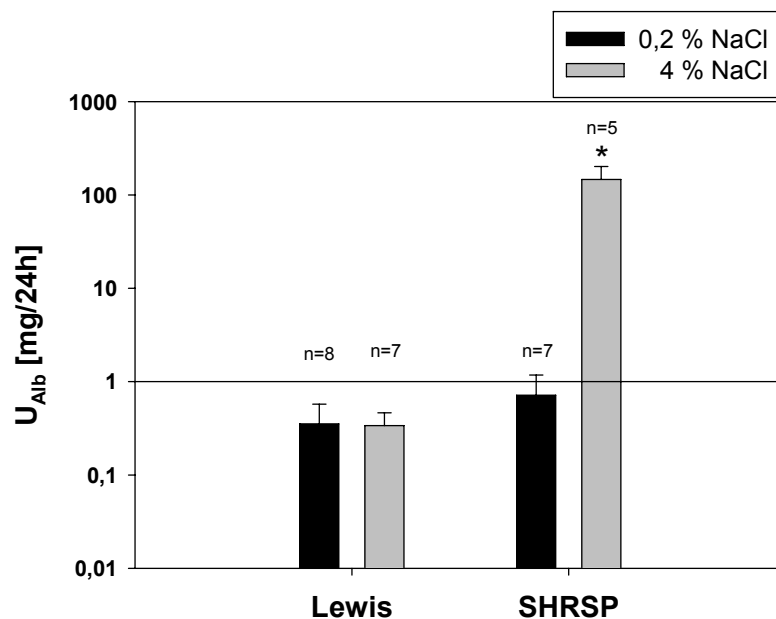


Abbildung 5: Albuminurie (U_{Alb}) männlicher Lewis- und SHRSP- Ratten in der 14. Woche unter 0,2% NaCl und nach 8-wöchiger Salzbelastung mit 4% NaCl. * $p < 0,00001$ vs. Lewis und SHRSP-0,2 % NaCl; Die durchgezogene Linie zeigt den physiologischen Grenzwert für die U_{Alb} n, Anzahl der Tiere.

Tabelle 1: Phänotypisierung männlicher SHRSP- und Lewis-Ratten in der 14. Woche. SBD, systolischer Blutdruck; U_{Alb} , Albuminurie.

Merkmal/Stamm/Diät	Mittelwert	Standard- Abweichung	Minimalwert	Maximalwert	Anzahl der Tiere
SBD [mm/Hg] Lewis mit 0,2 % NaCl	122,4	10,8	112,5	137,5	8
SBD [mm/Hg] Lewis mit 4 % NaCl	121,8	8,0	111,3	130,5	7
SBD [mm/Hg] SHRSP mit 0,2 % NaCl	172,0	13,2	158,5	196,0	8
SBD [mm/Hg] SHRSP mit 4 % NaCl	262,1	22,8	225,0	290,0	6
U_{Alb} [mg/24h] Lewis mit 0,2 % NaCl	0,35	0,22	0,10	0,74	8
U_{Alb} [mg/24h] Lewis mit 4 % NaCl	0,34	0,13	0,17	0,48	7
U_{Alb} [mg/24h] SHRSP mit 0,2 % NaCl	0,72	0,46	0,17	1,46	7
U_{Alb} [mg/24h] SHRSP mit 4 % NaCl	146,47	55,37	69,40	210,00	5

3.2 Kosegregationsanalyse

3.2.1 Phänotypisierung der F2 Population

Nach einer achtwöchigen Salzbelastung wurde in der 14. Woche der Blutdruck gemessen und die Ausscheidung von Albumin im 24h-Urin bestimmt (Tab. 2).

Die Auswertung der systolischen Blutdruckwerte zeigte eine rechtsschiefe, unimodale Normalverteilung (Abb. 6). Die gemessenen Werte lagen im Bereich von 104,9 und 202,1 mmHg. Der Mittelwert betrug $143,1 \pm 15,4$ mmHg (n=186).

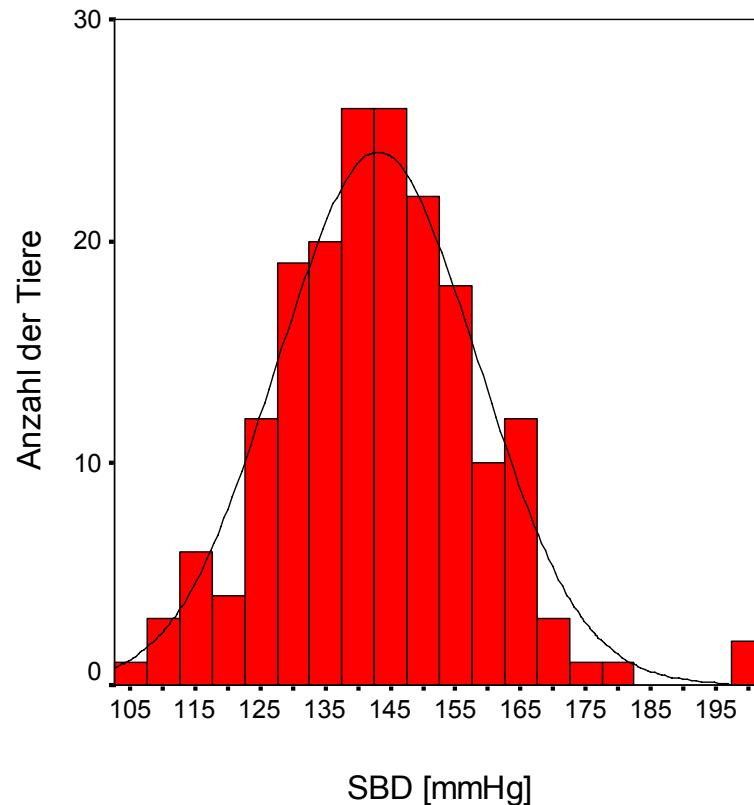


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung des systolischen Blutdrucks bei der F2-Generation SHRSP x Lewis (n=186) in der 14. Woche. SBD, systolischer Blutdruck.

Die Messung der Albuminurie im 24h-Urin erbrachte Werte zwischen 0,07 und 191,5 mg/24h. Der Mittelwert lag bei $3,2 \pm 16,1$ mg/24h (n=187).

Tabelle 2: Systolischer Blutdruck und Albuminurie bei der F2-Generation SHRSP x Lewis (weitere Erläuterungen siehe Tab. 1).

Merkmal	Mittelwert	Standard- Abweichung	Minimalwert	Maximalwert	Varianz
SBD [mm/Hg] 14. Woche	143,1	15,4	104,9	202,1	237,6
U_{Alb} [mg/24h] 14. Woche	3,18	16,08	0,07	191,52	258,7

Die Auswertung der Albuminurie ergab keine Normalverteilung, so dass die Werte logarithmiert wurden. Für die logarithmierten Werte zeigte sich eine rechtsschiefe, unimodale Normalverteilung (Abb. 7).

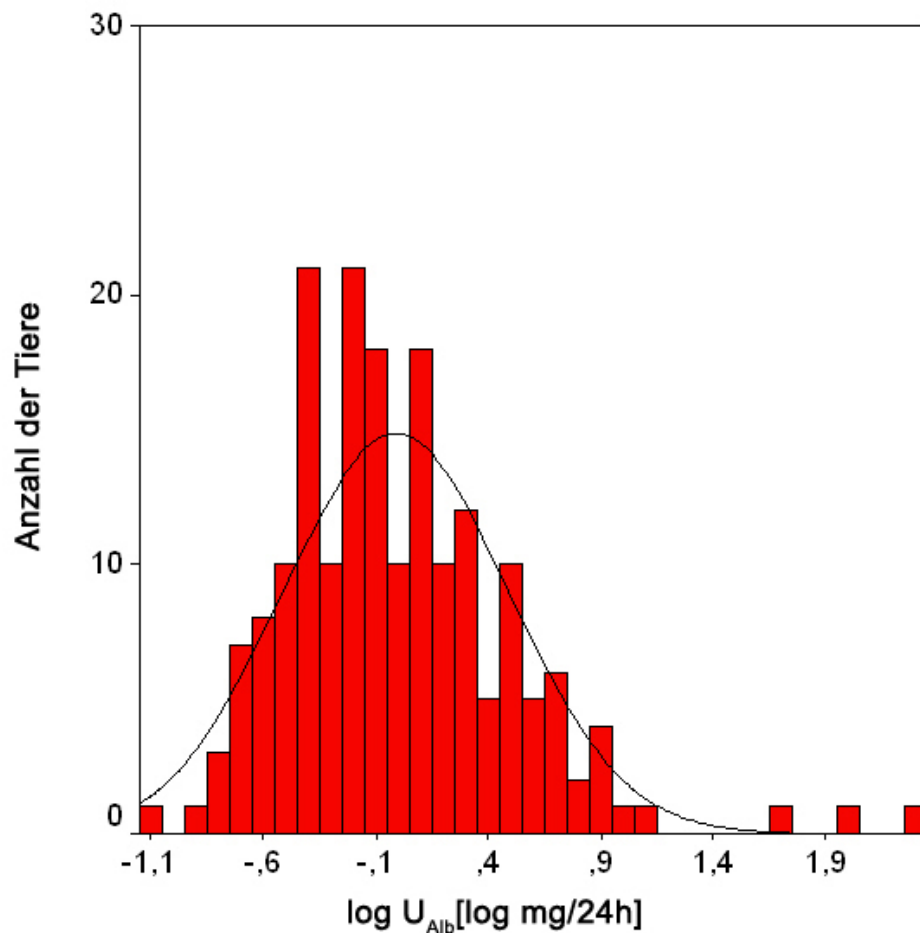


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der Albuminurie bei der F2-Generation SHRSP x Lewis (n=187) in der 14. Woche. U_{Alb}, Albuminurie.

3.2.2 Korrelationsanalyse zwischen systolischem Blutdruck und Albuminurie

Die Korrelationsanalyse der Phänotypen Albuminurie und systolischer Blutdruck in der 14. Woche zeigte eine signifikante Korrelation der untersuchten Parameter (Abb. 8). Der Korrelationskoeffizient r betrug 0,34 ($r^2 = 0,11$). Der p-Wert lag bei 0,01.

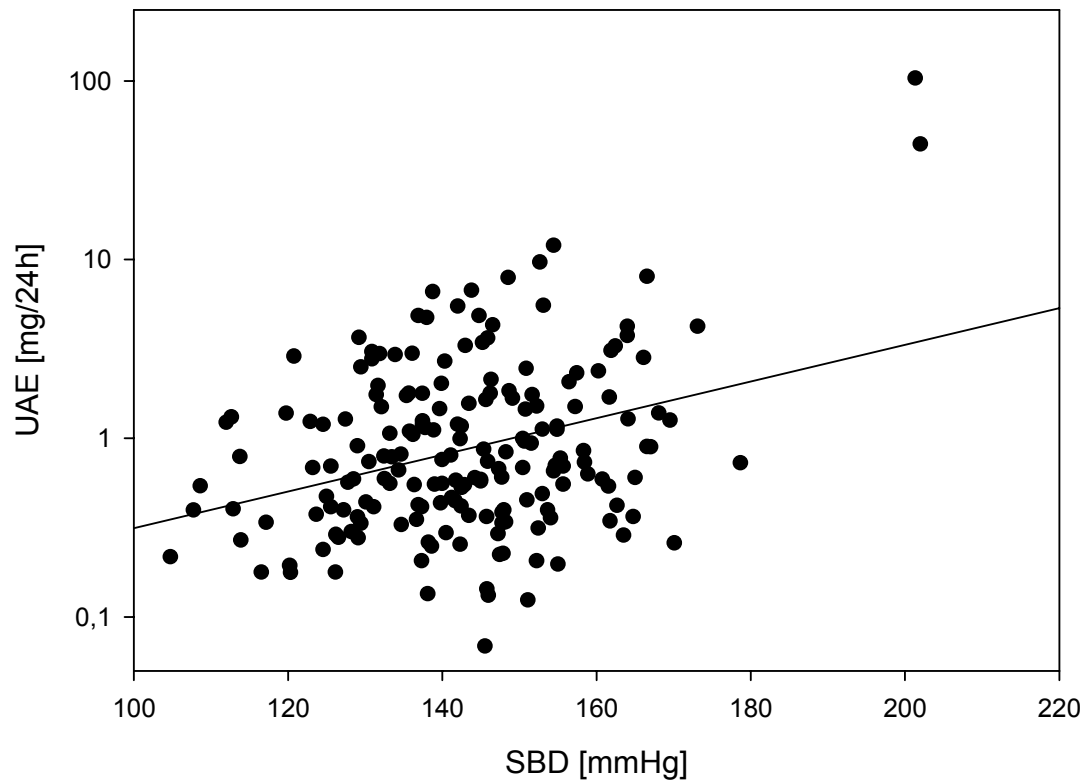


Abbildung 8: Korrelation von systolischem Blutdruck (SBD) und Albuminurie (U_{Aib}) bei der F2-Generation SHRSP x Lewis in der 8. Woche ($n = 186$).

3.3 Genotypisierung der F2-Generation

Basierend auf den Grundprinzipien der Genetik ergaben sich für eine F2-Generation drei mögliche Kombinationen von Genotypen, die sich nach den Mendelschen-Regeln im Verhältnis 1:2:1 aufteilen. Insgesamt wurden 181 Genloci mit polymorphen Markern untersucht.

3.3.1 Genotypisierung der Extremitiere

Zunächst wurde eine genomweite Kopplungsanalyse der 46 Extremitiere, auch als Primärscreen bezeichnet, durchgeführt.

3.3.1.1 Blutdruck- und Albuminurie-QTL auf Chromosom 1 der Extremtiere

Im Primärscreen konnte auf RNO1 ein QTL für den SBD identifiziert werden. Das Vorkommen beider SHRSP-Allele auf RNO1 im Bereich des Peak-Markers D1Rat43 führte bei diesen Tieren zu einem signifikanten Anstieg des SBD auf $165,6 \pm 18,9$ mmHg ($p < 0,0001$). Im Vergleich dazu wiesen die Tiere mit dem homozygoten Lewis-Allel einen SBD von $117,6 \pm 7,1$ mmHg auf. Der LOD-Score von 7,96 für diesen Marker zeigte eine hoch signifikante Kopplung zwischen Genotyp und Phänotyp ($p < 0,0001$). Auf demselben Chromosom ca. 25 cM entfernt wurde für den Peak-Marker D1Rat287 ein weiterer SBD-QTL mit einem Lod-Score von 5,28 gefunden ($p < 0,0001$). Die für diesen Genomabschnitt homozygoten SHRSP Tiere wiesen mit $165,2 \pm 20,3$ mmHg im Vergleich zu den homozygoten Lewis-Tieren mit $120,2 \pm 7,7$ mmHg einen hoch signifikant erhöhten SBD auf ($p < 0,0001$).

Ein QTL für U_{Aib} auf RNO1 mit einem LOD-Score von 4,85 wurde im Bereich des Markers D1Rat61 identifiziert ($p < 0,0002$). Homozygote SHRSP-Allelträger hatten eine signifikant erhöhte U_{Aib} von $23,13 \pm 38,23$ mg/24h im Vergleich zu den homozygoten Lewis-Allelträgern, welche eine U_{Aib} von $0,34 \pm 0,24$ mg/24 aufwiesen ($p < 0,02$).

3.3.1.2 Blutdruck-QTL auf Chromosom 2 der Extremtiere

Auf RNO2 zeigte sich eine wahrscheinliche Assoziation zwischen dem Marker D2Rat147 und dem SBD (LOD-Score 3,90, $p < 0,0003$). Unter dem Einfluss des homozygoten SHRSP-Allels zeigten diese Tiere einen SBD von $156,5 \pm 19,0$ mmHg im Vergleich zu dem homozygoten Lewis-Allel mit einem SBD von $119,8 \pm 7,0$ ($p < 0,009$).

