

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
CharitéCentrum 4 für Therapieforschung
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Histomorphologische und molekulargenetische
Untersuchungen zur Pathogenese der
Nephropathie bei salzsensitiver spontaner
Hypertonie im Rattenmodell**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gregor Fahrenholz

aus Bremen

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Kreutz
 2. Priv.-Doz. Dr. med. J. Beige
 3. Priv.-Doz. Dr. med. L. Rothermund

Datum der Promotion: 19.11.2010

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Die primäre arterielle Hypertonie und deren Folgen	4
1.2	Tiermodelle zur Untersuchung der kardiovaskulären Erkrankungen	8
1.3	Identifizierung krankheitsrelevanter Gene bei der primären Hypertonie	10
1.4	Die Ratteninzuchtstämme Spontaneously Hypertensive Rat / Stroke-Prone und Fischer 344	11
1.5	Identifizierung der zur arteriellen Hypertonie und Nephropathie führenden genetischen Faktoren am Tiermodell der salzsensitiven SHRSP-Ratte	12
1.6	Ziel der Arbeit	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Chemikalien und Radionukleotide	16
2.1.2	Enzyme	17
2.1.3	Puffer, Lösungen und Medien	17
2.1.4	Sonstige Materialien und Futtermittel	17
2.1.5	Geräte	18
2.2	Methoden	20
2.2.1	Haltung	20
2.2.2	Zucht	20
2.2.1.1	Parentaltiere	20
2.2.2.2	F2-Population SHRSP x F344	21
2.2.3	Versuchsprotokoll	21
2.2.4	Phänotypisierung	22
2.2.4.1	Systolische Blutdruckmessung	22
2.2.4.2	Urin und biochemische Untersuchung	22
2.2.4.2.1	Uringewinnung für die Erhebung der klinischen Daten	22
2.2.4.2.2	Biochemische Analysen	23
2.2.4.3	Präparation	23
2.2.5	Histologie	24
2.2.5.1	Einbettung der Organe in Paraffin	24
2.2.5.2	Schneiden und Färben der Nieren	24

2.2.6 Morphologische Bildanalyse und semiquantitative Bewertung	26
2.2.6.1 Morphologische Bildanalyse der interstitiellen Fibrose der Niere	26
2.2.6.2 Semiquantitative Bewertung der Glomerulosklerose	28
2.2.7 Genom- und Kopplungsanalyse.....	28
2.2.7.1 DNA-Isolierung	28
2.2.7.2 Prinzip der Genomanalyse	29
2.2.7.3 Genotypen-Charakterisierung der F2-Population	30
2.2.7.4 Herstellung der DNA-Stockplatten.....	31
2.2.7.5 Primer-Kinasierung.....	31
2.2.7.6 Mikrosatellitenmarker	31
2.2.7.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.2.7.8 Polyacrylamidgel-Elektrophorese	32
2.2.7.9 Statistische Analyse	33
3 Ergebnisse.....	35
3.1 Genotypisierung der Parentaltierstämme SHRSP und F344	35
3.2 Phänotypisierung der Parentaltierstämme SHRSP und F344	35
3.2.1 Gruppeneinteilung der Parentaltierstämme SHRSP und F344.....	35
3.2.2 Systolischer Blutdruck.....	36
3.2.3 Endorganschäden.....	37
3.3 Kosegregationsanalyse.....	40
3.3.1 Phänotypen-Charakterisierung der F2-Tiere SHRSP x F344	40
3.3.2 Genotypen-Charakterisierung der F2-Tiere SHRSP x F344	50
3.3.3 QTL-Mapping und Kopplungsanalysen.....	50
4 Diskussion	60
5 Zusammenfassung	68
6 Abkürzungen.....	70
7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	73
7.1 Abbildungsverzeichnis	73

7.2 Tabellenverzeichnis	76
8 Literatur	77
9 Anhang.....	83
9.1 Danksagung.....	83
9.2 Lebenslauf	84
9.3 Erklärung	85

1 Einleitung

1.1 Die primäre arterielle Hypertonie und deren Folgen

In den Industrieländern sind kardiovaskuläre Erkrankungen die wichtigste Ursache für Morbidität und Mortalität (Murray et al., 1997; Deutsche Hochdruckliga, 2008). Hierbei zählt die Hypertonie, neben Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, Adipositas und Nikotinabusus, zu den bedeutendsten Risikofaktoren. Laut einer Erhebung des Statistischen Bundesamtes verstarb 2006 fast jeder Zweite (43,7 %) an einer Erkrankung des Kreislaufsystems (Statistisches Bundesamt, 2007) (*Abbildung 1*).

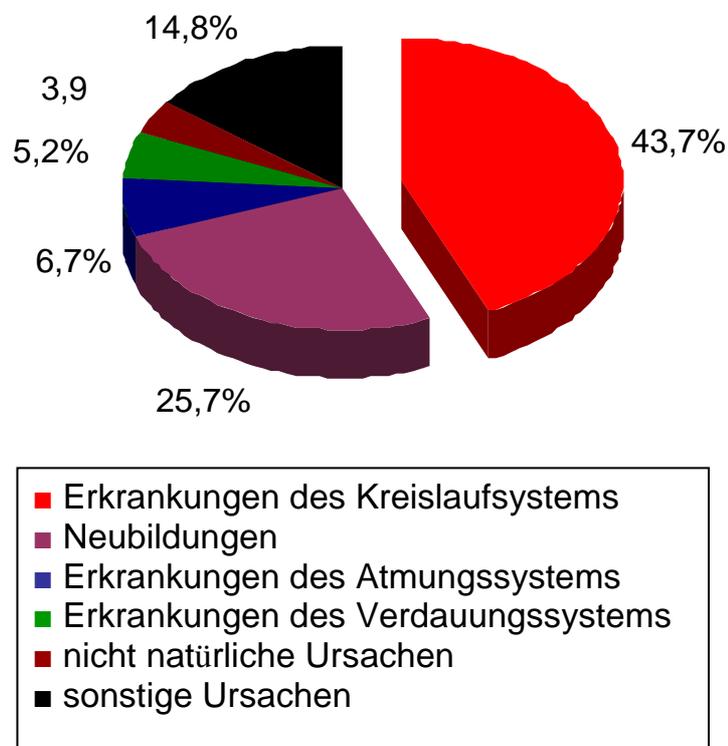


Abb. 1: Todesursachen 2006 in Deutschland (Statistisches Bundesamtes, 2007)

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert die arterielle Hypertonie beim Menschen durch einen systolischen Blutdruck größer/gleich 140 mmHg und/oder einen diastolischen Blutdruck größer/gleich 90 mmHg (WHO, 1999, Mancia et al., 2007). Morbidität und Mortalität der Herz-Kreislauserkrankungen steigen mit zunehmendem Blutdruck an. Die Einteilung in primäre und sekundäre Hypertonie erfolgt aufgrund der

Entstehungsursache. Bei der primären Hypertonie – auch essentielle Hypertonie genannt –, die mit circa 95 % die weitaus häufigere Form darstellt (Carretero, Oparil, 2000), kann kein ursächlicher Pathomechanismus diagnostiziert werden. Bei den sekundären Hypertonieformen können hingegen pathologische Organveränderungen nachgewiesen werden (Kreutz, Paul, Ganten, 2000).

Allein in Deutschland leiden etwa 25 % der Erwachsenen an primärer Hypertonie, wobei die Prävalenz mit zunehmendem Alter ansteigt (Kreutz, Paul, Ganten, 2000; Wolf-Maier et al., 2003). Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung in den Industrienationen steigt hier der Anteil der an Hypertonie erkrankten Menschen (van Rossum et al., 2000) und damit die Bedeutung dieser Thematik im klinischen Alltag. Die arterielle Hypertonie kann beim Menschen zu kardiovaskulären, zerebralen und renalen Endorganschäden wie Myokardinfarkt, Apoplex und Niereninsuffizienz führen. Da die Hypertonie jedoch kein homogener Prozess ist, korreliert die Höhe des Blutdruckes nicht immer mit dem Ausmaß der Schädigung. Zahlreiche Umweltfaktoren sowie genetische Faktoren beeinflussen die Hochdruckerkrankung, wobei die genetischen Faktoren die Endorganschäden positiv oder negativ beeinflussen können (Rubattu et al., 1996). Zu den seltenen monogenetischen beziehungsweise Mendelschen Vererbungsmustern, von denen beim Menschen bisher einige wenige beschrieben wurden, gehören unter anderem das Liddle-Syndrom sowie der glukokortikoid-reagible Aldosteronismus (GRA) (Lifton et al., 2001). Diese stellen jedoch seltene Ausnahmen bei der normalerweise polygenetisch und multifaktoriell regulierten Erkrankung der arteriellen Hypertonie dar (*Abbildung 2*).

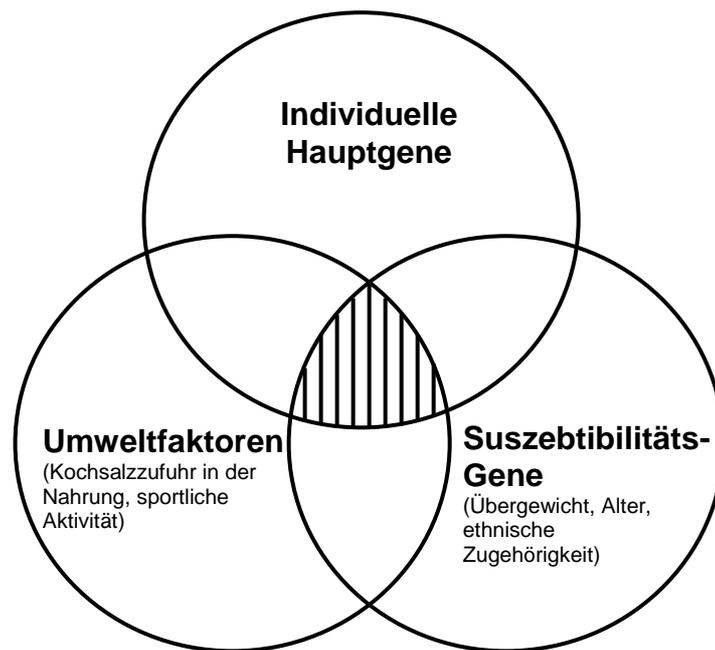


Abb. 2: *Verschiedene genetische Faktoren und Umweltfaktoren nehmen Einfluss auf die primäre Hypertonie (gestricheltes Feld) (modifiziert nach Rutherford, 2003)*

Bei einer gewissen Anzahl der Hypertonie-Patienten verursacht eine gesteigerte Kochsalzzufuhr eine Zunahme und eine verminderte Kochsalzzufuhr eine Senkung der Hypertonie (Luft, 1999). Dieses Phänomen wird als Salzsensitivität bezeichnet, die wiederum von zahlreichen anderen Faktoren beeinflusst wird. Neben dem Alter (Zunahme der Salzsensitivität mit dem Alter) spielen auch die ethnische Zugehörigkeit (höhere Prävalenz in der farbigen Bevölkerung) sowie die genetische Prädisposition eine Rolle. So beträgt der Anteil der salzsensitiven Patienten in Abhängigkeit von der ethnischen Zugehörigkeit und dem Alter bis zu 50 % aller primären Hypertoniker (Weinberger et al., 1986).

Hollenberg und Kollegen untersuchten die Salzsensitivität der primären Hypertonie beim Stamm der Kuna-Indianer in Panama (Hollenberg et al., 1997). Hier gab es drei Bevölkerungsgruppen: Die erste lebte traditionell mit geringer Kochsalzzufuhr auf den Inseln vor der Küste von Panama. Die zweite Gruppe lebte in Panamacity und hatte sich an die Hochsalzdiät und das hektische Großstadtleben angepasst, während die dritte Gruppe in einem Vorort von Panamacity namens KunaNega lebte, in der ausschließlich Kuna-Indianer wohnten. Diese dritte Gruppe lebte traditioneller als die

Großstadt-Indianer. Die Analyse der drei Bevölkerungspopulationen ergab, dass die Insel-Indianer die Gesündesten waren, bei denen auch noch im Alter die Hypertonie nicht vorkam, während die Großstadt-Indianer mit der angepassten Lebensweise den größten Anstieg bei der Hypertonie im Alter hatten. Dieses Beispiel zeigt, dass neben der genetischen Prädisposition beziehungsweise der ethnischen Zugehörigkeit auch Umweltfaktoren bedeutsam für die Ausprägung der Salzsensitivität sind. Als Letztes müssen noch Adipositas sowie Diabetes mellitus Typ II genannt werden, die ebenfalls prädisponierend auf die Ausbildung der Salzsensitivität wirken (Bianchi et al., 1999).

Bei salzsensitiven Hypertonikern kommt es im Vergleich zu salzresistenten häufiger zu hypertensiven Endorganschäden (Morimoto et al., 1997), die bis zur terminalen Niereninsuffizienz führen können. Bei der salzsensitiven Hypertonie wiederum führt eine Verschlechterung der Nierenfunktion im Sinne eines *circulus vitiosus* zu einem Fortschreiten der arteriellen Hypertonie. Da eine Nierenschädigung mit einer Verminderung der funktionstüchtigen Glomeruli und somit einer verminderten Filtrationsfläche einhergeht, kommt es zur Natrium- und Wasserretention. Somit gilt eine verminderte Anzahl an Glomeruli als prädisponierender Faktor bei der salzsensitiven Hypertonie (Brenner et al., 1988).

Ein charakteristisches Frühsymptom bei der hypertensiven Nierenschädigung ist die Mikroalbuminurie. Laut Definition liegt diese beim Menschen bei einer Ausscheidung von 30 bis 300 mg Albumin pro Tag vor und ist ein Indikator für die Schwere der Nierenschädigung bei der primären Hypertonie (Ruilope et al., 2001; Mann et al., 2001; Mancia et al., 2007). Die Mikroalbuminurie stellt nicht nur einen Risikofaktor für die Entstehung der Nephropathie dar, sondern auch für kardiovaskuläre und zerebrale Endorganschäden (*Abbildung 3*). Die Nierenfunktion verschlechtert sich mit zunehmender Albuminausscheidung sowie steigendem Blutdruck bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz. Die Arbeitsgruppe um Zucchelli geht davon aus, dass der Blutdruck bei bis zu 20 % aller Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz als Entstehungsursache anzusehen ist (Zucchelli et al., 1992).

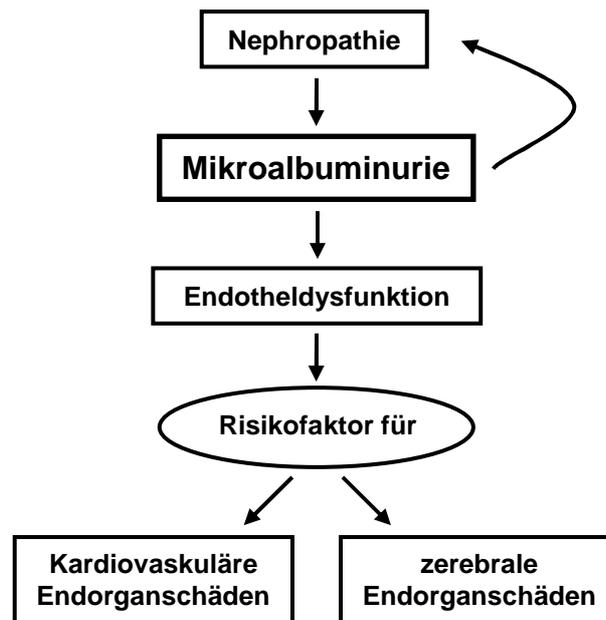


Abb. 3: *Mikroalbuminurie als Risikofaktor für kardiovaskuläre, zerebrale und renale Endorganschäden*

1.2 Tiermodelle zur Untersuchung der kardiovaskulären Erkrankungen

Das Rattenmodell bietet neben einer kurzen Generationsdauer gut kontrollierbare und standardisierte Haltungsbedingungen. Zusätzlich bieten die genauen physiologischen Kenntnisse über diese Tiere gute Bedingungen, um die Pathogenese der Hypertonie zu untersuchen. Aufgrund der geringen Körpergröße und der genauen anatomischen Kenntnisse ist das Rattenmodell zudem ideal für die Organentnahme, um Veränderungen im makroskopischen und mikroskopischen Bereich zu diagnostizieren. Beim Menschen wie auch bei wildtypisch lebenden Ratten kommen blutdruckregulierende Allele vor, die sich entweder gegenseitig beeinflussen (epistatische Interaktion) oder durch diverse Umweltfaktoren (ökogenetische Interaktion) beeinflusst werden. Da diese Interaktionen für die Untersuchung dieses heterogenen Krankheitsbildes hinderlich sind, wurden durch gezielte Bruder-Schwester-Verpaarung verschiedene ingezüchtete hypertensive Rattenstämme entwickelt. Hierzu sind Tiere mit sehr hohen Blutdruckwerten über mehr als zehn Generationen miteinander verpaart worden, sodass es durch die Kombination der natürlich selektionierten Allele zur spontanen Hypertonie und zu einer genetischen Homogenität

bei gleichgeschlechtlichen Tieren von mehr als 99 % kommt (Ganten et al., 1994). Durch die gezielte Bruder-Schwester-Verpaarung wird somit die genetische Heterogenität vermieden, wodurch sich Mutationen und Kandidatengene für die primäre Hypertonie analysieren lassen.

Der Blutdruck ist ein quantitatives Merkmal. Bestimmte chromosomale Bereiche, die mehrere Gene mit Einfluss auf einen zu untersuchenden Phänotyp enthalten, werden als Quantitative Trait Loci (QTL) bezeichnet. In den letzten Jahren wurden in tierexperimentellen Untersuchungen blutdruckregulierende QTL auf nahezu jedem Chromosom gefunden (Rapp, 2000). Die Ergebnisse müssen durch vergleichende Genomanalysen zwischen Mensch und Ratte und in anschließenden klinischen Analysen überprüft werden. Genetische Studien werden als Familien- beziehungsweise Geschwisterpaaranalysen, Fallkontrollstudien sowie Assoziationsstudien durchgeführt, um schließlich die identifizierten Kandidatengen-Polymorphismen in gezielten klinischen Studien zu untersuchen (*Abbildung 4*).

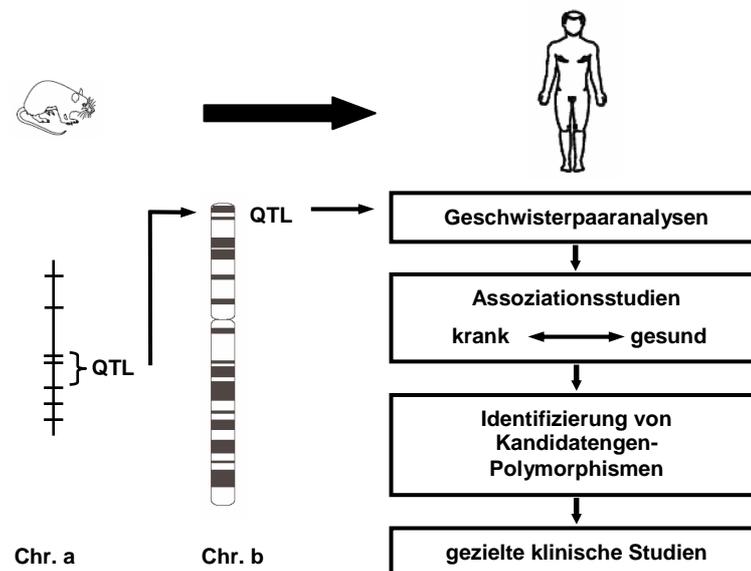


Abb. 4: *Identifizierung krankheitsrelevanter Gene über Homologievergleich zwischen Quantitative Trait Loci (QTL) bei der Ratte und beim Menschen. Anschließend können diese in Geschwisterpaaranalysen sowie Assoziationsstudien und abschließend gezielten klinischen Studien unterzogen werden.*

Durch den oben beschriebenen Untersuchungsansatz konnte bei der Ratte das α -Adduzin-Gen als ein Kandidatengen für die Hypertonie identifiziert werden (Bianchi et al., 1994). Manunta und Kollegen zeigten, dass eine Mutation im Zytoskelettprotein Adduzin zu einer Zunahme des aktiven Ionentransports der Natrium-Kalium-ATPase in den Nieren führt und damit für bis zu 50 % der Hypertonie bei den Milan-Hypertensiven (MHS)-Ratten verantwortlich ist (Manunta et al., 1998). Auf der Grundlage der Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Bianchi konnte in klinischen Untersuchungen eine Verbindung zwischen der Mutation im α -Adduzin-Lokus (Gly460Trp-Variante) und der primären Hypertonie beim Menschen aufgezeigt werden (Casari et al., 1995). Durch Kopplungs- und Assoziationsstudien wurde anschließend beim Menschen eine Mutation in der α -Untereinheit gefunden, die bei hypertensiven Patienten im Vergleich zu normotensiven Versuchspersonen gehäuft auftrat. Der Einfluss dieser Mutation wurde anschließend bei der Behandlung mit einem Thiaziddiuretikum nachgewiesen (Cusi et al., 1997), bei der Patienten mit einer Mutation im α -Adduzin-Gen eine stärkere Senkung der Hypertonie nach Thiazidtherapie hatten als Patienten ohne diese Mutation. Somit wurde erstmalig die Therapie der Hypertonie abhängig vom Genotyp des Patienten beschrieben.

1.3 Identifizierung krankheitsrelevanter Gene bei der primären Hypertonie

Für die Identifizierung der blutdruckrelevanten QTL bei Ratten eignen sich Kosegregationsanalysen, für die zwei kontrastierende hypertensive und normotensive Parentaltierstämme benötigt werden. Das Prinzip der Kosegregationsanalyse beruht auf dem Austausch von genetischem Material zwischen homologen väterlichen und mütterlichen Chromosomen während der meiotischen Rekombination. Durch die Verpaarung der ingezüchteten normotensiven, salzresistenten F344-Ratte mit der ingezüchteten hypertensiven, salzsensiblen Spontaneously Hypertensive Rat / Stroke-Prone-Ratte (SHRSP) entsteht die erste Filialgeneration. Diese ist an allen Genorten gemäß den Mendelschen Regeln homozygot. Durch die Bruder-Schwester-Verpaarung dieser ersten Tochtergeneration entsteht die heterozygote zweite Filialgeneration, dass heißt, während der Meiose wird das genetische Material zufällig an die F2-Generation verteilt (*Abbildung 5*). Die Genotypen bleiben mit den jeweiligen Phänotypen Blutdruck

und Salzsensitivität assoziiert, sodass die Allele in der Nähe eines QTL liegen beziehungsweise dem QTL entsprechen (Hübner, Kreutz, Lindpaintner, 1994). Es bleiben somit nur die für die Ausbildung des entsprechenden Merkmals relevanten Genorte mit dem Phänotyp assoziiert.

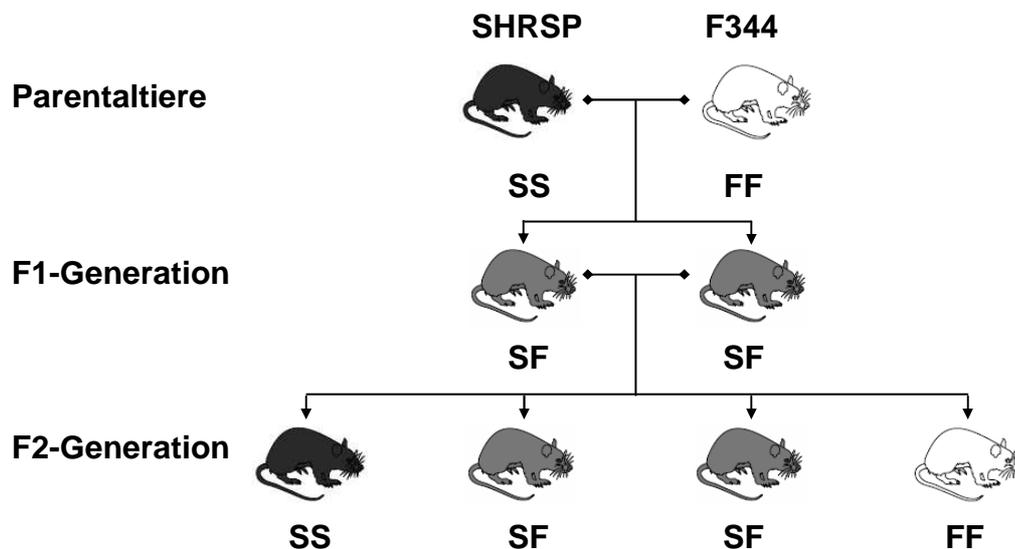


Abb. 5: *Kosegregationsanalyse am Beispiel eines F2-Intercross: Verpaarung eines normotensiven und salzresistenten F344 Rattenstammes mit einem hypertensiven und salzsensiblen SHRSP-Rattenstamm (S = SHRSP-Allel), F = F344-Allel, F1 = erste Tochtergeneration, F2 = zweite Tochtergeneration)*

1.4 Die Ratteninzuchtstämme Spontaneously Hypertensive Rat / Stroke-Prone und Fischer 344

Die zum Schlaganfall neigende spontan-hypertensive Ratte (SHRSP) stammt aus Kyoto und wurde 1974 von der Arbeitsgruppe um Okamoto und Kollegen aus der spontan-hypertensiven Ratte (SHR) etabliert (Okamoto et al., 1974). Dieser Stamm wurde wiederum 1962 von derselben Arbeitsgruppe aus der Wistar-Ratte gezüchtet. Bei der Etablierung der SHRSP-Ratte wurde eine selektive Inzucht der Nachkommen von SHR-Tieren vorgenommen, die zuvor an einem Schlaganfall verstorben waren. Dieser Stamm ist außerordentlich salzsensitiv hinsichtlich der Blutdruckregulation und hat bereits im jungen Alter systolische Blutdruckwerte von über 240 mmHg sowie

ausgeprägte Endorganschäden, die vor allem an der Niere zu finden sind (Tanase et al., 1982). Yamori beschrieb weiterhin eine starke Natrium- und Wasserretention unter einer chronischen Zufuhr von Kochsalz, die zu einem paradoxen Reninanstieg führt (Yamori, 1994). Zusätzlich kommt es unter einer Hochsalzdiät zur Ausbildung einer Nephropathie mit Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose (Orth et al., 1998).

Der Inzuchtstamm Fischer 344 – später F344 genannt – wurde ursprünglich von einem kommerziellen Züchter namens Fischer im Jahr 1919 entwickelt, der diesen Stamm mit der Wurfnummer 344 an Dr. Maynie Rose Curtis lieferte (Russel, Baker, 1980). Die River Charles Laboratorien führten diesen Stamm 1960 schließlich weiter (Charles River Laboratories, 2005). Dieser Stamm ist normotensiv und salzresistent und weist keine ausgeprägten Endorganschäden auf.

1.5 Identifizierung der zur arteriellen Hypertonie und Nephropathie führenden genetischen Faktoren am Tiermodell der salzsensitiven SHRSP-Ratte

Genetische Ursachen der Hypertonie können entweder mit einer primären oder einer sekundären Störung (SHRSP als Rattenmodell) der renalen Natriumextraktion einhergehen. Zudem gibt es arterielle Hypertoniker, bei denen es zu einer Kompensation der renalen Funktionsveränderungen kommt (SHR als Rattenmodell). Dieser Patiententeil hat aufgrund der Salzresistenz eine bessere Prognose hinsichtlich der Progression der Endorganschäden. Bei dieser letztgenannten Gruppe existieren vermutlich Schutzmechanismen, die zu einer Salzresistenz führen. Bei einem Teil der an Hypertonie leidenden Patienten mit einer gestörten Natriumausscheidung kann sich eine salzsensitive Hypertonie entwickeln – unabhängig davon, ob zuerst die Nierenschädigung oder die Hypertonie vorhanden war. Durch diese salzsensitive Hypertonie kommt es sowohl zu einer Nephropathie als auch zu einer weiteren Verschlechterung der Hypertonie, sodass es als Folge zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre und renale Endorganschäden kommt. Da es bei salzsensitiven Hypertonikern häufiger zu einer Nierenschädigung als bei salzresistenten Patienten kommt (Bigazzi et al., 1996), ist die SHRSP-Ratte aus klinischer Sicht hierfür ein geeignetes Tiermodell (*Abbildung 6*).

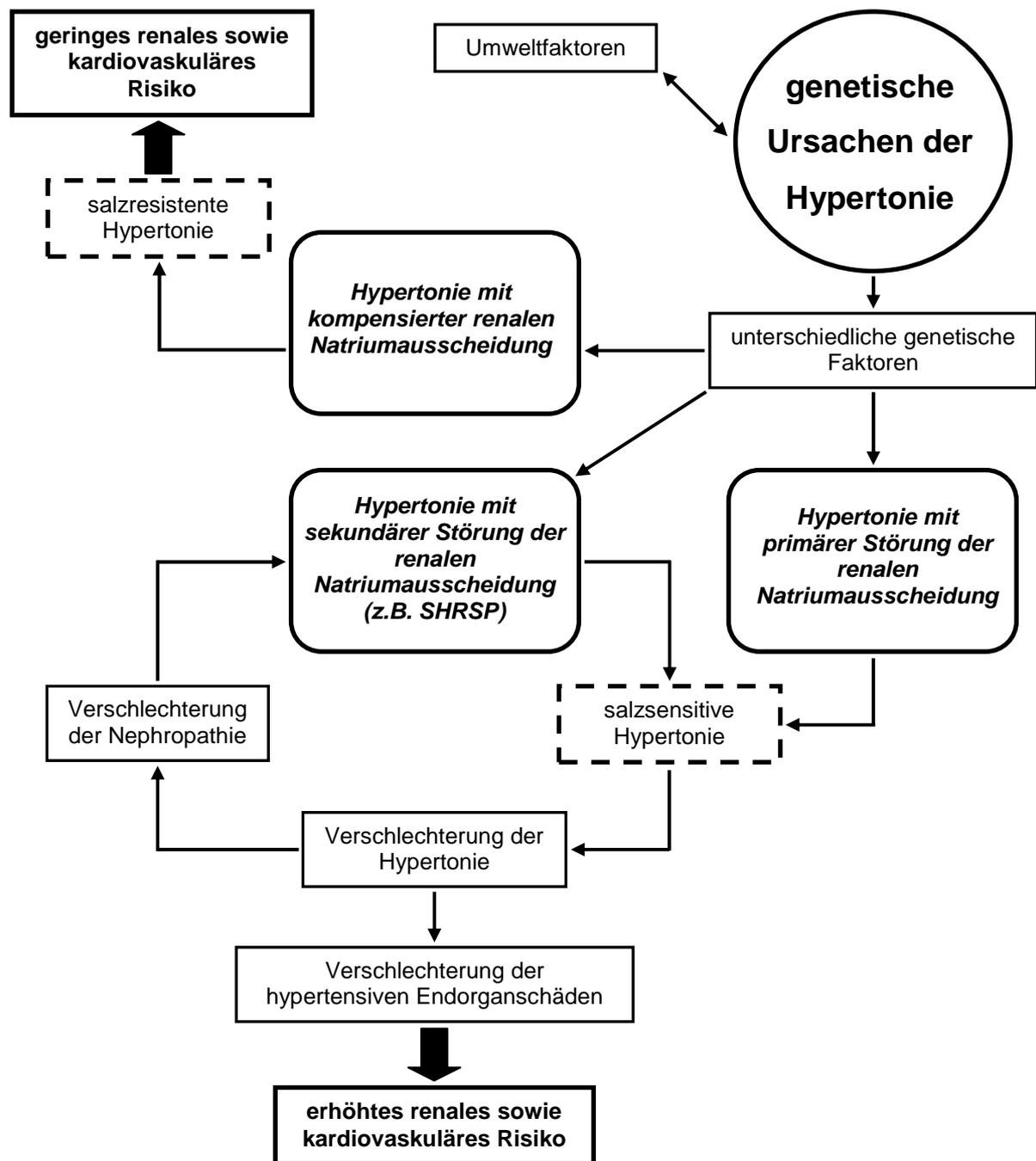


Abb. 6: Tiermodell am Beispiel der SHRSP-Ratte zur Bestimmung der genetischen Faktoren, die eine salzsensitive Hypertonie sowie die Verschlechterung der hypertensiven Endorganschäden beeinflussen

Da die F344-Ratte weder salzsensitiv noch hyperten ist, kann man vermuten, dass in der zweiten Tochtergeneration der Kreuzung zwischen SHRSP und F344 sowohl die Hypertonie als auch die Endorganschäden im Vergleich zu den SHRSP-Parentaltieren abgeschwächt werden. Das Ausmaß der renalen Endorganschäden wird mithilfe eines

semiquantitativen Systems ausgewertet, welches zuvor in der Arbeitsgruppe (Koßmehl, Dissertation 2005) etabliert wurde. Hierbei werden die morphologischen Veränderungen der Nieren erstens anhand der Ausprägung der interstitiellen Fibrose mit einer Bildanalyseeinheit gemessen (de Heer et al., 2000). Zweitens werden die Schäden in den Glomeruli mittels eines modifizierten Glomeruloskleroseindex bewertet (Raij et al., 1984). Durch diese Auswertungen wird untersucht, in welchem Zusammenhang die arterielle Hypertonie mit der Ausbildung der Nephropathie steht, beziehungsweise ob unabhängige Genloci diese Phänotypen beeinflussen (Johnson et al., 1997).

1.6 Ziel der Arbeit

Die arterielle Hypertonie als einer der wichtigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen hat in den Industrienationen eine enorme Bedeutung, da bei steigender Lebenserwartung immer mehr Menschen daran erkranken und den Gesundheitssystemen hierdurch noch größere Belastungen bevorstehen. Einen wichtigen Teil bei der Erforschung der arteriellen Hypertonie nimmt die Salzsensitivität ein. Diese ist bei bis zu 50 % der Patienten vorhanden, wobei mit zunehmendem Alter die Salzsensitivität unter den Hypertonikern ansteigt (Weinberger et al., 1991), sodass auch hier bei steigender Lebenserwartung die Bedeutung weiter zunimmt. Die genetischen Ursachen bei der salzsensitiven arteriellen Hypertonie sind immer noch weitgehend ungeklärt. Ebenso ist nicht bekannt, warum bei Hypertonikern mit einer Salzsensitivität häufiger Endorganschäden auftreten als bei Patienten mit einer Salzresistenz. Dieses Phänomen der Häufung der Endorganschäden bei der salzsensitiven arteriellen Hypertonie kommt unter anderem bei der Nephropathie vor (Dworkin et al., 1984).

Um zukünftig neben einer wirkungsvollen Therapie effektive Präventionsmaßnahmen zur Verfügung zu haben, müssen die genetischen Ursachen dieser Erkrankung erforscht werden. Hierdurch könnten die Endorganschäden am Herz-Kreislauf-System sowie an der Niere vermindert, beziehungsweise zum Teil sogar gänzlich vermieden werden. Die geeigneten Tiermodelle spielen für die Grundlagenforschung der arteriellen Hypertonie eine wichtige Rolle (Kreutz et al., 2000).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung der chromosomalen Regionen, die zu histomorphologischen Veränderungen und damit zur Pathogenese der

Nephropathie bei der salzsensitiven spontanen Hypertonie im Rattenmodell führen. Als Tiermodell dienten dazu der SHRSP-Rattenstamm sowie die F344-Ratte als Kontrollstamm. Als erster Schritt erfolgte die Phänotypisierung der Parentaltiere unter Hochsalzdiät. Nach diesen Untersuchungen wurde anschließend aus den Parentaltierstämmen SHRSP und F344 eine F2-Kreuzungspopulation gezüchtet und diese nach einer Hochsalzdiät mit 4 % NaCl wieder phänotypisiert. Als Phänotypen wurden Blutdruck, Albuminurie, Proteinurie, interstitielle Fibrose der Nieren sowie Glomerulosklerose erfasst, außerdem Körpergewicht und Nierengewicht. Insgesamt wurden 232 männliche Tiere untersucht.

Im Anschluss daran wurde durch eine genomweite Kopplungsanalyse und QTL-Kartierung geprüft, ob und gegebenenfalls welche Genloci Einfluss auf Nierenschäden bei der salzsensitiven spontanen Hypertonie haben. Zusätzlich sollte eine Kosegregationsanalyse zwischen Blutdruck, den funktionellen (Albuminurie und Proteinurie) sowie den strukturellen Nierenschädigungen (Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose) durchgeführt werden.

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse im Rattenmodell bei der salzsensitiven arteriellen Hypertonie dienen als Grundlage, um weiterführende experimentelle und klinische Studien durchführen zu können. Hierdurch können schließlich Diagnostik, Therapie und Prävention von Risikopatienten verbessert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Radionukleotide

Substanz	Firma
[γ - ³² P]dATP (1 mCi, 3000 Ci/mol, wässrige Lösung)	Amersham
10x PCR-Puffer	Rapidozym, Promega
10x TBE (Tris-Borat-EDTA-Lösung)	Gibco BRL
Aceton	Baker
Acrylease	Stratagene
Agarose zur DNA-Elektrophorese	Roth
Ammoniumpersulfat-Lösung (100 mg/ml)	Sigma
Autoklaviertes Wasser	Toxikologie CCBF
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Bradford-Reagenz	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	Roth
dNTPs (2,5 mM)	Rapidozym, Promega
Essigsäure (100 %)	Merck, Roth
Ethanol	Baker
Ether	Merck
Färbemittel Periodic Acid Schiff (PAS)	Microm International
Färbemittel Sirius-Red (SR)	Microm International
Formaldehyd (37 %, v/v)	Baker
Formamid	Merck
Glycerin (99 %, w/v)	Janssen Chimica
Glycerin-Eiweiß-Lösung	Toxikologie CCBF
Harnstoff	Roth
Isopropanol	Sigma
Kinase-10x-Puffer	Promega
Magnesiumchlorid (1,5 mM)	Rapidozym, Promega
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck
Pikrinsäure	Merck
Rotiphorese (40 % Acrylamid, 2 % Bisacrylamid)	Merck
SDS (Lauryl Sulfate)	Sigma
Stickstoff, tiefgekühlt, flüssig UN 1977	Linde AG
Temed (N, N, N', N'-Tetramethylethylen-diamin)	Sigma
Trizma Base (MG = 121,1)	Sigma
Xylen Cyanol FF	Sigma

2.1.2 Enzyme

Enzym	Aktivität	Firma
T ₄ -Polynukleotidkinase	5 U/μl	Promega
Proteinase K	34 U/mg	Sigma
Taq-Polymerase	5 U/μl	Rapidozym, Promega

2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer	Bestandteil	Konzentration
10x Laufpuffer	Bromphenolblau Glycerin Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat Xylen Cyanol FF	0,25 % (w/v) 50 % (v/v) 10,0 mM, pH 7,0 0,25 % (w/v)
Duboscq-Brasil-Fixativ	Eisessig Ethanol 80 % (v/v) Formaldehyd 37 % (v/v) Pikrinsäure	15 ml 150 ml 60 ml 1 g
Fixativ für die Histologie	Essigsäure 100 % Ethanol 80 % (v/v) Formaldehyd 37 % (v/v) Pikrinsäure	5 ml 150 ml 60 ml 1 g
Formamid-Laufpuffer	Bromphenolblau Di-Natrium-EDTA-Dihydrat Formamid Xylen Cyanol FF	1 % (w/v) 0,5 M 10 % (v/v) 1 % (w/v)
Lysis-Puffer	Di-Natrium-EDTA-Dihydrat Natriumchlorid SDS Trizma Base	100 mM, pH 8,0 100 mM 1 % (w/v) 50 mM, pH 8,0

2.1.4 Sonstige Materialien und Futtermittel

Artikel	Firma
Bildanalyseprogramm Scion Image 1.62a	Scion Co.
BioMax MR-Röntgenfilme	Kodak
Deckgläschen 24 x 32 mm	Menzel Glaser
Edelstahlklemmen	Peq Lab
Einbettringe	Microm International
Einmal-Ausgießringe	Microm International
Entwässerungsgefäße Histokinette II, with LID	Simport Plastics
Einwegklingen	Microm International
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell
Glasplatten für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse (Normalfutter)	Altromin
Histoacryl-Gewebekleber	Braun
Kämme und Spacer für Polyacrylamidgele	Peq Lab
Lochzange für Labortiere	Esculap

Makrolonkäfige Typ III und IV	Ebeco
Mehrkanal-Spritze (8-Kanal, 0-10 µl)	Hamilton
Messer für Mikrotom SEC 35, Low Profile Blade	Richard Allan Scientific
Micro Amp Reaction Tube with Cap (0,2 ml, dünnwandig)	Perkin Elmer GeneAmp
Mikrotiterplatten	ABgene
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel Glaser
Organhalterung Tissue Embedding M460 White	Simport Plastics
Paraffin	Microm International
Pinsel	Faber Castell
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
Restrainer	Werkstatt CCBF
Röntgenkassette	Amersham
Schweißfolie	GENETIX
Skalpelle, Größe 20	Heather
Standardpipetten	Eppendorf
Stickstoffbehälter zum Kühlen	KGW Isotherm
Stoffwechselkäfige für Ratten bis 300 g	Ehret
Szintillationsgefäße aus Kunststoff	Packard
TurbOflow™ Kassette	Microm International
Weithalsflaschen aus Polyethylen	Roth

2.1.5 Geräte

Gerät	Firma
Agarosegelkammer	Bio Rad
Automat für die Filmentwicklung X-OMAT 5000 RA	Kodak
Blutdruckmessgerät	TSE
Brutschrank	Memmert
Einbettvorrichtung	Bavimed
Entwässerungsanlage Histokinette	Reichert Jung
Färbeautomat HMS 760 X Robot-Stainer	Microm International
Folienschweißgerät	MDC
Fotomikroskop Axiophot	Carl Zeiss, Oberkochen
Gefrierschrank	Siemens
Histokinettenautomat	British American Optical Co.Ltd.
Hybridisierungssofen	Biometra
Kühlklemme Cool Cut	Microm International
Mikroskop	Zeiss
Mikrotiterplattenschüttler	Roth
Minifuge RF (Zentrifuge)	Heraeus sepatech
Multipette plus	Eppendorf
Rotationsmikrotom HM 355	Microm International
Paraffinabfüllanlage	Enno Vieth Mikrotome
PCR-Maschine	MJ Research
pH-Meter	Knick
Photometer UV-1202	Shimadzu
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer	Peq Lab
Power Macintosh 8200/120	Apple Computer

Stickstoffbehälter	Cryo System
Stromversorgungsgerät für Elektrophoresekammer	Biometra
Szintillations-Zähler	LKB Wallace
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Videosystem	AVT-Horn
Vortexer VF2	Janke&Kunkell KA Labortechnik
Waage	Sartorius
Wärmeplatte	Agar Scientific
Wassererwärmer Typ STS	Microm International
Zwischengerät für Computer	AFT Horn

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung

Die Haltung der für diese Arbeit verwendeten Ratten erfolgte in Absprache mit dem Institut für Klinische Pharmakologie in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) des Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Die Genehmigungsnummer vom 13.10.2004 für die Tierversuche lautet G0089/04 und wurde durch das Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales (Referat I C) erteilt.

Es wurden jeweils vier gleichgeschlechtliche Tiere in je einem Makrolonkäfig Typ IV gehalten. Für die Zeit der Verpaarung wurden die Tiere vorübergehend in Makrolonkäfige Typ III verbracht. Die Tiere wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 75 % unter einem kontrollierten 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus gehalten und erhielten Wasser und Futter ad libitum. Nach dem Absetzen der Jungtiere von der Mutter nach vier Wochen erhielten die Tiere mittels einer Lochzange eine Ohrmarkierung mit einer fortlaufenden Nummer.

2.2.2 Zucht

2.2.1.1 Parentaltiere

Der verwendete Rattenstamm SHRSP (Spontaneously Hypertensive Rat / Stroke-Prone) stammt aus der eigenen Zucht des Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Er wurde ursprünglich von Herrn Prof. Dr. med. Detlev Ganten von der Universität Heidelberg eingeführt, der den Originalstamm aus Japan bezogen hatte. Der Rattenstamm SHRSP ist spontan hypertensiv, salzsensitiv und weist ausgeprägte Endorganschäden auf.

Der Rattenstamm F344 wurde 1997 am Campus Benjamin Franklin etabliert, nachdem er aus der Zucht der Firma Møllegaard (Bomholtvej, Dänemark) gekauft wurde. Der Rattenstamm F344 ist normotensiv und salzresistent.

Beide Rattenstämme stellten durch konsequente Bruder-Schwester-Verpaarung von mehr als 20 Generationen Inzuchtstämme dar. Die Erhaltung beider Stämme erfolgte ebenfalls durch Bruder-Schwester-Verpaarung, die in der FEM vorgenommen wurde.

2.2.2.2 F2-Population SHRSP x F344

Für die Kosegregationsanalyse wurden männliche, homozygote Parentaltiere des Stammes SHSRP und weibliche, homozygote Parentaltiere des Stammes F344 verpaart. Aus diesen genetisch identischen Jungtieren ist durch anschließende Bruder-Schwester-Verpaarung eine F2-Generation mit insgesamt 232 männlichen Tieren hervorgegangen (*Abbildung 7*).

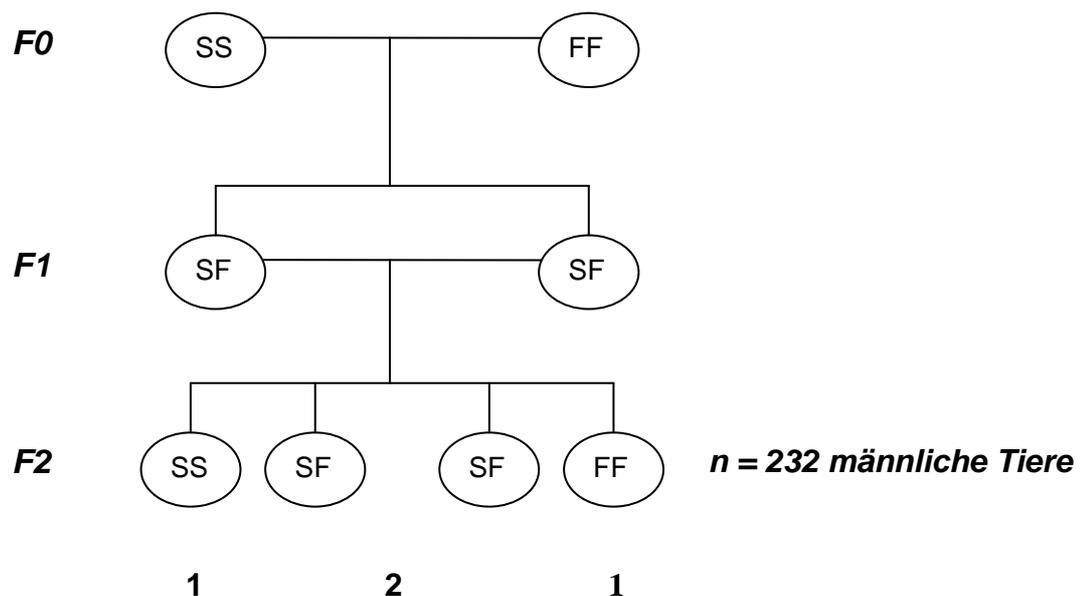


Abb. 7: *Zucht der F2-Generation aus Parentaltieren der Stämme SHSRP und F344 und anschließender Bruder-Schwester-Verpaarung (S = SHSRP-Allel, F = F344-Allel, F0 = Parentalgeneration, F1 = 1. Filialgeneration, F2 = 2. Filialgeneration, n = Anzahl)*

2.2.3 Versuchsprotokoll

Die 232 männlichen Tiere erhielten zur Untersuchung der Salzsensitivität ab der sechsten Woche post partum für acht Wochen eine Hochsalzdiät (Spezialfutter mit 4 % Natriumchlorid). In der 14. Woche wurden der Blutdruck gemessen, der 24-h-Urin für biochemische Analysen gesammelt sowie anschließend die Organe entnommen.