3.3.1.3 Blutdruck-QTL auf Chromosom 4 und 10 der Extremtiere

Weitere Ergebnisse des Primärscreens waren die mögliche Kopplung zwischen dem Marker D4Rat137 und dem SBD auf Chromosom 4 (LOD-Score 2,77; $p < 0,004$), sowie die mögliche Assoziation des Markers D10Rat204 und dem SBD auf Chromosom 10 (LOD-Score 2,77; $p < 0,008$)

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse des Primärscreens findet sich in der Tabelle 3.

Tabelle 3: Ergebnisse der Kopplungsanalyse für die Extremtiere der F2-Generation SHRSP x Lewis. SBD, systolischer Blutdruck; U_{Alb}, Albuminurie.

Merkmal	Marker	Genotyp			Statistik	
		SP/SP (n)	SP/L (n)	L/L (n)	LOD-Score	Signifikanz ANOVA
SBD [mmHg]	D1Rat43	165,6 ± 18,9 (14)	141,8 ± 22,1 (18)	117,6 ± 7,1 (12)	7,96	p<0,0001
	D1Rat287	165,2 ± 20,3 (16)	138,1 ± 23,4 (21)	120,2 ± 7,7 (8)	5,28	p<0,0001
	D2Rat147	156,5 ± 19,0 (5)	152,1 ± 25,8 (29)	119,8 ± 7,0 (12)	3,90	p<0,0003
	D4Rat137	147,8 ± 23,8 (11)	153,3 ± 27,0 (23)	123,0 ± 11,3 (11)	2,77	p<0,004
	D10Rat204	159,7 ± 25,5 (13)	145,2 ± 23,4 (19)	128,5 ± 22,3 (13)	2,21	p<0,008
U_{Alb} [mg/24h]	D1Rat61	23,13 ± 38,23 (7)	1,80 ± 2,68 (27)	0,34 ± 0,24 (8)	4,85	p<0,0002

3.3.2 Genotypisierung der gesamten F2 Generation

Nach der Identifizierung verschiedener QTL im Primärscreen wurde die gesamte F2-Generation mit 187 Tieren mittels Mikrosatellitenmarker untersucht (Sekundärscreen). Es galt die Validität der signifikanten, wahrscheinlichen sowie der geringfügig unter der unteren Signifikanzschwelle liegenden QTL bei Betrachtung einer größeren Population zu bestätigen.

Der Sekundärscreen zeigte SBD-QTL auf den Chromosomen 1, 2, 4 und 10. Ebenfalls konnte ein U_{Alb}-QTL auf RNO1 detektiert werden. Es wurden keine Abweichungen hinsichtlich der identifizierten Chromosomen im Vergleich zum Primärscreen gefunden. Lediglich die LOD-Scores und die Lokalisation der Peakmarker für die einzelnen QTL wiesen Unterschiede auf. Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Tabelle 4.

3.3.2.1 Blutdruck- und Albuminurie-QTL auf Chromosom 1

Der Lod Plot für das Merkmal SBD wies drei Spitzen auf. Die ersten beiden Spitzen bildeten eine Doppelspitze, wobei die zum Chromosomenanfang gelegene etwas niedriger war (Abb. 11). Der Abstand zwischen den Spitzen betrug ca. 10 cM. Die erste Spitze hatte ihr Maximum innerhalb des Markerintervalls D1Rat35 und D1Rat43. Der LOD-Score für das Maximum betrug 8,1. Unterhalb der zweiten Spitze lag der Peakmarker D1Rat47. Dieser wies die höchste signifikante Kopplung mit dem Merkmal SBD auf. Der LOD-Score für diesen Marker betrug 8,44 ($p < 0,00001$). Tiere mit dem homozygoten SHRSP-Allel in diesem Bereich hatten einen durchschnittlichen systolischen Blutdruck von $153,4 \pm 15,5$ mmHg. Dieser Wert war signifikant ($p < 0,00001$) höher als der durchschnittliche SBD bei Vorkommen des homozygoten Lewis-Allels, mit $130,2 \pm 11,7$ mmHg (Abb. 9). Von allen detektierten Loci wies dieser mit einer Blutdruckdifferenz von 23,2 mmHg den größten Blutdruckeffekt auf. In einer Entfernung von nur ca. 17 cM zu der zweiten Spitze zeigte sich ein weiterer Peak bei dem ebenfalls eine signifikante Assoziation zwischen dem Marker D1Rat287 und dem Merkmal SBD vorlag. Der LOD-Score für den SBD betrug 4,68 ($p < 0,00001$). Diese drei Spitzen wurden zu einem QTL zusammengefasst, der für ~18,9 % der gesamten Blutdruckvarianz verantwortlich ist. Ebenfalls wies der Marker D1Rat287 eine signifikante Assoziation mit dem Merkmal U_{Alb} auf. Der LOD-Score für die U_{Alb} betrug 5,04 ($p < 0,00001$). Unter dem Einfluss des homozygoten SHRSP-Allels im Bereich des Markers D1Rat287 wiesen die Tiere eine signifikant höhere U_{Alb} mit $9,5 \pm 32,2$ mg/24h, als die Tiere mit homozygotem Lewis-Allel auf ($p < 0,05$). Bei diesen betrug die U_{Alb} durchschnittlich $0,9 \pm 0,8$ mg/24h (Abb. 10). Der Effekt dieses QTL erklärte 13,0% der gesamten Albuminurievarianz. Die LOD-Plots für SBD und U_{Alb} zeigten für LOD-Score-Werte $> 4,3$ eine deutliche Kolo-kalisation über eine Länge von ca. 10 cM auf RNO1 (Abb. 11).

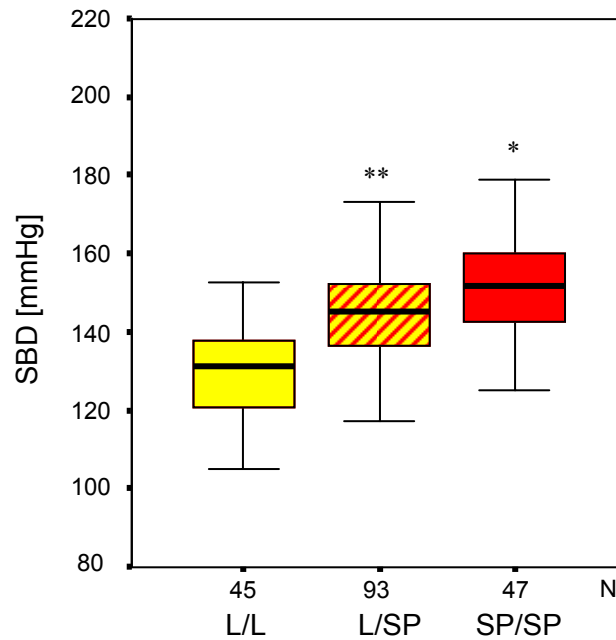


Abbildung 9: Systolische Blutdruckwerte in Abhängigkeit vom Genotyp am Locus des Markers D1Rat47. N, Anzahl der Tiere; L/L, homozygotes Lewis-Allel; L/SP, heterozygot; SP/SP, homozygotes SHRSP-Allel; SBD, systolischer Blutdruck. * $p < 0,001$ vs. L/SP und L/L; ** $p < 0,0001$ vs. L/L.

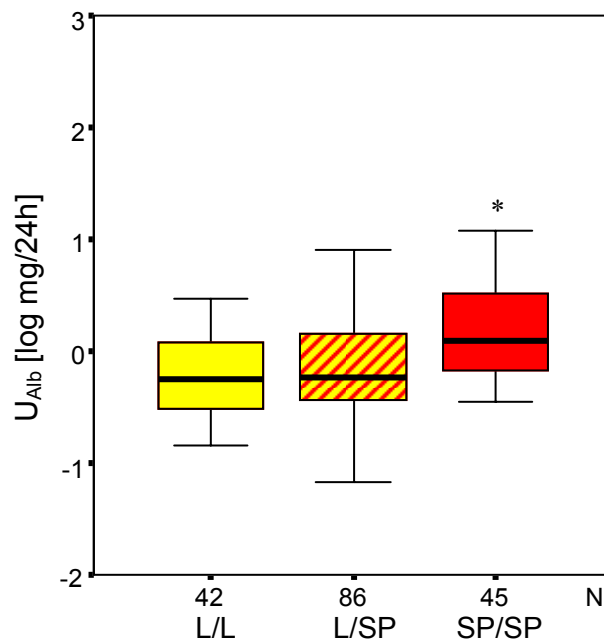


Abbildung 10: Albuminurie im 24h-Urin in Abhängigkeit vom Genotyp am Locus des Markers D1Rat287. U_{Alb} , Albuminurie. * $p < 0,0001$ vs. L/SP und L/L. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 9.

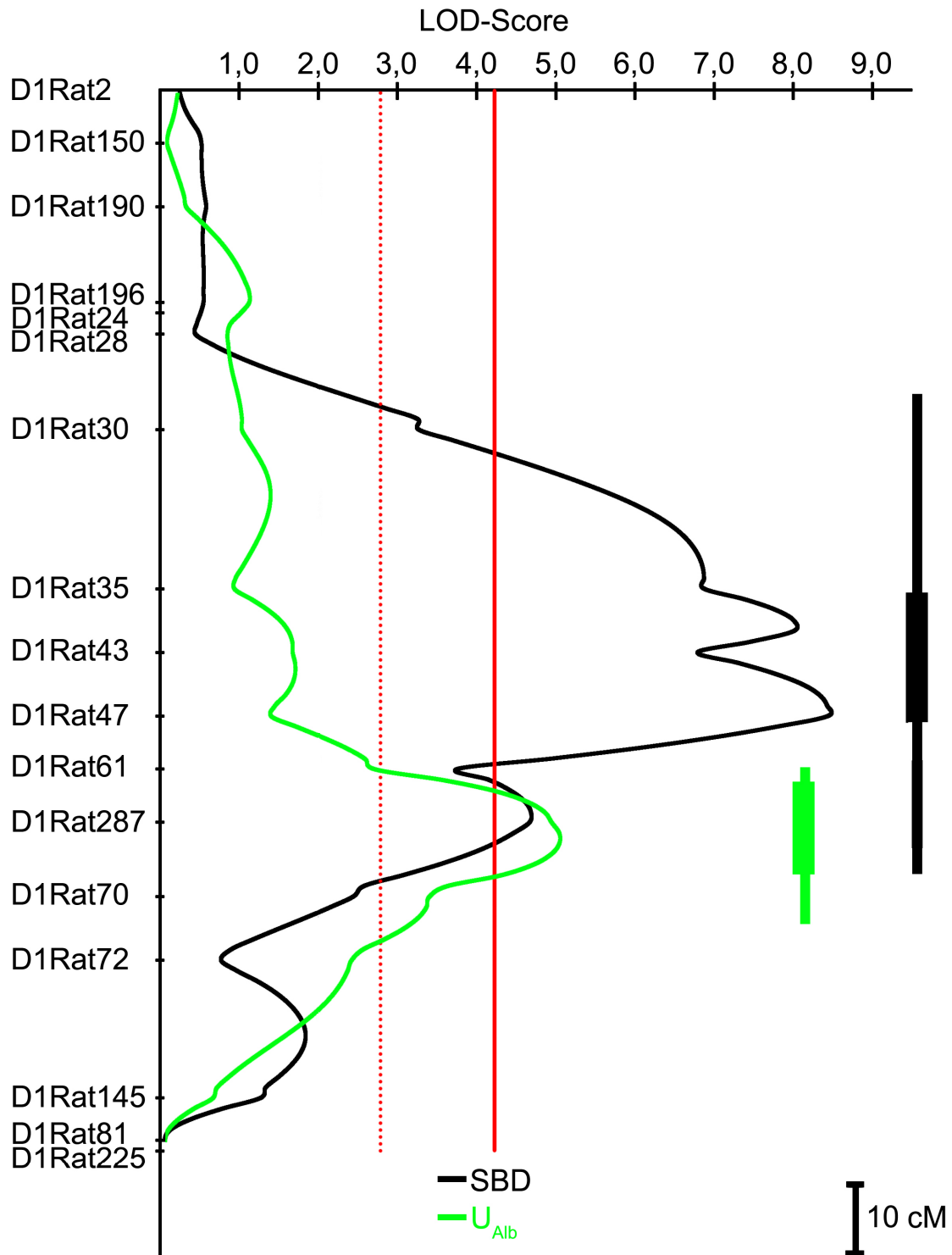


Abbildung 11: QTL für systolischen Blutdruck und Albuminurie auf Chromosom 1 bei der F2-Generataion SHRSP x Lewis in der 14. Woche. Max. Lod-Score 8,4. SBD, systolischer Blutdruck; U_{Alb} , Albuminurie, rote durchgezogene Linie bei Lod-Score 4,3 signifikante Kopplung; rote gepunktete Linie bei Lod-Score 2,8 wahrscheinliche Assoziation; breiter vertikaler Balken, 1-Lod-Intervall, schmaler vertikaler Balken, 2-Lod-Intervall.

3.3.2.2 Blutdruck-QTL auf Chromosom 2

Auf RNO2 konnten zwei SBD-QTL detektiert werden. Der erste QTL stellte sich zweigipfelig im Lod-Plot dar. Das etwas niedrigere Maximum mit einem LOD-Score von 4,3 lag zwischen den Markern D2Rat19 und D2Rat145. Für den Peakmarker D2Rat147 bestand eine signifikante Kopplung ($p < 0,0002$) mit dem SBD. Der LOD-Score lag bei 5,36 (Abb.14). Das Vorhandensein des homozygoten SHRSP-Allels im Bereich des Markers D2Rat147 führte zu einem durchschnittlichen SBD von $147,1 \pm 11,1$ mmHg und war damit höher ($p < 0,005$) als die Werte der homozygoten Lewis-Allelträger mit durchschnittlich $134,4 \pm 13,3$ mmHg (Abb. 12). Der Unterschied zu den heterozygoten Tieren war nicht signifikant. Dieser QTL erklärte ca. $\sim 12,4\%$ der gesamten Blutdruckvarianz. Ein weiterer SBD-QTL lag im Bereich des Markers D2Rat56, welcher einen Abstand von ca. 78,9 cM zu dem Marker D2Rat147 aufwies. Der Marker D2Rat56 ließ mit einem LOD-Score von 3,44 eine wahrscheinliche Assoziation mit dem SBD erkennen ($p < 0,005$). Die an diesem Locus homozygoten SHRSP-Tiere wiesen einen SBD von $144,8 \pm 12,9$ mmHg auf und hatten damit höhere Blutdruckwerte als die homozygoten Träger des Lewis-Allels mit $136,7 \pm 17,0$ mmHg. Die Differenz der Mittelwerte war jedoch nicht signifikant. Der SBD der heterozygoten Allelträger war im Durchschnitt höher als der der homozygoten (Abb. 13). Der SBD der an dieser Markerposition heterozygoten Tiere lag bei $145,5 \pm 15,1$ mmHg und war damit signifikant ($p < 0,004$) höher als der durchschnittliche SBD der homozygoten Lewis-Allelträger.