2.2.4 Phänotypisierung

2.2.4.1 Systolische Blutdruckmessung

Die systolische Blutdruckmessung wurde schwanzplethysmographisch mit einem nicht-invasiven Mehrkanal-Messsystem (Blutdruckmessgerät der Firma TSE, Bad Homburg) gemessen. Diese als „Tailcuff“ bezeichnete Methode erfolgt als unblutige Messung am Schwanz des Tieres unter Verwendung einer Druckmanschette (Williams et al., 1939). Für die Blutdruckmessung wurde jeweils ein Tier nach wiederholten Eingewöhnungsphasen zur Ruhigstellung in eine spezielle Plexiglasröhre (Restrainer) verbracht, die für die Hyperämisierung der Schwanzarterie auf 32 °C temperiert war. Die Blutdruckmessungen während der Eingewöhnungsphasen wurden verworfen. Nach Kalibrierung des Systems und Gewöhnung der Tiere an die Blutdruckmessungen wurde an drei aufeinander folgenden Tagen der systolische Blutdruck je drei Mal gemessen. Im Anschluss daran wurden die Ergebnisse der Messungen an den einzelnen Tieren gemittelt. Alle Messungen wurden von demselben Untersucher und unter Berücksichtigung der zirkadianen Rhythmen zu derselben Tageszeit durchgeführt.

2.2.4.2 Urin und biochemische Untersuchung

2.2.4.2.1 Uringewinnung für die Erhebung der klinischen Daten

Zur Bestimmung von verschiedenen klinischen Stoffwechselfparametern wurde der 24-Stunden-Sammelurin in der 14. Woche untersucht. Für die Uringewinnung wurden die Ratten jeweils einzeln für 24 Stunden in einen aus Polycarbonat (Makrolon®) bestehenden Stoffwechselfkäfig gesetzt. Die übrigen Haltungsbedingungen waren gleich und die Tiere bekamen weiterhin Futter und Wasser ad libitum. Der in den ersten zwölf Stunden (Eingewöhnungszeit der Tiere) gewonnene Urin wurde verworfen. Um falsch-negative Werte durch Ablagerungen von Albumin zu vermeiden, wurde der 24-Stunden-Sammelurin anschließend in Polyethylen-Weithalsflaschen dekantiert und das Urinvolumen durch Auswiegen bestimmt (1 ml \cong 1 g). Für die weiteren Analysen wurde nach Durchmischung des Urins ca. 1 ml in ein 1,5-ml-Eppendorfggefäß abpipettiert. Zur Entfernung von bakteriellen und mechanischen Verunreinigungen des Urins wurde dieser bei 900 Upm mit der Eppendorf Tischzentrifuge 5415C für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Lagerung des übrigen, nicht für Messungen benutzten Urins erfolgte bei -20 °C in Polyethylenflaschen.

2.2.4.2.2 Biochemische Analysen

Aus dem 24-Stunden-Sammelurin wurde die Konzentration der Proteine mit der Bradford-Methode (Bradford, 1976) gemessen. Hierbei kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums nach Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G 250 an die Proteine. Dies geschieht durch die Stabilisierung der anionischen Sulfonatform in einem Proteinkomplex.

Als Erstes wurde zur Erstellung einer Eichgeraden für die Bestimmung der Proteinkonzentration eine Stammlösung aus Bovine Serum Albumin (BSA) (Konzentration von 20 mg/ml) hergestellt. Die Stammlösung wurde anschließend mit Aqua bidest. 1:100 verdünnt. Hieraus wurden Standardverdünnungen in den Konzentrationen 0 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,15 mg/ml BSA hergestellt. Als zweiten Schritt wurden die jeweiligen Urinproben nach der angenommenen Proteinkonzentration mit Aqua bidest. verdünnt und anschließend mit dem Vortexer durchmischt. Die Verdünnung lag hierbei zwischen 1:50 bis 1:500. Für die Doppelbestimmung wurden jeweils 100 µl Aqua bidest. und 100 µl Standardverdünnung bzw. 100 µl Aqua bidest. und 100 µl Urinverdünnung pro Mikrotiterplattenloch pipettiert und danach rasch mit je 150 µl Bradford-Reagenz pro Loch mittels einer Multipipette aufgefüllt. Nach einer Wartezeit von fünf Minuten wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen, nachdem unmittelbar vorher die Probe drei Sekunden lang geschüttelt wurde. Die jeweilige Messung wurde in einer anderen Verdünnung wiederholt, sofern die ermittelte Konzentration nicht im mittleren Bereich der Eichgeraden lag.

Aus dem 24-Stunden-Sammelurin wurde neben der Gesamtproteinbestimmung die Ausscheidung von Albumin gemessen. Diese Messung wurde mittels einer direkten kompetitiven ELISA-Technik durchgeführt, die zuvor in der Arbeitsgruppe etabliert worden war (Kreutz et al., 2000).

2.2.4.3 Präparation

Für die Isolierung der DNA wurde den Tieren im Alter von vier Wochen ein ca. 0,5 cm langes Schwanzstück abgeknipst. Die Wunde wurde anschließend mit Histoacryl-Gewebekleber verschlossen. Die abgetrennte Schwanzspitze wurde bei -20 °C gelagert.

Die Präparation der Tiere erfolgte in der 14. Woche, nachdem unmittelbar zuvor das Körpergewicht der Tiere ermittelt worden war. Für die Präparation wurden die Tiere zuerst in eine Ethernarkose versetzt. Anschließend wurden nach Eröffnung von Thorax und Abdomen mittels medianer Schnittführung Herz, Aorta abdominalis, Milz sowie beide Nieren entnommen. Alle Organe mit Ausnahme der Milz, die zur späteren DNA-Isolierung diente, wurden gewogen und vermessen. Das Blut wurde zur Gewinnung von Plasma und Serum über eine Kanüle aus der Aorta thoracica Pars descendens entnommen. Am Herzen wurden beide Ventrikel separat präpariert und anschließend noch einmal getrennt gewogen, wobei der linke Ventrikel das Septum enthielt. Die rechte Niere wurde für die Histologie am Nierenhilus transversal geteilt und zusammen mit linkem Ventrikel und der Aorta abdominalis für 24 Stunden in Dubosq-Brasil fixiert. Im Anschluss wurde das Fixativ zur Dehydratation durch 80-prozentiges Ethanol ersetzt. Die restlichen Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C eingelagert. Das entnommene Blut wurde mit 6 000 Upm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert.

2.2.5 Histologie

2.2.5.1 Einbettung der Organe in Paraffin

Nach der Fixierung in Dubosq-Brasil und der anschließenden Aufbewahrung für 24 Stunden in 80-prozentigem Ethanol erfolgte die Umlagerung der Organe in Histologie-Kassetten. Hierauf folgte die Entwässerung und Paraffineinbettung, die in einem Histokinettensystem nach dem Tauchprinzip vorgenommen wurde. Die Organe wurden hierzu in einer aufsteigenden Alkoholreihe zwei Stunden in 90-prozentigem, vier Stunden in 100-prozentigem Ethanol und abschließend zwei Stunden in Isopropylalkohol entwässert. Im Anschluss daran wurden die Organe zur Entfernung des Alkohols für sechs Stunden in Intermedium und dann für drei Stunden in einem Wärmepf mit einem Gemisch aus Intermedium und Paraffin (Verhältnis 1:1) verbracht. Als letzter Arbeitsschritt wurden die Organe in Kassetten überführt und für 24 Stunden in einen Wärmepf aus reinem Paraffin gegeben.

2.2.5.2 Schneiden und Färben der Nieren

In einer Einbettvorrichtung wurden die Nieren mit der transversalen Ebene nach unten in speziell dafür vorgesehene Einbettringe mit reinem Paraffin umgelagert. Hierdurch

wurde die optimale Oberfläche zwischen oberem Nierenpol und Hilus erhalten, sodass in der Schnittebene der Präparate superficiale und juxtamedulläre Glomeruli sowie der Übergang von Nierenrinde und Mark inklusive des S3-Segmentes enthalten sind (*Abbildung 8*). Die Schnittführung erfolgte mit standardisierten, 3 µm breiten koronaren Schnitten mithilfe eines Rotationsmikrotoms der Firma Microm International. Jeweils acht dieser Schnitte wurden auf einen zuvor mit Glycerin-Eiweiß-Lösung bestrichenen Objektträger aufgezogen und bei 37 °C über Nacht getrocknet. Anschließend wurden sie standardisiert im Färbeautomaten der Firma Microm International mit Sirius-Red (SR) und mit Periodic Acid Schiff (PAS) gefärbt. Die Färbung dieser Schnitte erfolgte nach folgenden Protokollen:

1. Sirius-Red:

Histoclear für 30 Minuten, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe mit 100-prozentigem, 90-prozentigem, 80-prozentigem und 70-prozentigem Alkohol jeweils für fünf Minuten. Anschließend spülen mit H₂O für drei Minuten, Aqua dest. für zwei Minuten, Sirius-Red F3BA für 60 Minuten, 0,01 N HCL für vier Minuten. Danach aufsteigende Alkoholreihe mit 70-prozentigem und 90-prozentigem Alkohol für jeweils drei Minuten, zweimal 95-prozentigem Alkohol für jeweils fünf Minuten gefolgt von zweimal 100-prozentigem Alkohol für jeweils fünf Minuten. Abschließend Histoclear für 30 Minuten.

2. Periodic Acid Schiff:

Histoclear für 30 Minuten, gefolgt von einer absteigender Alkoholreihe mit 100-prozentigem, 90-prozentigem, 80-prozentigem und 70-prozentigem Alkohol jeweils für fünf Minuten. Anschließend spülen mit H₂O für drei Minuten, Aqua dest. für zwei Minuten, 0,8-prozentige wässrige Perjodsäure für 15 Minuten, spülen mit H₂O für vier Minuten, Aqua dest. für eine Minute, Schiffreagens für 15 Minuten, dann zweimal SO₂ (300 ml Aqua dest., 15 ml N HCL, 18 ml einer 10-prozentigen wässrigen Lösung von Natriumdisulfit) für jeweils drei Minuten und spülen in H₂O für fünf Minuten. Danach aufsteigende Alkoholreihe mit 90-prozentigem Alkohol für vier Minuten, zweimal 95-prozentigem Alkohol für jeweils fünf Minuten, gefolgt von zweimal 100-prozentigem Alkohol für jeweils fünf Minuten. Abschließend Histoclear für 30 Minuten.

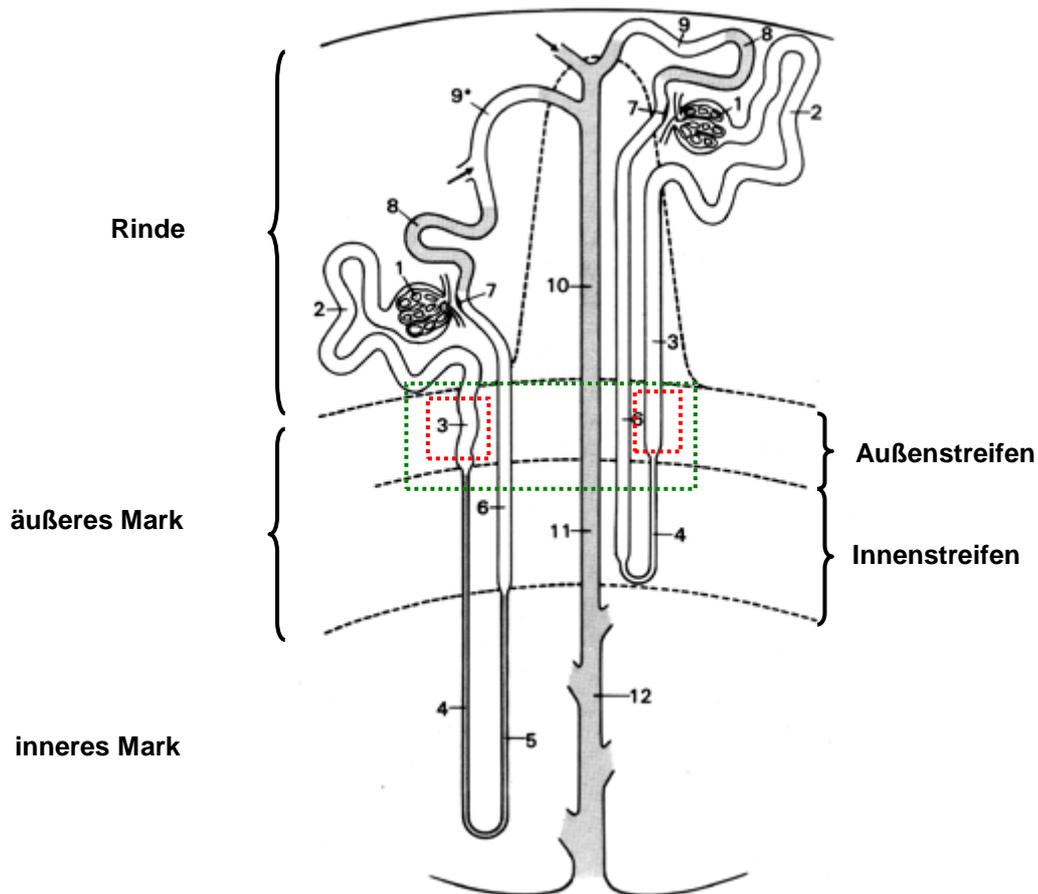


Abb. 8: Schema der Nierenstruktur

1 = Corpusculum renale, 2 = Pars convoluta des proximalen Tubulus, 3 = Pars recta des proximalen Tubulus, 4 = Pars descendens des intermediären Tubulus, 5 = Pars ascendens des intermediären Tubulus, 6 = Pars recta des distalen Tubulus, 7 = Macula densa, 8 = Pars convoluta des distalen Tubulus, 9 = Verbindungstubulus, 10 = kortikales Sammelrohr, 11 = Sammelrohr im äußeren Mark, 12 = Sammelrohr im inneren Mark; rot gestrichelt = S3-Segment, grün gestrichelt = Bildfläche (modifiziert nach Kritz et al., 1988)

2.2.6 Morphologische Bildanalyse und semiquantitative Bewertung

2.2.6.1 Morphologische Bildanalyse der interstitiellen Fibrose der Niere

Die Auswertung erfolgte mittels Durchlichtmikroskopie bei zehn verschiedenen Bildausschnitten an SR-gefärbten Präparaten bei 100-facher Vergrößerung. Der Bildausschnitt begann im Übergangsbereich zwischen Nierencortex und Nierenmark und endete im Innenstreifen, sodass in diesem Areal keine Glomeruli, jedoch die S3-Segmente (mitochondrienreiche proximale Tubuli) vorhanden waren (Abbildung 8).

Das Ausmaß der interstitiellen Fibrose der Niere wurde durch die spezifisch für Gesamtkollagen wirkende SR-Färbung detektiert (*Abbildung 9*).

Für die Speicherung der Bilder wurde das Photomikroskop Axiophot der Firma Carl Zeiss verwendet. Hieran wurde ein Videosystem der Firma AVT-Horn angeschlossen, bestehend aus einer Farbvideokamera mit drei 1/2"-CCD-Chips, einem externen Kamerasteuergerät und einer Bildfangschaltung (Frame Grabber). Dieses System wurde zur Speicherung der digitalen Bilder an einen Power Macintosh 8200/120 der Firma Apple Incorporated angeschlossen. Hier wurden die Bilder im Tagged Image File Format (TIFF) gespeichert und auf eine Sicherungs-CD-Rom gebrannt. Die Auswertung wurde dann mit dem Freeware-Programm Scion Image 1.62a vorgenommen. Hierzu wurde die Bildanalyseeinheit zunächst mittels eines Objektmikrometers auf metrische Einheiten kalibriert, um die gefärbten Flächen zu messen. Anschließend wurde das Farbbild in ein Schwarz-Weiß-Bild umgewandelt, wobei die schwarzen Flächen den durch Sirius-Red gefärbten Gesamtkollagen und die weißen den nicht gefärbten Arealen entsprachen. Das so entstandene Schwarz-Weiß-Bild wurde, wenn nötig, per Hand an das Farbbild angeglichen, indem der Schwellenwert zur Detektion neu eingestellt wurde. Anschließend wurden die schwarzen Areale gemessen und prozentual auf das Gesamtbild umgerechnet. Diese Bildanalyse konnte mittels eines Analyseprogramms, geschrieben in der von der Arbeitsgruppe eigens entwickelten Makrosprache (auf Pascal basierend), das in das Programm Scion Image integriert worden war, größtenteils automatisiert werden. Von allen ausgemessenen zehn Bildausschnitten pro Organ wurde anschließend der Mittelwert errechnet.

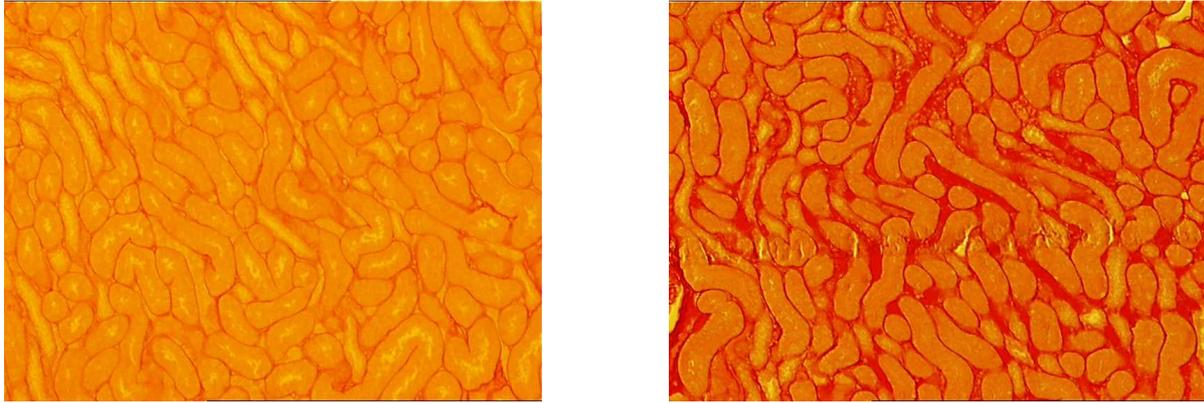


Abb. 9: *Histologische Nierenschnitte der F2-Population SHRSP x F344 in der 14. Woche. links: F2-Tier mit niedriger interstitieller Fibrose der Niere; rechts: F2-Tier mit hoher interstitieller Fibrose der Niere; Sirius-Red-Färbung*

2.2.6.2 Semiquantitative Bewertung der Glomerulosklerose

Für die Auswertung der Glomerulosklerose wurden die Schnitte geblindet und nach einer ersten vorläufigen Durchsicht im zweiten Durchgang bewertet. Die Auswertung erfolgte mittels Durchlichtmikroskopie bei dem besten von acht Schnitten auf einem Objektträger bei einer 200-fachen Vergrößerung. Hierzu wurde wie bei der interstitiellen Fibrose der Nieren ebenfalls das Photomikroskop Axiophot von der Firma Carl Zeiss benutzt. Pro Organ wurden 50 Glomeruli (superfizielle und juxtamedulläre) anhand eines Scores von 0 bis 1 ($0 \cong 0$ bis 10 % Schädigung, $1 \cong 11$ bis 100 % Schädigung) bewertet. Als Parameter der Schädigung galten Einlagerung von PAS-positivem Material in das Mesangium und um die Kapillarschlingen, Zunahme des glomerulären Volumens bzw. bei stärkerer Schädigung narbige Schrumpfung, Hyperzellularität und Abnahme der Kapillarschichtungen. Das Ergebnis der Glomerula mit beziehungsweise ohne Sklerose wurde in Prozent angegeben.

2.2.7 Genom- und Kopplungsanalyse

2.2.7.1 DNA-Isolierung

Für die Isolierung der DNA wurden entweder ein ca. 0,5 cm großes Gewebestück vom Schwanzende der Ratte oder ein ca. 50 mg schweres Stück der Milz benutzt. Das Gewebe wurde zur Verdauung in ein Gemisch aus 700 μ l Lysis-Puffer und 40 μ l Proteinase K (34 U/mg) gegeben und dann für 24 Stunden (Schwanzende) bzw. 48 Stunden (Milz) bei einer Temperatur von 55 $^{\circ}$ C über Kopf drehend im

Hybridisierungssofen verdaut. Im Anschluss wurde der Ansatz für zehn Minuten auf Eis gelagert und mit 300 µl gesättigter Natriumchloridlösung (6 M) versetzt, um eine Reinigung und Eiweißfällung zu erzielen. Nach einer Inkubation von fünf Minuten auf Eis wurde der Ansatz bei 14.000 Upm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. 850 µl des Überstandes wurden anschließend in ein neues Probengefäß gegeben, zur DNA-Fällung mit 1 ml Isopropanol versetzt und dann für 50 Minuten auf Eis gestellt. Nach der Inkubation wurde die Probe erneut mit 14.000 Upm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der dabei entstandene Überstand verworfen. Das so entstandene Pellet wurde mit 500 µl -20 °C kaltem, 70-prozentigem Ethanol gewaschen und noch ein weiteres Mal mit 14.000 Upm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde wieder verworfen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur für 20 Minuten getrocknet, dann in 200 µl Aqua bidest. gegeben und im Anschluss daran zum Auflösen des Pellets über Nacht bei 4 °C gelagert. Für alle aufgeführten Zentrifugationsschritte wurde die Eppendorf Tischzentrifuge 5402 verwendet.

Um die Reinheit und Konzentration der DNA zu bestimmen, wurde die Probe mit Aqua bidest. (1:20) verdünnt und dann die optische Dichte im Photometer bei einer Wellenlänge von 260-280 nm gemessen. Die Konzentration der DNA wurde in der Einheit µg/µl berechnet.

Um eventuelle Tierverwechslungen aufzudecken, wurden die Genotypen von Schwanzende und Milz, also vor und nach der Präparation, miteinander verglichen.

2.2.7.2 Prinzip der Genomanalyse

Die Genotypisierung der Ratten wurde mithilfe von Mikrosatellitenmarkern vorgenommen. Dies sind kurze, repetitive, zwei bis vier Nukleotide umfassende Sequenzen, die vorwiegend in nichtkodierenden Abschnitten der DNA liegen. Aufgrund der hohen Polymorphismusrate der Marker kann man mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) und anschließender Auftrennung mittels Elektrophorese zwischen verschiedenen Individuen oder Rattenstämmen unterscheiden (Stallings et al., 1991; Beckmann & Weber, 1992). Dazu werden zwischen den Parentaltierstämmen SHSRP und F344 polymorphe SSR-Marker (simple sequence repeats), wie zum Beispiel das repetitive Dinukleotid (CA)_n, verwendet. Diese Marker werden mit radioaktiv markierten Primern in einer PCR vervielfältigt und im Anschluss zur Größenauftrennung der Amplifikate auf ein Polyacrylamidgel (PAA-Gel)

aufgetragen. Für die Tiere der F2-Population entstehen so Bandenmuster, die entweder homozygot für das Allel vom Vater, heterozygot oder homozygot für das Allel der Mutter sind (Abbildung 10).

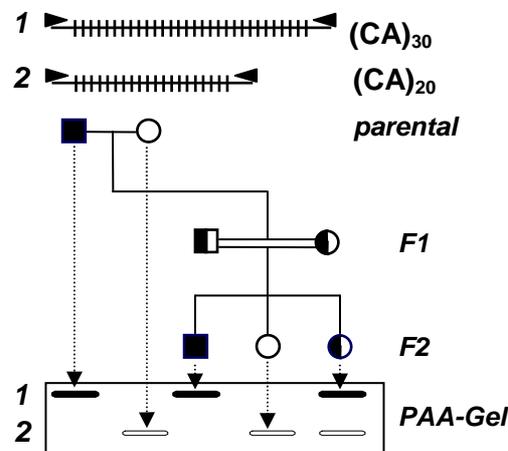


Abb. 10: Genotypisierung mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern
(CA = CA-Repeat, F1 = 1. Filialgeneration, F2 = 2. Filialgeneration, PAA-Gel = Polyacrylamidgel)

2.2.7.3 Genotypen-Charakterisierung der F2-Population

Um herauszufinden, durch welche genetischen Faktoren die verstärkt auftretenden Endorganschäden der Nieren bei der salzsensitiven Hypertonie beeinflusst werden, wurden die Tiere der F2-Population einer Kopplungsanalyse unterzogen. Dabei wurde das gesamte Genom, mit Ausnahme des Y-Chromosoms, untersucht. Als Erstes wurden 46 Extremtiere (23 Tiere mit den niedrigsten und 23 Tiere mit den höchsten Blutdruck- und Albuminwerten) mit insgesamt 227 Primern untersucht. Nach der statistischen Analyse der gewonnenen Daten wurden als zweiter Schritt die übrigen Tiere für die chromosomalen Regionen getestet, an denen der Grenzwert für eine wahrscheinliche Kopplung liegenden LOD (Logarithm of the odds)-Score fast erreicht bzw. überschritten wurde. Die Definition der Grenzwerte für eine wahrscheinliche bzw. signifikante Kopplung erfolgte dabei nach den Richtlinien von Lander und Kruglyak (s. 2.2.7.9).

2.2.7.4 Herstellung der DNA-Stockplatten

Zur rationellen Durchführung der Genotypisierung und zur Vermeidung von DNA-Verwechslungen wurden DNA-Stockplatten pipettiert, die jeweils 5 µl DNA-Lösung (10 ng/µl) pro Loch enthielten. Hierzu wurden Mikrotiterplatten der Firma ABgene verwendet. Anschließend kamen die Platten zur Lagerung für mindestens zwei Stunden bei 37 °C in den Brutschrank. Alle Platten wurden im Anschluss bei -20 °C in einem Gefrierraum gelagert.

2.2.7.5 Primer-Kinasierung

Zum Anhängen von radioaktiv markiertem Phosphat an das 5'-Ende der DNA wurden 0,04 µl Kinasepuffer, 0,017 µl T₄-Polynukleotidkinase (10 U/µl) und 0,0583 µl $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3000 Ci/mM) gemischt. Von dieser Kinase-Mischung wurden 0,11 µl zu 0,22 µl sense(+)-Primer gegeben. Anschließend wurde dieses Gemisch erst für 45 Minuten bei 37 °C und im Anschluss für zehn Minuten bei 65 °C inkubiert. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei 4 °C.

2.2.7.6 Mikrosatellitenmarker

Für die Genom-Analyse wurden zwischen SHRSP und F344 227 polymorphe Mikrosatellitenmarker verwendet, die von folgenden Instituten entwickelt wurden: 1) Medical College of Wisconsin [(Rat) <http://www.rgd.mcw.edu/>], 2) Massachusetts General Hospital [(Mgh) <http://www.genome.wu.edu/>], Massachusetts Institute of Technology [(Mit) <http://www.genome.wu.edu/rat/public>]. Der Abstand zwischen den benachbarten Markern betrug im Durchschnitt 10 centiMorgan (cM).

2.2.7.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, mit der man in kurzer Zeit in vitro bestimmte DNA-Abschnitte mittels Oligonukleotidprimern vervielfältigen kann. 50 ng der genomischen DNA wurden mit 1,3 µl 10x PCR-Puffer, 0,78 µl 25 mM Magnesiumchlorid (1,5 mM Endkonzentration), 1,1 µl 2,5 mM dNTPs (0,2 mM Endkonzentration), 0,22 µl 6 µM antisense(-)-Primer (0,1 µM Endkonzentration), der gesamten Kinasierung, 0,07 µl Taq-Polymerase (0,4 U/µl Endkonzentration) und Aqua bidest. zu einem Gesamtvolumen

von 10 µl vermischt. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten mit Folie verschweißt und dann das 120-minütige Programm YONH1 der PCR-Maschine gestartet.

Nach einer initialen Denaturierung von zwei Minuten bei 92 °C wurde für 30 Zyklen eine PCR für 15 Sekunden bei 92 °C, eine Minute Primer-spezifische Annealingtemperatur, eine Minute bei 72 °C und sieben Minuten bei 72 °C angeschlossen. Einige Primer wurden zur spezifischeren Bindung und zum Erhalt deutlicher Amplifikate einem Touchdown-Programm unterzogen (*Tabelle 1*). Die Aufbewahrung der Proben erfolgte nach Beendigung der PCR im Kühlschrank bei 4 °C.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	94 °C	3 min
2	65 °C	45 sec
3	72 °C	45 sec
4	94 °C	30 sec
5	64 °C	45 sec
6	72 °C	45 sec
7	94 °C	30 sec
8	63 °C	45 sec
9	72 °C	45 sec
10	94 °C	30 sec
11	62 °C	45 sec
12	72 °C	45 sec
13	94 °C	30 sec
14	61 °C	45 sec
15	72 °C	45 sec
16	94 °C	30 sec
17	30 Zyklen bei 60 °C für 45 sec	
18	72 °C	45 sec
19	94 °C	30 sec
20	72 °C	5 min

Tabelle 1: Touch-Down-PCR-Programm 65 bis 60 °C

2.2.7.8 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte aufgrund der 14-tägigen Halbwertszeit des $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP's innerhalb von zwei Wochen nach Durchführung der PCR auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel. Hierzu wurden eine Glasplatte (45 x 35 cm) mit Ethanol (70 %) und Aceton und eine zweite, kleinere Glasplatte nur mit Ethanol (70 %) gereinigt. Anschließend wurde die kleinere Glasplatte mit Acrylease-Spray beschichtet. Danach wurden die beiden Platten, an der Längsseite durch 0,4 mm dicke Spacer

getrennt, aufeinander gelegt und verklammert und anschließend an der schmalen Unterseite zum Gießen des Gels mit Paketklebeband verschlossen.

Für die Herstellung des Polyacrylamidgels wurden 31,5 g Harnstoff zur Denaturierung der DNA, 7,0 ml 10x TBE, 10,5 ml Rotiphorese und Aqua bidest. zu einem Gesamtvolumen von 70 ml gemischt und anschließend bei 4 °C gelagert. Zum Auspolymerisieren wurde der Gelansatz mit 40 µl Temed zur Quervernetzung und 400 µl Ammoniumpersulfat-Lösung (APS 100 mg/ml) zum Starten der Reaktion gemischt. Nachdem sämtliche Luftblasen aus dem Gelmix verschwunden waren, wurde dieser sofort blasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und der Haifischkamm zur Schaffung eines glatten Gelsaumes umgekehrt an der oberen Schmalseite ca. 5 mm in die Gelflüssigkeit geschoben. Im Anschluss an das Auspolymerisieren des Gels innerhalb von mindestens 90 Minuten wurde der Haifischkamm gezogen und mit dem Zinken voran 1-2 mm tief in die Gelmatrix geschoben. Klemmen und Klebeband wurden entfernt.

Es wurden jeweils 10 µl Formamid-Laufpuffer zu den einzelnen Proben gegeben und diese anschließend bei 94 °C für fünf Minuten denaturiert. 3 µl der jeweiligen Proben wurden mit einer Mehrkanal-Spritze in das eingespannte Gel aufgetragen, das dann in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer kam. Anschließend liefen hier die Proben, regelmäßig kontrolliert, für ca. 150 Minuten bei 75 Watt und 300 mA. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde die Gelmatrix von den Glasplatten getrennt, auf Gel-Blotting-Papier gezogen, dann in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Röntgenkassette gelegt. Die Expositionszeit des Röntgenfilms betrug bei -20 °C ca. 18 Stunden.

2.2.7.9 Statistische Analyse

Für eine erste chromosomale Lokalisation der Quantitative Trait Loci (QTL) wurde das Programm MapManager QTXb03 verwendet. Für die endgültige chromosomale Lokalisation und die im Anschluss durchgeführte Linkage-Analyse der F₂-Generation wurde das Computerprogramm MapMaker/QTL von Lander benutzt. Die genetischen Distanzen in centiMorgan wurden mit Hilfe dieses Programms über die Rekombinationsfrequenz mittels des Kosambi-Algorithmus errechnet (Lander et al., 1987; Lander und Botstein, 1989). Die vom MapMaker/QTL erhaltenen LOD-Scores wurden nach den Empfehlungen von Lander und Kruglyak (Lander und Kruglyak, 1995)

interpretiert. Danach gilt ein LOD-Score von $\geq 4,3$ als signifikante Kopplung, während ein LOD-Score von $\geq 2,8$ einer wahrscheinlich signifikanten Kopplung entspricht. Damit der genetische Einfluss der Parentaltierstämme auf den jeweiligen Phänotyp festzustellen ist, wurden die Marker, die am dichtesten am ermittelten QTL-Peak lagen, einer Genotyp-Phänotyp-Analyse mit Hilfe einer one-way-Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Die Ermittlung der p-Werte wurde mit dem Computerprogramm ANOVA von SPSS 10.0 vorgenommen. Die Korrelationen zwischen den einzelnen Phänotypen wurden mittels einer linearen Regressionsanalyse mit dem Computerprogramm SPSS untersucht. Als Signifikanzschwelle galt hierbei ein p-Wert von $< 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung der Parentaltierstämme SHRSP und F344

Vor Beginn der experimentellen Studien wurde die genetische Reinheit der Parentaltierstämme SHSRP und F344 über eine systematische Genomanalyse überprüft. Hierdurch wurde der Beweis erbracht, dass alle Tiere innerhalb eines Stammes nach der Genotypisierung das gleiche homozygote Bandenmuster aufwiesen. Dadurch existierte an jedem untersuchten Loci eine genetische Homogenität.

3.2 Phänotypisierung der Parentaltierstämme SHRSP und F344

3.2.1 Gruppeneinteilung der Parentaltierstämme SHRSP und F344

Für die Überprüfung eines möglichen Zusammenhanges zwischen einer gesteigerten Salzzufuhr und der arteriellen Hypertonie mit Nephropathie wurden mit Beginn der sechsten Lebenswoche die beiden Parentaltierstämme in drei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe bestand aus SHRSP-Tieren, die eine achtwöchige Niedrigsalzdiät mit 0,2 % NaCl im Futter erhielten. Die beiden anderen Gruppen, bestehend aus SHRSP beziehungsweise F344, bekamen eine achtwöchige Hochsalzdiät mit 4 % NaCl im Futter. In der 14. Lebenswoche wurden mittels der Tailcuff-Methode der systolische Blutdruck gemessen sowie zusätzlich die Protein- und Albuminexkretion bestimmt. Nach der Tötung der Tiere wurden das Körpergewicht sowie die einzelnen Organgewichte ermittelt. Die hierbei erhobenen phänotypischen Befunde sind in Tabelle 2 dargestellt.

	F344 (4 %) [n = 6]	SHRSP (0,2 %) [n = 8]	SHRSP (4 %) [n = 6]
SBD (mmHg)	132,83 ± 7,55	172,00 ± 13,19	262,08 ± 22,83
UAE (mg/24h)	0,22 ± 0,11	0,71 ± 0,46	122,31 ± 77,17
UPE (mg/24h)	20,51 ± 4,61	14,57 ± 9,20	154,82 ± 119,68
KG (g)	286,68 ± 9,93	230,63 ± 29,45	199,17 ± 23,33
NG li. (g)	0,95 ± 0,05	0,94 ± 0,11	0,99 ± 0,12
KG re. (g)	0,94 ± 0,04	0,98 ± 0,13	0,96 ± 0,06
NG ges. (g)	1,89 ± 0,07	1,89 ± 0,22	1,90 ± 0,24
rel. NG li.	0,33 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,50 ± 0,10
rel. NG re.	0,33 ± 0,02	0,42 ± 0,05	0,46 ± 0,07
rel. NG ges.	0,66 ± 0,03	0,84 ± 0,08	0,94 ± 0,19

Tabelle 2: *Ergebnis der Phänotypen-Charakterisierung der Parentaltierstämme F344 mit Hochsalzdiät (4 % NaCl), SHRSP mit Nidrigsalzdiät (0,2 % NaCl) und SHRSP mit Hochsalzdiät (4 % NaCl) in der 14. Woche*

(SBD = systolischer Blutdruck, UAE = Albuminausscheidung im Urin, UPE = Proteinausscheidung im Urin, KG = Körpergewicht, NG li. = Gewicht der linken Niere, NG re. = Gewicht der rechten Niere, NG ges. = Nierengesamtgewicht, rel. NG li. = relatives Gewicht der linken Niere, rel. NG re. = relatives Gewicht der rechten Nieren, rel. NG ges. = relatives Nierengesamtgewicht)

3.2.2 Systolischer Blutdruck

Der Parentaltierstamm F344 zeigte unter der Hochsalzdiät mit 4 % NaCl physiologische Blutdruckwerte mit einem Mittelwert bei den sechs Tieren von 132,83 ± 7,55 mmHg. Das Minimum lag bei 125 mmHg und das Maximum bei 145 mmHg. Bei den acht Tieren des SHRSP-Stammes, die mit 0,2-prozentiger Nidrigsalzdiät gefüttert wurden, lagen die Blutdruckwerte signifikant höher ($p < 0,0001$). Der Mittelwert lag bei 172,00 ± 13,19 mmHg, die Blutdruckwerte lagen dabei zwischen 158,5 und 196 mmHg. Unter der 4-prozentigen Hochsalzdiät kam es bei den sechs SHRSP-Tieren noch zu einem weiteren signifikanten Blutdruckanstieg ($p < 0,0001$) im Vergleich zu denen unter der Nidrigsalzdiät.

Der Mittelwert dieser Gruppe lag bei 262,08 ± 22,83 mmHg und die Werte reichten von 225 bis 290 mmHg (*Abbildung 11*).

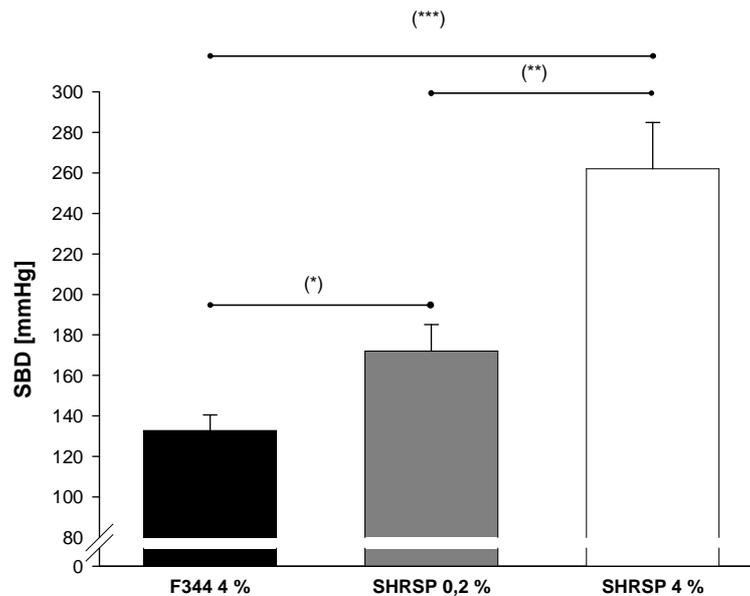


Abb. 11: Systolischer Blutdruck (SBD) am Ende der 14. Lebenswoche von F344-Tieren mit Hochsalzdiät (4 % NaCl), sowie SHRSP-Tieren mit Nidrigsalzdiät (0,2 % NaCl) beziehungsweise Hochsalzdiät (4 % NaCl)

* $p < 0,001$; ** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0001$

3.2.3 Endorganschäden

Um den Einfluss der Salzsensitivität auf die Ausprägung der Endorganschäden zu beurteilen, wurden zum einem die Protein- und Albuminurie im 24-Stunden-Urin gemessen und zum anderen die Nierengewichte bestimmt.

Die Parentaltiere des mit einer Hochsalzdiät gefütterten F344-Stammes entwickelten eine Proteinexkretion im 24-Stunden-Urin von $20,51 \pm 4,61$ mg/24h, wobei die Werte bei diesen Tieren im Bereich von 16,80 bis 27,96 mg/24h lagen. Die SHRSP-Tiere, die eine Nidrigsalzdiät mit 0,2 % NaCl erhielten, hatten hingegen niedrigere Werte, wobei diese Änderung nicht signifikant war. Hier lag der Mittelwert bei $14,57 \pm 9,20$ mg/24h, das Minimum bei diesen Tieren lag bei 0,74 mg/24h und das Maximum bei 27,79 mg/24h.

Bei den SHRSP-Tieren, die zuvor eine achtwöchige Hochsalzdiät erhielten, kam es hingegen zu einem signifikanten Anstieg der Proteinurie ($p < 0,01$). Der Mittelwert bei diesen Tieren lag hier bei $154,82 \pm 119,68$ mg/24h und die Werte lagen im Bereich von 14,74 bis 283,75 mg/24h (Abbildung 12).

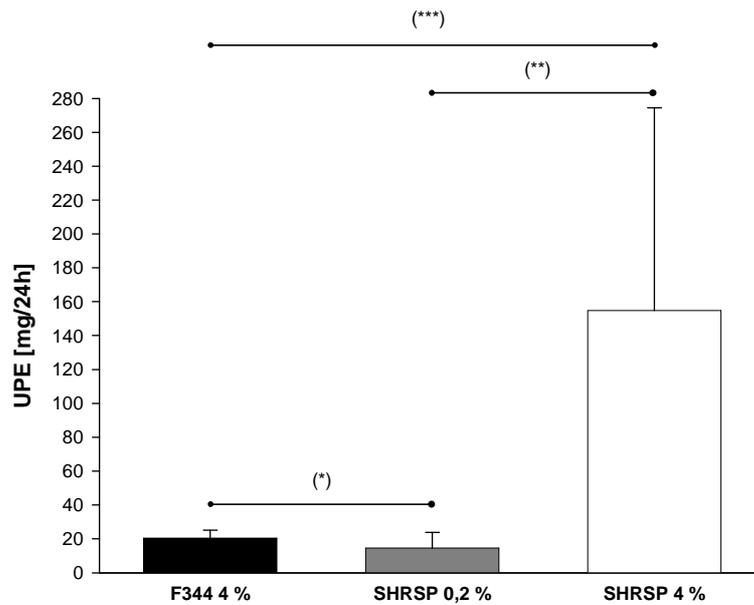


Abb. 12: *Proteinurie (UPE) im 24-Stunden-Urin am Ende der 14. Lebenswoche von F344-Tieren mit Hochsalzdiät (4 % NaCl), sowie SHRSP-Tieren mit Nidrigsalzdiät (0,2 % NaCl) beziehungsweise Hochsalzdiät (4 % NaCl)*

* $p = 1,0$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$

Bei der Albuminurie waren die Werte bei den F344-Tieren mit Hochsalzdiät am niedrigsten und bei SHRSP-Tieren mit Hochsalzdiät am höchsten. Der Mittelwert der Albuminexkretion lag bei mit Hochsalzdiät gefütterten F344-Tieren bei $0,22 \pm 0,11$ mg/24h und die Werte reichten von 0,09 bis 0,41 mg/24h. Ein leichter Anstieg war bei SHRSP-Tieren mit einer Nidrigsalzdiät zu verzeichnen. Hier lag der Mittelwert bei $0,71 \pm 0,46$ mg/24h, wobei die Werte bei diesen acht Tieren im Bereich von 0,17 bis 1,46 mg/24h lagen. Auch hier war der Unterschied jedoch genau wie bei der Proteinurie nicht signifikant. Bei der Albuminurie kam es bei den SHRSP-Tieren, die zuvor eine Hochsalzdiät erhielten, ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,001$). Der Mittelwert lag bei $122,31 \pm 77,17$ mg/24h und die Werte bei diesen sechs Tieren reichten von 1,51 bis 210,00 mg/24h (Abbildung 13).

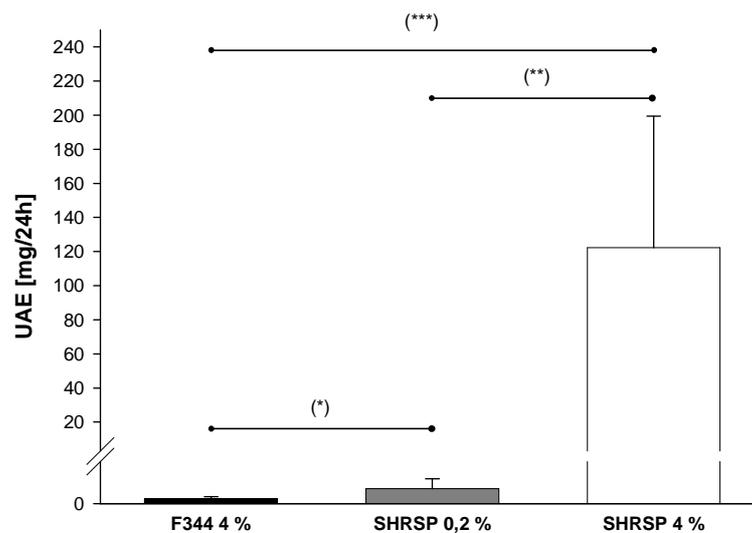


Abb. 13: Albuminurie (UAE) im 24-Stunden-Urin am Ende der 14. Lebenswoche von F344-Tieren mit Hochsalzdiät (4 % NaCl), sowie SHRSP-Tieren mit Nidrigsalzdiät (0,2 % NaCl) beziehungsweise Hochsalzdiät (4 % NaCl)
 * $p = 1,0$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$

Beim relativen Nierengesamtgewicht lag der Mittelwert bei F344-Tieren mit einer Hochsalzdiät bei $0,66 \pm 0,03$, die Werte reichen von 0,61 bis 0,70. Bei den Tieren des SHRSP-Stammes, die eine Nidrigsalzdiät erhielten, lag der Mittelwert bei $0,84 \pm 0,08$, wobei die Werte bei diesen Tieren zwischen 0,73 und 0,95 lagen. Auch das relative Gesamt nierengewicht war bei den SHRSP-Tieren mit einer Hochsalzdiät am höchsten. Der Mittelwert lag bei $0,94 \pm 0,19$ und die Werte lagen im Bereich von 0,72 bis 1,13. Signifikant waren hierbei der Anstieg zu F344 mit Hochsalzdiät und SHRSP mit 0,2 % und 4 % Kochsalzdiät ($p < 0,01$). Der Anstieg beim relativen Nierengesamtgewicht von SHRSP mit Nidrigsalzdiät zu Hochsalzdiät war hingegen nicht signifikant ($p = 0,3$) (Abbildung 14).