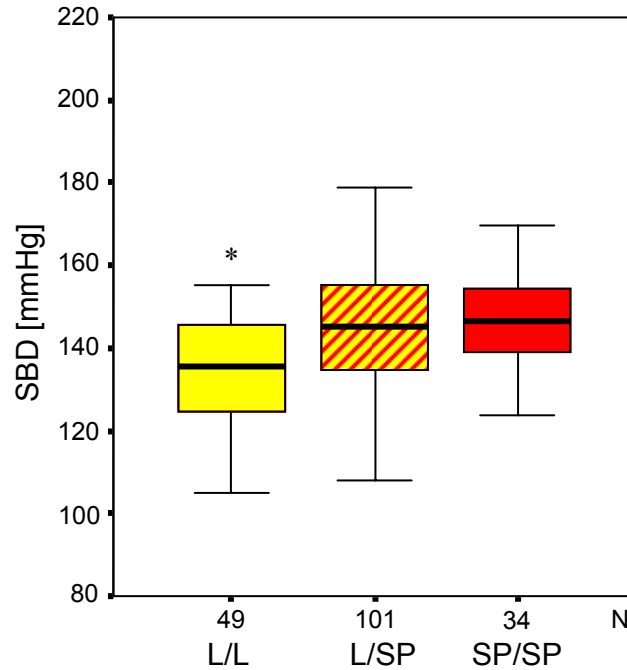


Abbildung 12: Systolische Blutdruckwerte in Abhängigkeit vom Genotyp am Locus des Markers D2Rat147. * $p < 0,005$ vs. L/SP und SP/SP. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 9.

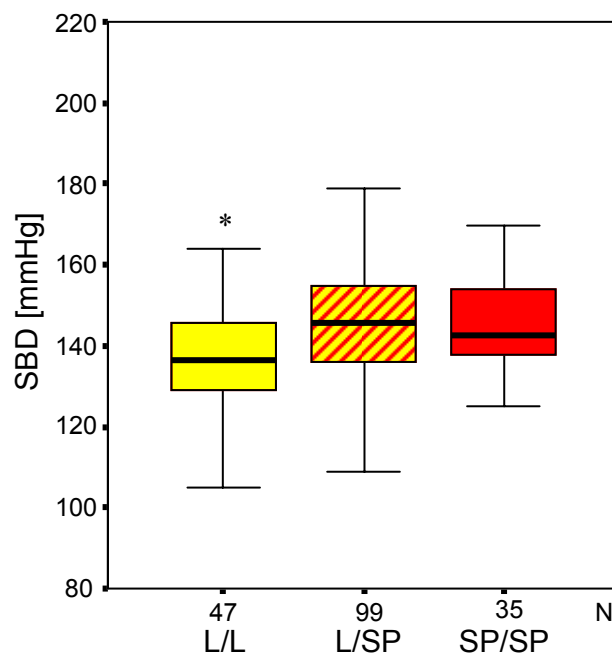


Abbildung 13: Systolische Blutdruckwerte in Abhängigkeit vom Genotyp am Locus des Markers D2Rat56. * $p < 0,004$ vs. L/SP. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 9.

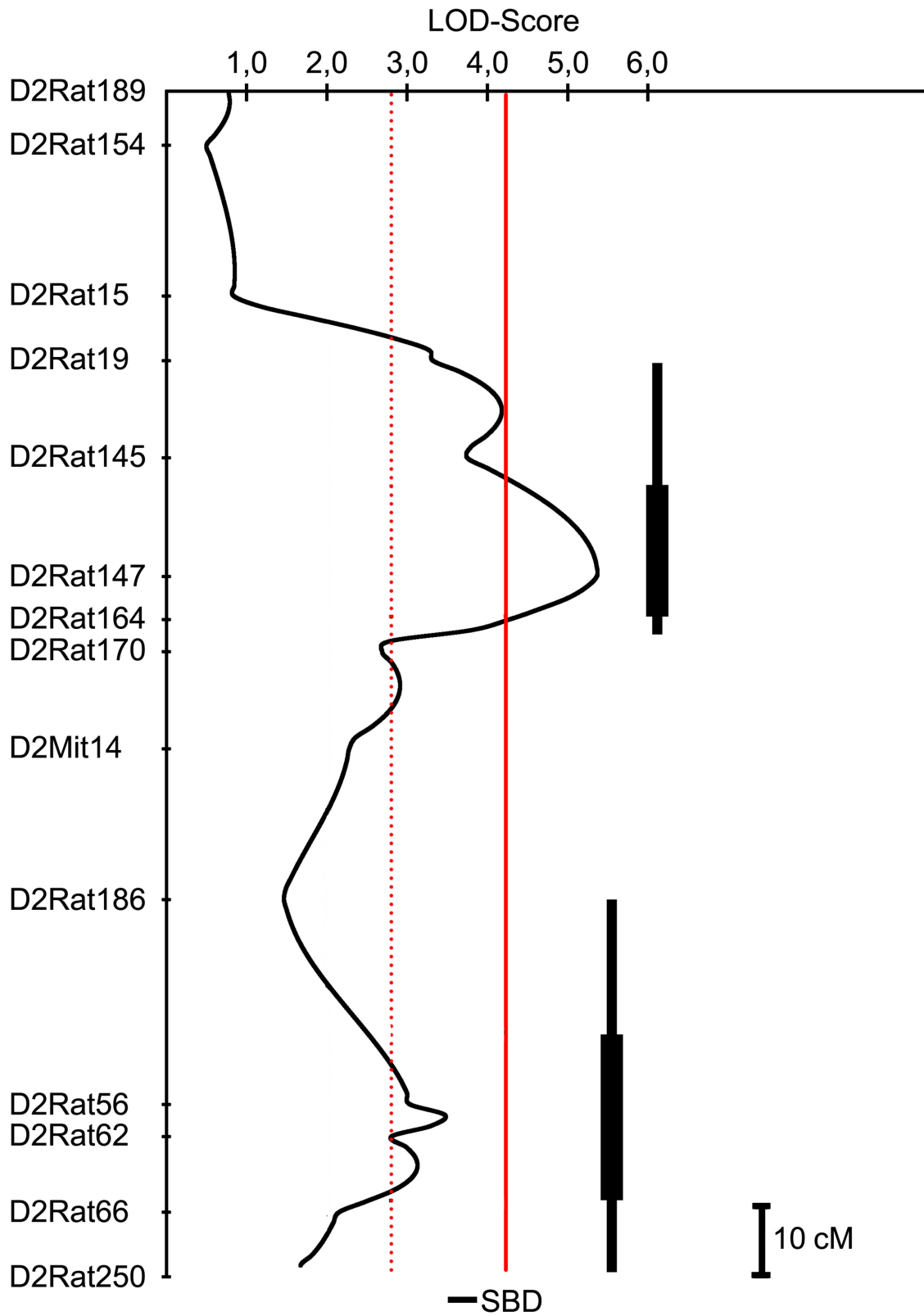


Abbildung 14: QTL für systolischen Blutdruck (SBD) auf Chromosom 2 bei der F2-Generation SHRSP x Lewis in der 14. Woche. Max. Lod-Score 5,36 (Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 11).

3.3.2.3 Blutdruck-QTL auf Chromosom 4

In der Kosegregationsanalyse wurde auf Chromosom 4 ein QTL für den SBD detektiert (Abb. 16). Die Kopplung zwischen dem Marker D4Rat58 und dem Phänotyp SBD konnte bei einem LOD-Score von 3,4 als wahrscheinlich angesehen werden ($p < 0,002$). Das homozygote SHRSP-Allel bei den Tieren an dieser Position im Genom führte zu einem SBD von $143,5 \pm 15,2$ mmHg. Tiere mit heterozygoten Allelen zeigten jedoch einen noch höheren Blutdruck von durchschnittlich $146,1 \pm 16,8$ mmHg. Die Tiere mit homozygotem Lewis-Allel wiesen in diesem Fall den niedrigsten SBD mit $136,3 \pm 10,7$ mmHg auf (Abb. 15). Die Differenz war nur zwischen den Lewis-Tieren mit homozygoten Allel und den Ratten mit heterozygotem Allel signifikant ($p < 0,002$). Der Effekt dieses QTL im Hinblick auf die gesamte Blutdruckvarianz lag bei $\sim 8,1$ %.

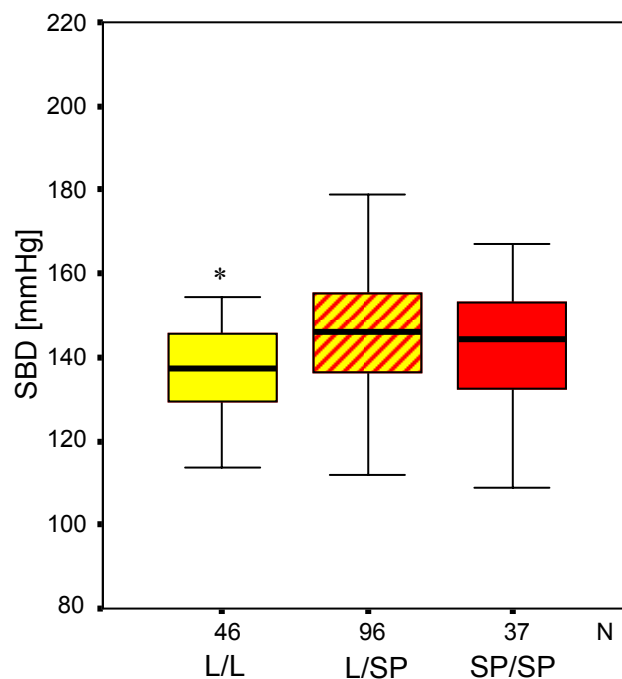


Abbildung 15: Systolische Blutdruckwerte in Abhängigkeit vom Genotyp am Locus des Markers D4Rat58. * $p < 0,002$ vs. L/SP. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 9.

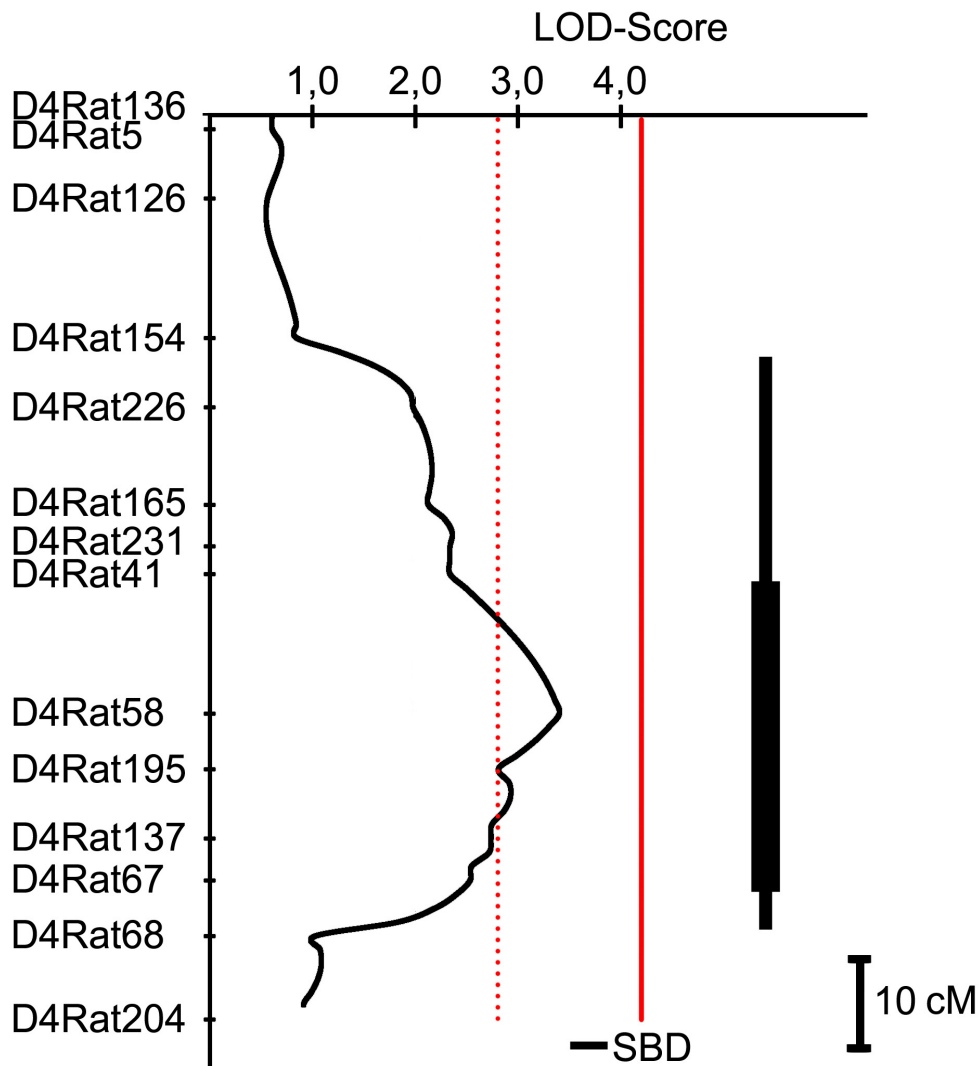


Abbildung 16: QTL für systolischen Blutdruck (SBD) auf Chromosom 4 bei der F2-Generation SHRSP x Lewis in der 14. Woche. Max. Lod-Score 3,4 (Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 11).

3.3.2.4 Blutdruck-QTL auf Chromosom 10

Auf Chromosom 10 zeigte sich nach Durchführung der Kopplungsanalyse ein flaches ca. 30 cM umfassendes QTL für den SBD (Abb. 17). Bei einem LOD-Score von 2,67 kann von einer möglichen Kopplung zwischen dem SBD und dem Peakmarker D10Rat124 gesprochen werden ($p < 0,02$). Das Vorhandensein beider SHRSP-Allele an der Markerposition D10Rat124 bei den Tieren führte zu einem SBD von $147,8 \pm 14,8$ mmHg, der im Vergleich zu den homozygoten Lewis-Allelträgern mit durchschnittlich $138,7 \pm 15,5$ mmHg signifikant ($p < 0,02$) höher lag (Abb.18). Dieser QTL erklärte $\sim 7,1$ % der gesamten Blutdruckvarianz.

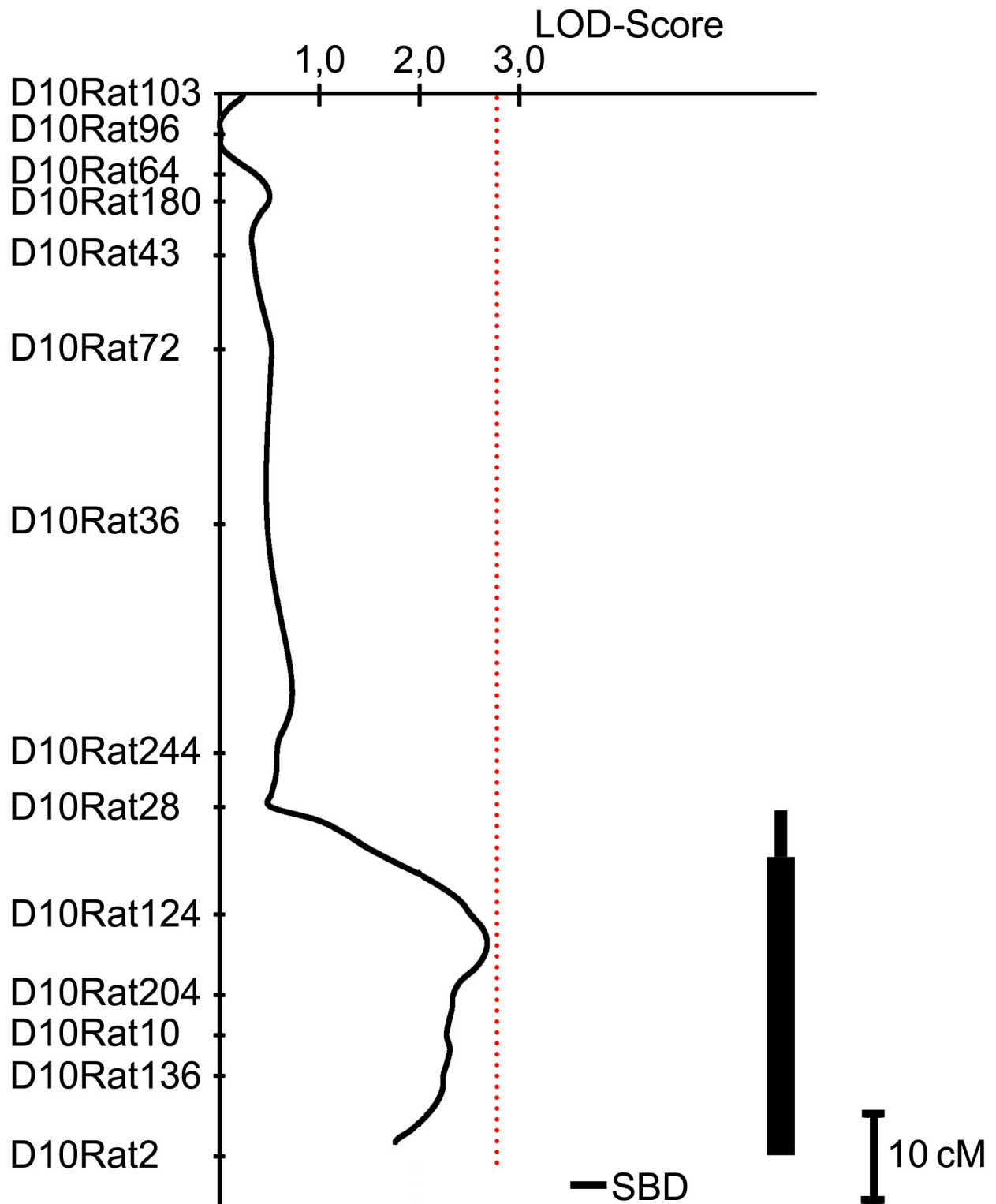


Abbildung 17: QTL für systolischen Blutdruck (SBD) auf Chromosom 10 bei der F2-Generation SHRSP x Lewis in der 14. Woche. Max. Lod-Score 2,7(Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 11).