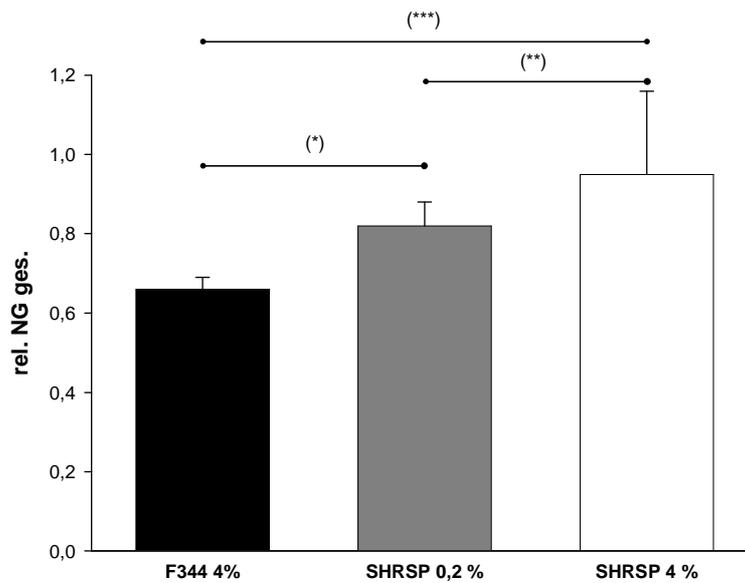


Abb. 14: relatives Gesamtnierengewicht (rel. NG ges.) nach der Tötung der Tiere in der 14. Woche von F344-Tieren mit Hochsalzdiät (4 % NaCl), sowie SHRSP-Tieren mit Niedrigsalzdiät (0,2 % NaCl) beziehungsweise Hochsalzdiät (4 % NaCl)
* $p = 0,01$; ** $p = 0,3$; *** $p < 0,01$

3.3 Kosegregationsanalyse

3.3.1 Phänotypen-Charakterisierung der F2-Tiere SHRSP x F344

Um den Einfluss der gesteigerten Salzzufuhr auf die renalen Endorganschäden und den Blutdruck zu untersuchen, wurden die 232 männlichen Tiere der F2-Generation ab der sechsten Woche auf eine standardisierte Hochsalzdiät gesetzt. In der 14. Woche erfolgte die Phänotypisierung mit Hilfe von systolischen Blutdruckmessungen und Messung von Albumin und Gesamtprotein im 24-Stunden-Sammelurin. Die Organentnahme erfolgte ebenfalls zu diesem Zeitpunkt. Nachdem die Nieren gewogen wurden, erfolgte die histologische Untersuchung der Organe. Die Ergebnisse der Phänotypen-Charakterisierung sind in Tabelle 3 dargestellt.

	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum
SBD (mmHg)	186,84	26,13	139,00	284,00
UAE (mg/24h)	3,38	13,17	0,04	170,88
UPE (mg/24h)	13,26	12,63	1,12	156,80
RIF (%)	6,76	1,48	2,54	11,99
GSI (%)	98,45	2,12	90,00	100,00
KG (g)	287,09	26,18	177,07	361,82
NG li. (g)	1,09	0,14	0,78	2,07
NG re. (g)	1,10	0,14	0,81	1,99
NG ges. (g)	2,19	0,26	1,59	3,92
rel. NG li.	0,38	0,05	0,29	0,77
rel. NG re.	0,10	0,01	0,07	0,21
rel. NG ges.	0,20	0,01	0,15	0,24

Tabelle 3: Ergebnis der Phänotypen-Charakterisierung der F2-Tiere SHRSP x F344 in der 14. Woche (n = 232)

(RIF = interstitielle Fibrose der Niere, GSI = Glomeruloskleroseindex)

Die Verteilung des Blutdrucks lag in der 14. Woche im Bereich zwischen 139 und 284 mmHg mit einem Mittelwert von $186,84 \pm 26,13$ mmHg. Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich eine unimodale linkssteile Normverteilung (Abbildung 15).

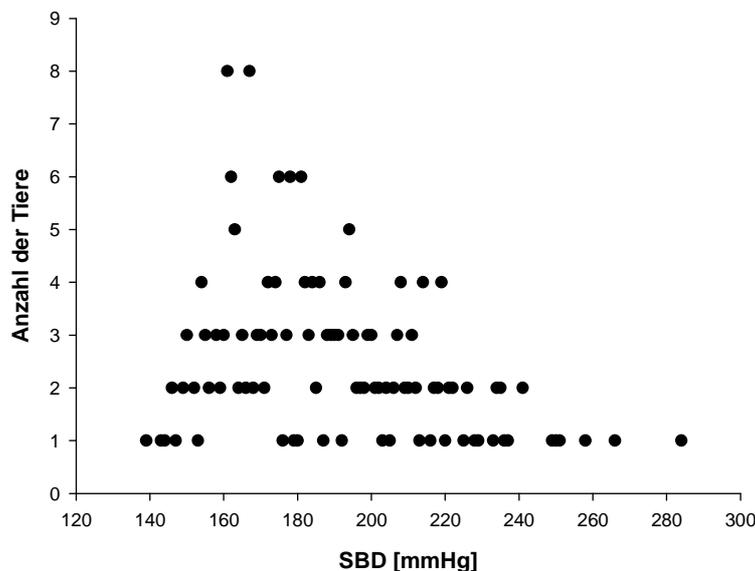


Abb. 15: Verteilung des systolischen Blutdrucks (SBD) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche

Die Verteilung der Albuminexkretion im Urin lag in der 14. Woche im Bereich zwischen 0,04 und 170,88 mg/24h mit einem Mittelwert von $3,38 \pm 13,17$ mg/24h. Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich eine unimodale linkssteile Normverteilung (*Abbildung 16*).

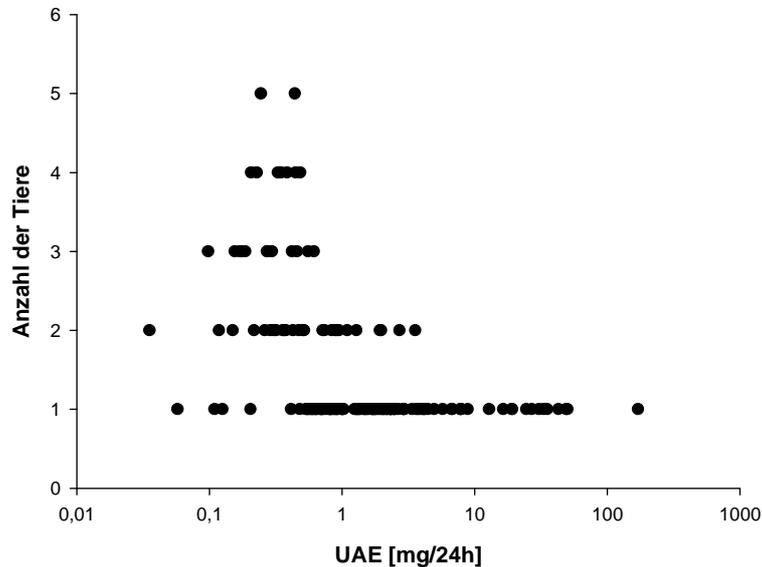


Abb. 16: Verteilung der Albuminexkretion im Urin (UAE) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche. UAE im logarithmierten Maßstab aufgetragen.

Die Korrelationsanalyse zwischen systolischem Blutdruck und Albuminexkretion im Urin ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,17$ ($r^2 = 0,029$) und einem p-Wert von 0,009. Somit zeigte sich hier eine schwache Korrelation dieser beiden Parameter. 2,9 % der Gesamtvarianz der Albuminexkretion im Urin waren damit durch den Blutdruck zu erklären (*Abbildung 17*).

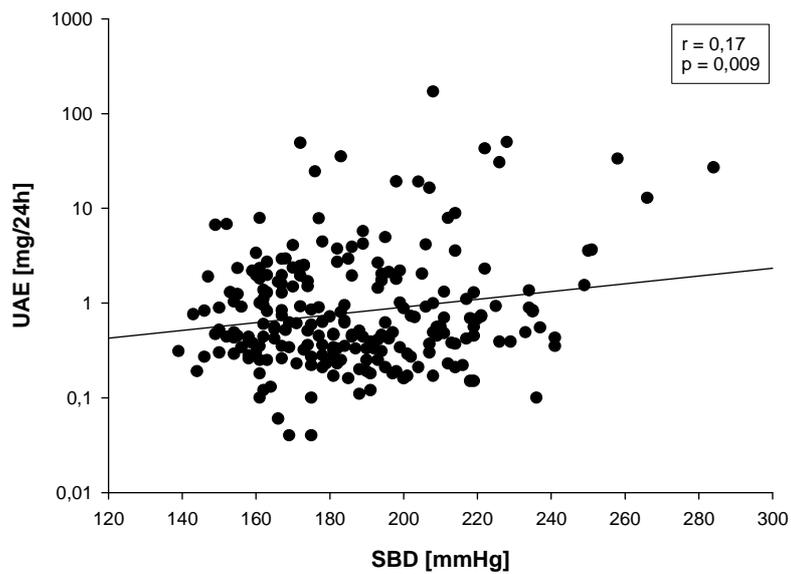


Abb. 17: Korrelation zwischen systolischem Blutdruck (SBD) und Albuminexkretion im Urin (UAE) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche ($n = 231$). UAE im logarithmierten Maßstab aufgetragen.

Die Verteilung der Gesamtproteinexkretion im Urin lag in der 14. Woche im Bereich zwischen 1,12 und 156,80 mg/24h mit einem Mittelwert von $13,26 \pm 12,63$ mg/24h. Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich eine unimodale Normverteilung (Abbildung 18).

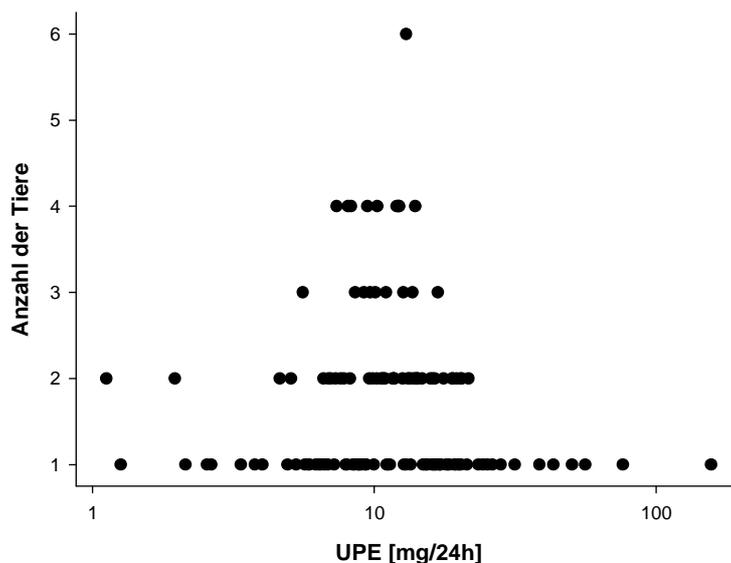


Abb. 18: Verteilung der Gesamtproteinexkretion im Urin (UPE) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche. UPE im logarithmierten Maßstab aufgetragen.

Die Korrelationsanalyse zwischen systolischem Blutdruck und Gesamtproteinexkretion in Urin ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,16$ ($r^2 = 0,026$) und einem p-Wert von 0,003 und somit eine schwache Korrelation der beiden Parameter. 2,6 % der Gesamtvarianz der Proteinexkretion im Urin waren damit durch den Blutdruck zu erklären (*Abbildung 19*).

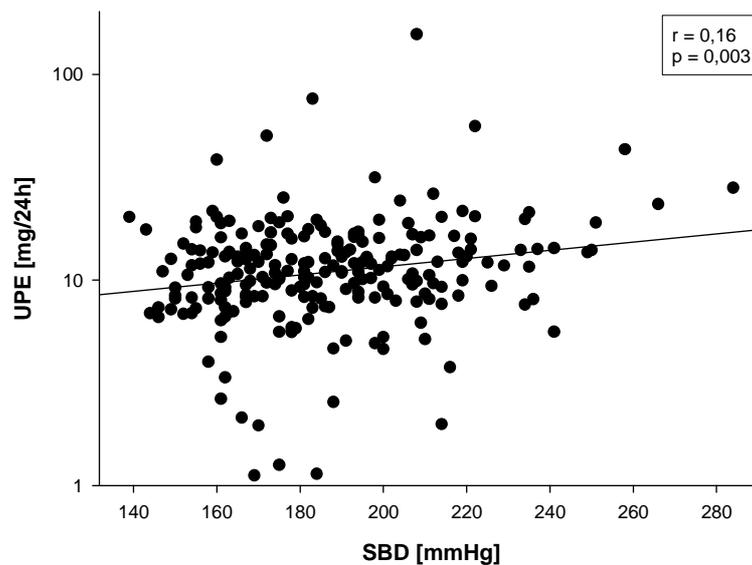


Abb. 19: *Korrelation zwischen systolischem Blutdruck (SBD) und Gesamtproteinexkretion im Urin (UPE) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche (n = 224). UPE im logarithmierten Maßstab aufgetragen.*

Die Verteilung der interstitiellen Fibrose der Niere lag in der 14. Woche zwischen 2,5 und 12,0 % mit einem Mittelwert von $6,8 \pm 1,5$ %. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich eine unimodale linkssteile Normverteilung (*Abbildung 20*).

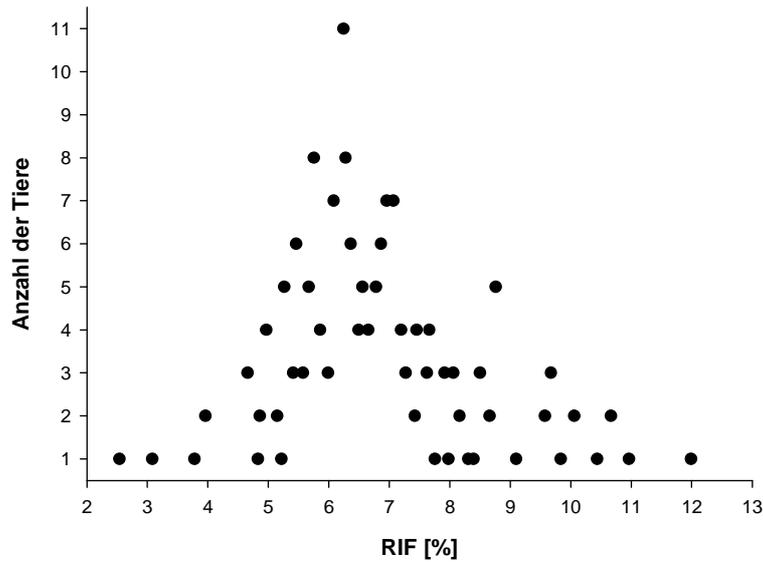


Abb. 20: Verteilung der Interstitiellen Fibrose der Niere (RIF) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche

Die Korrelationsanalyse zwischen systolischem Blutdruck und interstitieller Fibrose der Niere ergab mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,08$ und einem p-Wert von 0,31 keine signifikante Korrelation der beiden Parameter (Abbildung 21).

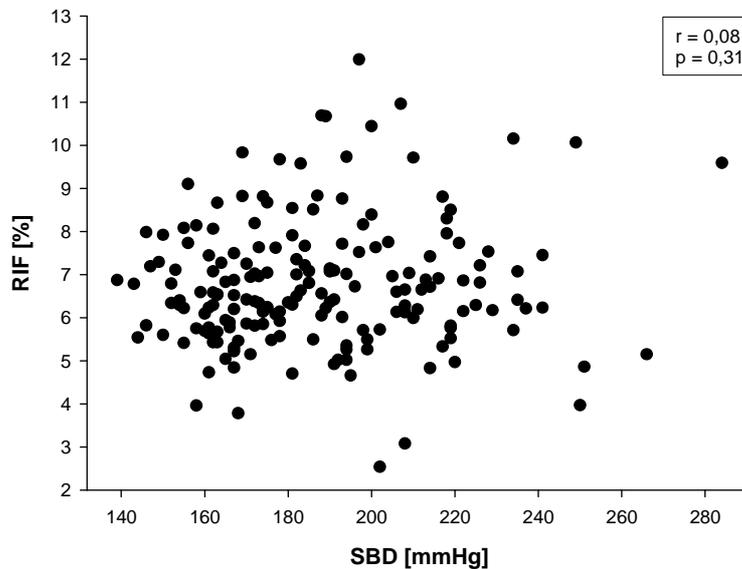


Abb. 21: Korrelation zwischen systolischem Blutdruck (SBD) und interstitieller Fibrose der Niere (RIF) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche ($n = 182$)

Die Verteilung des Glomerulosklerose lag in der 14. Woche zwischen 90 und 100 % mit einem Mittelwert von $98,5 \pm 2,1$ % (*Abbildung 22*).

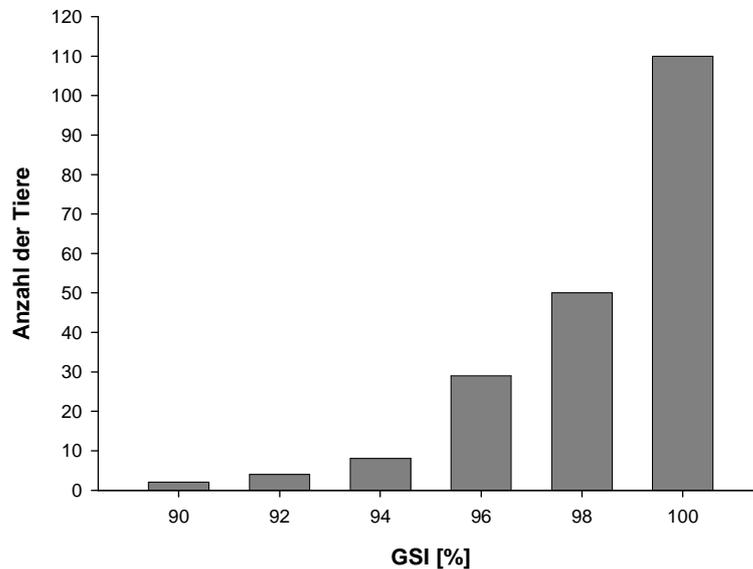


Abb. 22: Verteilung des Glomeruloskleroseindex bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche

Die Korrelationsanalyse zwischen systolischem Blutdruck und Glomerulosklerose ergab mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,03$ und einem p-Wert von 0,67 keine signifikante Korrelation der beiden Parameter (*Abbildung 23*).

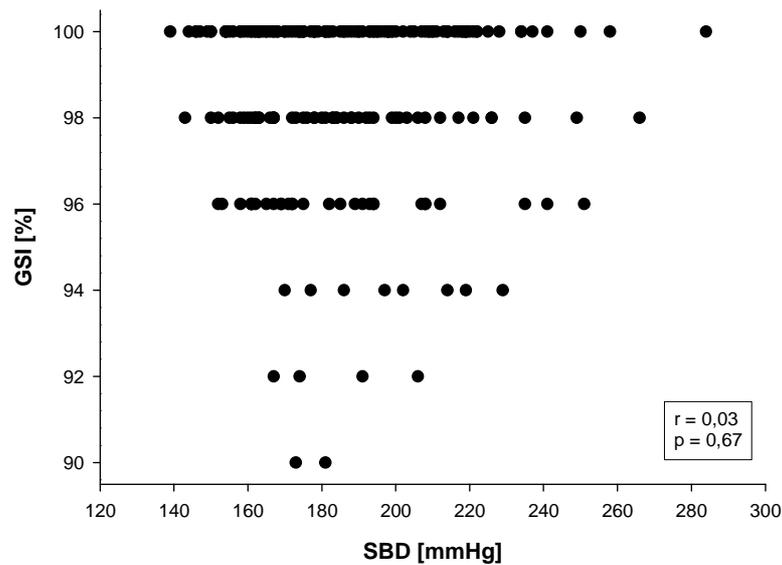


Abb. 23: Korrelation zwischen systolischem Blutdruck (SBD) und Glomeruloskleroseindex (GSI) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche ($n = 204$)

Die Korrelationsanalyse zwischen Albuminexkretion im Urin und interstitieller Fibrose der Niere ergab mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,001$ und einem p-Wert von 0,99 keine signifikante Korrelation der beiden Parameter (Abbildung 24).

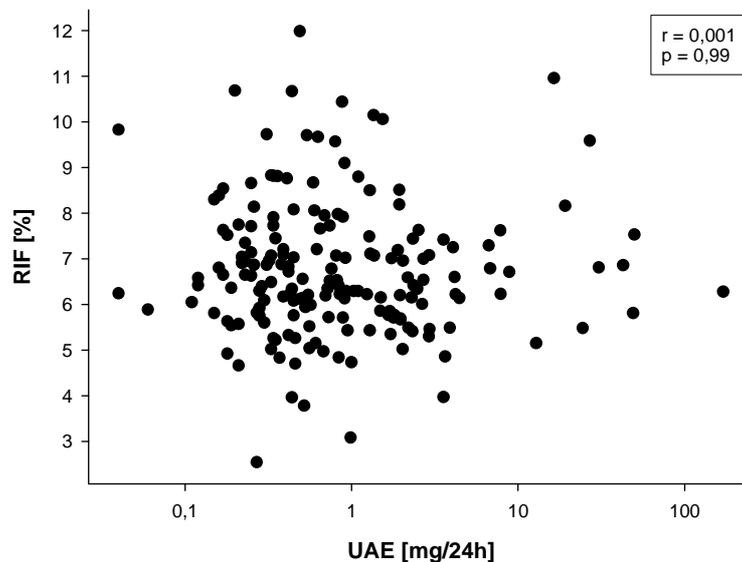


Abb. 24: Korrelation zwischen Albuminexkretion im Urin (UAE) und interstitieller Fibrose der Niere (RIF) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche ($n = 182$). UAE im logarithmierten Maßstab aufgetragen.

Die Korrelationsanalyse zwischen Proteinexkretion im Urin und interstitieller Fibrose der Niere ergab mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0,04$ und einem p-Wert von 0,60 keine signifikante Korrelation der beiden Parameter (*Abbildung 25*).

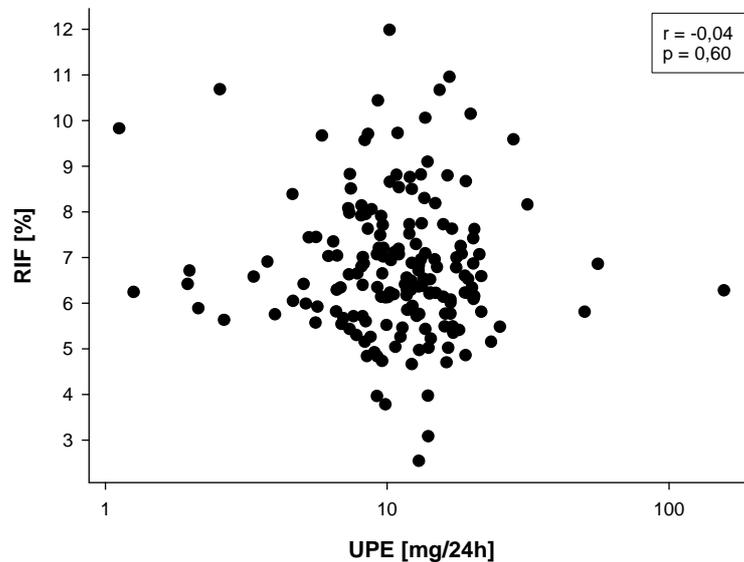


Abb. 25: *Korrelation zwischen Proteinexkretion im Urin (UPE) und interstitieller Fibrose der Niere (RIF) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche (n = 174). UPE im logarithmierten Maßstab aufgetragen.*

Die Korrelationsanalyse zwischen Albuminexkretion im Urin und Glomerulosklerose ergab mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0,42$ und einem p-Wert von 0,55 keine signifikante Korrelation der beiden Parameter (*Abbildung 26*).

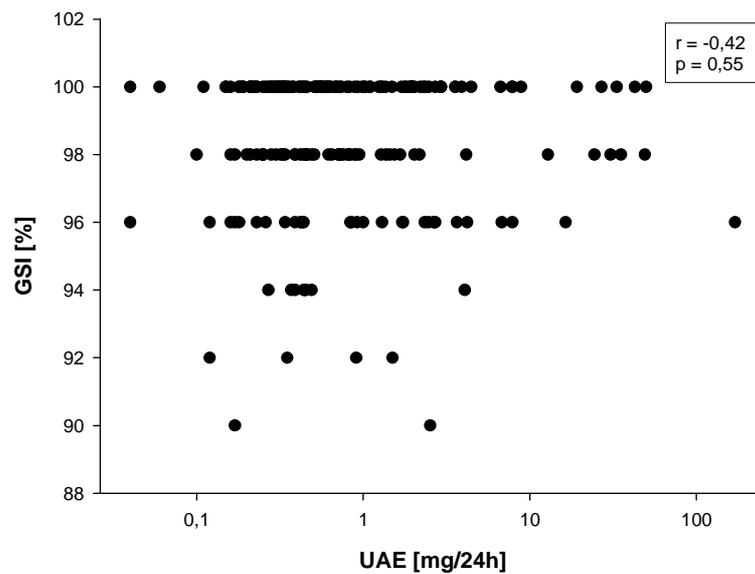


Abb. 26: Korrelation zwischen Albuminexkretion im Urin (UAE) und Glomeruloskleroseindex (GSI) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche ($n = 203$). UAE im logarithmierten Maßstab aufgetragen.

Die Korrelationsanalyse zwischen Proteinexkretion im Urin und Glomerulosklerose ergab mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = -0,007$ und einem p-Wert von 0,35 keine signifikante Korrelation der beiden Parameter (Abbildung 27).

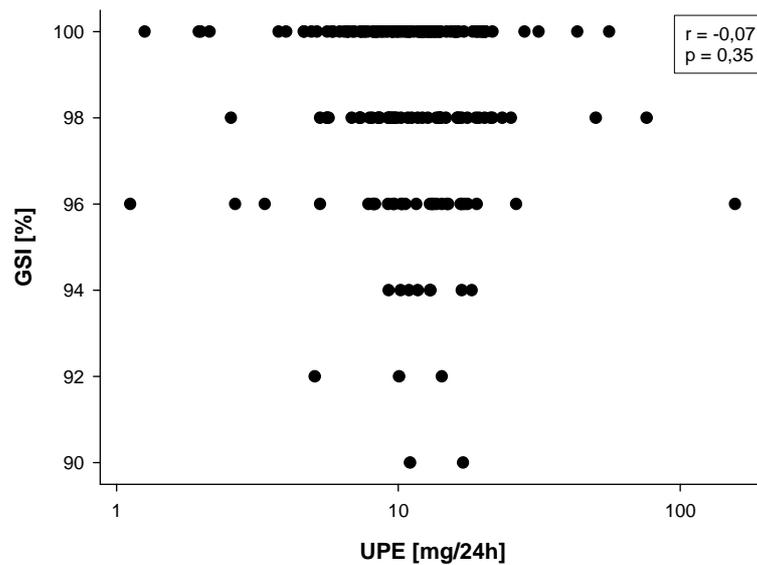


Abb. 27: Korrelation zwischen Proteinexkretion im Urin (UPE) und Glomeruloskleroseindex (GSI) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche (n = 196). UPE im logarithmierten Maßstab aufgetragen.

3.3.2 Genotypen-Charakterisierung der F2-Tiere SHRSP x F344

Um die Genotypen-Charakterisierung der F2-Tiere durchzuführen, mussten zuvor polymorphe Mikrosatellitenmarker zwischen den Parentaltierstämmen identifiziert werden, wobei der Abstand zwischen den einzelnen Markern durchschnittlich 10 cM betrug. Hieraus ergaben sich 227 polymorphe Marker, die für die Genotypisierung verwendet wurden.

3.3.3 QTL-Mapping und Kopplungsanalysen

Die Genome der beiden kontrastierenden Parentaltierstämme SHRSP und F344 vermischten sich in der F2-Population nach den Mendelschen Regeln, d.h. die Tiere waren entweder homozygot für SHRSP, homozygot für F344 oder heterozygot. In Tabelle 4 sind die QTL dargestellt, die durch die genomweite Kopplungsanalyse detektiert wurden.

Parameter	Locus	SS (n)	SF (n)	FF (n)	LOD- Score	p (ANOVA)	Anteil an Gesamt- varianz (%)
UAE (mg/24h)	<i>D1Rat287</i>	9,44 (53)	1,94 (118)	0,87 (60)	4,2	0,0005	8,6
SBD (mmHg)	<i>D3Rat45</i>	195,9 (65)	186,1 (106)	178,5 (61)	3,2	0,0007	6,2
SBD (mmHg)	<i>D4Rat94</i>	197,7 (61)	185,5 (118)	178,0 (51)	6,3	0,0002	11,8
UPE (mg/24h)	<i>D6Rat146</i>	19,64 (45)	12,18 (111)	10,80 (68)	4,6	0,0005	9,0

Tabelle 4: *Ergebnis der Kopplungsanalyse der F2-Population SHRSP x F344*
(SS = homozygot SHRSP, SF = heterozygot, FF = homozygot F344, n = Anzahl, UAE = Albuminexkretion im Urin, SBD = systolischer Blutdruck, UPE = Gesamtproteinexkretion im Urin)
LOD-Score $\geq 4,3 \rightarrow$ signifikante Kopplung (fett), LOD-Score $\geq 2,8 \rightarrow$ wahrscheinlich signifikante Kopplung

Durch die Auswertung der Kopplungsanalyse konnte ein QTL auf Chromosom 1 für die Albuminexkretion im Urin am Marker *D1Rat287* mit einem wahrscheinlich signifikanten LOD-Score von 4,2 ($p = 0,0005$) festgestellt werden. (*Abbildung 28*).

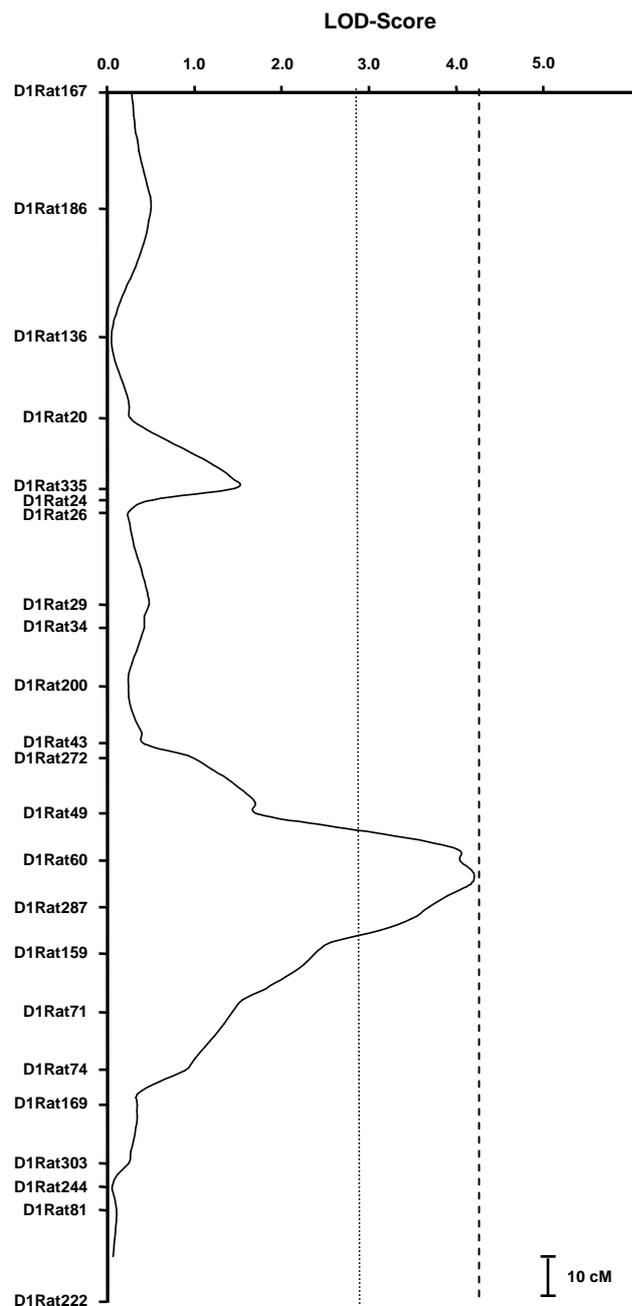


Abb. 28: *QTL für die Albuminexkretion logarithmiert auf Chromosom 1 in der 14. Woche. Maximaler LOD-Score = 4,2. gepunktete Linie bei LOD-Score 2,8 = wahrscheinlich signifikante Kopplung, gestrichelte Linie bei LOD-Score 4,3 = signifikante Kopplung*

Wenn beide Allele von SHRSP stammen, bewirkt dies eine Zunahme der Albuminexkretion im Urin: die Albuminexkretion verstärkt sich um 8,57 mg/24h im Vergleich zu den F2-Tieren, bei denen beide Allele von F344 stammen. Die Albuminexkretion im Urin in Abhängigkeit vom Genotyp am Marker *D1Rat287* ist in der

Abbildung 29 graphisch dargestellt. Der kontinuierliche Anstieg der Albuminexkretion im Urin mit einem signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen den für das SHRSP-Allel homozygoten und heterozygoten Tieren deutet hierbei auf einen kodominanten Vererbungsgang hin. 8,6 % der Gesamtvarianz der Albuminexkretion im Urin sind durch diesen QTL erklärbar.

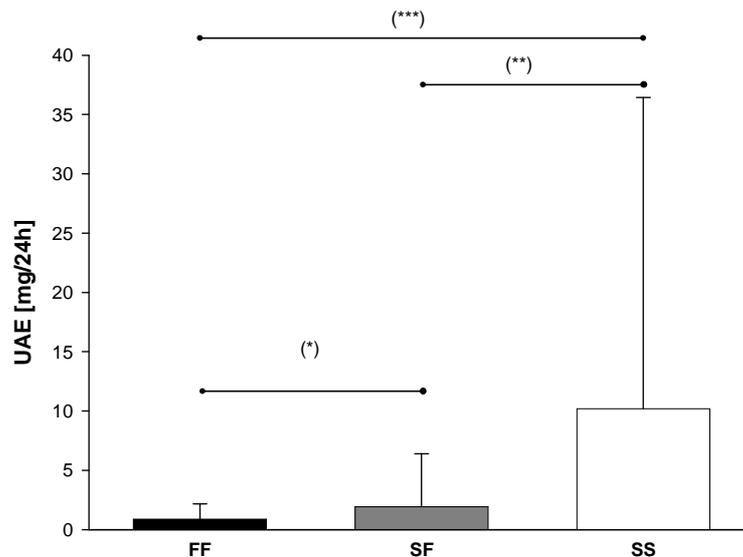


Abb. 29: Albuminexkretion in Abhängigkeit vom Genotyp am Marker D1Rat287 auf Chromosom 1

(FF = homozygot F344, SF = heterozygot, SS = homozygot SHRSP)

* $p = 1,0$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,01$

Des Weiteren wurde durch die Kopplungsanalyse für den systolischen Blutdruck ein QTL auf Chromosom 3 am Marker D3Rat45 mit einem wahrscheinlich signifikanten LOD-Score von 3,2 ($p = 0,0007$) identifiziert (Abbildung 30).

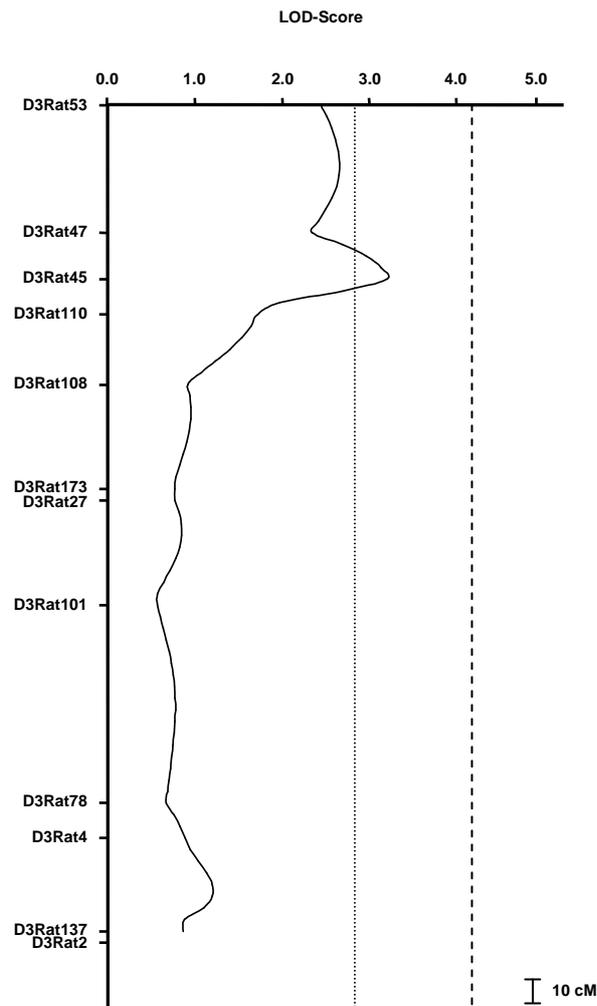


Abb. 30: QTL für den systolischen Blutdruck auf Chromosom 3 in der 14. Woche. Maximaler LOD-Score = 3,2.

Bei homozygoten F₂-Tieren für SHRSP zeigt sich eine Zunahme des systolischen Blutdrucks um 17,4 mmHg gegenüber homozygoten F₂-Tieren für F344. Der systolische Blutdruck in Abhängigkeit vom Genotyp am Marker *D3Rat45* ist in Abbildung 31 graphisch dargestellt. Da ein kontinuierlicher Anstieg der Hypertonie mit einem signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen den für das SHRSP-Allel heterozygoten und homozygoten Tieren vorhanden ist, lässt dies wie bei der Albuminurie ebenfalls auf einen kodominanten Erbgang schließen. 6,2 % der Gesamtvarianz des systolischen Blutdrucks sind durch diesen QTL erklärbar.

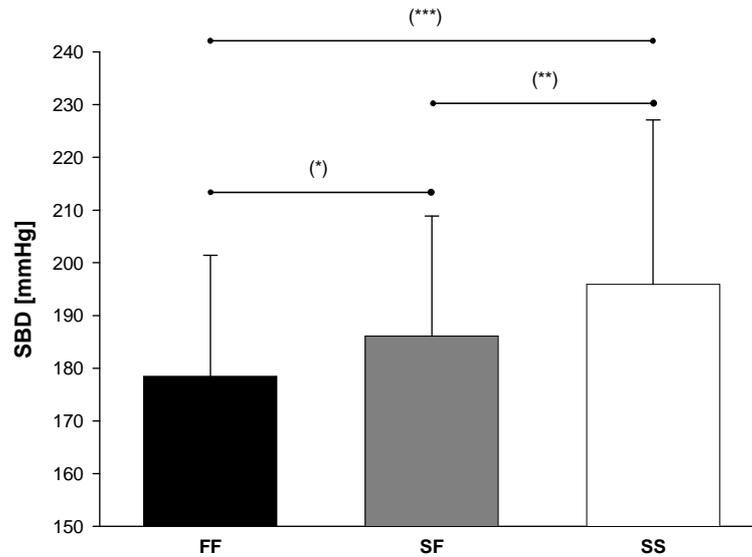


Abb. 31: Systolischer Blutdruck in Abhängigkeit vom Genotyp am Marker D3Rat45 auf Chromosom 3

(FF = homozygot F344, SF = heterozygot, SS = homozygot SHRSP)

* $p = 1,0$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,01$

Ein zweiter QTL für den systolischen Blutdruck wurde auf Chromosom 4 am Marker D4Rat94 mit einem hochsignifikanten LOD-Score von 6,3 ($p = 0,0002$) identifiziert (Abbildung 32).

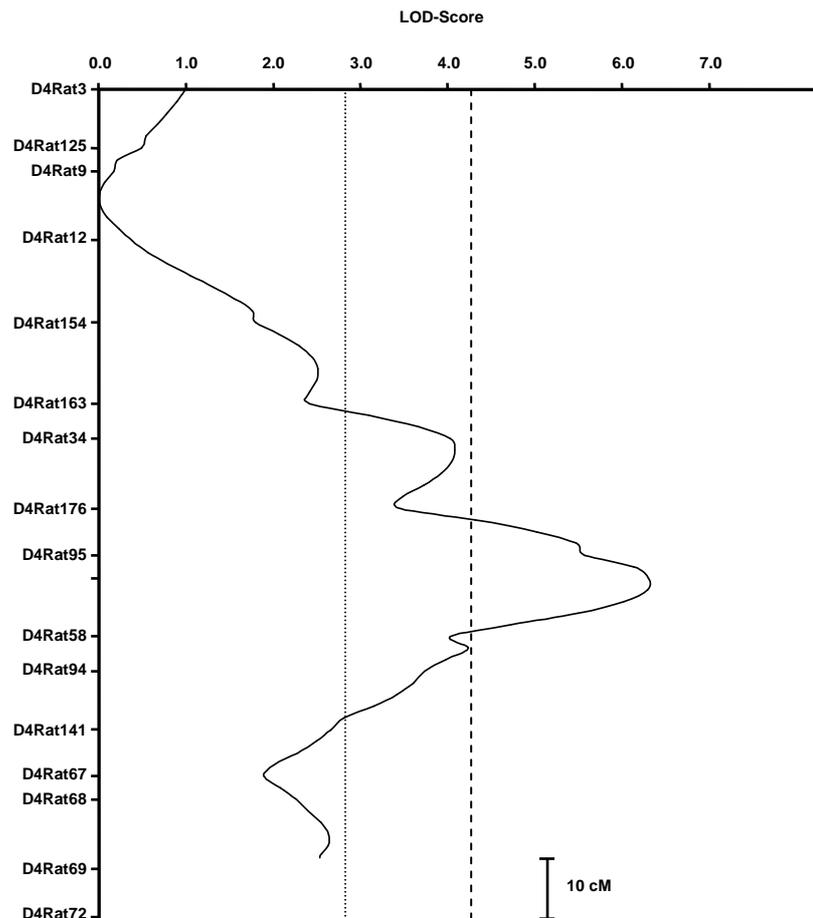


Abb. 32: QTL für den systolischen Blutdruck auf Chromosom 4 in der 14. Woche. Maximaler *LOD-Score* = 6,3.

Bei homozygoten F₂-Tieren für SHRSP zeigt sich eine Zunahme des systolischen Blutdrucks um 19,7 mmHg gegenüber homozygoten F₂-Tieren für F344. Der systolische Blutdruck in Abhängigkeit vom Genotyp am Marker *D4Rat94* ist in Abbildung 33 graphisch dargestellt. Wie schon auf Chromosom 3 für die Hypertonie festgestellt, deutet auch auf Chromosom 4 der kontinuierliche Blutdruckanstieg mit einem signifikanten Unterschied ($p < 0,02$) zwischen den für das SHRSP-Allel heterozygoten und homozygoten Tieren auf ein kodominantes Vererbungsmuster hin. 11,8 % der Gesamtvarianz des systolischen Blutdrucks sind durch diesen QTL erklärbar.

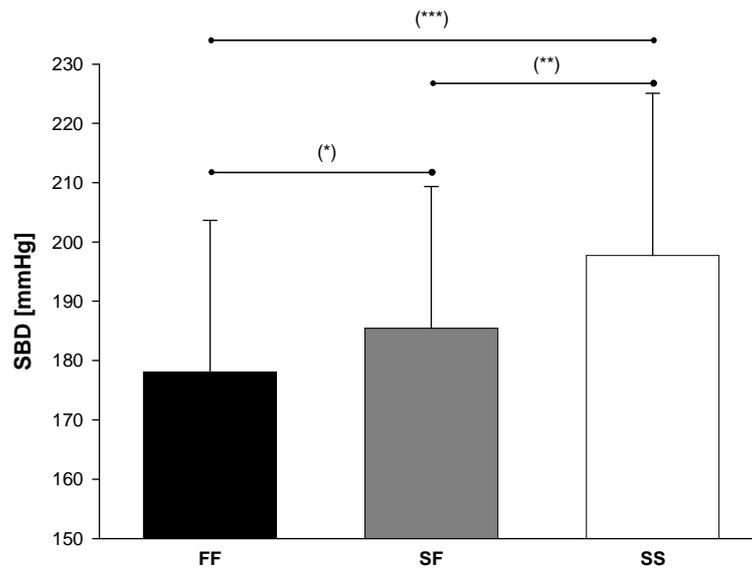


Abb. 33: Systolischer Blutdruck in Abhängigkeit vom Genotyp am Marker *D4Rat94* auf Chromosom 4

(FF = homozygot F344, SF = heterozygot, SS = homozygot SHRSP)

* $p < 0,5$; ** $p < 0,02$ *** $p < 0,001$

Auf Chromosom 6 wurde durch die Kopplungsanalyse am Marker *D6Rat146* für die Gesamtproteinexkretion im Urin ein signifikanter LOD-Score von 4,6 ($p = 0,0005$) identifiziert (Abbildung 34).

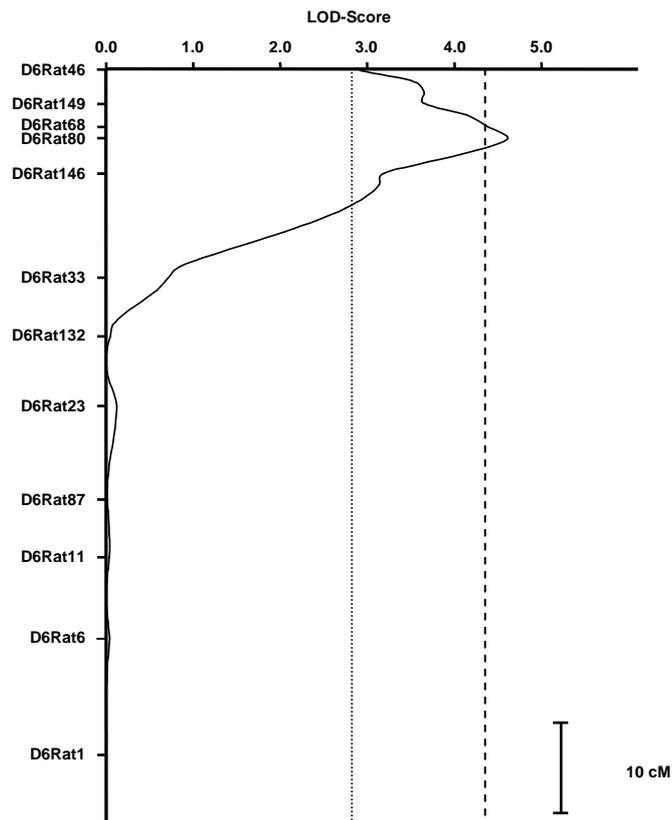


Abb. 34: QTL für die Gesamtproteinexkretion logarithmiert auf Chromosom 6 in der 14. Woche. Maximaler LOD-Score = 4,6.

Bei homozygoten F2-Tieren für SHRSP zeigt sich eine Zunahme der Gesamtproteinexkretion im Urin um 8,84 mg/24h gegenüber homozygoten F2-Tieren für F344. Die Gesamtproteinexkretion im Urin in Abhängigkeit vom Genotyp am Marker *D6Rat146* ist in Abbildung 35 graphisch dargestellt. Der kontinuierliche Anstieg der Proteinexkretion im Urin mit einem signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen den für das SHRSP-Allel heterozygoten und homozygoten Tieren lässt wieder einen kodominanten Erbgang vermuten. 9,0 % der Gesamtvarianz der Proteinexkretion im Urin sind durch diesen QTL erklärbar.