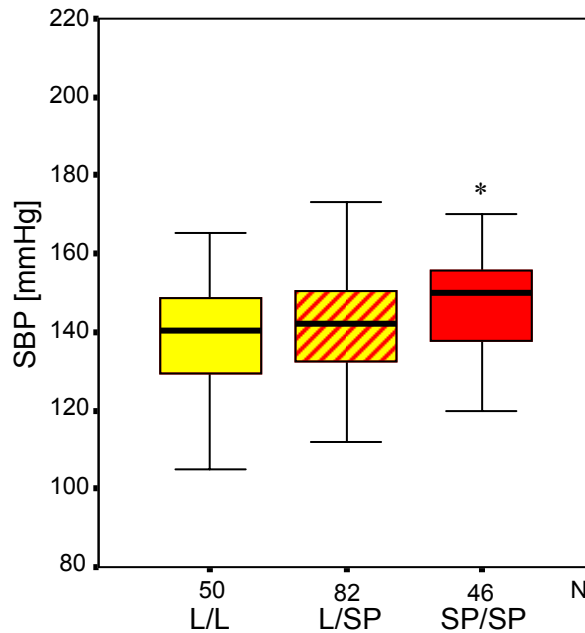


Abbildung 18: Systolische Blutdruckwerte [mmHg] in Abhängigkeit vom Genotyp am Locus des Markers D10Rat124. * $p < 0,02$ vs. L/L. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 9.

Tabelle 4: Ergebnisse der Kopplungsanalyse für die gesamten F2-Generation SHRSP x Lewis. SBD, systolischer Blutdruck; U_{Alb} , Albuminurie.

Merkmal	Marker	Genotyp			Statistik	
		SP/SP (n)	SP/L (n)	L/L (n)	LOD-Score	Signifikanz ANOVA
SBD [mmHg]	D1Rat47	153,4 ± 15,5 (47)	144,5 ± 12,5 (93)	130,2 ± 11,7 (45)	8,44	$p < 0,00001$
	D1Rat287	153,3 ± 16,5 (44)	142,6 ± 14,1 (86)	134,0 ± 11,9 (42)	4,66	$p < 0,00001$
	D2Rat147	147,1 ± 11,1 (34)	146,0 ± 16,2 (101)	134,4 ± 13,3 (49)	5,36	$p < 0,00002$
	D2Rat56	144,8 ± 12,9 (35)	145,5 ± 15,1 (99)	136,7 ± 17,0 (47)	3,74	$p < 0,005$
	D4Rat58	143,5 ± 15,2 (37)	146,1 ± 16,8 (96)	136,3 ± 10,7 (46)	3,40	$p < 0,002$
	D10Rat124	147,8 ± 14,8 (46)	142,9 ± 15,2 (82)	138,7 ± 15,5 (50)	2,67	$p < 0,02$
U_{Alb} [mg/24h]	D1Rat287	9,54 ± 32,15 (45)	1,14 ± 1,41 (86)	0,90 ± 0,76 (42)	5,04	$p < 0,00001$

4 Diskussion

Die arterielle Hypertonie ist eine der häufigsten Erkrankungen weltweit. Betroffen von den Langzeitfolgen eines Hypertonus sind vor allem das Herzkreislaufsystem und die Nieren. Eine Schädigung dieser blutdruckregulierenden Systeme führt zur Progression der Hypertonie und begünstigt damit die Entstehung eines Circulus vitiosus. Folgen sind eine erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität. Die der Hypertonie zugrunde liegenden Pathomechanismen sind bislang weitestgehend ungeklärt. Genetische sowie umweltbedingte Faktoren scheinen einen Einfluss auf den arteriellen Blutdruck zu haben. Diese Beobachtung führte dazu, dass die Suche nach prädisponierenden Genen intensiviert wurde und mittlerweile wenigstens 10 den Blutdruck beeinflussende Genmutationen bekannt sind. Diese monogenetischen Veränderungen führen überwiegend zu Verschiebungen im Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt (Lifton, 1996). Die Hypertonieforschung beim Menschen ist auf Grund der großen Heterogenität des menschlichen Genoms und der nicht kontrollierbaren äußeren Einflüsse schwierig. Als Alternative hierzu bietet sich die Verwendung von Tiermodellen mit isogenetischem Erbgut an, die - analog zum Krankheitsbild der essentiellen Hypertonie beim Menschen - dieses ebenfalls entwickeln. Darüber hinaus können durch kontrollierte Tierhaltung die Umwelteinflüsse stark reduziert werden (Kreutz and Hubner, 2002; Cowley, 2006).

Unter der Anzahl der bisher etablierten hypertensiven Rattenmodelle sind die SHRSP-Ratten, die durch einen stark ausgeprägten Hypertonus und eine Neigung zu Schlaganfällen charakterisiert sind, ein hervorragendes Tiermodell zur Studie der Hypertonie und der hypertoniebedingten Endorganschäden (Okamoto, 1974).

Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass eine erhöhte Salzbelastung bei SHRSP-Ratten sowohl einen stark erhöhten systolischen Blutdruck als auch eine gesteigerte Albuminurie zur Folge haben (Siegel et al., 2004).

Für die Durchführung einer aussagekräftigen Kosegregations- und Kopplungsanalyse wird ein zu den SHSRP-Ratten kontrastierender Stamm benötigt. Lewis-Ratten sind auf Grund ihres salzresistenten Blutdruckverhaltens und der physiologischen Albuminausscheidung hierfür prädisponiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Parentaltiere SHRSP und Lewis, sowie die gezüchtete F2-Generation SHRSP x Lewis phänotypisch charakterisiert. Anschließend erfolgte mittels Kopplungsanalyse die Identifizierung der genetischen Loci, die eine Assoziation mit den Phänotypen Albuminurie und systolischen Blutdruck aufweisen.

4.1 Parentaltierstudie

Die SHRSP-Ratten zeigen auf Grund der erhöhten Salzbelastung eine signifikante Progression der Hypertonie und Albuminurie im Vergleich zu den SHRSP-Ratten mit Standardfutter. Die Differenz der durchschnittlichen Blutdruckwerte beträgt 90,1 mmHg (Tab. 1). Die physiologische Albuminausscheidung bei Ratten liegt in einem Bereich von bis zu 1,00 mg/24h. Die SHRSP-Ratten mit Standardfutter weisen eine physiologische U_{Alb} mit durchschnittlichen Werten von 0,72 mg/24h auf. Nach zusätzlicher Gabe von Salz hingegen treten massiv erhöhte pathologische Werte zwischen 69,40 mg/24h und 210,00 mg/24h für die Albuminausscheidung auf. Entsprechende Beobachtungen wurden auch schon von Siegel et al. 2004 bei Dahl/SS- und SHRSP-Ratten gemacht. Diese entwickelten nach einer Hochsalzdiät einen massiven Anstieg des systolischen Blutdrucks, der Albuminausscheidung und der Indizes für die Nierenschädigung. SHRSP- und Dahl/SS-Tiere zeigten beide die Entwicklung einer schweren Glomerulosklerose, wobei die Mikroangiopathie, die tubulointerstitielle Fibrose und Entzündung bei den SHRSP-Ratten stärker ausgeprägt war (Siegel et al., 2004).

Mögliche Unterschiede von Messergebnissen bei der Phänotypisierung der Parentaltiere im Vergleich zu bereits veröffentlichten Studien können generell auf saisonale Unterschiede im Blutdruckverhalten, eine unterschiedliche Adaptation der Tiere an die Meßmethode, abweichende Haltungsbedingungen der Ratten sowie mögliche genetische Unterschiede zwischen den jeweiligen Kolonien eines Stammes, im Sinne einer Gendrift, zurückzuführen sein (Lindpaintner, 1992; Rapp, 2000).

Bei der Phänotypisierung der Lewis-Ratten zeigen sich nach der Salzbelastung weder eine signifikante Erhöhung der normalen Blutdruckwerte (122,4 mmHg vs. 121,8 mmHg), noch eine Veränderung der physiologischen Albuminausscheidung (0,35 mg/24h vs. 0,34 mg/24h). Auf Grund der physiologischen Befunde für den SBD und die U_{Alb} auch nach Salzbelastung, eignen sich daher die Lewis-Ratten hervorragend als kontrastierender Stamm zu den salzsensitiven SHRSP-Ratten.

4.2 Ergebnisse der Kosegregationsanalyse

Die Blutdruckmessung in der 14. Woche bei den 186 Tieren der F2-Generation nach einer achtwöchigen Salzbelastung ergibt durchschnittliche SBD-Werte von 143,1 mmHg

und ist somit um 119,0 mmHg niedriger als die durchschnittlichen SBD-Werte der SHRSP-Parentaltiere nach Salzbelastung. Diese großen Blutdruckdifferenzen zwischen den isogenen SHRSP-Ratten und der heterogenetischen F2-Population belegen die allgemein protektive Wirkung der Lewis-Allele in Bezug auf die Suszeptibilität eines salzsensitiven Hypertonus.

Die Blutdruckwerte der F2-Tiere liegen im Bereich von 104,9 mmHg bis 202,1 mm/Hg und weisen eine Normalverteilung mit einer leichten Tendenz zu den niedrigeren Werten auf (Abb. 6). Diese kontinuierliche Variation von niedrigen zu hohen Werten spricht dafür, dass es sich bei dem Blutdruck um ein quantitatives Merkmal handelt, welches durch ökogenetische Faktoren beeinflusst wird und somit verschiedene Genloci vorhanden sind, die das Merkmal Blutdruck kontrollieren (Rapp, 2000).

In der Kopplungsanalyse konnten insgesamt 4 QTL, die den Blutdruck beeinflussen und auf vier unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, identifiziert werden. Bei der Lokalisation mehrerer Kandidatengene auf einem Chromosom kann der LOD-Plot multiple Spitzen aufweisen, was dazu führt, dass die eindeutige Differenzierung zwischen zwei bzw. drei voneinander getrennten QTL nicht immer möglich ist. Der LOD-Plot auf RNO1 zeigt beispielsweise drei Spitzen, deren Abstände zueinander kleiner als 80 cM sind. Dieser Befund macht es bei der Analyse unmöglich, drei unabhängige QTL zu identifizieren (Rapp, 2000). Aus diesem Grund handelt es sich auf RNO1 am wahrscheinlichsten um einen SBD-QTL mit zwei flankierenden Nebenpeaks. Der LOD-Plot von RNO2 zeigt ebenfalls mehrere Peaks, die jedoch mehr als 80 cM voneinander getrennt sind und damit ohne Schwierigkeiten bei der Analyse unterschieden werden konnten. Auf den Chromosomen 4 und 10 liegt jeweils ein SBD-QTL. Nach Anwendung der von Lander und Kruglyak 1995 publizierten Grenzwerte zur Interpretation von LOD-Scores innerhalb einer F2-Generation, erfüllen 4 SBD-QTL bei der Zucht SHRSP x Lew die Kriterien für eine wahrscheinliche Kopplung mit einem LOD-Score $> 2,8$. Der QTL auf RNO10 unterschreitet mit einem LOD-Score von 2,7 knapp den Grenzwert für eine wahrscheinliche Kopplung. Um Regionen wie diese, die eine schwache Kosegregation mit dem Merkmal SBD zeigen, zu verifizieren müsste gegebenenfalls die Markerdichte in diesem Bereich erhöht werden. Zwei QTL erfüllten außerdem die Bedingungen für eine signifikante Kopplung mit einem LOD-Score $> 4,3$. Der SBD-QTL an der Position des Peak-Markers D1Rat47 auf RNO1 zeigt mit einem LOD-Score von 8,4 den höchsten aller detektierten Werte. Die Effekte aller Blutdruck-

QTL sind zusammen für ~46,5% der Blutdruckvarianz verantwortlich und bekräftigen damit die Hypothese, dass der Genotyp eine erhebliche Rolle bei der Beeinflussung des systolischen Blutdrucks spielt.

Die detektierten SBD-QTL auf RNO1 zeigen, vom Genotyp abhängige, signifikant ansteigende Blutdruckwerte. Tiere mit dem homozygoten Lewis-Allel in diesem Bereich besitzen hierbei die niedrigsten Werte, gefolgt von den heterozygoten Allelträgern bis hin zu den homozygoten Trägern des SHRSP-Allels (Abb. 9). Diese Tendenz bekräftigt die aufgestellte Hypothese, dass ein Vorhandensein des SHRSP-Allels bzw. der Verlust des protektiven Lewis-Allels in diesem Genombereich auf RNO1 zu einem salzsensitiven Hypertonus prädisponiert.

Bei Betrachtung des SBD-QTL auf RNO2 im Bereich des Markers D2Rat147 fällt hingegen auf, dass das Lewis-Allel an diesem Genlocus keinen protektiven Einfluss zu besitzen scheint. Es zeigt sich wie erwartet eine signifikante Differenz der durchschnittlichen systolischen Blutdrücke zwischen den jeweils homozygoten Lewis- und SHRSP-Allelträgern, sowie den in diesem Bereich heterozygoten Tieren im Vergleich zu den homozygoten Lewis-Allelträgern. Es liegt jedoch keine signifikante Differenz zwischen den für den Marker D2Rat147 heterozygoten Tieren und den homozygoten SHRSP-Allelträgern vor (Abb. 12). Das Vorhandensein eines einzigen SHRSP-Allels in diesem Genomabschnitt führt bereits zu einer vollständigen Ausprägung des pathologischen Phänotyps und zeigt damit einen dominanten Effekt.

Die SBD-QTL im Bereich der Peakmarker D2Rat56 und D4Rat58 auf den Chromosomen 2 und 4 zeigen eine weitere Variante der Interaktion zwischen Genotyp und Phänotyp. Die durchschnittlichen Blutdruckwerte sind interessanterweise bei den heterozygoten Allelträgern in diesen Bereichen höher als die bei den Trägern des homozygoten Lewis-Allels. Die Frage wie der SBD der jeweiligen Träger des homozygoten SHRSP-Allels an den beschriebenen Genloci im Vergleich zu den homozygoten Lewis-Allelträgern oder den heterozygoten Allelträgern eingeordnet werden kann, ist auf Grund fehlender Signifikanzen nicht möglich (Abb. 13, Abb. 15). Eine Erklärung für diese Ergebnisse ist, dass eine Geninteraktion zwischen Lewis- und SHRSP-Allelen an diesen Stellen einen negativen, das heißt den Blutdruck erhöhenden, Effekt bewirkt. Ein kompletter Wegfall des Lewis-Allels, wie es bei den homozygoten Trägern des SHRSP-Allels der Fall ist, scheint keinen Einfluss auf die Prädisposition für einen salzsensitiven Blutdruckanstieg in diesen Genabschnitten zu haben.

Bei Betrachtung der Genotypen und den dazu gehörigen systolischen Blutdrücken auf RNO10 im Bereich des SBD-QTL zeigt sich, dass es weder zwischen homozygoten SHRSP-Allelträgern und heterozygoten Tieren, noch zwischen letztgenannten und homozygoten Lewis-Allelträgern signifikante Blutdruckunterschiede gibt. Erst eine Vererbung von zwei SHRSP-Allelen an diesem Genlocus führt zu einer signifikanten Blutdruckerhöhung gegenüber den Tieren mit homozygotem Lewis-Allel, was für eine rezessive Vererbung spricht. In diesem Abschnitt des Genoms scheint das Vorkommen von mindestens einem Lewis-Allel protektiv zu wirken (Abb. 18).

Das Vorhandensein multipler SBD-QTL auf mehreren Chromosomen und die unterschiedlichen Allelkombinationen an diesen Loci, die zur Ausprägung des Phänotyps prädisponieren unterstreichen die bisherigen Erkenntnisse, dass es sich bei der salzsensitiven Hypertonie um eine polygenetische Erkrankung handelt (Rapp, 2000).

Neben dem systolischen Blutdruck wurde auch die Albuminurie bei der genomweiten Kopplungsanalyse untersucht. Die zugrunde liegenden Albuminuriewerte befinden sich im Bereich von 0,07 mg/24h bis 191,52 mg/24h (Tab. 2). Nach Abschluss der Analyse konnte ein U_{Alb} -QTL mit einem LOD-Score von 5,04 auf RNO1 detektiert werden. Damit besteht eine signifikante Kopplung zwischen dem Genlocus und dem Phänotyp Albuminurie. Dieser U_{Alb} -QTL im Bereich des Markers D1Rat278 ist für ~13,0% der gesamten Albuminurievarianz verantwortlich.

Die Differenz der durchschnittlichen Albuminuriewerte zwischen den Tieren mit dem homozygoten Lewis bzw. SHRSP-Allel an diesem Genomabschnitt beträgt 8,6 mg/24h. Die homozygoten Träger des SHRSP-Allels im Bereich des Markers D1Rat278 haben eine um mehr als das Zehnfache erhöhte Albuminurie im Vergleich zu den homozygoten Lewis-Allelträgern (Tab. 4). Es können allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren mit homozygotem SHRSP-Allel und für diesen Genabschnitt heterozygoten Allelträgern, sowie zwischen letztgenannten und homozygoten Lewis-Allelträgern gefunden werden (Abb. 10). Hieraus lässt sich folgern, dass die Lewis-Allele an diesem Genlocus protektiv gegenüber einer pathologischen Albuminurie wirken. Die Vererbung zweier SHRSP-Allele führt hingegen zu einer gesteigerten Albuminurie und folgt damit einem rezessiven Vererbungsmuster. Diese Beobachtung korreliert auch mit den Ergebnissen früherer tierexperimenteller Studien und Humanstudien, die einheitlich auf ein rezessives Vererbungsmuster für die

Albuminurie hinweisen (Murayama et al., 1998; Fogarty et al., 2000; Fogarty et al., 2000; Shiozawa et al., 2000; Schulz et al., 2002; Garrett et al., 2003; Schulz et al., 2003).

Bei Betrachtung der LOD-Plots für die Merkmale SBD und U_{Aib} auf RNO1 fällt eine Kolokalisation des SBD-QTL mit dem U_{Aib} -QTL auf. Im Bereich des Markers D1Rat287 liegt eine ca. 10 cM umfassende Überlappung der jeweiligen LOD-Plots auf dem Niveau einer signifikanten Kopplung vor (Abb. 11). Nach der Korrelationsanalyse zwischen den Phänotypen Albuminurie und durchschnittlichem systolischen Blutdruck bestätigt sich diese Beobachtung. Das Bestimmtheitsmaß r^2 der Korrelationsanalyse sagt aus, dass ca. 11% der Albuminurie bei der F2-Generation SHRSP x Lewis durch den SBD erklärt werden. Die Kolokalisation der QTL für SBD und U_{Aib} , sowie die positive Korrelation beider Phänotypen können auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Einerseits ist es möglich, dass an diesem Genlocus unterschiedliche Gene für die Ausprägung der Phänotypen SBD und U_{Aib} verantwortlich sind und zufällig im gleichen Bereich lokalisiert sind. Andererseits ist es denkbar, dass nur ein Gen durch seine Funktion einen Pathomechanismus bedingt, der sowohl zu einem erhöhten Blutdruck als auch einer eingeschränkten Nierenfunktion führt. Eine mögliche Interpretation dieser Kolokalisation könnte sein, dass an diesem Genlocus die Nierenschädigung mit dem Phänotyp U_{Aib} als Folge der Hypertonie zu sehen ist. Diese These könnte durch eine weitere Studie, die den „age-of-onset“-Effekt erfasst, d.h. die Phänotypen werden zu mehreren Zeitpunkten bestimmt, überprüft werden. Hierbei würde beispielsweise das zunächst alleinige Detektieren eines SBD-QTL in der 8. Woche und das zu einem späteren Zeitpunkt kolokalisierte Auftreten eines U_{Aib} -QTL diese Vermutung stützen.

4.3 Vergleich mit anderen Studien

Im Jahr 1991 führten zum ersten Mal zwei Studiengruppen genomweite Kopplungsanalysen an einer Kreuzpaarungspopulation zwischen den aus der Heidelberger Kolonie stammenden SHRSP/Heidelberg-Ratten und normotensiven Wistar-Kyoto Ratten (WKY) durch (Hilbert et al., 1991; Jacob et al., 1991). Ziel war es, die genetische Suszeptibilität der Hypertonie zu erforschen. Auch Kreutz et al. verwendeten für ihre Studien SHRSP-Tiere aus der Heidelberger Kolonie (Kreutz et al., 1997). Ähnliche Studien wurden darüber hinaus mit F2-Generationen durchgeführt, bei denen die SHRSP-Ratten beispielsweise aus der Kolonie in Glasgow

(SHRSP/Glasgow) oder aus Japan (SHRSP/Izm) stammten (Clark et al., 1996; Mashimo et al., 1999).

Die Lokalisation des Blutdruck QTL auf RNO1 im Bereich des Markers D1Rat47 wurde übereinstimmend sowohl von Kreutz et al. durch die Kopplungsanalyse bei einer F2-Generation aus SHRSP/Heidelberg- und WKY-Ratten als auch von Hubner et al. an Hand des teilkongeneten Stammes WKY.SHRSP-(Mt1pa-D1Rat200) beschrieben (Kreutz et al., 1997; Hubner et al., 1999). Der LOD-Score für den detektierten Peakmarker D1M7Mit236 bzw. D1Rat55 betrug 5,0. Diese Marker wurden auf der Genkarte Rat SHRSP_x_BN GeneticMAP RNO1 von Rat Genome Database (www.rgd.mcu.edu/maps/) bei 83,52 cM kartiert. Der in dieser Arbeit identifizierte Peak-Marker D1Rat47 ist auf derselben Genkarte bei 77,9 cM lokalisiert und liegt damit in unmittelbarer Nähe. Eine weitere genomweite Kopplungsanalyse bei einer F2-Generation aus SHRSP/Izm- und WKY/Izm-Ratten lieferte ebenfalls Ergebnisse, die mit den bisherigen Beobachtungen übereinstimmen. Der LOD-Plot für die 10 Wochen alten Tiere zeigte auf RNO1 einen Blutdruck-QTL mit einem LOD-Score von 5,6. Der Abstand des zugrunde liegende Markers D1Mit2 betrug ca. 10,14 cM zum Marker D1Rat47 (Mashimo et al., 1999). Bei SHRSP-Ratten aus der Kolonie in Glasgow wird bislang kein Blutdruck-QTL auf RNO1 beschrieben. Bei Betrachtung weiterer experimenteller Kreuzpaarungspopulationen, die nicht SHRSP-Ratten, sondern andere hypertensive Rattenstämme für die Identifizierung von SBD-QTL mittels einer Kosegregations- und Kopplungsanalyse verwendeten, wurden weitere Kollokationen mit denen in dieser Arbeit identifizierten SBD-QTL auf RNO1 gefunden. So zeigte eine Studie von Shiozawa et al. an Hand einer F2-Generation aus FHH x ACI in der 14. Woche, sowie eine Studie von Garrett et al. mit einem Backcross aus SS x SHR unter 4%iger Salzbelastung in der 8. und 16. Woche eine Kollokation der identifizierten SBD-QTL mit dem SBD-QTL im Bereich des Marker D1Rat47 in dieser Arbeit. Bei der F2-Population von Shiozawa konnte darüber hinaus noch eine Kollokation mit dem Nebenpeak des SBD-QTL auf RNO1 im Bereich des Markers D1Rat287 detektiert werden (Shiozawa et al., 2000; Garrett et al., 2003). Auch Clemitson et al. demonstrierte an Hand eines Crosses aus SHR x WKY eine regionale Übereinstimmung der SBD-QTL mit diesem Marker. Diese Befunde deuten darauf hin, dass das Chromosom 1 der Ratte unabhängig vom jeweiligen Stamm mehrere Regionen enthält, in denen mit hoher Wahrscheinlichkeit Kandidatengene liegen, die

den arteriellen Blutdruck regulieren und dabei eine Salzsensitivität aufweisen (Clemitson et al., 2007).

Die Vermutung, dass auf RNO2 Allele mit dem Blutdruck kosegregieren, wurde bereits mehrfach bestätigt. Bei Kreuzpaarungspopulationen zwischen SHRSP- und WKY-Ratten aus der Glasgow Kolonie wurden Blutdruck-QTL gefunden, die Überlappungen mit den 2 Lod-Intervallen der in dieser Arbeit beschriebenen Blutdruck-QTL auf RNO2 zeigen (Clark et al., 1996; McBride et al., 2003). Darüber hinaus konnten diese detektierten QTL mittels teilkongener Stämme bestätigt werden. Hierbei wurden Genabschnitte vom normotensiven Donorstamm WKY in den isogenetischen SHRSP-Stamm gezüchtet. Die teilkongenen Stämme wiesen signifikant niedrigere Blutdruckwerte als die parentalen SHRSP-Ratten auf (Jeffs et al., 2000; Carr et al., 2002).

Kato et al. beschrieben für eine F₂-Generation aus SHRSP x WKY, die aus der japanischen Kolonie stammen, auf RNO4 einen Blutdruck-QTL mit dem Peak-Marker D4Rat34 der einen LOD-Score von 3,0 aufwies (Kato et al., 2003). Dieser QTL war nur bei männlichen Tieren der F₂-Generation zu detektieren und bekräftigt die Hypothese, dass auch das Geschlecht einen bedeutenden Einfluss auf die Expression eines Phänotyps haben kann. Diese Beobachtungen korrelieren gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der bei der F₂-Generation ausschließlich männliche Tiere untersucht wurden. Der LOD-Score für den Peak-Marker D4Rat58 auf RNO4 beträgt 3,4 und ist damit etwas höher (Abb.16). Das 2-Lod-Intervall dieses QTL umfasst den bei 43,1 cM kartierenden Marker D4Rat34 von Kato et al. und zeigt damit auch eine Übereinstimmung bei der Lokalisation. Ähnliche Ergebnisse publizierten auch Mashimo et al. für RNO4. Sie beschrieben einen SBD-QTL zwischen den flankierenden Markern D4Mit2 und D4Mit11 mit einem LOD-Score von 3,2 (Mashimo et al., 1999).

Der Blutdruck-QTL auf RNO10 erfüllt nicht die Kriterien für eine wahrscheinliche Kopplung. In der Literatur jedoch beschreiben mehrere Studien basierend auf Kosegregationsstudien zwischen SHRSP-Ratten aus der Heidelberger Kolonie und WKY-Ratten als Referenzstamm einen Blutdruck-QTL mit gleicher Lokalisation. Auch die Züchtung von teilkongenen Stämmen aus WKY-Ratten, die für einen erhöhten Blutdruck verantwortliche Genomabschnitte von SHRSP-Ratten enthalten, bestätigte diese Kolokalisation (Hilbert et al., 1991; Jacob et al., 1991; Monti et al., 2003). Aus

diesem Grund ist anzunehmen, dass es sich hierbei nicht um einen Artefakt, sondern um einen tatsächlichen QTL handelt.

Aus genealogischer Sicht stammen die einzelnen SHRSP-Kolonien alle von den durch Okamoto et al. 1963 ursprünglich gezüchteten SHRSP-Ratten ab, so dass gewisse Übereinstimmungen bei den identifizierten Blutdruck-QTL wahrscheinlich sind. Mögliche Unterschiede zwischen den Stämmen und den jeweils identifizierten SBD-QTL können mehrere Ursachen haben. Diese Varianz kann beispielsweise auf das Vorliegen einer Gendrift innerhalb eines Unterstammes bzw. einer Kolonie, das Verwenden anderer kontrastierender Stämme, die Verwendung von Ratten mit unterschiedlichem Geschlecht im Sinne eines sexuellen Dimorphismus, unterschiedliche Altersgruppen bei den untersuchten Tieren, abweichende Messmethoden des Blutdrucks oder geringfügig variierende Ernährungs- und Haltungsbedingungen zurückzuführen sein. Für die Verifizierung eines QTL ist die Etablierung konsomer und kongener Stämme eine besonders geeignete Methode. Auf diese Weise kann überprüft werden, ob die Genabschnitte eines SBD-QTLs auch in einem anderen genetischen Hintergrund zu der Ausprägung eines hypertonen Phänotyps führen.

Der direkte Vergleich des U_{Aib} -QTL auf RNO1 mit bisher bekannten Studien ist nicht möglich, da bis zu diesem Zeitpunkt kein U_{Aib} -QTL bei einer Kopplungsanalyse basierend auf einer F2-Generation aus SHRSP- und Lewis-Ratten publiziert wurde. Es gibt jedoch mehrere Veröffentlichungen bei anderen Inzuchtstämmen, die das Vorhandensein von U_{Aib} -QTL auf RNO1 bestätigen. Hierbei handelt es sich unter anderem um eine Studie zwischen MWF_{Rkb} - und Lew_{Rkb} -Ratten bzw. um ein Versuchdesign mit MWF_{Rkb} - und SHR_{Rkb} -Ratten. Diese Studien beschreiben jeweils zwei verschiedene U_{Aib} -QTL auf RNO1 mit LOD-Scores von 3,8 und 3,5. Die Lokalisation mit dem in dieser Arbeit detektierten U_{Aib} -QTL auf RNO1 zeigt keine Kolo-kalisation. Interessanterweise kann stattdessen festgestellt werden, dass eine Kolo-kalisation zwischen dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Blutdruck-QTL (LOD-Score 8,44) und dem U_{Aib} -QTL (LOD-Score 3,8) auf RNO1 besteht (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die gleichen Gene, die bei dem Cross aus $MWF_{Rkb} \times Lewis_{Rkb}$ zu einer renalen Dysfunktion führen, bei den SHRSP-Ratten über renale Mechanismen einen ausgeprägten Hypertonus verursachen.

Garret et al. identifizierten bei einer Rückkreuzung aus SS/JrMco- und SHR/NHSD-Ratten einen Albuminurie-QTL auf RNO1 mit einem LOD-Score von 4,0 (Garrett et al., 2003). Dieser QTL kartierte im Bereich von 75,64 cM bis 143,55 cM und umfasste damit den in dieser Arbeit beschriebenen QTL für Albuminurie, der zwischen ca. 86 cM und 106 cM liegt. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass in diesem Abschnitt eventuell ein oder mehrere Gene liegen, die in den Studien zu dem Phänotyp der pathologischen Albuminurie prädisponieren und somit als mögliche Kandidatengene betrachtet werden könnten.

4.4 Identifizierung von Kandidatengen

Der Peakmarker gibt die wahrscheinlichste Lokalisation eines QTL im Genom an, der das für die Ausprägung eines Phänotyps verantwortliche bzw. die verantwortlichen Gene beinhaltet. Es handelt sich hierbei um einen Genomabschnitt, der durch die 1- und 2-LOD-Intervalle definiert wird. In dieser Arbeit wurden 6 QTL detektiert, von denen der signifikanteste Blutdruck-QTL auf RNO1 eine Länge von ca. 20 cM (1-LOD-Intervall) bzw. 54 cM (2-LOD-Intervall) hat. Bei Verwendung des 1-LOD-Intervalls und einer durchschnittlichen Anzahl von ca. 20 Genen pro 0,5 cM (Rapp, 2000), beträgt die geschätzte Anzahl an Kandidatengen mehr als 800. Diese große Anzahl an potentiellen Genen ist für die Durchführung einer effizienten Kandidatengenanalyse ungeeignet. Aus diesem Grund ist es nötig, den Bereich weiter einzuengen, wobei die Züchtung von kongenen bzw. konsomen Tieren eine etablierte Methode darstellt (Rapp, 2000). Dieses Verfahren könnte den QTL effektiv auf 1-2 Millionen Basenpaare, die ca. 10-20 Gene enthalten, einschränken. Bei dieser geringen Anzahl von Genen ist es möglich mittels Genexpressionsanalysen und Sequenzierungen potentielle Kandidatengene zu identifizieren und in ihrer Funktion zu analysieren. Clemitson et al. haben beispielsweise einen Blutdruck-QTL auf RNO1 identifiziert, welcher mit dem in dieser Arbeit beschriebenen QTL kolokalisiert ist. Durch Züchtung des kongenen Stamms SHR.WKY-D1Got158/D1Got161 konnten sie diesen QTL auf eine Größe von ca. 3 Mb einschränken. Die im Anschluss daran durchgeführten Sequenzierungen und Genexpressionsanalysen detektierten das potentielle Kandidatengen Spon1, das besonders in den Nieren exprimiert wird. Die RT-PCR zeigte für die Tiere mit SHR-Allel im Vergleich zu Tieren mit dem WKY-Allel einen relativ erhöhten Expressionslevel für

Spon1 (Clemitson et al., 2007). Dieses Gen kodiert für das Protein F-Spondin, das in verschiedenen Studien eine hemmende Wirkung auf die Angiogenese zeigte (de Fraipont et al., 2001; Terai et al., 2001). Diese Beobachtung und die Erkenntnis, dass SHR-Ratten im Vergleich zu WKY-Ratten ein vermindertes angiogenetisches Potential besitzen, unterstützt die Hypothese, dass der Hypertonus bei SHR-Tieren möglicherweise auf ein Ungleichgewicht des Gefäßwachstums während einer frühen Entwicklungsphase zurückzuführen ist (le Noble et al., 1998). Die Frage nach weiteren Faktoren, die Einfluss auf die Expression von Spon1 nehmen, ist weiterhin zu klären. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist interessant, ob Spon1 auch bei SHRSP-Ratten, welche aus genealogischer Sicht mit den SHR-Ratten eng verwandt sind, ein mögliches Kandidatengen mit Einfluss auf die Hypertonie darstellt. Ob eine erhöhte Expression von Spon1 in der Entwicklungsphase von SHRSP-Tieren zu einer verminderten angiogenetischen Kapazität der renalen Gefäße und damit zur Einschränkung der Nierenfunktion führt, bleibt noch zu klären. Weitere Untersuchungen bei den SHRSP-Ratten, insbesondere Genexpressionsstudien, sind daher unerlässlich, um die Pathophysiologie der Hypertonie besser zu verstehen.

Ein Nutzen für die Verwendung von Tiermodellen in der molekulargenetischen Forschung liegt in der Möglichkeit Erkenntnisse von Tiermodellen auf den Menschen zu übertragen. Auf Grund der Syntänie können blutdruckregulierende Gene der Ratte Genen im humanen Genom zugeordnet werden (Stoll et al., 2000).

Die so identifizierten Kandidatengene beim Menschen dienen als Basis für weitere humangenetische Studien wie beispielsweise Geschwisterpaaranalysen oder Assoziationsstudien bei Patienten mit und ohne Hypertonie. Ein Ziel der Erforschung von blutdruckregulierenden Genen und ihrer Funktion ist mit genetischen Untersuchungen, im Sinne einer primären Prävention, diejenigen Patienten zu identifizieren, welche ein besonders hohes Risikopotential für die Entwicklung eines Hypertonus besitzen. Im Rahmen pharmakogenomischer und pharmakogenetischer Studien können individuelle Pharmakotherapien entwickelt werden. Diese Forschung sollte es in Zukunft ermöglichen die Zahl der Hypertoniker und damit auch das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bzw. Endorganschäden zu verringern.

5 Zusammenfassung

Die essentielle Hypertonie ist eine komplexe Erkrankung, die sowohl durch genetische als auch umweltbedingte Faktoren beeinflusst wird. Besonders die übermäßige Salzaufnahme kann bei salzsensitiven Patienten zu einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks führen und dadurch die Progression der hypertoniebedingten Endorganschäden beschleunigen. Folge ist ein erhöhtes Risiko der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität.

Das gehäufte Vorkommen der salzsensitiven Hypertonie innerhalb bestimmter Bevölkerungsgruppen oder ausgewählter Patientenkollektiven spricht für das Vorhandensein von Genen, die für Suszeptibilität der salzsensitiven Hypertonie prädisponieren.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe einer Kreuzpaarungspopulationsanalyse zwischen ingezüchteten SHRSP- und Lewis-Ratten, verschiedene Genloci zu identifizieren, die sowohl zu spontaner salzsensitiver Hypertonie als auch zu hypertoniebedingten bzw. unabhängigen Nierenschädigungen prädisponieren. Die renalen Endorganschäden sollten hierbei durch den biochemischen Parameter der Albuminurie erfasst werden.

Die Ergebnisse der Kopplungsanalyse belegen, dass der salzsensitive Hypertonus bei dem SHRSP-Rattenstamm nicht durch den Effekt eines einzelnen Gens, sondern durch geringe Effekte mehrerer Gene auf verschiedenen Chromsomen polygenetisch determiniert ist. Insgesamt konnten 4 QTL auf 4 verschiedenen Chromsomen detektiert werden, die ca. 46% der gesamten Blutdruckvarianz erklären. Hinsichtlich der Frage, ob hypertonieabhängige oder hypertonieunabhängige renale Schädigungen vorliegen, findet sich bei der F2-Generation eine signifikante Kopplung zwischen dem systolischen Blutdruck und der Albuminurie ($p=0,01$). In Ergänzung dazu zeigt die Kopplungsanalyse, dass eine Konkordanz zwischen den Genloci auf Chromosom 1 besteht, die zu einem salzsensitiven Hypertonus und zu einer Albuminurie prädisponieren. Diese Befunde belegen, dass bei den SHRSP-Ratten die salzsensitive Hypertonie entscheidend für die Manifestation der Nierenschädigung verantwortlich ist.

Die in dieser Arbeit detektierten QTL bieten die Basis für weitergehende Studien mit dem Ziel, blutdruckregulierende Kandidatengene zu identifizieren. Dieses wird zu neuen Einblicken in die der essentiellen Hypertonie zugrunde liegenden Pathomechanismen führen. Die frühzeitige Identifizierung von Patienten, die für die essentielle Hypertonie prädisponierende genetische Faktoren besitzen, sowie eine rechtzeitige, individuelle

pharmakologische Behandlung werden es ermöglichen das Auftreten hypertonieassoziierter Endorganschäden zu minimieren.

6 Abkürzungen

$(CA)_n$	Repetitives Cytosin-Adenin-Dinukleotid
$[\gamma - ^{32}P] \text{ dATP}$	Radioaktives Adenosintriphosphat
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μ	mikro
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Adiuretin
ANOVA	Statistische Varianzanalyse
ANP	atriale natriuretische Peptid
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
cM	centiMorgan (Einheit für genetische Distanzen)
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
et. al	et alia
etc.	et cetera
F1- / F2-Generation	erste- / zweite Folgegeneration
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
g	Gramm
h	Stunde
HZV	Herzzeitvolumen
kb	Kilobasen
l	Liter
Lewis	Lewis-Ratten
LOD	Logarithm of the odds
Log	Logarithm
m	milli
M	Mol; molar
min	Minute
Na^+	Positiv geladenes Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
QTL	Quantitative Trait Loci
RNOX	Chromosom X Rattus norvegicus
RT	Raumtemperatur
SBD	Systolischer Blutdruck
SHR	spontan hypertensive Ratte
SHRSP	Schlaganfall-prädisponierte spontan hypertensive Ratte
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
U_{Alb}	Albuminurie
Upm	Umdrehungen pro Minute
WKY	Wistar-Kyoto Ratten

7 Literatur

- Anavekar, N. S. and Pfeffer, M. A.** (2004). "Cardiovascular risk in chronic kidney disease." *Kidney Int Suppl*(92): S11-5.
- Carr, F. J., Negrin, C. D., Clark, J. S., et al.** (2002). "Chromosome 2 reciprocal congenic strains to evaluate the effect of the genetic background on blood pressure." *Scott Med J* 47(1): 7-9.
- Clark, J. S., Jeffs, B., Davidson, A. O., et al.** (1996). "Quantitative trait loci in genetically hypertensive rats. Possible sex specificity." *Hypertension* 28(5): 898-906.
- Clemitsen, J. R., Dixon, R. J., Haines, S., et al.** (2007). "Genetic dissection of a blood pressure quantitative trait locus on rat chromosome 1 and gene expression analysis identifies SPON1 as a novel candidate hypertension gene." *Circ Res* 100(7): 992-9.
- Cowley, A. W., Jr.** (1992). "Long-term control of arterial blood pressure." *Physiol Rev* 72(1): 231-300.
- Cowley, A. W., Jr.** (2006). "The genetic dissection of essential hypertension." *Nat Rev Genet* 7(11): 829-40.
- de Fraipont, F., Nicholson, A. C., Feige, J. J., et al.** (2001). "Thrombospondins and tumor angiogenesis." *Trends Mol Med* 7(9): 401-7.
- Denton, D., Weisinger, R., Mundy, N. I., et al.** (1995). "The effect of increased salt intake on blood pressure of chimpanzees." *Nat Med* 1(10): 1009-16.
- Fogarty, D. G., Hanna, L. S., Wantman, M., et al.** (2000). "Segregation analysis of urinary albumin excretion in families with type 2 diabetes." *Diabetes* 49(6): 1057-63.
- Fogarty, D. G., Rich, S. S., Hanna, L., et al.** (2000). "Urinary albumin excretion in families with type 2 diabetes is heritable and genetically correlated to blood pressure." *Kidney Int* 57(1): 250-7.
- Forte, J. G., Miguel, J. M., Miguel, M. J., et al.** (1989). "Salt and blood pressure: a community trial." *J Hum Hypertens* 3(3): 179-84.
- Ganten, D., Schmidt, S. and Paul, M.** (1994). "Genetics of primary hypertension." *J Cardiovasc Pharmacol* 24 Suppl 3: S45-50.
- Garrett, M. R., Dene, H. and Rapp, J. P.** (2003). "Time-course genetic analysis of albuminuria in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet." *J Am Soc Nephrol* 14(5): 1175-87.

- Geller, D. S., Farhi, A., Pinkerton, N., et al.** (2000). "Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy." *Science* 289(5476): 119-23.
- Go, A. S., Chertow, G. M., Fan, D., et al.** (2004). "Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization." *N Engl J Med* 351(13): 1296-305.
- Gong, M. and Hubner, N.** (2006). "Molecular genetics of human hypertension." *Clin Sci (Lond)* 110(3): 315-26.
- Griffin, K. A., Churchill, P. C., Picken, M., et al.** (2001). "Differential salt-sensitivity in the pathogenesis of renal damage in SHR and stroke prone SHR." *Am J Hypertens* 14(4 Pt 1): 311-20.
- Group, I. C. R.** (1988). "Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group." *Bmj* 297(6644): 319-28.
- Guyton, A. C.** (1991). "Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids." *Science* 252(5014): 1813-6.
- Guyton, A. C., Coleman, T. G. and Granger, H. J.** (1972). "Circulation: overall regulation." *Annu Rev Physiol* 34: 13-46.
- He, F. J. and MacGregor, G. A.** (2002). "Effect of modest salt reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized trials. Implications for public health." *J Hum Hypertens* 16(11): 761-70.
- Hilbert, P., Lindpaintner, K., Beckmann, J. S., et al.** (1991). "Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats." *Nature* 353(6344): 521-9.
- Hubner, N., Lee, Y. A., Lindpaintner, K., et al.** (1999). "Congenic substitution mapping excludes Sa as a candidate gene locus for a blood pressure quantitative trait locus on rat chromosome 1." *Hypertension* 34(4 Pt 1): 643-8.
- Ibsen, H., Olsen, M. H., Wachtell, K., et al.** (2005). "Reduction in albuminuria translates to reduction in cardiovascular events in hypertensive patients: losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study." *Hypertension* 45(2): 198-202.
- Jacob, H. J., Lindpaintner, K., Lincoln, S. E., et al.** (1991). "Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat." *Cell* 67(1): 213-24.
- Jeffs, B., Negrin, C. D., Graham, D., et al.** (2000). "Applicability of a "speed" congenic strategy to dissect blood pressure quantitative trait loci on rat chromosome 2." *Hypertension* 35(1 Pt 2): 179-87.

- Kasper, D. L. and Harrison, T. R.** (2005). Harrison's principles of internal medicine 16th Edition. Part 8 - Section 4 - 230. Hypertensive Vascular Disease New York, McGraw-Hill, Medical Pub. Division.
- Kato, N., Mashimo, T., Nabika, T., et al.** (2003). "Genome-wide searches for blood pressure quantitative trait loci in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat of a Japanese colony." *J Hypertens* 21(2): 295-303.
- Kawasaki, T., Delea, C. S., Bartter, F. C., et al.** (1978). "The effect of high-sodium and low-sodium intakes on blood pressure and other related variables in human subjects with idiopathic hypertension." *Am J Med* 64(2): 193-8.
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., et al.** (2005). "Global burden of hypertension: analysis of worldwide data." *Lancet* 365(9455): 217-23.
- Kreutz, R. and Hubner, N.** (2002). "Congenic rat strains are important tools for the genetic dissection of essential hypertension." *Semin Nephrol* 22(2): 135-47.
- Kreutz, R., Kovacevic, L., Schulz, A., et al.** (2000). "Effect of high NaCl diet on spontaneous hypertension in a genetic rat model with reduced nephron number." *J Hypertens* 18(6): 777-82.
- Kreutz, R., Struk, B., Rubattu, S., et al.** (1997). "Role of the alpha-, beta-, and gamma-subunits of epithelial sodium channel in a model of polygenic hypertension." *Hypertension* 29(1 Pt 1): 131-6.
- Lalouel, J. M.** (2003). "Large-scale search for genes predisposing to essential hypertension." *Am J Hypertens*. 16(2): 163-6.
- Lander, E. and Kruglyak, L.** (1995). "Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results." *Nat Genet* 11(3): 241-7.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., et al.** (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* 409(6822): 860-921.
- Lander, E. S. and Schork, N. J.** (1994). "Genetic dissection of complex traits." *Science* 265(5181): 2037-48.
- le Noble, F. A., Stassen, F. R., Hacking, W. J., et al.** (1998). "Angiogenesis and hypertension." *J Hypertens* 16(11): 1563-72.
- Lee, W. K., Padmanabhan, S. and Dominiczak, A. F.** (2000). "Genetics of hypertension: from experimental models to clinical applications." *J Hum Hypertens* 14(10-11): 631-47.
- Lifton, R. P.** (1996). "Molecular genetics of human blood pressure variation." *Science* 272(5262): 676-80.

- Lifton, R. P., Dluhy, R. G., Powers, M., et al.** (1992). "A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension." *Nature* 355(6357): 262-5.
- Lifton, R. P., Gharavi, A. G. and Geller, D. S.** (2001). "Molecular mechanisms of human hypertension." *Cell* 104(4): 545-56.
- Lindpaintner, K.** (1992). "Genetic linkage analysis in hypertension: principles and practice." *J Hypertens* 10(2): 121-4.
- Luft, F. C.** (2004). "Present status of genetic mechanisms in hypertension." *Med Clin North Am* 88(1): 1-18, vii.
- Mashimo, T., Nabika, T., Matsumoto, C., et al.** (1999). "Aging and salt-loading modulate blood pressure QTLs in rats." *Am J Hypertens* 12(11 Pt 1): 1098-104.
- Matavelli, L. C., Zhou, X. and Frohlich, E. D.** (2006). "Hypertensive renal vascular disease and cardiovascular endpoints." *Curr Opin Cardiol* 21(4): 305-9.
- McBride, M. W., Carr, F. J., Graham, D., et al.** (2003). "Microarray analysis of rat chromosome 2 congenic strains." *Hypertension* 41(3 Pt 2): 847-53.
- Monti, J., Plehm, R., Schulz, H., et al.** (2003). "Interaction between blood pressure quantitative trait loci in rats in which trait variation at chromosome 1 is conditional upon a specific allele at chromosome 10." *Hum Mol Genet* 12(4): 435-9.
- Murayama, S., Yagy, S., Higo, K., et al.** (1998). "A genetic locus susceptible to the overt proteinuria in BUF/Mna rat." *Mamm Genome* 9(11): 886-8.
- Okamoto, K. and Aoki, K.** (1963). "Development of a strain of spontaneously hypertensive rats." *Jpn Circ J* 27: 282-93.
- Okamoto, K. Y., Y.; Nagaoka A.** (1974). "Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR)." *Circulation Research* 34/35 suppl. I: I143-I153.
- Poulter, N. R., Khaw, K. T., Hopwood, B. E., et al.** (1990). "The Kenyan Luo migration study: observations on the initiation of a rise in blood pressure." *Bmj* 300(6730): 967-72.
- Rapp, J. P.** (2000). "Genetic analysis of inherited hypertension in the rat." *Physiol Rev* 80(1): 135-72.
- Roskopf, D., Schurks, M., Rimmbach, C., et al.** (2007). "Genetics of arterial hypertension and hypotension." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374(5-6): 429-69.
- Sarnak, M. J., Levey, A. S., Schoolwerth, A. C., et al.** (2003). "Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High

- Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention." *Circulation* 108(17): 2154-69.
- Schulz, A., Litfin, A., Kossmehl, P., et al.** (2002). "Genetic dissection of increased urinary albumin excretion in the munich wistar fromter rat." *J Am Soc Nephrol* 13(11): 2706-14.
- Schulz, A., Standke, D., Kovacevic, L., et al.** (2003). "A major gene locus links early onset albuminuria with renal interstitial fibrosis in the MWF rat with polygenetic albuminuria." *J Am Soc Nephrol* 14(12): 3081-9.
- Shiozawa, M., Provoost, A. P., van Dokkum, R. P., et al.** (2000). "Evidence of gene-gene interactions in the genetic susceptibility to renal impairment after unilateral nephrectomy." *J Am Soc Nephrol* 11(11): 2068-78.
- Siegel, A. K., Kossmehl, P., Planert, M., et al.** (2004). "Genetic linkage of albuminuria and renal injury in Dahl salt-sensitive rats on a high-salt diet: comparison with spontaneously hypertensive rats." *Physiol Genomics* 18(2): 218-25.
- Staessen, J. A., Wang, J., Bianchi, G., et al.** (2003). "Essential hypertension." *Lancet* 361(9369): 1629-41.
- Statistisches Bundesamt, W.** (2007). *Todesursachen in Deutschland Fachserie 12 Reihe 4 - 2006.*
- Stoll, M., Kwitek-Black, A. E., Cowley, A. W., Jr., et al.** (2000). "New target regions for human hypertension via comparative genomics." *Genome Res* 10(4): 473-82.
- Terai, Y., Abe, M., Miyamoto, K., et al.** (2001). "Vascular smooth muscle cell growth-promoting factor/F-spondin inhibits angiogenesis via the blockade of integrin alphavbeta3 on vascular endothelial cells." *J Cell Physiol* 188(3): 394-402.
- Volpe, M., Cosentino, F. and Ruilope, L. M.** (2003). "Is it time to measure microalbuminuria in hypertension?" *J Hypertens* 21(7): 1213-20.
- Wachtell, K., Ibsen, H., Olsen, M. H., et al.** (2003). "Albuminuria and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study." *Ann Intern Med* 139(11): 901-6.
- Weinberger, M. H.** (1996). "Salt sensitivity of blood pressure in humans." *Hypertension* 27(3 Pt 2): 481-90.
- Weinberger, M. H., Miller, J. Z., Luft, F. C., et al.** (1986). "Definitions and characteristics of sodium sensitivity and blood pressure resistance." *Hypertension* 8(6 Pt 2): II127-34.
- WHO** (2002). "The World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life " Geneva: World Health Organization <http://www.who.int/whr/2002/en/>.

- Wolf-Maier, K., Cooper, R. S., Banegas, J. R., et al.** (2003). "Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States." *Jama* 289(18): 2363-9.
- Yamori, Y.** (1984). Development of the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. *Handbook of hypertension*. W. D. Jong. and ill. Experimental and genetic models of hypertension, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. vol. 4: pp. 224-239.
- Yamori, Y., Nara, Y., Mizushima, S., et al.** (1990). "International cooperative study on the relationship between dietary factors and blood pressure: a report from the Cardiovascular Diseases and Alimentary Comparison (CARDIAC) Study." *J Cardiovasc Pharmacol* 16 Suppl 8: S43-7.

8 Anhang

8.1 Primer

Tabelle 5: Polymorphe Marker für die Genom-Analyse bei der F2-Population SHRSP x Lew.

Primer	Sequenz sense Primer (5')	Sequenz antisense Primer (3')	Annealing-Temperatur
D1Rat2	TTTGTCCGCACTATAGCAGC	AATTAGGAGCAGGGCTGTCA	55°C
D1Rat150	ATCCAGTGTCAACCTTTGGC	AGAGGCAATGAAGTCCCTGA	55°C
D1Rat190	GAACAGGAGCAGGGAGATTG	AAGCCACAGGCAGAGTATGC	55°C
D1Rat196	AACATACTGAGTCAATTTCTCTTGG	TGCTTTTCAGATTCTCCTCCC	55°C
D1Rat24	GGTCTACCCTGTGCTGCACT	GCATGCAAGCACGTGAGTAT	55°C
D1Rat28	TGTCAGGACACATTCTGCT	ATGCACTCTATGATTGGCCC	55°C
D1Rat30	AATTTCTGTCCACATTTCCC	TTCCAGGGACAAGCTACCTG	55°C
D1Rat35	TGCAAGAGTAAGATGGCAATGA	CATAAGTGCCACTTAGAGCATGA	55°C
D1Rat43	TCCAGTGAGTAAGCTGTGAGCT	CATCATGGAAGTGAAGCTCC	55°C
D1Rat47	GCCTTGGGAGAAACACATA	AGGAGTTTGGGAGACACCCT	55°C
D1Rat61	GTGCACATGTGTGTGTCCAA	AGGTCCCATCAGGTTGACAA	55°C
D1Rat287	GGCGTGACCAGGTTACTTA	GTGCTATGGTGGGCAAGTTT	55°C
D1Rat70	GACTGATCTCTGCCCTCCAC	GGAAGCCCCAGTATCCTCTC	55°C
D1Rat72	AAGCTCATTTTTGTCTATCAGG	TGCTTTTCTTTCTCTTGTGC	55°C
D1Rat145	GTATCCCATTTCCCATGTG	TGTGTGAGCAGTGTGTGTGTG	55°C
D1Rat81	TGAAGACTGAATCCCCAAC	TGGTTCCAATGGATACCCATA	55°C
D1Rat225	ACCTCCAGTACCACCAACC	ACCCGTGTTTATGGCACTGT	55°C
D2Rat189	GAGGGGAAGGAAGGATTTTG	TGTGCAACTTTTTGTTTGTG	55°C
D2Rat154	AGTGCTCCTGCAAAGCAGAC	TATGTGCTTGTATGCGTGCC	55°C
D2Rat15	TTATTCTGAATAGCTGCCAGG	GGCAGACAAACATCATCAATTC	55°C
D2Rat19	TTTATATTCTCTCCCCGCC	CTGAGGATGTAGCTCAGCGA	55°C
D2Rat145	GTTCCAGCCAGGCTTTCAGAC	AGGGTGGAGTGGGAGGATAG	55°C
D2Rat147	GCTGCAAAGACAGAAGGGTC	TGTTTTGAATGTCAGGGTCA	55°C
D2Rat164	TCTCCCCCTCCTTCTAACTCA	ATGGGGTGGCTCACTTGTA	55°C
D2Rat170	CAATGCATTGATGCATCTTG	CAAAGGCCTTATTCCATTACG	55°C
D2Mit14	ATGAGAGGTCAAAGCTTCTCA	AGACCTGGGACAGGGTCTCT	TD63-58°C
D2Rat186	TTTGGTGATAGGTGCACGAG	ACTGTGGGCATCCACTTTTC	55°C
D2Rat56	CTTCTGGTCTCCTCAGGCAC	TTTTTCTCCTCTTCTTCTGGG	55°C
D2Rat62	CAAGGCCCTTAGCTTCCTG	CCCCCTGTCCTTTATCTTGC	55°C
D2Rat66	AACATGCCCATGAAAGTCTTG	ATTGCACATACACACGTGCC	55°C
D2Rat250	GTCCCTCTCCTGTCCCTCTC	GAAGTCTGAACGCTCATGCA	55°C
D3Mgh8	GCTGAACGGATGCTGAGAG	GGGATTCCTAAGACAGTTGCC	TD55-50°C
D3Rat47	CACATACGCACACACAGAA	ACAAGTAGCACAGTGTGCC	55°C
D3Rat45	CCAGCCATAATACCAAGACAC	AGCTCCTACTGGATGGTCGA	55°C
D3Rat43	TCGACAGAAACAGGCATCTG	AGCGTGGGATAAAATGATTAGA	55°C
D3Rat173	TGACAAGCCTGACAACCTGA	AATCCAGGCCTTGCACTTAA	55°C
D3Rat160	GGGGAAGCAGTTAAATTTAACCAT	CCTGCCTGGCTTTTAATTGA	55°C

D3Rat63	ACCAGGGGAGAAAAGCATCT	TGATACCCAAGGCTTCAATTG	55°C
D3Rat107	TCTGGAGCATCCAAACCAG	CAGATCCACACCGTGCAG	55°C
D3Rat97	AAATTCAAAGCTTCCCCAG	CCTCTCCTAGTACGCTTGCG	55°C
D3Rat2	CCAGGAGCTTCACTTAGGGTT	TGTCCTGACAGATGATCTAAAGC	55°C
D4Rat136	CAGGCCTCAGAAACACACAA	CAGCACCAGTAGAAATGGATGA	55°C
D4Rat5	TTACGAGTGCTTTGCTGCAT	CAAAGCCAAGTTGAAGCTCC	55°C
D4Rat126	CATTCCTGTGCCACTCAAGA	GCAGGTAAGAAAAGCAAGGC	55°C
D4Rat154	TCAACAAGTAAATTTCTCTCAAGGC	TGCGTATCCAAGTAGACTGG	55°C
D4Rat226	CATCCCAGGTTGGTTTCTTG	GACCTCCACATGCCTGTGT	55°C
D4Rat165	GATTGGTGGCAAGGAGACAT	GCAGCAGTCATTATCGCTCA	55°C
D4Rat231	CGAATATTCCAAGAGGGTGC	ACCTCAGTCCGACCTTCTT	55°C
D4Rat41	CCTTTCTGTCTTTGCCCTA	GGCTTCTCCATGTGTGCTTA	55°C
D4Rat58	AGCAGCAACGGAGACAATCT	ACAGCGGCAAACAACAGTTT	55°C
D4Rat195	TGATTTGAACCCCTTTCTC	CTTAGGTGGTGGAGAGTGA	55°C
D4Rat137	ACGAGTGTTTCCACCGCTAC	CCAGCCAAGGTTCCATATTG	55°C
D4Rat67	AACCACCAGTTTCACATGCA	GTCTGAGCCATCTCCTCAGC	55°C
D4Rat68	TTCCCAAGTGCTGGAGTTGT	CAGGACTTGGTGCATGCTAA	55°C
D4Rat204	GCACTGAAGTCAGCTTTCCC	CACAAAATTGGTGTGCCTTG	55°C
D5Rat187	GGGCTTATCCCTAGTTTCCC	AAGCATGTGCATATGCCCA	55°C
D5Mgh17	TTCAAGCTGTTGTCATGTTTCC	AGCAATAAACATAAAACAAGGCTC	TD60-55°C
D5Rat189	CATGGGCTCAAGAAATCAA	CCAAAATCCTCAGAGAAGGC	55°C
D5Rat82	AACATCACACAGAATGAGCCA	TGGGTCATTGGGAACTTTT	55°C
D5Mit10	GAAAGAGGAGACCTATGTGCA	AACAGGTCAGTTGTCAACTGG	TD63-58°C
D5Rat77	TCTGTGGCCATTCTAATGGA	CTAGAGGCAAGAGCAGGGGT	55°C
D5Rat68	TGGGCTTGATTCAAGATGGT	TTGAGGGAATCATACTTTTGTG	55°C
D5Rat153	AGCCCCTAGAAACCTGGAGA	AGGGAACTTGTGGTGGGT	55°C
D5Rat28	CCATATCAAACCTCACTCCCT	CCACCTTTCCTAGGAAGTGAT	55°C
D5Rat86	AGAGCTGCAGCATAAGGAGG	GAAGCAGGGATTGGAAAGGT	55°C
D5Rat171	ACCAGCATCCGGCTTTTATA	ACCCATCATTGGATGTTGCT	55°C
D5Rat44	CTCCAGGCTGACCTGAAAA	GCTTTGCAGCCATCTTCTC	55°C
D5Rat246	GTGAGGCTTTGTGCCTTCTC	GCTGGAAAGTGGCAATTCAT	55°C
D6Rat46	TGGATGCTTCATAAACTGGTCA	CCCCTCATACTGGAAATAGACC	55°C
D6Rat69	GGCGCATACCAGGATTAGTC	AGGTGTCATAGGTGCCAAGG	55°C
D6Rat80	GCACCTGCATTCTATGGTT	TGTTGGCTTGGAACTTTTCA	55°C
D6Mit9	AGAGTCAGCGAAAGGCTGG	TTAATTACAATAGGGAAACATTTGT	TD58-53°C
D6Rat136	TATTTAGCATGCAGGGACCC	TTCCATAGGGCTAACTAGGG	55°C
D6Rat24	CAGCAGGAGTCATACTACCC	GTCCTTCTTCTCTCCACCC	55°C
D6Rat59	TTTTCTTCTCTGTGCCCC	GGAACACTAGGTAGCCAGCC	55°C
D6Rat121	CACATGTCTGTGCAACCCTC	GAGGATGTCCTTTGCTTTGC	55°C
D6Rat115	CTCCAGATCCAAGCACAGAA	TTTCCCTTAGGAACCAGCTG	55°C
D6Rat6	CATGGTCACCACCAACTCAG	AAGGTTTGTGCTTGAGAACCA	55°C
D6Mgh1	TTGTTGATGTCTATGGATACCCC	ACAAAACCAGCAAATAAATGAGC	TD55-50°C
D7Rat36	GTAGGAGCTGAGGGTCCACA	TTTCAAACGAGGTTGGAGG	55°C
D7Rat154	GTTCTTAACCAAACCGCAGG	GGGGTAATTTGTTTGAGGCA	55°C

D7Rat152	ATCCATGCTCTTTCCACCAG	ACCAAATGAGCACTTTTCCC	55°C
D7Rat107	CCCATCCCATTTTCCTCATA	TGTCTAGGCTTGCTGAATGAAA	55°C
D7Rat145	CCATAGACAAATGCTACTCTCAGC	ATGTCTTCCAGATTCACCCGC	55°C
D7Rat142	AAAAC TAACACCTACAAGTTGCTCT	ATTTAATGCATGTGTGTGCATG	55°C
D7Rat138	AGTTTCAACTTCTCTTTTTGGATG	TCTGTCTACCAAGCCTGATGC	55°C
D7Rat122	GACTGACTGAAAAATGTACCCTG	GGGTGCCTTATGCATAAGTGTT	55°C
D7Rat119	TCCAAAAGTTGTGTTTTGATGC	CATACTGGATGAACGCAAGG	55°C
D7Rat116	ATGCACATGGTATCCATCCA	CGCTATGTGGCAGTTATGCA	55°C
D8Rat77	TGCAGATTATTGAGGTAGCATTG	ACCTGTGCCTAATCACACCT	55°C
D8Rat70	TTGTGGGTTTCAGTGGTGAA	TGCATAATATTTCAAAGCAGATTT	55°C
D8Rat162	TCACTGGCAGCAATTTACCA	TCTGAGACCTCTTCAACTCTGTTG	55°C
D8Rat46	TCCGTCTGCTGATTGAACTG	AGAGCAGCCAAAGCTTTCAA	55°C
D8Rat113	GGCAGGACTGGAGCACATAT	CACCTTGAGTTCGAAATTAATCTTG	55°C
D8Rat16	TTTTAAATTGCTGTTTGATTGGTT	TCTGCACTTTAACAAGGTGTGA	55°C
D8Rat13	AGTGAGAAACCTTGCCTCCA	TGGAGACCAGAAGTTGACATC	55°C
D8Rat81	AAAGGTGGTAGGGCAGGATC	TGTCCTCGTCTGTCAAATGG	55°C
D8Rat171	CAGCAGGCAGTCTCTCTGTG	TTCTTGCCCCTGATTATTGC	55°C
D9Rat43	TTACAAGACCAGAAAAGTAGCCA	TGAGTGTGCTGTCATTGCAA	55°C
D9Rat34	CGAAGGTGATTTGTGGATCA	TGGTTTGGTGGCAGATATGA	55°C
D9Rat29	AACATCACATTAACCCATGGC	TTTTTGTACTAGGGTGGGGG	55°C
D9Rat26	AACCTGCAGACAAGCACCTC	ACTCGTGACCAAAGTCCCAG	55°C
D9Rat61	TTTTGAGCAAAATAGAACAATGTG	AGGCAAATGGGAAAGACAGA	55°C
D9Rat11	CATTCCCAATTTTTGGTTAAGG	TAAAACTGGGATGCATGGGT	55°C
D9Rat5	TGCATTTCTTGTCTGTCTCCA	CCTCTACACATGTGCCATGG	55°C
D9Rat83	TGTCAGTCAGAGAAGCTGCAA	TGATGCCTACTTGTGTGTGGA	55°C
D9Rat3	AGAAATTGCAGGCACAGTCC	GGCTTCGGATTCTCATTGAA	55°C
D9Rat2	GACATACACCTTCTCACGCG	AACCCATTTAAAAGTAGGATTCAA	55°C
D10Rat103	ATGCGCCACACTAGACACAG	GACAGGTGGGCTAGAAGAACA	55°C
D10Rat96	GACACCTGACATGTTCCCCT	CCTTTGGAGACCAGGGTCTT	55°C
D10Rat64	TCTAACACCTAAGAAACATGTCCA	TCAAAGGGAAAAAAAAAGGAGA	55°C
D10Rat180	TATAGACCTTCCACGGGTGC	CCAGATCTTCTAAATTGGCCA	55°C
D10Rat43	GCCACAATAATTCAGGTGGTG	CATTTGCACATTGGACCATC	55°C
D10Rat72	CTTCGAGCACCAGTGTTCAA	AACCTTGATGTCTGTGTGTAGACA	55°C
D10Rat36	CCGAGCTGCAGAAGTTACCT	TGCTCACACAGAGATGTGCA	55°C
D10Rat244	CCAATGCTGACAACCAAAG	TGAAGTAGTCTCTGCCTCAAGG	55°C
D10Rat28	ATGGGCTGATGCATAGCTGT	TGCACACACAAACATAGAGAGAGA	55°C
D10Rat124	AGAAAGCAGGAAATGGCTGA	AGCGTCTGGGATTGGATTTA	55°C
D10Rat204	CTACCACAATTGGCTGGCTT	CTTCACAAACGAGAGCCTGA	55°C
D10Rat10	AGTGGCCACAGCATATAGGG	CGAAGTAAAGCCCTGAAACG	55°C
D10Rat136	ATTTTCATGGACAAGCCAGG	TGATAGTGATGGAGGGAGGC	55°C
D10Rat2	TGAGAACAGTCAAGGGGACA	CCACTTAAGAGCCCAGCAA	55°C
D11Rat8	ATCCAAACCCATCACCATGT	ATACCTCCCCAATTCCTCC	55°C
D11Rat17	CCAGTTGCAGATGATTTCCA	GCATATGGGAGTTTTGCCTG	55°C
D11Rat6	TCTGGGGATTTGAAAGATGC	GTGCAGCCATACCATTCAA	55°C

D11Rat93	CCAAGAAAATGTAAGCCCCA	TGGTTACACTATTTTGCCACTTTT	55°C
D11Rat45	GTCCTTCCAGTGTGTCAGCA	CCCATAAACCAACCAACCATC	55°C
D11Rat50	GACCTGTCATGTTCCCTTGGC	CAGGAGACCTCCACAGGAAA	55°C
D12Rat59	TGGGGTCCTGGTCTTTGATA	CAGCAATTTTCAGACCTTTCC	55°C
D12Rat43	TCCCACAAGTTCTCTGTGCA	CTCACTATGGCCTGGACCTT	55°C
D12Rat72	GCTCCCTTGCAATACCTGAT	GCACATGCTGTGTATCTAGATGG	55°C
D12Rat93	CCGCCTTTGACCATTTATGA	GCCCAGCTATTGTGCTTCAT	55°C
D12Rat36	TGTAGAGAATCTAAAGCCCTCTTG	GAGGGACTTGGGAAGAGTGTT	55°C
D12Rat80	CTCCAAGTGTGCTGGTAAA	CTTTCATCTCCTCCGCACAC	55°C
D13Rat2	TGTTACTCAGTGGGAAGCCC	AAGACACAAGCACATGCACG	55°C
D13Rat71	CATAGTAACTGTGCGCACGC	CCGGGAGAGATGGGAAATAG	55°C
D13Rat91	TCTGCATTGATTATGTGCCA	TATGGAGCAGTTTGGGAACC	55°C
D13Rat62	GATAAACACACACGCCACCA	TCTCTCTCGTCTGTAGGCTCTTC	55°C
D13Rat132	CTGTCATACATGTGCATGCG	TACCTCCCCACACAGCTCTC	55°C
D13Rat86	CCATCCCCAACTGTCCATTA	TGGATTTGGTGGAAAGTAGGG	55°C
D14Rat1	CAGTCCCTGGGTTTTACAT	CTCCAAGACACAAAACGATCA	55°C
D14Rat78	AATCATTTCAGGCCAACCTG	ACATGCGAGCAAAACACTGT	55°C
D14Rat8	CCTGTAACCATGAAGCAGCA	TCCAAATTTTCTTTTCCTGTCTTT	55°C
D14Rat68	ACAGGATGCTGGGTTCAATC	CCTGCTAGCAAACCTATGGCC	55°C
D14Rat39	GGCTGATCCCCAAGTGTCTA	TGAATCAAAGGGGGCATTTC	55°C
D14Rat51	TACATTAGACCTGGGTGGGG	AAGCCCTTCTCAGCTCACTG	55°C
D14Rat22	TCACCTGTCCATCGTGTGGT	TCCTCCTGTGCCAAATCTCT	55°C
D15Rat69	AGCACAGTGGAAGGCTCAGT	TTGTGTTGCCTGCCTGTAAG	55°C
D15Rat3	TCCATAATGTAAAGAAGAAGGCAA	TGGAGAGGATCACTGTGTGC	55°C
D15Rat13	TCCAGTGTACCCTGTTTCAAAA	AAGAAGGTCATATCCCCTCTCA	55°C
D15Rat21	TGCCAAGAAGCTGGATATCAGG	TTGGTGGTCAAAGCTCTCCT	55°C
D15Rat40	TCATACACACTCACATGCGC	TCTTTCTTGGCAGGCAGATT	55°C
D15Rat102	TGTCTGGTCCTTTATCTGTAATGG	TTCAAATCAACCTCAAAAATCA	55°C
D15Rat29	AGAGGTGATGCCAAGTGCTT	TGACCTATTTGCATTTGGCA	55°C
D7Rat130	AAACCAATCTCTCTCTCTGTCTG	TGTTCTCTTCTGACTTCTGTGGG	55°C
D16Mit2	AACGAGGGGAAATAAGCACC	ATCCAAACCTGACATCTGGC	55°C
D16Mit4	CTTATCACTTCAATGATGTTTGCC	CACGAGTTCATTGTGCTGGT	55°C
D16Rat28	ATGTTAGGGAGCATGTGCAA	TGTTTTGTCTACCAAGGGC	55°C
D16Rat58	TGCTCTTTACCTGCCTTTCC	CCCTGCTGTTGTGTTAAACCT	55°C
D16Rat15	ATCGGTAAACAAATCGCTGG	TGGCATCTTTCGCTTAGACA	55°C
D16Rat37	TCCTTGGTAGAAAACCTGCC	ACAAAATCAGTGCTGGACCA	55°C
D17Rat1	GTGGTTAGGCTCAGCCAGAG	CTTTTACTGTTCTGGGGCCA	55°C
D17Rat8	GAAGCATTGCCAGACAACAC	TTCTCTGAGGGCTCTGGAAA	55°C
D17Rat12	GCCTTCATTAGAAAGTGAAAGTAAA	GGCAAAGGACAGAGGATGA	55°C
D17Rat87	CCTTTTCCACTTACTCTGATCTCA	GAGATGGTCTTCACTCAACAGG	55°C
D17Rat36	ATTGCCTTGCTACTCGGTGT	AGCCAATGTGGATGCATGTA	55°C
D17Rat47	CCCTGCTTTCTGCTTTGAAC	TGCATATACGAATTACAGCTCAA	55°C
D18Rat114	TTGAATCAAAACAGGGCAAA	CAAATGACAGATCCTACACATCA	55°C
D18Rat105	CTCTGCCCATCACTCCTACC	TGGTTTGTCTGGAAAGTCCCT	55°C

D18Rat41	TGTGAAGTCTGTCAGATTAACGTTT	TGGTACTTCGACCTCCCAGT	55°C
D18Rat17	ACTCCTTTGGTTCTTGGCAA	GCCAAGGCATTTTAAAATTAACC	55°C
D18Rat91	GGAACGAGTGAACACACGTG	ACGTTCTGACCTTTAGGGGG	55°C
D18Rat123	GGATGTTTTTCATTTTGCAGAA	TTCCCAAAGAACTTGGTTTCT	55°C
D18Rat44	CTGGCCACTACCTATTCCCA	CTGTTGAAATCAGACCCCAA	55°C
D19Rat34	CCAGAGCAGAGAAAAGCTCG	TGTCCAGTATGCTCAAGGCA	55°C
D19Rat17	CATGTCAGCCTTAAAAAGCAA	TCTCCGTTTCAAAGGAGCTC	55°C
D19Rat41	GTCTGCACATACATGCCTGC	TGCTGGTTCAGAAATCAACG	55°C
D19Rat70	TGTGTAGGTCAGAGGACAACCT	AAGCTGGACAACCTGCTTTG	55°C
D19Rat8	TGTTGTCTCCTCTGGAACACA	TGGAGACAAGCACAATCCAA	55°C
D20Rat32	CAGCCCTGGCTAGTTTGTGT	AAGAGGGAATTTGGGGTGAC	55°C
D20Rat3	CCTAATACTGTGAAGACAGCGTG	ATACCCAAAATGGTTGCCAG	55°C
D20Rat5	CCATGGACTTTCTCAGGAAAA	TCTCAGACCAACTCAGTGAGGA	55°C
D20Rat9	GGAGGCAGCAATGACATTTT	TACACACATTCGTACACGCG	55°C
D20Rat11	CAGGTTATCCTATATGTGCTCCTG	GGGATGCCTATGTTGTCTTTG	55°C
D20Rat19	CCAGGCTGTCAGCCTTAGTT	TGGTTTTCTTGAGCACAGCA	55°C
D20Rat29	GAGGCTCCAGGACTCAACAG	CCTTCCATAGACCTATAGCGGA	55°C
DXRat2	ACTGCACAAGGTGTCACAGG	CCAGCCTGAACCCTATCTCA	55°C
DXRat6	TGCTTTTCCAATCGCTTCTT	ACACACGCATACACAAGCAA	55°C
DXRat12	AAGCAGCCACCTAGCCATTA	CATGAAAACGTTTCAGTACAATAAA	55°C
DXRat18	TGCCATTTGAAGTTCTTCTTTTC	CCAACACAGTGGGTTAAGGG	55°C
DXRat66	CCCCCAGAGAGATAGACCAG	AGCGGTGGGGAACACTGT	55°C
DXRat20	GCAGAAACAGCTCTCTTAAGTAGAG	GGTTCTGCTGAGATAGCTTTCC	55°C

8.2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe der Klinischen Pharmakologie danken. Für die hervorragende Betreuung, die regelmäßigen Besprechungen und Anregungen bin ich sehr dankbar.

Ein besonderer Dank gebührt Frau Dr. Angela Schulz, für die intensive Einarbeitung in die zahlreichen Methoden, die konstruktiven Gespräche und die intensive Begleitung während der gesamten Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Sabine Wunderlich für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken. In der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin sei vor allem Frau Betina Bublath für Durchführung der Rattenzucht gedankt.

Herrn Dr. Markus Wehland von Trebra danke ich für die Hilfsbereitschaft beim Erlernen der tierexperimentellen Verfahren, sowie der Unterstützung bei statistischen Fragestellungen.

8.3 Lebenslauf

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

8.4 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Patrick Schulte, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Genomweite Analyse von Blutdruck- und Albuminurie-QTL in einer Kreuzpaarungspopulation zwischen salzsensitiven SHRSP und salzresistenten Lewis Ratten 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.“

Berlin, 25.08.2008

Patrick Schulte