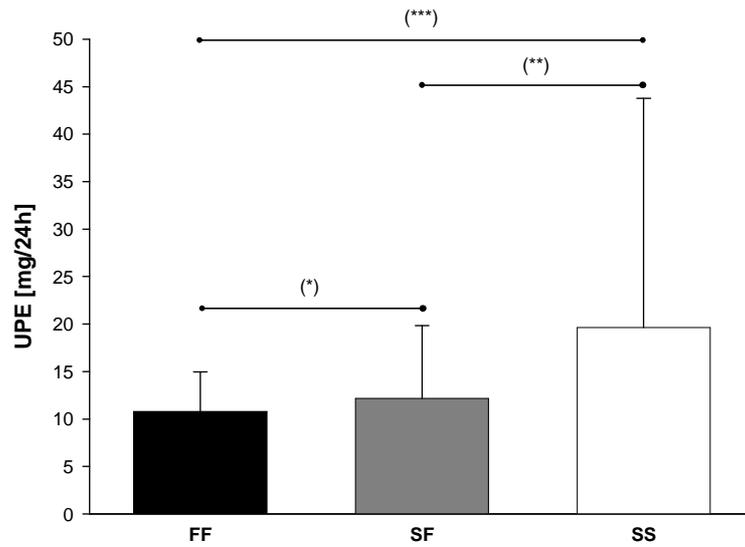


Abb. 35: Gesamtproteinexkretion in Abhängigkeit vom Genotyp am Marker D6Rat146 auf Chromosom 6

(FF = homozygot F344, SF = heterozygot, SS = homozygot SHRSP)

* $p = 1,0$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

4 Diskussion

Der Blutdruck jedes Individuums wird durch ein Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren beeinflusst. Bei den Umwelteinflüssen ist vor allem die kochsalzreiche Ernährung entscheidend an der Entwicklung und dem Fortschreiten der Hypertonie beteiligt. Auch heute ist noch nicht vollständig geklärt, warum eine vermehrte Kochsalzzufuhr bei manchen Menschen zu einer Entwicklung oder zum Fortschreiten einer Hypertonie verbunden mit renalen und kardiovaskulären Endorganschäden führt, während bei anderen Menschen die gleiche Kochsalzzufuhr keinen Einfluss auf den Blutdruck hat. Da sowohl in einzelnen Bevölkerungsgruppen sowie in bestimmten Familien eine Häufung der spontanen Hypertonie besteht, werden hierfür bestimmte Gene, die so genannten Suszeptibilitätsgene, verantwortlich gemacht (Weinberger et al., 1996). Ein Beispiel für eine solche Bevölkerungsgruppe ist die schwarzafrikanische Bevölkerung Amerikas. Diese hat im Vergleich zur weißen Bevölkerung deutlich höhere Blutdruckwerte, wobei die Frauen gegenüber den Männern in dieser Gruppe die höchsten Blutdruckwerte aufweisen (Brenner et al., 1988).

Die Identifizierung der genetischen Faktoren, die Einfluss auf Entwicklung und Progression der salzsensitiven spontanen Hypertonie sowie die renalen Endorganschäden haben, war das Ziel dieser Arbeit.

Der Mensch ist jedoch aufgrund seiner genetischen Heterogenität, den individuell extrem unterschiedlichen Lebensweisen sowie den unterschiedlichen Umweltfaktoren nicht geeignet, um bei ihm diese genetischen Faktoren zu identifizieren. Aus diesem Grund wurde ein Tiermodell gewählt, bei dem einerseits genetische Homogenität herrscht und andererseits die Umwelteinflüsse standardisiert werden konnten (Kreutz et al., 2002).

Für die Untersuchung der salzsensitiven spontanen Hypertonie ist der Rattenstamm SHRSP mit seinen genotypischen und phänotypischen Eigenschaften geeignet, da die salzsensitive spontane Hypertonie in Zusammenhang mit den Endorganschäden einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung und das Fortschreiten der Nephropathie hat. Der Rattenstamm F344 diente hierbei als Kontrollstamm, da dieser sowohl normotensiv als auch salzresistent ist.

Zuerst wurden die Parentaltierstämme SHRSP und F344, die sich hinsichtlich ihres Blutdruckes und der Salzsensitivität unterscheiden, phänotypisch untersucht. Im

Anschluss daran erfolgte zur Identifizierung der genetischen Faktoren die Kosegregationsanalyse der F₂-Kreuzungspopulation.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der unterschiedlichen Kochsalzzufuhr bei den Parentaltieren hinsichtlich der Nephropathie und des Blutdruckes untersucht. Die F₃₄₄ Tiere hatten unter der Hochsalzdiät mit 4 % NaCl durchschnittliche Blutdruckwerte von 132,83 mmHg, die damit im normotensiven Bereich lagen. Eine Niedrigsalzdiät wurde bei den F₃₄₄-Ratten in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Jedoch wurde in einer Arbeit von Tanase und Kollegen gezeigt, dass der mittlere Blutdruck unter einer Niedrigsalzdiät bei 131 mmHg lag (Tanase et al., 1982), sodass hier im Vergleich zur Hochsalzdiät keine signifikante Differenz zu dem vorliegenden Ergebnis unter Hochsalzdiät besteht. Man kann also bei dem F₃₄₄-Stamm von salzresistenten Tieren ausgehen. Bei den SHRSP-Tieren, die auf eine Niedrigsalzdiät gesetzt wurden, lag der durchschnittliche Blutdruckwert mit 172,00 mmHg schon im hypertensiven Bereich. Unter der Hochsalzdiät verstärkte sich erwartungsgemäß die Hypertonie als Ausdruck der Salzsensitivität noch weiter mit einem Durchschnittsblutdruck von 262,08 mmHg. Die Albuminausscheidung, an der man eine beginnende Nierenschädigung erkennen kann, liegt bei gesunden Ratten unter 1 mg/24h. Bei Menschen beginnen die Organschäden an der Niere laut Mancina und Kollegen (Mancina et al., 2007) ab einer Mikroalbuminurie von 30 – 300 mg/24h beziehungsweise ab einem Albumin-Kreatinin-Verhältnis von größer/gleich 22 mg/g Kreatinin bei Männern und größer/gleich 31 mg/g Kreatinin bei Frauen. Sowohl die F₃₄₄-Tiere mit Hochsalzdiät als auch die SHRSP-Tiere mit Niedrigsalzdiät waren mit der Albuminausscheidung im physiologischen Bereich. Lediglich bei den SHRSP-Tieren mit Hochsalzdiät lag der Durchschnittswert mit 122,31 mg/24h weit im pathologischen Bereich. Das Gleiche gilt für die Proteinurie, bei der ebenfalls nur die SHRSP-Tiere, die eine Hochsalzdiät erhalten hatten, pathologische Werte mit durchschnittlich 154,83 mg/24h aufwiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass es bei den SHRSP-Tieren im Vergleich zu den nierengesunden F₃₄₄-Tieren nach einer Kochsalzbelastung zu einer signifikanten Steigerung des Blutdruckes sowie der Albuminurie und Proteinurie als Maß für die Nephropathie kommt. Analog zur Steigerung des Blutdruckes verhielt es sich mit dem relativen Gesamtnierengewicht. Dieses lag bei den F₃₄₄-Tieren bei 0,66, bei den SHRSP-Tieren mit Niedrigsalzdiät bei 0,82 und bei den mit 4 % NaCl gefütterten SHRSP-Tieren bei 0,95. Diese Untersuchungsergebnisse charakterisieren die SHRSP-Ratte als geeignetes Tiermodell für die spontane salzsensitive Hypertonie.

Auf der Grundlage der Daten der Parentaltierstämme mit unterschiedlicher Salzsensitivität und den damit verbundenen Endorganschäden an der Niere wurde eine Kosegregationsstudie an der zweiten Tochtergeneration durchgeführt. Hierbei sollten genetische Faktoren der zweiten Tochtergeneration SHRSP x F344 identifiziert werden, die durch eine Hochsalzdiät bei arterieller Hypertonie zu Endorganschäden an den Nieren führen. Für die Untersuchungen wurden die Analysen der Phänotypen und Genotypen herangezogen.

Durch Bruder-Schwester-Verpaarung der ersten Tochtergeneration, die aus den Parentaltieren der männlichen SHRSP- und der weiblichen F344-Ratte hervorgegangen waren, entstand die 232 männliche Tiere umfassende zweite Tochtergeneration. Bei diesen Tieren wurde ab der sechsten Lebenswoche eine achtwöchige Hochsalzdiät durchgeführt.

Für die Erfassung der phänotypischen Parameter der F2-Kreuzungspopulation wurden die gleichen Untersuchungsmethoden herangezogen, die auch schon für die Parentaltiere verwendet wurden. Der durchschnittliche systolische Blutdruck lag bei den F2-Tieren bei 186,84 mmHg, wobei sich die Messwerte unimodal mit einer leichten Linksverschiebung von 139 bis 284 mmHg verteilen. Die kontinuierliche Verteilung beruht auf Umwelt- oder genetischen Faktoren oder auf einem Zusammenspiel beider Faktoren. Durch diese natürliche Variation wird der Blutdruck als quantitatives Merkmal gekennzeichnet, dessen Ursache zumeist das Resultat verschiedener genetischer Faktoren ist. Quantitative Trait Loci (QTL) beschreiben einen Abschnitt eines Chromosoms, in dem vermutlich ein Gen oder mehrere Gene mit Einfluss auf die Ausprägung eines quantitativen phänotypischen Merkmals liegen (Rapp, 2000).

Bei der Linkage-Analyse, die mit Ausnahme des Y-Chromosoms genomweit durchgeführt worden ist, wurden zwei QTL für die Regulierung des Blutdruckes gefunden, die sich auf den RNO 3 und 4 befinden. Von diesen beiden Loci wies der QTL auf dem Chromosom 4 den stärkeren Effekt auf. Dabei betrug die Blutdruckdifferenz zwischen den homozygoten SHRSP-Ratten und den homozygoten F344-Ratten 19,7 mmHg. Der QTL ist für 11,8 % der gesamten Blutdruckvarianz verantwortlich. Der Blutdrucklocus im mittleren Bereich von Chromosom 4 wurde bereits in einer früheren Dissertationsarbeit der Arbeitsgruppe beschrieben (Schulz, Dissertation 2002). Hierbei handelte es sich um eine Kopplungsanalyse einer

Backcross-Zucht MWF x Lew, bei dem der LOD-Score nur eine wahrscheinlich signifikante Assoziation erreichte. Zusätzlich wurde ein Locus für die Blutdruckregulation auf Chromosom 4 in einer weiteren Dissertationsarbeit aus der Arbeitsgruppe beschrieben (Siegel, Dissertation 2004), wobei hier eine F₂-Kreuzungspopulation zwischen salzsensitiven Dahl-Ratten x SHR/Mol-Ratten als Modell verwandt wurde. In einer Studie von Garrett und Mitarbeitern (Garrett et al., 2002) wurde ebenfalls ein QTL auf Chromosom 4 mit Einfluss auf den Blutdruck beschrieben, dessen Peakmarker in der Umgebung des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Peakmarkers liegt. Hier wurde der Rattenstamm Dahl/SS/Jr-Ratte x Albino Surgery-Ratte verwendet. Ebenso wurde von Mashimo und Mitarbeitern dieser Locus beschrieben, wobei hier ein Intercross aus SHRSP-Ratten x Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) untersucht wurde (Mashimo et al., 1999). Auch in jüngeren Arbeiten wird dieser Locus bei unterschiedlichen Rattenstämmen immer wieder beschrieben (Schulz et al., 2002; Kato et al., 2003; Moreno et al., 2003).

Der zweite QTL, der Einfluss auf die Blutdruckregulation hat, wurde auf Chromosom 3 identifiziert. Dabei zeigte sich eine Blutdruckdifferenz von 17,4 mmHg zwischen den homozygoten Tierstämmen SHRSP und F344, wobei dieser QTL für 6,2 % der gesamten Blutdruckvarianz verantwortlich war. Auch dieser Blutdrucklocus im ersten Drittel des Chromosoms 3 ist bereits durch Siegel und Mitarbeiter (Siegel et al., 2004) aus der Arbeitsgruppe beschrieben, wobei hier salzsensitive Dahl-Ratten mit SHRSP-Ratten gekreuzt wurden. Zwei weitere Arbeitsgruppen (Clark et al., 1996; Mashimo et al., 1999) fanden ebenfalls auf Chromosom 3 einen QTL für Blutdruck bei einer männlichen F₂-Kreuzungspopulation zwischen SHRSP-Ratten x WKY-Ratten. In einer Arbeit von Matsumoto und Mitarbeitern wird Chromosom 3 mit einem QTL für den Blutdruck beschrieben, wobei es sich um eine weibliche F₂-Kreuzungspopulation zwischen SHRSP und Wistar-Kyoto-Ratten handelte (Matsumoto et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um einen wahrscheinlich signifikanten LOD-Score von 3,2, sodass ein falsch-positives Ergebnis möglich ist.

Zu den hochdruckassoziierten Endorganschäden zählen die Nierenschäden, die Herz- und Kreislauferkrankungen sowie der Apoplex, wobei die vorliegende Arbeit die renalen Endorganschäden untersuchte. Hierbei sollte untersucht werden, ob es eine Kolokalisation zwischen den Blutdruck-QTL und den genetischen Faktoren der renalen Endorganschäden gibt oder ob diese blutdruckunabhängige genetische Faktoren sind.

Diese unabhängigen Faktoren könnten einen Einfluss auf die Empfindlichkeit der durch die Hypertonie bedingten Endorganschäden haben. Für diese Untersuchung wurden zum einen die histologischen Parameter wie Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose der Niere ausgewertet, zum anderen wurden die funktionellen Parameter Albumin- und Proteinurie bestimmt und zusätzlich das Nierengewicht ermittelt.

Das Spektrum der Albuminurie bewegte sich hierbei von 0,04 bis 170,88 mg/24h, wobei die logarithmierten Messwerte eine unimodale Verteilung mit einer leichten Verschiebung zu den niedrigeren Werten aufwiesen. Die große Bandbreite der Ergebnisse korreliert mit den beiden kontrastierenden Parentaltierstämmen. Die durchschnittliche Albuminurie lag mit 3,38 mg/24h weit unter dem Wert von 122,31 mg/24h, der bei den SHRSP-Tieren nach der Hochsalzdiät gemessen wurde. Zusätzlich fiel bei der näheren Betrachtung der Messwerte auf, dass lediglich 13 der insgesamt 232 Tiere eine deutliche Albuminurie von über 10 mg/24h hatten. Nur bei einem einzigen Tier trat eine Albuminurie von über 100 mg/24h auf. Diese Verteilung deutet auf eine rezessive Vererbung hin, die bereits mehrfach für diesen Phänotyp beschrieben wurde (Garrett et al., 2003; Schulz et al., 2002).

Bei der mit Ausnahme des Y-Chromosoms durchgeführten genomweiten Kopplungsanalyse konnte für die Albuminurie lediglich ein QTL auf Chromosom 1 detektiert werden, wobei der LOD-Score mit 4,2 einer fast signifikanten Kopplung entspricht. Die durchschnittliche Differenz lag an diesem QTL bei 8,57 mg/24h zwischen den für das SHRSP-Allel und das F344-Allel homozygoten Tieren. Dieser QTL ist für 8,6 % der Gesamtvarianz der Albuminurie verantwortlich. Dieser Locus im mittleren Bereich von Chromosom 1 wurde bereits durch eine Dissertationsarbeit aus der Arbeitsgruppe sowie von Schulz und Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe identifiziert (Schulz, Dissertation 2002; Schulz et al., 2003). Bei Schulz und Mitarbeitern handelt es sich um eine Backcross-Zucht zwischen MWF x SHR. Des Weiteren wurde dieser Locus auf Chromosom 1 von Garrett und Mitarbeitern beschrieben, die als Modell eine Backcross-Zucht aus salzsensitiven Dahl-Ratten und einem SHR-Stamm hatten (Garrett et al., 2006).

Bei der Proteinurie lag das Gesamtspektrum zwischen 1,12 und 156,80 mg/24h und korrelierte wie bei der Albuminurie mit den kontrastierenden Parentaltierstämmen. Nach dem Logarithmieren der Werte zeigt sich hier ebenfalls eine unimodale Verteilung. Der

Durchschnittswert mit 13,26 mg/24h weicht wieder erheblich von der durchschnittlichen Proteinurie der mit einer Hochsalzdiät belasteten SHRSP-Parentaltiere ab, bei denen dieser Wert bei 154,82 mg/24h lag. Nach genauerer Betrachtung der einzelnen Messwerte lässt sich auch hier eine rezessive Vererbung für diesen Phänotyp postulieren, da lediglich sieben der insgesamt 232 Tiere eine deutliche Proteinurie von über 30 mg/24h aufwiesen.

Bei der in der F2-Kreuzungspopulation mit Ausnahme des Y-Chromosoms durchgeführten Linkage-Analyse des gesamten Genoms konnte für die Proteinurie ein QTL auf Chromosom 6 bestimmt werden. Die durchschnittliche Differenz lag an diesem QTL bei 8,84 mg/24h zwischen homozygoten SHRSP-Ratten und homozygoten F344-Ratten. Der QTL ist für 9,0 % der Gesamtvarianz der Proteinurie verantwortlich. Dieser Locus wurde bereits in mehreren Arbeiten zuvor bestätigt (Garrett et al., 2003, Schulz et al., 2003; Garrett et al., 2006, Ijpelaar et al., 2008).

Bei denen in der vorliegenden Arbeit insgesamt vier beschriebenen QTL für den Blutdruck sowie für die Albumin- und Proteinurie konnte jedoch keine Kolo-kalisation zwischen den einzelnen Phänotypen aufgezeigt werden. Diese Befunde befinden sich im Einklang mit früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe (Siegel, Dissertation 2004). Auch nach Auswertung der Phänotypen Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose der Nieren in der Korrelationsanalyse der F2-Kreuzungspopulation SHRSP x F344 korrelieren beide histologischen Phänotypen weder mit der Albumin- beziehungsweise Proteinurie noch mit dem systolischen Blutdruck. Ebenso gelang es nicht, für die morphologischen Veränderungen genetische Faktoren zu identifizieren. Auch dieses Ergebnis wurde in einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe (Kößmehl, Dissertation 2005) bereits beschrieben. 2003 wurde ein ähnliches Ergebnis durch Siegel und Mitarbeiter der Arbeitsgruppe bereits am Herzen festgestellt (Siegel et al., 2003). Auch hier gab es keinen Zusammenhang zwischen der linksventrikulären interstitiellen Fibrose und dem systolischen Blutdruck und es konnten ebenfalls keine genetischen Faktoren für diese Veränderungen gefunden werden. Da es in der vorliegenden Arbeit nicht gelang, eine Korrelation zwischen der interstitiellen Fibrose der Niere und der Glomerulosklerose mit dem Blutdruck herzustellen, kann vermutet werden, dass hier unabhängige genetische Faktoren die Ausprägung dieser Phänotypen beeinflussen. Für diese Hypothese spricht, dass die renale interstitielle Fibrose eine unimodale Verteilung in der F2-Kreuzungspopulation aufweist. Nach Timberlake und Mitarbeitern geht eine unimodale Verteilung normalerweise mit einem polygenetischen Befund einher, während die

bimodale Verteilung nach Timberlake eher für einen monogenetischen Effekt spricht (Timberlake et al., 2001). Allerdings muss bei der semiquantitativen Auswertung der Glomerulosklerose berücksichtigt werden, dass in dieser Arbeit lediglich ein Score von 0 bis 1 ($0 \cong 0$ bis 10 % Schädigung, $1 \cong 11$ bis 100 % Schädigung) benutzt wurde. In einigen Veröffentlichungen wird auf die Notwendigkeit von vollautomatisierten Messsystemen hingewiesen. Wenn keine vollautomatisierte Messsysteme verwendet würden, kam es zu einem Informationsverlust beziehungsweise die Messungen wären zu zeitaufwendig und könnten nur von trainiertem Personal durchgeführt werden (Moreso et al., 1994; Masseroli et al., 1998). Deshalb wurde auf eine feinere Scoreeinteilung bei der semiquantitativen Auswertung, wie sie in vorangegangenen Dissertationen der Arbeitsgruppe verwendet wurde, verzichtet. Nach Auswertung aller Ergebnisse ist die Einteilung mit einem zweistufigen Score-System jedoch zu ungenau, um hierdurch genetische Faktoren zu identifizieren.

Die vorliegende Arbeit sollte das Verständnis über die Zusammenhänge zwischen der Ausbildung der Nephropathie und der salzsensitiven Hypertonie erweitern und die Vererbung der Nephropathie darstellen. Dieses ist mit dem beschriebenen hoch signifikanten QTL auf RNO 6 gelungen, welcher bei der Ratte für die Ausbildung der Proteinurie als Maß einer funktionellen Nierenschädigung verantwortlich ist. Es wird jedoch erst nach Feinkartierung des chromosomalen Abschnittes möglich sein, die Gene im Einzelnen zu benennen. Hierfür werden noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden müssen. Eine Verkleinerung des Markerabstandes unter 10 cM würde jedoch nach Auffassung von Davasi und Kollegen nur eine bedingt verbesserte Auflösung der QTL-Karte bedeuten, da diese ab dem oben beschriebenen Abstand nicht mehr proportional mit der Markerdichte ansteigen würde (Darvasi et al., 1997). Hierfür wäre dann eine Züchtung von kongenen Rattenstämmen nötig, bei denen sich die Position einzelner Gene noch genauer bestimmen ließe.

Bisherige Studien am Menschen habe für die Albuminurie und die damit verbundene Nephropathie bisher lediglich zwei QTL auf Chromosom 12 und 19 festgestellt (Freedman et al., 2003), für die Proteinurie konnten bisher keine QTL ermittelt werden.

Es bleibt für die Zukunft zu hoffen, dass eine genauere Kenntnis des Zusammenspiels zwischen der Ausbildung der Nephropathie und der salzsensitiven Hypertonie zu verbesserten diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten der Nephropathie führt

und sich damit die Lebensqualität der immer älter werdenden Menschen verbessert. Zusätzlich würde es für das Gesundheitssystem eine enorme Kostenersparnis bedeuten – laut Keller und Mitarbeitern liegen die jährlichen Kosten pro Dialysepatient bei etwa 55.000 € (Keller et al., 2007) –, wenn ein Anstieg der altersbedingten Nephropathie bei der stetig älter werdenden Bevölkerung vermindert beziehungsweise gänzlich verhindert werden könnte.

5 Zusammenfassung

Die Nephropathie stellt einen wichtigen Risikofaktor für die hypertonieassoziierte Morbidität und Mortalität dar. Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung in den Industrienationen wird die Bedeutung dieser Erkrankung weiter zunehmen. In der vorliegenden Arbeit wurden anhand eines SHRSP-/F344-Rattenstammes die histomorphologischen und molekulargenetischen Ursachen der Nephropathie bei der salzsensitiven Hypertonie erforscht.

Als erster Schritt wurde eine phänotypische Analyse der Parentaltierstämme SHRSP und F344 durchgeführt, wobei die Ausprägung der Phänotypen mit der bisherigen Literatur übereinstimmte. Die F344-Ratte hatte unter einer Hochsalzdiät mit 4 % NaCl weder pathologische Werte bei der Albuminurie als Ausdruck einer möglichen Nierenschädigung, noch hatte sie signifikant erhöhte systolische Blutdruckwerte. Die SHRSP-Ratte zeigte hingegen schon unter der Niedrigsalzdiät um circa 39 mmHg höhere Blutdruckwerte im Vergleich zu F344, während dieser Unterschied unter der Hochsalzdiät auf bis 129 mmHg anstieg. Unter Hochsalzdiät entwickelten SHRSP-Ratten eine starke Albuminurie bis zu etwa 120 mg/24h, während die Albuminurie bei F344 sehr gering war (< 1 mg/24h). Diese Ergebnisse der Parentaltiere zeigen zum einen das unterschiedliche Blutdruckniveau der beiden Rattenstämme, zum anderen wird dadurch die unterschiedliche Salzsensitivität deutlich.

Als zweiter Schritt wurde eine Phänotypisierung der F2-Kreuzungspopulation aus SHRSP-Ratten x F344-Ratten durchgeführt. Hierbei zeigte sich jedoch, dass der Blutdruck kaum mit der Albuminausscheidung im Urin korreliert und der Blutdruck lediglich einen Anteil von 2,9 % der Gesamtvarianz der Albuminurie erklärte. Das Gleiche gilt für die Proteinurie, bei der der Blutdruck 2,6 % an der Gesamtvarianz der Proteinexkretion im Urin beeinflusste. Die vorliegende Arbeit konnte in der F2-Kreuzungspopulation dagegen keine Korrelation zwischen den strukturellen Nierenschäden (Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose der Niere) und der Hypertonie aufzeigen.

Als letzter Schritt wurde eine genomweite Kopplungsanalyse der 232 männlichen F2-Tiere durchgeführt. Hierbei konnten insgesamt vier QTL detektiert werden. Der Hauptbefund lag auf Rattenchromosom 4 (RNO 4) mit einem hochsignifikanten QTL bei Marker *D4Rat94* für den systolischen Blutdruck. Der maximale LOD-Score lag an dieser

Stelle bei 6,3. Dieser QTL beeinflusst circa 12 % der Gesamtvarianz des systolischen Blutdruckes in dieser untersuchten F2-Kreuzungspopulation. Ein zweiter QTL für den systolischen Blutdruck lag auf Chromosom 3 bei Marker *D3Rat45*, wobei es sich hierbei um eine wahrscheinlich signifikante Kopplung mit einem LOD-Score von 3,2 handelt.

Der zweithöchste LOD-Score für einen QTL lag mit 4,6 auf Chromosom 6 am Marker *D6Rat146* für die Proteinurie. 9 % der Gesamtvarianz der Proteinexkretion im Urin werden in dieser Population durch den genannten QTL beeinflusst. Für die Albuminurie konnte ein QTL auf RNO 1 am Marker *D1Rat287* mit einer wahrscheinlich signifikanten Kopplung mit einem LOD-Score von 4,2 gefunden werden.

In der bisherigen Literatur wurde bisher ein einziges Mal ein blutdruckunabhängiger QTL auf Chromosom 6 für die Proteinurie beschrieben, ebenso finden sich für die Albuminurie bisher wenige Veröffentlichungen zu blutdruckunabhängigen QTL auf Chromosom 1. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde können damit die Grundlage für weitere Forschungsarbeiten über die Nephropathie bei der salzsensitiven Hypertonie bilden. Die klinische Bedeutung dieser Studie liegt darin, dass sie zu verbesserten diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten der Nephropathie beiträgt. Dies würde auf längere Sicht zu einer Steigerung der Lebensqualität der immer älter werdenden Bevölkerung und zusätzlich zu einer erheblichen Kostenersparnis im Gesundheitssystem führen.

6 Abkürzungen

Die Abkürzungen für die chemischen Elemente, die internationalen Standardeinheiten (SI-Einheiten), andere gesetzliche Maßeinheiten und nach den Regeln der deutschen Rechtschreibung allgemein gültige Abkürzungen sind nicht aufgenommen.

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$	radioaktives Adenosintriphosphat
A	Adenin
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
(CA) _N	repetitives Cytosin-Adenin-Dinukleotid
CCBF	Charité – Campus Benjamin Franklin
CCD	Charge-coupled device = ladungsabhängiges Bauteil
cM	centi Morgan (Einheit für die genetische Distanz)
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
et al.	et alia
F	F344-Allel
F0	Parentalgeneration, Elterngeneration
F1	erste Filialgeneration, Tochtergeneration
F2	zweite Filialgeneration, Tochtergeneration
F344	Fischer 344
FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
FF	homozygot für F344
G	Guanin
ges.	Gesamt
GSI	Glomeruloskleroseindex
HDL	high density lipoprotein
ISH	International Society of Hypertension
KG	Körpergewicht
LDL	low density lipoprotein

li.	Links
Lew	Lewis-Ratte
LOD	Logarithm of the odds
MG	Molekulargewicht
MHS	Milan hypertensive strain of rats
MWF	Munich Wistar Frömter Ratte
n	Anzahl
NG	Nierengewicht
p	p-Wert, Wert für die statistische Signifikanz
PAA	Polyacrylamid
PAS	Periodic Acid Schiff
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
ph	pH-Wert
QTL	Quantitative trait loci, genetische Region mit Einfluss auf einen quantitativen Phänotyp
r	Korrelationskoeffizient
re.	Rechts
rel.	Relatives
RIF	renale interstitielle Fibrose
S	SHRSP-Allel
SBD	systolischer Blutdruck
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SF	heterozygot SHRSP / F344
SHRSP	Spontaneously Hypertensive Rat/Stroke-Prone
SR	Sirius-Red
SS	homozygot für Spontaneously Hypertensive Rat/Stroke-Prone
SSR	simple sequence repeats
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borrat-EDTA
Temed	Tetramethyldiamin
TIFF	Tagged Image File Format ≈ codierte Bilddatei
U	Unit(s) = Einheit(en)

UAE	Urinary albumin excretion = Albuminausscheidung im Urin
UPE	Urinary protein excretion = Proteinausscheidung im Urin
Upm	Umdrehungen pro Minuten
v/v	volume / volume
WKY	Wistar-Kyoto
w/v	weight / volume

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Todesursachen 2006 in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2007) [Seite 4]
- Abb. 2: Verschiedene genetische Faktoren und Umweltfaktoren nehmen Einfluss auf die primäre Hypertonie [Seite 6]
- Abb. 3: Mikroalbuminurie als Risikofaktor für kardiovaskuläre, zerebrale und renale Endorganschäden [Seite 8]
- Abb. 4: Identifizierung krankheitsrelevanter Gene über Homologievergleich zwischen Quantitative Trait Loci (QTL) bei der Ratte und beim Menschen [Seite 9]
- Abb. 5: Kosegregationsanalyse am Beispiel eines F2-Intercross: Verpaarung eines normotensiven und salzresistenten F344 Rattenstammes mit einem hypertensiven und salzsensiblen SHRSP-Rattenstamm [Seite 11]
- Abb. 6: Tiermodell am Beispiel der SHRSP-Ratte zur Bestimmung der genetischen Faktoren, die eine salzsensitive Hypertonie sowie die Verschlechterung der hypertensiven Endorganschäden beeinflussen [Seite 13]
- Abb. 7: Zucht der F2-Generation aus Parentaltieren der Stämme SHRSP und F344 und anschließender Bruder-Schwester-Verpaarung [Seite 21]
- Abb. 8: Schema der Nierenstruktur [Seite 26]
- Abb. 9: Histologische Nierenschnitte der F2-Population SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 28]
- Abb. 10: Genotypisierung mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern [Seite 30]
- Abb. 11: Systolischer Blutdruck (SBD) am Ende der 14. Lebenswoche von F344-Tieren mit Hochsalzdiät (4 % NaCl), sowie SHRSP-Tieren mit Niedrigsalzdiät (0,2 % NaCl) beziehungsweise Hochsalzdiät (4 % NaCl) [Seite 37]
- Abb. 12: Proteinurie (UPE) im 24-Stunden-Urin am Ende der 14. Lebenswoche von F344-Tieren mit Hochsalzdiät (4 % NaCl), sowie SHRSP-Tieren mit Niedrigsalzdiät (0,2 % NaCl) beziehungsweise Hochsalzdiät (4 % NaCl) [Seite 38]

- Abb. 13: Albuminurie (UAE) im 24-Stunden-Urin am Ende der 14. Lebenswoche von F344-Tieren mit Hochsalzdiät (4 % NaCl), sowie SHRSP-Tieren mit Nidrigsalzdiät (0,2 % NaCl) beziehungsweise Hochsalzdiät (4 % NaCl) [Seite 39]
- Abb. 14: relatives Gesamtnierengewicht (rel. NG ges.) nach der Tötung der Tiere in der 14. Woche von F344-Tieren mit Hochsalzdiät (4 % NaCl), sowie SHRSP-Tieren mit Nidrigsalzdiät (0,2 % NaCl) beziehungsweise Hochsalzdiät (4 % NaCl) [Seite 40]
- Abb. 15: Verteilung des systolischen Blutdrucks (SBD) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 41]
- Abb. 16: Verteilung der Albuminexkretion im Urin (UAE) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 42]
- Abb. 17: Korrelation zwischen systolischem Blutdruck (SBD) und Albuminexkretion im Urin (UAE) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 43]
- Abb. 18: Verteilung der Gesamtproteinexkretion im Urin (UPE) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 43]
- Abb. 19: Korrelation zwischen systolischem Blutdruck (SBD) und Gesamtproteinexkretion im Urin (UPE) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 44]
- Abb. 20: Verteilung der Interstitiellen Fibrose der Niere (RIF) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 45]
- Abb. 21: Korrelation zwischen systolischem Blutdruck (SBD) und interstitieller Fibrose der Niere (RIF) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 45]
- Abb. 22: Verteilung des Glomeruloskleroseindex bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 46]
- Abb. 23: Korrelation zwischen systolischem Blutdruck (SBD) und Glomeruloskleroseindex (GSI) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 47]
- Abb. 24: Korrelation zwischen Albuminexkretion im Urin (UAE) und interstitieller Fibrose der Niere (RIF) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 47]

- Abb. 25: Korrelation zwischen Proteinexkretion im Urin (UPE) und interstitieller Fibrose der Niere (RIF) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 48]
- Abb. 26: Korrelation zwischen Albuminexkretion im Urin (UAE) und Glomeruloskleroseindex (GSI) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 49]
- Abb. 27: Korrelation zwischen Proteinexkretion im Urin (UPE) und Glomeruloskleroseindex (GSI) bei F2-Tieren SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 50]
- Abb. 28: QTL für die Albuminexkretion logarithmiert auf Chromosom 1 in der 14. Woche [Seite 52]
- Abb. 29: Albuminexkretion in Abhängigkeit vom Genotyp am Marker *D1Rat287* auf Chromosom 1 [Seite 53]
- Abb. 30: QTL für den systolischen Blutdruck auf Chromosom 3 in der 14. Woche [Seite 54]
- Abb. 31: Systolischer Blutdruck in Abhängigkeit vom Genotyp am Marker *D3Rat45* auf Chromosom 3 [Seite 55]
- Abb. 32: QTL für den systolischen Blutdruck auf Chromosom 4 in der 14. Woche [Seite 56]
- Abb. 33: Systolischer Blutdruck in Abhängigkeit vom Genotyp am Marker *D4Rat94* auf Chromosom 4 [Seite 57]
- Abb. 34: QTL für die Gesamtproteinexkretion logarithmiert auf Chromosom 6 in der 14. Woche [Seite 58]
- Abb. 35: Gesamtproteinexkretion in Abhängigkeit vom Genotyp am Marker *D6Rat146* auf Chromosom 6 [Seite 59]

7.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Touch-Down-PCR-Programm 65 bis 60 °C [Seite 32]
- Tabelle 2: Ergebnis der Phänotypen-Charakterisierung der Parentaltierstämme F344 mit Hochsalzdiät (4 % NaCl), SHRSP mit Niedrigsalzdiät (0,2 % NaCl) und SHRSP mit Hochsalzdiät (4 % NaCl) in der 14. Woche [Seite 36]
- Tabelle 3: Ergebnis der Phänotypen-Charakterisierung der F2-Tiere SHRSP x F344 in der 14. Woche [Seite 41]
- Tabelle 4: Ergebnis der Kopplungsanalyse der F2-Population SHRSP x F344 [Seite 51]

8 Literatur

- Beckmann JS**, Weber JL. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*. **1992**; 12(4): 627-31.
- Bianchi G**, Tripodi G, Casari G et al. Two point mutations within the adducin genes are involved in blood pressure variation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1994**; 91(9): 3999-4003.
- Bianchi S**, Bigazzi R, Campese VM. Microalbuminuria in essential hypertension: significance, pathophysiology, and therapeutic implications. *Am J Kidney Dis*. **1999**; 34(6): 973-95.
- Bigazzi R**, Bianchi S, Baldari G, Campese VM. Clustering of cardiovascular risk factors in salt-sensitive patients with essential hypertension: role of insulin. *Am J Hypertens*. **1996**; 9(1): 24-32.
- Bradford MM**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **1976**; 72: 248-54.
- Brenner BM**, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens*. **1988**; 1(4 Pt 1): 335-47.
- Carretero OA**, Oparil S. Essential hypertension. Part I: Definition and etiology. *Circulation*. **2000**; 101(3): 329-35.
- Casari G**, Barlassina C, Cusi D et al. Association of the alpha-adducin locus with essential hypertension. *Hypertension*. **1995**; 25(3): 320-6.
- Charles River Laboratories**, Research Models & Services Catalogue 2005. **2005**, S. 9.
- Clark JS**, Jeffs B, Davidson AO et al. Quantitative trait loci in genetically hypertensive rats. Possible sex specificity. *Hypertension* **1996**; 28(5): 898-906.
- Cusi D**, Barlassina C, Azzani T et al. Polymorphisms of α -adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet*. **1997**; 349(9062): 1353-7.
- Darvasi A**, Soller M. A simple method to calculate resolving power and confidence interval of QTL map location. *Behav Genet*. **1997**; 27(2): 125-32.
- De Heer E**, Sijpkens YWJ, Verkade M et al. Morphometrie of interstitial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. **2000**; 15(suppl. 6): 72-3.
- Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL – Deutsche Hypertonie Gesellschaft**, Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie. **2008**, S. 92.

- Dworkin LD**, Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM. Hemodynamic basis for glomerular injury in rats with desoxycorticosterone-salt hypertension. *J Clin Invest.* **1984**; 73(5): 1448-61.
- Freedman BI**, Beck SR, Rich SS et al. A genome-wide scan for urinary albumin excretion in hypertensive families. *Hypertension* **2003**; 42(3): 291-6
- Ganten D**, de Jong W. Experimental and genetic models of hypertension. *Handbook of Hypertension.* **1994**, Elsevier Science B. V., Vol. 16.
- Garrett MR**, Joe B, Dene H, Rapp JP. Identification of blood pressure quantitative trait loci that differentiate two hypertensive strains. *J Hypertens.* **2002**; 20(12): 2399-406.
- Garrett MR**, Dene H, Rapp JP. Time-course genetic analysis of albuminuria in Dahl salt-sensitive rats on low-salt diet. *J Am Soc Nephrol.* **2003**; 14(5): 1175-87.
- Garrett MR**, Joe B, Yerga-Woolwine S. Genetic linkage of urinary albumin excretion in Dahl salt-sensitive rats: influence of dietary salt and confirmation using congenic strains. *Physiol Genomics.* **2006**; 25(1): 39-49.
- Hollenberg NK**, Martinez G, McCullough M, et al. Aging, Acculturation, Salt Intake, and Hypertension in the Kuna of Panama. *Hypertension.* **1997**; 29 (1 Pt 2): 171-6.
- Hübner N**, Kreutz R, Lindpaintner K. Strategies for the identification of chromosomal loci associated with hypertension in hereditary hypertensive rats. In: Ganten D and de Jong W, ed. *Handbook of Hypertension* **1994**; Elsevier Science B. V.; Vol. 16: 173-85.
- Ijpelaar DHT**, Schulz A, Aben J et al. Genetic predisposition for glomerulonephritis-induced glomerulosclerosis in rats is linked to chromosome 1. *Physiol Genomics* **2008**; 35(2): 173-81.
- Johnson RJ**, Schreiner GF. Hypothesis: The role of acquired tubulointerstitial disease in the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Kidney Int.* **1997**; 52(5): 1169-79. Review.
- Kato N**, Mashimo T, Nabika T, Cui CH, Ikeda K, Yamori Y. Genome-wide searches for blood pressure quantitative trait loci in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat of a Japanese colony. *J Hypertens* **2003**; 21(2): 295-303.
- Keller F**, Dress H, Mertz A, Marckmann G. [Financial incentives and dialysis]. *Med Klin (Munich).* **2007**; 102(8): 659-64.
- Koßmehl P**. Charakterisierung von renalen Endorganschäden bei der salzsensitiven spontanen Hypertonie im Rattenmodell. Dissertation, Charité – Universitätsmedizin Berlin, **2005**.

- Kreutz R**, Paul M, Ganten D. Hypertonie, In: Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H (eds): *Die Innere Medizin*. Stuttgart, 10. Aufl., Stuttgart, New York: Schattauer, **2000**; Kap. 6.10: 377-99.
- Kreutz R**, Hübner N. Congenic rat strains are important tools for the genetic dissection of essential hypertension. *Semin Nephrol.* **2002**; 22(2): 135-47.
- Kritz W**, Bankir L. A standard nomenclature for structures of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS). *Kidney Int.* **1988**; 33(1): 1-7.
- Lander ES**, Botstein D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics.* **1989**; 121(1): 185-99.
- Lander ES**, Green P, Abrahamson J et al. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics.* **1987**; 1(2): 174-81.
- Lander E**, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat. Genet.* **1995**; 11(3): 241-7.
- Lifton RP**, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell.* **2001**; 104(4): 545-56.
- Luft FC**. [Cum grano salis] *Dtsch Med Wochenschr* **1999**; 124(45): 1351-5.
- Mancia G**, De Backer G, Dominiczak A et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension, The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens.* **2007**; 25: 1105-87.
- Mancia G**, De Backer G, Dominiczak A et al. 2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension, ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens.* **2007**; 25(9): 1751-62.
- Mann JF**, Gerstein HC, Pogue J, Bosch J, Yusuf S. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: the HOPE randomized trial. *Ann Intern Med.* **2001**; 134(8): 629-36.
- Manunta P**, Cusi D, Barlassina C et al. Alpha-adducin polymorphisms and renal sodium handling in essential hypertensive patients. *Kidney Int.* **1998**; 53(6): 1471-8.
- Mashimo T**, Nabika T, Matsumoto C et al. Aging and salt-loading modulate blood pressure QTLs in rats. *Am J Hypertens* **1999**; 12(11 Pt 1): 1098-104.
- Masseroli M**, O'Valle F, Andujar M et al. Design and validation of a new image analysis method for automatic quantification of interstitial fibrosis and glomerular morphometry. *Lab Invest.* **1998**; 78: 511-22.

- Matsumoto C**, Nara Y, Ikeda K et al. Cosegregation of the new region on chromosome 3 with salt-induced hypertension in female F2 progeny from stroke-prone spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **1996**; 23(12): 1028–34.
- Moreno C**, Dumas P, Kaldunski ML et al. Genomic map of cardiovascular phenotypes of hypertension in female Dahl S rats. *Physiol Genomics* **2003**; 15(3): 243-57.
- Moreso F**, Seron D, Vitria J et al. Quantification of interstitial chronic renal damage by means of texture analysis. *Kidney Int.* **1994**; 46: 1721-7.
- Morimoto A**, Uzu T, Fujii T et al. Sodium sensitivity and cardiovascular events in patients with essential hypertension. *Lancet.* **1997**; 350(9093): 1734-7.
- Murray CJ**, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* **1997**; 349 (9061): 1269-76.
- Okamoto K**, Yamori Y, Nagaoka A. Establishment of the Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). *Circ. Res.* **1974**; 34-35 (suppl. I): I43-I53.
- Orth SR**, Esslinger JP, Amann K, Schwarz U, Raschack M, Ritz E. Nephroprotection of an ET(A)-receptor blocker (LU 135252) in saltloaded uninephrectomized stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* **1998**; 31(4): 995–1001.
- Raij L**, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int.* **1984**; 26(2): 137-43.
- Rapp JP**. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev.* **2000**; 80(1): 135-72.
- Rubattu S**, Volpe M, Kreutz R, Ganten U, Ganten D, Lindpaintner K. Chromosomal mapping of quantitative trait loci contributing to stroke in a rat model of complex human disease. *Nat Genet.* **1996**; 13(4): 429-33.
- Ruilope LM**, Salvetti A, Jamerson K et al. Renal function and intensive lowering of blood pressure in hypertensive participants of the hypertension optimal treatment (HOT) study. *J Am Soc Nephrol.* **2001**; 12(2): 218-25.
- Russel JR**, Baker HJ. Historical Foundations, in Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL: *The Laboratory Rat*, 2. Aufl., Oxford: Elsevier LTD, **1980**, Kapitel 1: 1-52.
- Rutherford PA**. Genetic influences in human hypertension. *J Hypertens.* **2003**; 21(1): 19-22.
- Schulz A**. Genetische Charakterisierung der MWF-Ratte: Ein Rattenmodell zur Identifizierung genetischer Faktoren, die zu arterieller Hypertonie und Proteinurie führen. Dissertation Freie Universität Berlin, **2002**.

- Schulz A**, Litfin A, Kossmehl P, Kreutz R. Genetic dissection of increased urinary albumin excretion in the Munich Wistar Frömter rat. *J Am Soc Nephrol.* **2002**; 13(11): 2706-14.
- Schulz A**, Standke D, Kovacevic L et al. A major gene locus links early onset albuminuria with renal interstitial fibrosis in the MWF rat with polygenetic albuminuria. *J Am Soc Nephrol.* **2003**; 14(12): 3081-9.
- Siegel AK**. Experimentelle Genetik der salzsensitiven Hypertonie und hypertensiven Endorganschäden. Dissertation, Charité – Universitätsmedizin Berlin, **2004**.
- Siegel AK**, Kossmehl P, Planert M et al. Genetic linkage of albuminuria and renal injury in Dahl salt-sensitive rats on a high-salt diet: comparison with spontaneously hypertensive rats. *Physiol Genomics.* **2004**; 18(2): 218-25.
- Stallings RL**, Ford AF, Nelson D, Torney DC, Hildebrand CE, Moyzis RK. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics.* **1991**; 10(3): 807-15.
- Statistisches Bundesamt**, Todesursachen in Deutschland 2006 - Fachserie 12 Reihe 4, **2007**: 6.
- Tanase H**, Yamori Y, Hansen CT, Lovenberg W. Heart size in inbred strains of rats, Part I: Genetic determination of the development of cardiovascular enlargement in rats. *Hypertension.* **1982**; 4(6): 864–72.
- Timberlake DS**, O'Connor DT, Parmer RJ. Molecular genetics of essential hypertension: recent results and emerging strategies. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **2001**; 10(1): 71-9.
- van Rossum CT**, van de Mheen H, Witteman JC, Hofman A, Mackenbach JP, Grobbee DE. Prevalence, Treatment, and Control of Hypertension by Sociodemographic Factors Among the Dutch Elderly. *Hypertension.* **2000**; 35(3): 814-21.
- Weinberger MH**, Miller JZ, Luft FC, Grim CE, Fineberg NS. Definitions and characteristics of sodium sensitivity and blood pressure resistance. *Hypertension.* **1986**; 8(6Pt2): II127-34.
- Weinberger MH**, Fineberg NS. Sodium and volume sensitivity of blood pressure. Age and pressure change over time. *Hypertension.* **1991**; 18(1): 67-71.
- Weinberger MH**. Salt sensitivity of blood pressure in humans. *Hypertension.* **1996**; 27(3): 481-90.
- WHO/ISH-Guidelines Sub-Committee**. 1999 World Health Organisation-International Society of hypertension guidelines for the management of hypertension. *J Hypertens.* **1999**; 17: 151-83.
- Williams JR**, Harrision TR, Grollmann A. A simple method for determining the systolic blood pressure of the unanesthetized rat. *J Clin Invest.* 1939; 18(3): 373-6.

Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR et al. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA*. **2003** May 14; 289(18): 2363-9.

Yamori Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR), the stroke-prone SHR (SHRSP) and their various substrain models for hypertension-related cardiovascular disease. In: Ganten D, de Jong W, ed. *Handbook of Hypertension*. **1994**, Elsevier Science B.V., Vol. 16, 346-64.

Zucchelli P, Zuccala A, Borghi M et al. Long-term comparison between captopril and nifedipine in the progression of renal insufficiency. *Kidney Int*. **1992**; 42(2): 452-8.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Klinische Pharmakologie, Centrum für Therapieforschung, des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz dafür, dass ich unter seiner Betreuung diese Promotion anfertigen konnte. Er hatte immer ein offenes Ohr und half mir stets bei der Lösung von Problemen, auch wenn er selbst beruflich sehr in Anspruch genommen wurde.

Für die guten Forschungsbedingungen bei der Erarbeitung der experimentellen Grundlagen von 2000 bis 2002 sei Herrn Prof. Dr. Martin Paul als damaligem Direktor des Institutes für Klinische Pharmakologie und Toxikologie gedankt.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. med. Peter Koßmehl und Frau Helga Stürje, die mir bei der Einarbeitung in die histologischen Methoden halfen, die einen großen Teil meiner Arbeit darstellten.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. med. Gerold Koplín, der mich stets unterstützt hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere Herrn Bujar Aliu, möchte ich für die gute und freundliche Zusammenarbeit danken.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich bei der vorliegenden Arbeit und meinem gesamtem beruflichen Lebensweg stets unterstützt haben.

9.2 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

9.3 Erklärung

„Ich, Gregor Fahrenholz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema *Histomorphologische und molekulargenetische Untersuchungen zur Pathogenese der Nephropathie bei salzsensitiver spontaner Hypertonie im Rattenmodell* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittels benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift