

Freie Universität Berlin



Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung der pathophysiologischen Bedeutung  
der erhöhten ACE-Genexpression bei spontaner Hypertonie  
im kongenen Rattenmodell**

Vorgelegt von

Ibrahim Nassar

aus Beit-Hanun/Gaza-Streifen, Palästina

Dezember 2015

Diese Arbeit wurde von März 2004 bis November 2008 an der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Klinische Pharmakologie, Campus Benjamin Franklin, in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Reinhold Kreutz durchgeführt.

Gutachter:

Prof. Dr. Reinhold Kreutz, Charité - Universitätsmedizin Berlin

Prof. Dr. Matthias Melzig, Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin

Datum der Disputation: 20.04.2016

Meinem Vater

## **DANKSAGUNG**

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Klinische Pharmakologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, angefertigt. Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Reinhold Kreutz, für die Aufnahme in sein Forschungsteam, für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die hervorragende Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft während der gesamten Promotion. Herrn Prof. Dr. Melzig danke ich herzlich für seine Motivation und die Bereitschaft, meiner Dissertation als Zweitgutachter zur Verfügung zu stehen. Besonderer Dank gilt meiner geschätzten Kollegin Frau Dr. Angela Schulz für die Unterstützung während der experimentellen Arbeiten und ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion der Resultate. Allen Doktoranden und Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die ausgesprochen freundliche Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Besonders erwähnen möchte ich hier Dr. Juliane Bolbriker, Dr. Claudia Junge, Dr. Markus Wehland-von Trebra, Dr. Norbert Wendt, Dr. Matthias Huber, Dr. Jacqueline Schönfelder, Sabine Wunderlich, Katrin Kossatz, Gabriele Riedel und Heike Negatu. Für die Durchführung und Betreuung der Rattenzucht am FEM/FU danke ich Simone Pechmann und Bettina Bublath. Mein Dank gilt auch den Kooperationspartnern meiner Arbeit, Herrn Prof. Dr. Jan Danser, Niederlande und Ralph Plehm am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin. Meinem Team in der Tannenberg Apotheke in Berlin danke ich für ihre freundliche Unterstützung. Besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern in Palästina bedanken, die mich stets aus der Ferne unterstützt und mir den Weg, den ich einschlug, stets mental und mit viel Rückhalt ermöglicht haben. Nicht zuletzt danke ich herzlich meiner Ehefrau Nevin, die neben ihrem Studium und ihrer eigenen Promotion mir zur Seite stand, mich mental und fachlich motivierte und mir in meinem gesamten beruflichen Werdegang eine liebevolle Unterstützung war und ist. Ebenso danke ich meinen Kindern Amir, Ali, Razan und Riemas für ihre Geduld und die mitunter notwendige Ablenkung.

# INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG .....	3
INHALTSVERZEICHNIS .....	4
ABSTRACT .....	7
ZUSAMMENFASSUNG .....	8
ABKÜRZUNGEN .....	9
1. EINLEITUNG .....	13
1.1 Die arterielle Hypertonie .....	13
1.2 Das Renin-Angiotensin-System .....	15
1.2.1 Eigenschaften und Funktion.....	15
1.2.2 Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE).....	19
1.3 Genetik der arteriellen Hypertonie.....	20
1.3.1 Allgemeine Angaben .....	20
1.3.2 Identifizierung hypertensiver Gene .....	22
1.3.3 Das ACE-kodierende Gen .....	24
1.4 Tiermodelle.....	26
1.4.1 Allgemeine Angaben .....	26
1.4.2 Hypertensive Rattenmodelle.....	27
1.4.3 Normotensives Rattenmodell: Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) .....	29
1.4.4 Kongene Rattenmodelle.....	29
2. ZIELSTELLUNG .....	31
3. MATERIAL UND METHODEN .....	32
3.1 Materialien .....	32
3.1.1 Material und Chemikalien.....	32
3.1.2 Radionukleotide .....	34
3.1.3 Kits .....	34
3.1.4 Enzyme .....	34

3.1.5 Basenpaarleitern für die Agarosegel-Elektrophorese .....	35
3.1.6 Primer und Sonden für die RT-qPCR .....	35
3.1.7 Internetbasierte Literatur .....	36
3.1.8 Puffer und Lösungen .....	37
3.1.9 Sonstige Materialien und Futtermittel .....	39
3.1.10 Geräte .....	40
3.2 Methoden.....	42
3.2.1 Tierhaltung .....	42
3.2.2 Zucht des kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace <sub>(D10Rat99-D10Rat3)</sub> .....	42
3.2.3 Zucht des kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace <sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> .....	43
3.2.4 Präparation .....	45
3.2.5 DNA-Isolierung .....	45
3.2.6 Genomanalyse mit Mikrosatellitenmarkern .....	46
3.2.7 Radiomarkierung mit einer Polynukleotidkinase .....	47
3.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	47
3.2.9 Gelelektrophorese .....	47
3.3 Phänotypisierung .....	50
3.3.1 Blutdruckmessung mittels Tail-Cuff-Verfahren.....	50
3.3.2 Blutdruckmessung mittels Radiotelemetrie .....	50
3.3.3 ACE-Aktivität im Plasma und Gewebe (Membranproteine).....	51
3.3.4 ACE-mRNA.....	52
3.3.5 Bestimmung der plasmatischen Reninkonzentration.....	55
3.3.6 Bestimmung von Angiotensin I und II im Herzen .....	55
3.4 Statistik .....	56
4. ERGEBNISSE .....	57
4.1 Genotypisierung des kongenen Stamms .....	57
4.2 Phänotypisierung des kongenen Stammes .....	59
4.2.1 Körper- und Organgewichte .....	59

4.2.2 Blutdruck, Herzfrequenz.....	60
4.2.3 ACE-Aktivität im Plasma .....	61
4.2.4 Reninkonzentration im Plasma .....	61
4.2.5 ACE-mRNA- und ANP-mRNA-Expression, ACE-Aktivität und Ang I- und Ang II -Konzentration in den Organen und im Gewebe .....	63
5. DISKUSSION.....	74
5.1 Allgemeine Aspekte .....	74
5.2 Blutdruck.....	77
5.3 Plasmatische ACE-Aktivität .....	78
5.4 Körper- und Organgewichte .....	79
5.5 ACE-Genexpression .....	81
5.6 Renin Angiotensin System.....	82
5.7 Das Lokale RAS in der Niere und im linken Ventrikel .....	84
6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....	88
7. LITERATURVERZEICHNIS .....	90
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	104
9. ANHANG.....	105
9.1 Mikrosatellitenmarker für die Genomanalyse.....	105
9.2 Untersuchte Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 10 .....	110
9.3 Sequenzen der polymorphen Marker auf Chromosom 10 .....	113
9.4 ACE-Teil-Gensequenz (2257-2491 bp) im Intron 16 der Ratte.....	115
9.5 Genomkarte des Chromosoms 10 der Ratte .....	116
VERÖFFENTLICHUNGEN .....	117
Originalarbeiten .....	117
Poster und Vorträge.....	117
Stipendien und Auszeichnungen .....	118
LEBENS LAUF .....	120

## ABSTRACT

Hypertension affects a large part of the human population across the world and is associated with the development of cardiovascular morbidity and mortality. The chronic elevation of blood pressure is regarded as a multifactorial complex disease caused by both genetic and environmental factors. Despite the progress in the field of genetic and genomic research, the genetic determinants of hypertension are largely unclear. This work investigates the role of a naturally genetic variant occurring in rat models that mirrors phenotypically the insertion/deletion (I/D) polymorphism in intron 16 observed in humans. This work also explains its regulating influence on the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene (*Ace* in rat) expression. To this end, we established a novel congenic rat strain termed SHRSP.WKY-*Ace*<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> from stroke-prone spontaneously hypertensive (SHRSP) rats where a chromosomal fragment of rat chromosome 10 was replaced by the Wistar-Kyoto (WKY) rat locus. Specific hypertensive rat strains selectively bred over several generations are suitable to overcome the limitations inherent to functional genetic studies in human populations. By comparison of blood pressure, plasma ACE activity, tissue ACE messenger RNA (mRNA) and enzyme activities in kidney, lung, and left ventricle (LV) of the heart in adult animals, we showed that a genetically determined high ACE expression linked to WKY *Ace* remains unchanged in the hypertensive background of SHRSP.WKY-*Ace*<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>. Thus, a significant twofold increase in plasma ACE activity compared to SHRSP was observed in the congenic strain ( $p < 0.05$ ). Likewise, the elevated tissue ACE mRNA expression and the enzyme activity in kidney, lung, and LV observed in WKY compared to SHRSP rats was also observed in the congenic strain (SHRSP.WKY-*Ace*<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> vs. SHRSP,  $p < 0.05$ ). In contrast, both systolic and diastolic blood pressure were not different between SHRSP.WKY-*Ace*<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> and SHRSP. Based on these results and due to analysis of angiotensin in LV tissue and renin in plasma, the induction of compensatory mechanisms is proposed, where a possible pathway relies on buffering properties of the renin-angiotensin system by a downregulation of angiotensin I and renin concentrations in congenic animals. This observation is in keeping with the finding that development of spontaneous hypertension in SHRSP.WKY-*Ace*<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> is not affected and aggravated despite a higher ACE expression. Although the mechanisms underlying the compensatory mechanisms in the congenic SHRSP.WKY-*Ace*<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> strain remain to be elucidated this work clearly demonstrates that fairly hypertensive SHRSP rats can cope with an inborn twofold increase of ACE expression in plasma and tissue.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die essentielle arterielle Hypertonie stellt eine komplexe und multifaktorielle Erkrankung mit sehr hoher Prävalenz dar, welche dem Einfluss einer polygenen Veranlagung als auch diverser Umwelteinflüsse unterliegt und mit Folgeerkrankungen kardiovaskulärer, renaler und zerebrovaskulärer Art assoziiert ist. Für die Aufklärung der genetischen Ursachen der Hypertonie ist der Insertions-Deletions-(I/D)-Genpolymorphismus auf Intron 16 des für die Expression des ACE (Angiotensin-Converting-Enzym) verantwortlichen Gens beim Menschen von Bedeutung und ein zentraler Gegenstand der modernen kardiovaskulären Forschung. Im Rahmen dieser Dissertation wurde zur Untersuchung der Bedeutung der ACE-Genexpression im Zusammenhang mit arterieller Hypertonie ein neuer kongener Rattenstamm SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> etabliert. Dieser wurde gekreuzt aus einem hypertensiven Rattenstamm (*stroke prone hypertensive rat*, SHRSP) als Akzeptor und einem normotensiven Rattenstamm (*Wistar Kyoto rat*, WKY) als Donor, der über eine genetisch erhöhte ACE-Genexpression verfügt. Dabei wurde der *Ace-Locus*, der sich auf Chromosom 10 befindet, vom normotensiven WKY-Stamm auf den hypertensiven SHRSP-Stamm übertragen. In der phänotypischen Analyse besitzt der kongene Stamm eine zweifach höhere ACE-Aktivität im Plasma und in den pulmonalen, renalen und kardialen Geweben sowie eine zweifach erhöhte ACE-mRNA-Expression in der Lunge, in der Niere und im linken Ventrikel vergleichbar dem WKY-Stamm. Zudem verfügt der kongene Stamm über die hypertensiven Eigenschaften des SHRSP-Stammes. Diese Unterschiede sind signifikant zum jeweils anderen Parentalstamm ( $p < 0,05$ ). Die erhöhte ACE-Genexpression im linken Ventrikel führte im kongenen Stamm in Kombination mit niedriger Ang I- und Plasmareninkonzentration zu vollständiger Kompensation und damit nahezu gleichwertigen Ang II-Konzentrationen. Es kommt im kongenen Stamm durch die Übertragung des *Ace-Locus* von WKY auf den hypertensiven Hintergrund der SHRSP zur keiner statistisch signifikanten Veränderung der ACE-Genexpression in allen untersuchten Geweben im Vergleich zum WKY-Parentalstamm und zu keiner statistisch signifikanten Veränderung des Bluthochdrucks im Vergleich zum SHRSP-Parentalstamm. Die Ergebnisse stützen die Annahme ausgeprägter homöostatischer Effekte innerhalb des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Die Kompensationsmechanismen innerhalb des RAS tragen dazu bei, dass es trotz einer durchschnittlich verdoppelten ACE-Genexpression zu keiner weiteren Erhöhung der spontanen Hypertonie bei den kongenen Tieren kommt.

## ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
A, C, G, T, U	Stickstoffbasen Adenosin, Cytidin, Guanosin, Thymidin, Uracil
ACE	Angiotensin Converting Enzym
ADH	antidiuretisches Hormon, Vasopressin
Agt	Angiotensinogen
Agtr	Angiotensin II Rezeptortypen Gene
Agtr1a	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1a Gen
Agtr1b	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1b Gen
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANOVA	Statistische Analyse der Varianz
ANP	Atriales natriuretisches Protein
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
AS	Antisense Primer
AT <sub>1</sub>	Angiotensin II Rezeptor Typ I
AT <sub>2</sub>	Angiotensin II Rezeptor Typ II
AT <sub>1a</sub>	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1a
AT <sub>1b</sub>	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1b
Bp	Basenpaare (Maßeinheit für die Anzahl der Nukleotide)
BC	Backcross
BP/SP-1	Blutdruck-QTL auf Chromosom 10 der Ratte
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cDNA	Kodierende, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	Coding sequence (kodierende Sequenz)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cM	Centimorgan (Einheit für die genetische Kartierung)
cpm	Counts per minute
(d)dATP	(Di)Desoxyadenosintriphosphat
(d)dCTP	(Di)Desoxycytidintriphosphat
(d)dGTP	(Di)Desoxyguanosintriphosphat
(d)dNTPs	(Di)Desoxynukleotidtriphosphat

(d)dTTP	(Di)Desoxythymidintriphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DBD	Diastolischer Blutdruck
et al.	et alia
Fa.	Firma
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
F <sub>1</sub> -/F <sub>2</sub> -Generation	Erste-/ zweite- Filialgeneration
FU Berlin	Freie Universität Berlin
g	Gramm
GenBank	Datenbank aller öffentlich zugänglichen Gensequenzen, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
h	Stunde
HD	Abstammend von Kolonien an der Universität Heidelberg
Hf	Herzfrequenz
HG	Herzgewicht
IE	Internationale Einheit
Kb	Kilobasen
KD	Kilodalton
KG	Körpergewicht
l	Liter
LM	Längenmarker, Längenstandard für DNA- und RNA-Moleküle
LOD	Logarithm of the odds
LV	Linker Ventrikel
LV+S	Linker Ventrikel inkl. Septum
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
M	Mol, molar
m	Milli
μ	Micro
min	Minute
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Boten- (messenger) Ribonukleinsäure

MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NG	Nierengewicht
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS (e, i, n)	NO-Synthase (endothelial, induzierbar, neuronal)
OD	optische Dichte
P	Wert für die statistische Signifikanz
P-Generation	Parentalgeneration
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Konzentration
pmol	Picomol
QTL	Quantitative Trait Locus / Loci
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	radioaktives Adenosintriphosphat
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
Rad	radiation absorbed dose, 1 rad = 0,01 Gy (Gray)
RAS	Renin Angiotensin System
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsen	RNA zersetzende Enzyme mit ubiquitärem Vorkommen
RNO	Chromosom, auf die Ratte, Rattus norvegicus, bezogen
RT	reverse Transkription / Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SBD	systolischer Blutdruck
sec.	Sekunde
Seq.	Sequenzierung
SHR	spontaneously hypertensive rat
SHRSP	stroke-prone spontaneously hypertensive rat
SHRSP <sub>HD</sub>	SHRSP-Stamm, gezüchtet in Heidelberg
SHRSP.WKY-Ace	kongener Stamm: SHRSP.WKX-Ace(D10Rat142-D10Rat12)
s. o.	siehe oben
SNP	single nucleotide polymorphism
SSLP	simple sequence length polymorphism
s. u.	siehe unten

T	Temperatur
T <sub>a</sub>	Annealing-Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
Taq	Thermus aquaticus
TD	Touch down (PCR-Programm mit abnehmenden Annealing-Temperaturen)
U	Unit (Maßeinheit für die Enzymaktivität)
U/l	Units pro Liter
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vs.	versus
W	Watt
WKY	Wistar-Kyoto Ratte
WKY-0 <sub>HD</sub>	Wistar-Kyoto Kolonie gezüchtet in Heidelberg
WTCCC	Wellcome Trust Case Control Consortium

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Die arterielle Hypertonie

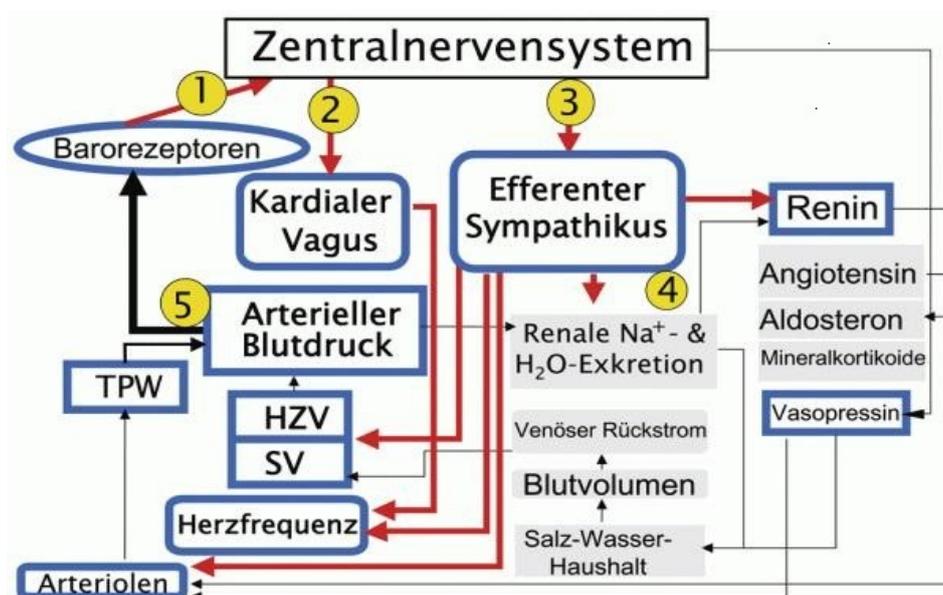
Die arterielle Hypertonie (Bluthochdruck, nachfolgend vorwiegend als Hypertonie bezeichnet) beschreibt die chronische Erhöhung des Blutdrucks. Sie betrifft 20 bis 30 Prozent der Weltbevölkerung (Kearny et al., 2005), wobei die Bundesrepublik Deutschland im internationalen Vergleich mit einer Prävalenz von 55 Prozent eine Spitzenposition erreicht (Wolf-Maier et al., 2003). Hypertonie ist überwiegend ein Problem der fortschrittlichen Industrienationen, da vorrangig Personen im Alter ab etwa 45 Jahren aus schwächeren und mittleren sozialen Schichten betroffen sind (Lawes et al., 2008). Männer unterscheiden sich deutlich von den Frauen. Obwohl jüngere Frauen zwar seltener einen erhöhten Blutdruck entwickeln als Männer, kehrt sich das Verhältnis im Alter jedoch um. Sie sind dann auch stärker von Herz-Kreislauf-Erkrankungen betroffen (Tschafary und Oertelt-Prigione, 2014).

Hypertonie begünstigt die renale, kardio- und zerebrovaskuläre Morbidität und Mortalität. Im globalen Maßstab sind 13,5 Prozent aller Todesfälle, 54 Prozent der Schlaganfälle und 47 Prozent der ischämischen Herzerkrankungen auf erhöhten Blutdruck zurückführbar (Lawes et al., 2008). Typische, auf chronischen Bluthochdruck zurückgehende Erkrankungen sind beispielsweise die Koronare Herzkrankheit (KHK), Hypertonie-bedingte Herzinsuffizienz und zerebrovaskuläre sowie periphere Gefäßerkrankungen. Weitere Endorganschäden betreffen die Herzhypertrophie und Nephrosklerose (Collins und MacMahon, 1994; Mosterd et al., 1999). Im Allgemeinen liegt eine Hypertonie vor, wenn der Blutdruck 139 mmHg (systolisch) oder 89 mmHg (diastolisch) oder beide Schwellenwerte gemeinsam überschreitet ( $\geq 140/90$  mmHg).

In Abhängigkeit der ätiologischen Entwicklung wird zwischen primärer (essentieller) und sekundärer Hypertonie unterschieden. Die primäre Hypertonie ist vorherrschend und umfasst Spielarten, deren Pathomechanismus nicht identifiziert werden kann und daher lediglich einer symptomatischen Behandlung zugänglich ist. Dagegen liegt der sekundären Hypertonie eine bekannte Ursache zugrunde. In diesen Fällen kann der Blutdruck häufig durch gezieltes und rechtzeitiges therapeutisches Eingreifen normalisiert werden. Die sekundäre Hypertonie liegt nur in 5 bis 10 Prozent der Fälle vor (Ganten und Ritz, 1998) ist aber bei der Diagnose als Ausschlusskriterium hilfreich.

Ein Grund für die Unsicherheiten sind die zahlreichen und divergierenden Einflüsse auf den Blutdruck.

Die Abbildung 1 zeigt ein vereinfachtes Schema der Blutdruckregulation: Die Aktivität der barorezeptorischen Afferenten (1) wird zentralnervös durch Vagus (2) und Sympathikus (3) beantwortet. Neurohormonale Informationen beeinflussen u. a. das Renin-Angiotensin-System, den Wasser-Salz-Haushalt (4), das Herzzeitvolumen und den peripheren Widerstand. Der arterielle Blutdruck (5) schließt den Regelkreis (Peters, 2008).



**Abb. 1:** Darstellung zur Blutdruckregulierung beim Menschen, HZV, Herzzeitvolumen; SV, Schlagvolumen; TPW, totaler peripherer Widerstand (Peters, 2008)

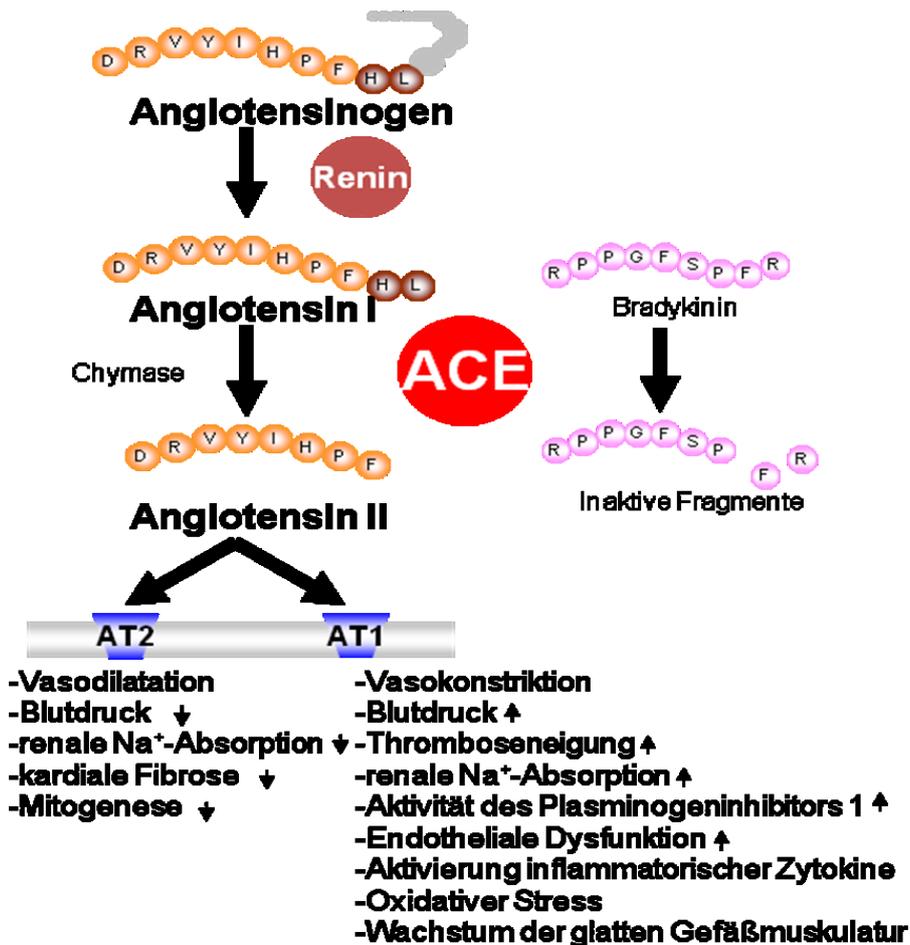
Zur medikamentösen Behandlung der arteriellen Hypertonie stehen 5 Substanzklassen als Medikamente der ersten Wahl zur Auswahl, die ein breites Therapiespektrum ermöglichen. So können die Vertreter dieser Substanzklassen auch miteinander kombiniert werden, um eine stärkere Senkung des Blutdrucks zu erzielen. Da eine Monotherapie oftmals nicht ausreicht, betonen die nationalen und internationalen Leitlinien die Notwendigkeit zur Kombination von zwei oder mehr Präparaten bei Hochrisikopatienten (Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL<sup>®</sup>, 2014).

## 1.2 Das Renin-Angiotensin-System

### 1.2.1 Eigenschaften und Funktion

Bei der Regulierung des Blutdrucks und der physiologischen Elektrolytbilanz spielen das Renin-Angiotensin-System (RAS) und seine Komponenten eine zentrale Rolle (Abb. 2). Der Regelkreis ist seit Ende des 19. Jahrhunderts bekannt, doch wird er nach wie vor immer noch unzureichend verstanden (Cat und Touyz, 2011; Zhuo und Li, 2011). Traditionell wird das RAS als endokrines System aufgefasst, das von der Kontrolle durch Renin und von der Wirkung des Angiotensins II und des Typ-1-Rezeptors  $AT_1$  beherrscht wird. Detaillierte graphische Übersichten zum RAS finden sich bei Smithies et al., 2000, Agata et al., 2006 und Bérard et al., 2014.

Renin ist ein Vertreter aus der Reihe der Proteasen (C-N-Hydrolasen). Das Enzym wird in den Zellverbänden des juxtaglomerulären Apparats der Niere sezerniert. Die Voraussetzung dafür ist ein vorausgehender Abfall des Blutdrucks, worauf die Barorezeptoren der arteriellen Nierengefäße die Ausschüttung des Renins einleiten. Die  $Na^+$ -Konzentration im distalen Tubulus spielt dabei eine Schlüsselrolle. Im ersten Schritt der Kaskade spaltet Renin katalytisch eine Leucin-Leucin-Bindung im aus der Leber stammenden Plasmaprotein Angiotensinogen, wodurch das physiologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) freigesetzt wird. Die Abspaltung von zwei Aminosäuren aus Ang I durch Einwirkung von ACE (s. u.) führt zum physiologisch wirksamen Angiotensin II (Ang II). Ang II wirkt stärker vasokonstriktorisch als Noradrenalin (Auterhoff, Knabe und Höltje, 1999, S. 517) und kurbelt in den Nebennieren die Produktion von Aldosteron an, das die tubuläre Rückresorption von Natrium begünstigt. Ang II und andere grundlegende RAS-Bestandteile werden in geringem Umfang auch im Herzen exprimiert (Morgan et al., 1994). Durch systemische Zirkulation wird Ang II im peripheren Gewebe verbreitet und kann seine vielfältige biologische Aktivität über zwei heterotrimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-protein-coupled receptors, GPCR),  $AT_1$  (Ang II Typ I-Rezeptor) und  $AT_2$  (Ang II Typ II-Rezeptor) entfalten. Die Bindung von Ang II an den  $AT_1$ - oder  $AT_2$ -Rezeptor hat gegenteilige und damit sehr unterschiedliche Konsequenzen (Levy, 2005). Für die Entwicklung von Bluthochdruck ist die Bindung an den  $AT_1$ -Rezeptor ausschlaggebend, da alle hierfür notwendigen Parameter (Blutvolumen, Vasokonstriktion/Gefäßverengung, Herzkontraktion) beeinflusst werden (Bérard et al., 2014).



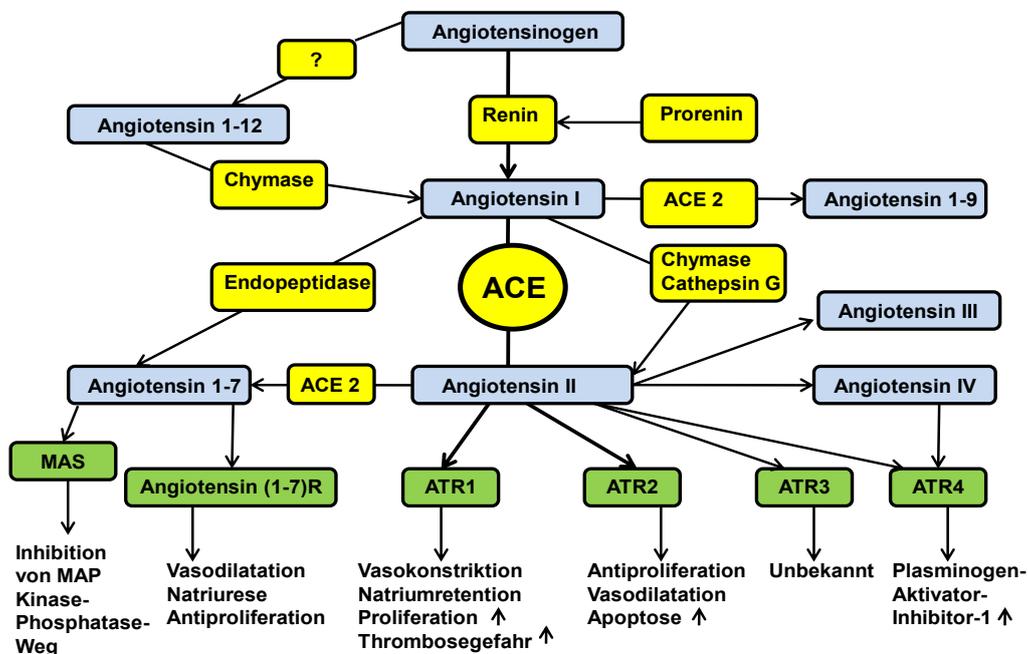
**Abb. 2:** Schematische Darstellung der ersten molekularen Schritte der Renin-Angiotensin-Kaskade und Effekte von ACE durch Bildung von Ang II und Aktivierung der AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptoren. Spaltung von Angiotensinogen zu Angiotensin I durch Renin, weitere Spaltung von Ang I zu Ang II durch ACE, gleichzeitig spaltet ACE Bradykinin in seine inaktiven Fragmente (rechts).

Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor ist im Vergleich zu seinem Komplementär AT<sub>2</sub> der (patho-)physiologisch wirksamere. Es ragen die vasokonstriktorisches und proliferationsfördernden Effekte hervor (Verheijen et al., 2004). Ang II vermittelt über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor neben einer Vasokonstriktion der Blutgefäße eine Stimulierung der Aldosteron- und Adrenalinfreisetzung in der Nebenniere und die Freisetzung von ACTH und Vasopressin in der Hypophyse. Es folgt eine Natrium- und Wasserretention und eine Minderung der glomerulären Filtrationsrate, womit ein Durstgefühl einhergeht und AT<sub>1</sub>-Rezeptoren im Hypothalamus stimuliert werden. Die chronische Stimulierung dieser Rezeptoren führt zur Proliferation der glatten Muskelzellen und Myozyten, zu vaskulärer und kardialer Hypertrophie, Nephrosklerose und endothelialer Dysfunktion (Schelling et al., 1991; Verheijen et al., 2004). Der AT<sub>2</sub>-Rezeptor ist hinsichtlich der Primärstruktur

(Aminosäuresequenz) nur zu 34 Prozent dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor homolog (Cat und Touyz, 2011). Seiner mutmaßlich nachgeordneten Bedeutung entsprechend wird der AT<sub>2</sub>-Rezeptor in vergleichsweise geringen Mengen im Organismus gefunden. Die Expression wird durch pathologische Vorgänge stimuliert - neben Hypertonie sind das auch Nieren- und Herzversagen sowie Diabetes (Cat und Touyz, 2011). Die Stimulierung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors induziert Vasodilatation, Natriuresis und Apoptose, was über eine Stimulierung von NO und cGMP vermittelt wird (Savoia et al., 2006; Yayama und Okamoto, 2008).

Ratte und Maus verfügen im Vergleich zum Menschen über zwei zusätzliche AT<sub>1</sub>-Rezeptorsubtypen AT<sub>1a</sub> und AT<sub>1b</sub> (Sasamura et al., 1992). Diese beiden Rezeptoren sind bezüglich ihrer Primärstruktur zu 95 Prozent und bezüglich ihrer Nukleotid-Basis zu 92 Prozent identisch. Sie unterscheiden sich durch ihr C-terminales Ende (Manaka et al., 2011). Pharmakologisch sind beide Subtypen nicht zu unterscheiden, da die Bindung von Liganden und die Signaltransduktion einen ähnlichen Verlauf nehmen (Manaka et al., 2011). Gleichwohl unterscheiden sie sich bezüglich der Verteilung im Gewebe, da sie Produkte unterschiedlicher Gene (Agtr1a, Agtr1b) sind und dementsprechend eine unterschiedliche Expression und Regulierung erfahren (Iwai und Inagami, 1992; Sasamura et al., 1992; Yoshida et al., 1992). Der AT<sub>1a</sub>-Rezeptor ist in den meisten Organen vorherrschend, während der AT<sub>1b</sub>-Rezeptor vor allem in der Nebenniere und der Hypophyse zu finden ist (Burson et al., 1994, Premer et al., 2013). Für den AT<sub>1b</sub>-Rezeptor gibt es im Menschen keine Entsprechung, gleichwohl aber für den AT<sub>1a</sub>-Rezeptor (Manaka et al., 2011). Die Pharmakologie der Ang II-Rezeptoren, speziell in der Niere, ist eingehender untersucht worden (de Gasparo und Levens, 1994; de Gasparo et al., 2000). Das RAS wurde lange Zeit als linearer Prozess aufgefasst. Zu der klassischen Kaskade des ACE existieren allerdings parallele Wege (Abb. 3). Neuere Ergebnisse erfordern daher eine Adaption und Verfeinerung der klassischen Vorstellungen. Mit den Methoden der modernen Molekulargenetik nahm das Wissen über die ACE-Expression und die Blutdruckregulierung deutlich zu; beispielsweise wurde mit der Entdeckung von ACE2 ein möglicher Komplementär zum herkömmlichen ACE gefunden. So wandelt ACE2 Ang I zum vasodilatierend wirkenden Ang 1-9 um (Kamilic et al., 2010) und Ang II zu Ang 1-7 (s. u.). Desweiteren wird die Bildung von Ang II auch durch Cathepsin G oder durch die hauptsächlich im Herzen vorkommende Serinprotease Chymase katalysiert (Urata et al., 1996). Zu den weiteren wichtigen aktiven Metaboliten der Angiotensine zählt Ang 1-7. Die Bildung von Ang 1-7 erfolgt

entweder aus Angiotensin I durch die Endopeptidase Nephrylin oder aus Angiotensin II durch ACE2. Durch die Anbindung an seinen Ang 1-7 Rezeptor kommt es u. a. zu Vasodilatation und Natriurese. Ang 1-7 hat im Gegensatz zu Ang II eine kardiorenalprotektive Wirkung durch Bindung an den MAS-Rezeptor. Ang 1-7 wird durch ACE in verschiedene inaktive Metabolite gespalten z. B. Ang 1-5 oder Ang 1-4. Ebenfalls zu den wesentlichen Neuerungen zählt die Identifizierung eines Renin-Prorenin-Rezeptors, von Ang II abgeleitete funktionelle Peptide (Ang 1 bis Ang 12) und der Umstand, dass das RAS nicht auf die Niere beschränkt ist (Cat und Touyz, 2011; Bérard et al., 2014).



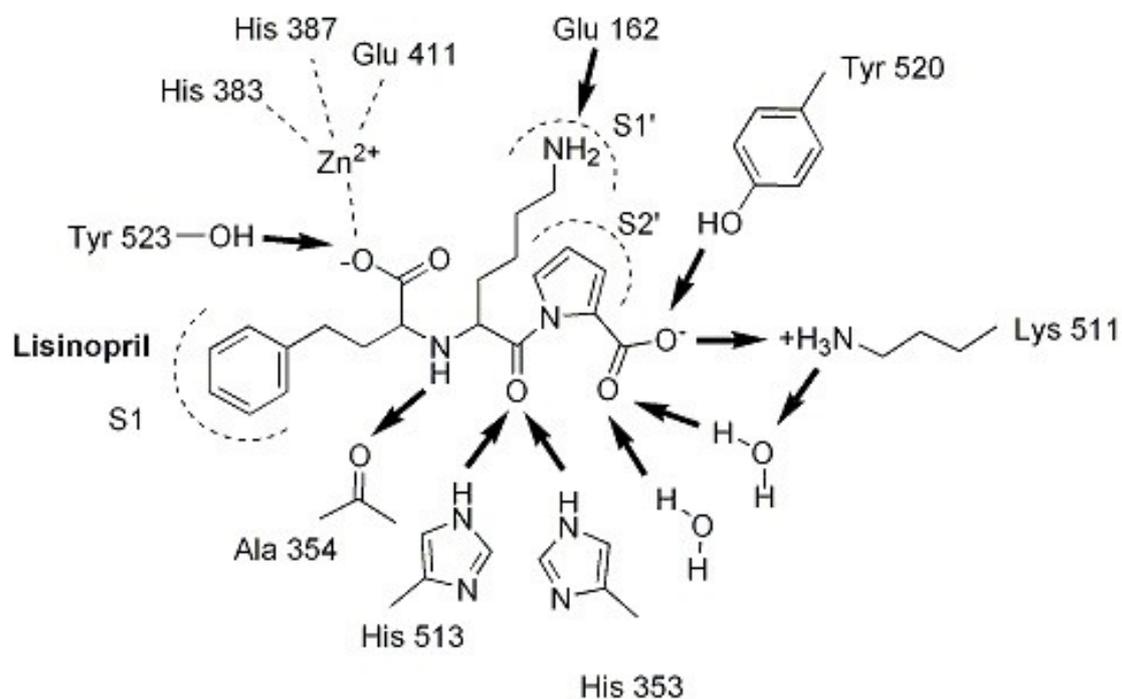
**Abb. 3:** Einfluss übergreifender Komponenten und deren Zusammenhänge im Renin-Angiotensin-System (RAS). Klassischer Weg von Angiotensinogenen zu Angiotensin I und II (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) durch Renin und ACE und bekannte Parallelmechanismen über Chymase, Cathepsin G, Endopeptidase und ACE2 zu den verschiedenen Spaltprodukten der Angiotensine (Ang 1 bis Ang 12) (Alreja et al., 2011).

## 1.2.2 Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)

Das Angiotensin-Converting-Enzym, kurz ACE (Synonyme: EC 3.4.15.1, Zinkmetallopeptidase, Peptidylpeptidase A oder Kininase II; bei der Ratte: *Ace*) ist eine membranständige Carboxypeptidase, die extrazellulär das physiologisch unwirksame Ang I durch Abspaltung eines Dipeptids (His-Leu) in wirksames Ang II umwandelt (vgl. die Angaben zum RAS). ACE war ab Mitte der 1980er Jahre als zentraler Bestandteil des RAS Ausgangspunkt für die Entwicklung der ACE-Hemmer (Antihypertensiva). Das und die Verbreitung der Hypertonie in den Industrienationen bedingen den hohen Bekanntheitsgrad von ACE auch außerhalb der Fachwelt. Obwohl die Rolle des ACE bei der Regulierung des Blutdrucks und des Elektrolythaushalts früh erkannt wurde, blieben die genetischen Faktoren, die zur Ausschüttung von ACE führten, lange Zeit ungeklärt. Erst die Entwicklung der modernen Molekulargenetik gestattete einen tieferen Einblick in die physiologischen Mechanismen der ACE-Expression.

Die molekulare Struktur von ACE ist uneinheitlich und variabel, weswegen sie von zahlreichen Autoren häufig ignoriert wird (Abb. 4). Die Struktur wird von der lokalen Positionierung, der katalytischen Aktivität und der Bindung (Komplexierungen) von Zink und Substraten maßgeblich beeinflusst (Natesh et al., 2003). Das menschliche ACE existiert in zwei Isoformen (*somatic* ACE, *testis* ACE). Im somatischen Gewebe liegt das Enzym separat als Polypeptid mit 1277 Aminosäuren vor (sACE). Es enthält zwei homologe Domänen (N- und C-Domäne), die zur Komplexierung von Zink(II)-Ionen befähigt sind. Beide Domänen unterscheiden sich in ihrer physiologischen Funktion, dem chlorid-abhängigen Aktivierungsprofil und der Selektivität gegenüber Substraten (Wirkstoffe, Inhibitoren). In Spermien findet sich eine modifizierte Glycoform aus 701 Aminosäuren (tACE) (Natesh et al., 2003; Fleming, 2006). ACE generiert nicht nur physiologisch wirksames Ang II, sondern bewirkt auch die Deaktivierung der vasodilatatorisch wirkenden Peptide Bradykinin und Kallidin als Folge einer enzymatischen Spaltung (Dorer et al., 1974; Kokkonen et al., 2000; Yang et al., 1970). Die ACE-Aktivität hängt von der Gegenwart von Chlorid ab, was ein Hinweis auf die Regulierung des Elektrolythaushalts ist, und wirkt in diesem Zusammenhang substratspezifisch. ACE findet sich daher vornehmlich auf der Oberfläche endothelialen Gewebes, da hier die plasmatische Chlorid-Konzentration im Blut nur wenig vom durchschnittlichen Wert von 100 mM abweicht, der für die Transformierung von Ang I in Ang II optimal ist (Shapiro et al., 1983). ACE ist dennoch in sehr unterschiedlichem,

nicht-vaskulärem Gewebe mit variierender Chlorid-Konzentration (Gehirn, Knochenmark, Bauchspeicheldrüse, Niere, Fettgewebe) nachgewiesen worden (Paul et al., 2006). Auch im intrazellulären Bereich wurde ACE festgestellt (Abadir et al., 2011), obwohl die Chlorid-Konzentration mit etwa 5 mM hier sehr gering ist. Daraus folgt zwangsläufig, dass die katalytische Aktivität für die Generierung vaskulär wirksamer Peptide der Chlorid-Konzentration entsprechend unterschiedlich ausfällt (Yates et al., 2014). Die ACE-vermittelte Signaltransduktion ist von Fleming, 2006 nachgezeichnet worden.



**Abb. 4:** Molekulare Struktur des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE). Links das Substrat Lisinopril als Enzym-Hemmer (gecco!®/modlab der Goethe-Universität Frankfurt am Main, 2004).

## 1.3 Genetik der arteriellen Hypertonie

### 1.3.1 Allgemeine Angaben

Obwohl in den vergangenen Jahrzehnten das Wissen über die Blutdruckregulierung deutlich erweitert wurde, harren die genauen genetischen Grundlagen der Hypertonie nach wie vor einer Klärung (Delles et al., 2010; Delles und Padmanabhan, 2012; Padmanabhan et al., 2012, Ehret und Caulfield, 2013). Eine wesentliche Triebkraft der Forschung ist die Entwicklung neuer Medikamente, die an der genetischen Struktur

ansetzen. Es ist sicher, dass der Hypertonie genetische Ursachen zugrunde liegen. Der Beitrag einer chinesischen Arbeitsgruppe sieht einen signifikanten Einfluss des ACE-I/D-Genpolymorphismus (s. u.) und der ACE-Aktivität auf die Entwicklung der Hypertonie (He et al., 2013). Sie wird gelegentlich im Rahmen der Mendelschen Vererbungsgesetze diskutiert (Binder, 2007; Padmanabhan et al., 2009; Delles et al., 2010). Studien belegen die Erbllichkeit von Hypertonie und zugleich die Relevanz von Umwelteinflüssen. Ältere Beiträge, die Hypertonie an Zwillingen (Feinleib et al., 1977) und an Familien beschreiben (Mongeau et al., 1986; Caulfield et al., 2003), suggerieren eine Vererbungswahrscheinlichkeit von 15 bis 40 Prozent für systolischen und 15 bis 30 Prozent für diastolischen Bluthochdruck (Delles et al., 2010). Die Zahlen sind nur als grober Hinweis auf die Erbllichkeit von Hypertonie zu verstehen, denn neben Messfehlern und der einseitigen Stichprobenauswahl leisten Umwelteinflüsse einen signifikanten Beitrag. So ergab eine generationenübergreifende Untersuchung an kanadischen Familien (Verwandtschaft 1. Grades, Vergleich von Eltern und biologischen bzw. adoptierten Kindern), dass der Blutdruck zu 61 Prozent (systolisch) bzw. 58 Prozent (diastolisch) genetisch und entsprechend zu 39 bzw. 42 Prozent von nicht-genetischen Einflüssen, also Umweltfaktoren bestimmt wird. Bei Geschwistern wurde der Blutdruck zu 33 Prozent von genetischen und zu 66 Prozent von nicht-genetischen Faktoren bestimmt; letztere setzten sich aus sowohl die Eltern als auch die Kinder gemeinsam begleitenden Umweltfaktoren (24 Prozent) und aus Generationen-typischen Einflüssen (43 Prozent) zusammen (Mongeau et al., 1986). Eine andere Arbeit setzt den genetischen Anteil pauschal auf 30 bis 60 Prozent an (Binder, 2007), eine neuere Studie (Xu et al., 2013) beziffert die Umwelteinflüsse gar auf bis zu 82 Prozent. Nicht-genetische Ursachen wie Ernährung (nahezu alle Autoren verweisen auf das Risiko eines hohen Salzkonsums), Alkoholkonsum, Fettleibigkeit und Belastung (Stress) (Whelton, 1994), spielen bei der Begünstigung von Hypertonie eine Rolle, die den evidenzbasierten, nichtmedikamentösen Empfehlungen zugrunde liegen (Göbel, 2012). Ein Grund für die nur begrenzt verlässlichen Angaben über die genetischen Faktoren des Blutdrucks ist die Unsicherheit bei der Eingrenzung und Definition phänotypischer Merkmale (Delles et al., 2010). Hypertonie konzentriert sich auf fortschrittliche Zivilgesellschaften und hängt mutmaßlich und primär von den Ernährungsgewohnheiten ab. So zeigten Angehörige der in Ostafrika (Kenia, Tansania) beheimateten Luo-Ethnie aus dem traditionellen ländlichen Raum einen niedrigeren Blutdruck als jene, die im urbanen Nairobi leben (Poulter et al., 1984). Dies ging mit Unterschieden im

physiologischen Elektrolythaushalt einher. Stadtbewohner wiesen danach mehr  $\text{Na}^+$  und weniger  $\text{K}^+$  im Urin auf als Personen des ländlichen Raums. Diese Beobachtungen belegen die genetische Basis des Blutdrucks, denn die zentrale Rolle der Renin-Angiotensin-Aldosteron-Kaskade bei der Regulierung des zellulären Natriumhaushalts (s. o.) ist bei der Entwicklung von Hypertonie in modernen Sozialgesellschaften mit hohem Salzkonsum ausschlaggebend. Umwelteinflüsse können den genetischen Einfluss auf den Phänotyp also deutlich überlagern, womit Fehlinterpretationen und Fehldiagnosen wahrscheinlich werden.

### **1.3.2 Identifizierung hypertensiver Gene**

#### **1.3.2.1 Quantitative Trait Loci (QTL)**

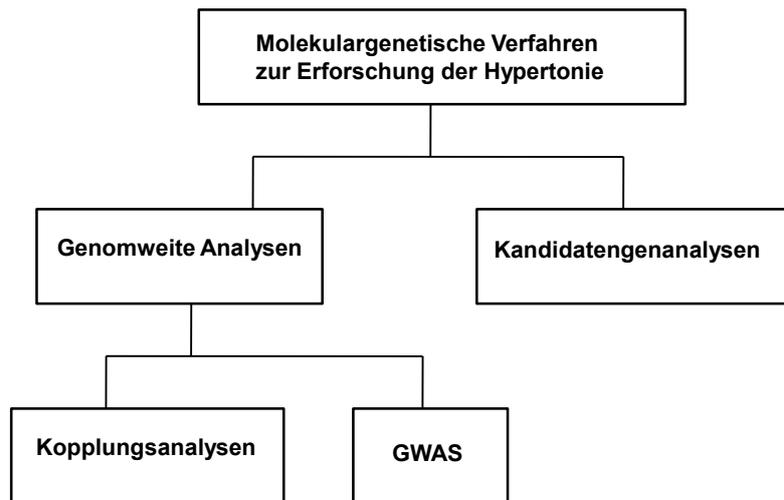
Bei der Analyse hypertensiver Gene spielen QTL (*quantitative trait locus/loci*) eine zentrale Rolle. QTL sind relativ breite Chromosomenabschnitte (Regionen, Loci), die die Ausprägung quantitativer phänotypischer Merkmale (hier den Blutdruck) beeinflussen. Wesentliche Erkenntnisse über QTL wurden an hypertensiven Rattenmodellen ausgearbeitet (Rapp, 2000; Cowley Jr., 2006; Pravenec und Kurtz, 2010). Die experimentelle Bestimmung von QTL wird durch Epistase und die beschränkten statistischen Verfahren (d. h. eine vergleichende Bewertung zahlreicher Hypothesen) erschwert. Zudem bewirkt ein diskreter QTL gewöhnlich nur den Bruchteil einer phänotypischen Variation, was einen geringen Zusammenhang zwischen Phänotyp und Genotyp begründet (Delles et al., 2010). Zwar wurden mit der Entwicklung molekulargenetischer Standards und statistischer Verfahren (Bioinformatik) zahlreiche QTL identifiziert, doch gelingt die vollständige Aufklärung der den QTL zugrundeliegenden Genetik nur schleppend (Glazier et al., 2002). Daher ist heute nicht mehr die Identifizierung von QTL der den Fortschritt der Forschung geschwindigkeitsbestimmende Schritt, sondern die Klärung der Genetik (Delles et al., 2010). Ein zentrales Problem ist die ausgesprochen polygenetische Grundlage des Blutdrucks. Aus ingezüchteten Tiermodellen wurde abgeleitet, dass an der Kontrolle des Blutdrucks mehrere Polygene beteiligt sein könnten (Harrap, 1986). Auf die Notwendigkeit eines holistischen Ansatzes wurde bereits hingewiesen.

Die Kartierung von QTL basiert gewöhnlich auf dem interessierenden Phänotyp, womit praktisch die vorausgehende Kenntnis der zugrundeliegenden Gene und deren Funktionen entfallen. Deshalb fällt der Begriff QTL in erster Linie im Zusammenhang mit

den genomweiten Verfahren (s. u.). Diese Vereinfachung eröffnet die Identifizierung neuer, die Entwicklung von Krankheiten begünstigender Gene. Tiermodelle gestatten in diesem Zusammenhang den Vorteil, durch Züchtung kongener Stämme (Abb. 5) zunächst die Existenz von QTL zu bestätigen, um anschließend durch selektive Züchtung kongener Sub-Stämme eine genetische Feinanalyse und Feinkartierung zur Reduzierung von QTL vorzunehmen (s. u.). Unter den Verfahren zur Aufdeckung von QTL ragen die Kandidatengenanalysen und insbesondere die Kopplungsanalyse heraus (Rapp et al., 2000).

### **1.3.2.2 Einteilung der Verfahren**

Im Laufe der Jahre wurden unterschiedliche Ansätze zur Identifizierung hypertensiver Gene entwickelt. Sie wurden in Beiträgen zusammengefasst, die zugleich einen Überblick über die Genetik des Blutdrucks vermitteln (Rapp, 2000; Mein et al., 2004; Binder, 2007; Delles et al., 2010; Kamble et al., 2011; Padmanabhan et al., 2012). Wegen Überschneidungen und des komplementären Charakters ist eine Ordnung der Verfahren schwierig; eine grobe Klassifizierung zeigt die Abb. 5. Danach lassen sich die Ansätze in zwei Klassen einordnen: genomweite Verfahren und Kandidatengenanalyse. Bei den genomweiten Verfahren ist eine Differenzierung zwischen Kopplungsanalysen (*linkage analyses, linkage studies*) und genomweiten Assoziierungsstudien (*genom-wide association studies, GWAS*) möglich.



**Abb. 5:** Molekulargenetische Verfahren zur Analyse des Blutdrucks. GWAS, Genomweite Assoziationsstudien.

### 1.3.3 Das ACE-kodierende Gen

Das ACE-kodierende Gen ist ein wichtiges und gut untersuchtes Kandidatengen bei der Erforschung der Hypertonie und anderer mit ACE assoziierten Erkrankungen. Das Gen ist auf Chromosom 17 (17q23) des humanen Genoms lokalisiert und erstreckt sich mit einer Größe von 20 kD über 24 Exons (Ensembl-Datenbank; Sayed-Tabatabaei et al., 2006).

Bei der Diskussion um das ACE-kodierende Gen spielt in Zusammenhang mit dem Blutdruck ein Genpolymorphismus eine zentrale Rolle. Frühe molekulargenetische Untersuchungen bestätigten zwei unterschiedliche Varianten des ACE-kodierenden Gens beim Menschen (Rigat et al., 1990). Die beiden Allele unterscheiden sich um 287 Basenpaare; nach der akzeptierten Terminologie wird die längere Zustandsform mit I (*insertion*) und die kürzere mit D (*deletion*) bezeichnet. Dieser funktionale I/D-Polymorphismus bestimmt beim Menschen zur Hälfte die plasmatische und renale ACE-Aktivität (Rigat et al., 1990). Ein analoger Polymorphismus wurde bei der Ratte nachgewiesen, wo er eine unterschiedliche, gewebeabhängige Ace-Expression steuert (Kreutz et al., 1995a). Abgesehen vom zirkulierenden ACE wurde auch im Gewebe (lokales RAS) eine erhöhte ACE-Aktivität festgestellt, beispielsweise beim D-Allel im

Myokard des Menschen (Danser et al., 1995), in der Niere (Mizuiru et al., 1998) und in den T-Lymphozyten (Costerousse et al., 1993). Eine Beziehung zwischen dem ACE-I/D-Polymorphismus und der arteriellen Hypertonie konnte bislang nicht nachgewiesen werden wie zwei Metaanalysen zeigten (Staessen et al., 1997; Agerholm-Larsen et al., 2000), gleichwohl wurde das D-Allel mit verschiedenen kardiovaskulären Komplikationen assoziiert. Dazu gehören ein höheres Risiko für koronare Herzkrankheit (Staessen et al., 1997), Myokardinfarkt (Cambien et al., 1992; Samani et al., 1996) und Schlaganfall (Markus et al., 1995; Kario et al., 1996). Ein Zusammenhang zwischen dem D-Allel und einem erhöhten plasmatischen ACE-Level wurde nachgewiesen (Rigat et al., 1990; Sayed-Tabatabaei et al., 2006; Abraham et al., 2002), wenngleich die klinische Relevanz des I/D-Polymorphismus bezüglich der Niere und pharmagenetischer Effekte kontrovers diskutiert werden (Sayed-Tabatabaei et al., 2006; Danser et al., 2007). Trotz der Fortschritte der Genetik in den vergangenen Jahren (speziell die Analyse der genetischen Variabilität mittels SNP und Haplotypisierung) sind die genauen molekularbiologischen Ursachen der plasmatischen ACE-Regulierung bis heute unklar, obwohl der I/D-Polymorphismus und damit die divergierende, durch das jeweilige Allel abweichende ACE-Expression und die in Zusammenhang stehende Evolution der Hypertonie eingehender untersucht wurde (Sayed-Tabatabaei et al., 2006). Dabei wurden wesentliche Eigenschaften und Funktionen des ACE-Gens mit Hilfe von Tiermodellen aufgeklärt. Ein erster und herausragender Schritt bestand in der experimentellen Kartierung eines QTL mit *Ace*-Locus beim SHRSP-Rattenstamm. Diese anfängliche Intervallkartierung basierte auf F<sub>2</sub>-Kreuzungen zwischen SHRSP- und WKY-Ratten (Jacob et al., 1991; Hilbert et al., 1991). Der Vergleich der Chromosomenkarten von Mensch und Ratte bestätigte die Lokalisierung des ACE-Gens in Region BP/SP-1 auf Chromosom 10. Diese Region ist für 20 Prozent der Blutdruckvarianz nach Salzbelastung und 15 Prozent der Basaldruckvarianz bei den hypertensiven Ratten verantwortlich. Eine weitere Studie an F<sub>2</sub>-Hybridpopulationen (WKY x SHRSP) belegte eine Kosegregation von ACE und salzinduzierter Hypertonie (Nara et al., 1991). So zeigte die Kosegrationsanalyse an einer F<sub>2</sub>-Hybridpopulation (Kreuzung der Rattenstämme SHRSP<sub>-HD</sub> x WKY-0<sub>HD</sub>), dass die plasmatische ACE-Aktivität sich in beiden Linien und unabhängig vom Geschlecht der Tiere signifikant voneinander unterscheidet, worauf eine Kopplung zum *Ace*-Locus nachgewiesen werden konnte (Kreutz et al., 1995a; 1995b). Es wurde ein kodominantes Vererbungsmuster festgestellt, bei dem der

*Ace*-Locus zu 89% für die Gesamtvarianz der ACE-Aktivität im Plasma verantwortlich war. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen der plasmatischen ACE-Aktivität in der F<sub>2</sub>-Generation und dem Blutdruck nachgewiesen werden. In derselben Arbeit wurden auf der Grundlage eines gezüchteten kongenen Stammes (WKY-1<sub>HD</sub>) im Locus BP/SP-1 zwei blutdruckregulierende, voneinander unabhängig segregierende Genorte identifiziert und zwei unterschiedliche blutdruckrelevante Phänotypen definiert. Die WKY-1<sub>HD</sub>-Linie mit dem *Ace*-Genlocus (Region BP/SP-1a) steht mit einem signifikant höheren basalen und salzinduzierten Blutdruck in Zusammenhang, die WKY-0<sub>HD</sub>-Linie (Genlocus BP/SP-1b) dagegen nicht, obwohl die ACE-Aktivität im Plasma identisch war. Das traf auch auf den SHRSP<sub>HD</sub>-Stamm zu. Letztlich wurde mit dem Beitrag von Kreuz ein Einfluss der Allel-Variation innerhalb des *Ace*-Locus auf die plasmatische ACE-Aktivität durch den Vergleich von WKY- und SHRSP-Rattenstämmen nachgewiesen, wobei das Niveau der ACE-Aktivität in den Rattenstämmen mit dem im menschlichen Organismus vergleichbar ist (Kreutz et al., 1995a).

## **1.4 Tiermodelle**

### **1.4.1 Allgemeine Angaben**

In der Molekulargenetik stellen hypertensive Tiermodelle eine Alternative zu Untersuchungen beim Menschen dar. Sie ermöglichen eine vereinfachte Betrachtung komplexer phänotypischer Merkmale (Doggrella und Brown, 1998; Pinto et al., 1998; Dornas und Silva, 2011). Zudem können durch die Kontrolle der Zucht- und Umweltbedingungen genetische und exogene Einflüsse gezielt selektiert werden. Zur Identifizierung Hypertonie-relevanter Genorte wurden verschiedene Rattenmodelle etabliert, darunter das konsome, kongene und das rekombinante Tiermodell (Rapp, 2000; Delles et al., 2010; Pravenec und Kurtz, 2010). In der Hypertonieforschung ist die Identifizierung von relevanten Genen und die Beschreibung ihrer Funktionen ausschlaggebend, um diese Erkenntnisse in die humane Forschung zu übertragen. Im Rahmen der Untersuchung am Tiermodell lassen sich Chromosomenkarten erstellen, so dass die detektierten Kandidatengene nach dem Homologieprinzip auf das menschliche Genom übertragen werden können. Die Ratte konnte sich in der hypertensiven Forschung wegen des Mangels an Möglichkeiten geeigneter ingezüchteter Mausmodelle durchsetzen (Binder, 2007); ein Umstand, der zumindest in Teilen vom einfacheren genetischen Muster der Ratte im Vergleich zur Maus (Rapp, 2000)

kompensiert werden dürfte. Im Vergleich mit anderen Versuchstierarten zeichnen Ratten sich durch mehrere Vorteile wie die kurze Generationszeit und optimale Zucht- und Haltungsbedingungen aus. Dazu kommt eine angemessene Körpergröße, die neben genetischen auch physiologische, biochemische und hämodynamische Untersuchungen ohne Schwierigkeiten ermöglicht. Auf der Grundlage molekulargenetischer Studien gelangen die Entschlüsselung des Rattengenoms und dessen weitgehende Kartierung, die in genetischen Datenbanken wie Ensembl und NCBI einzusehen sind. Hierdurch konnten einige blutdruckrelevante Kandidatengene mit Hilfe des Genomscreenings nachfolgend lokalisiert werden (Pravenec und Kurtz, 2010; Delles et al., 2010).

### **1.4.2 Hypertensive Rattenmodelle**

Die Ratte erwies sich als ein wichtiges Tiermodell in der kardiovaskulären Forschung (Pinto et al., 1998). Zahlreiche genetische, insbesondere genomweite Studien an unterschiedlichen Rattenmodellen führten zur Identifizierung und Beschreibung genetischer Loci und von Kandidatengenen, die mutmaßlich an der Regulierung des Blutdrucks beteiligt sind (Pravenec und Kurtz, 2010; Delles et al., 2010). Andererseits sind die Eigenschaften, Funktionen und die pathophysiologische Bedeutung der Gene bislang nur unzureichend verstanden. Es gelten die Einschränkungen, die bereits bei der Vorstellung der Methoden zur Identifizierung hypertensiver Gene angeführt wurden.

#### **1.4.2.1 Spontan hypertensive Ratte (SHR)**

Die Inzucht homogener Rattenstämme umgeht die genetische Heterogenität und gestattet kontrollierte Rahmenbedingungen. Die spontane hypertensive Ratte (*spontaneously hypertensive rat*, SHR) entwickelte sich, neben der salzsensitiven Dahl-Ratte (Binder, 2007), zu einem intensiv genutzten Tiermodell in der molekulargenetischen hypertensiven Forschung (Pravenec und Kurtz, 2010). Tiere des betreffenden quantitativen Phänotyps (hier der Blutdruck) werden selektiv über mehrere Generationen miteinander verpaart. Zur Fixierung der beabsichtigten genetischen Konstellation und zur Sicherung der genetischen Homozygotität werden ausschließlich Paarungen zwischen Geschwistern über 20 Generationen vorgenommen; teilweise werden sogar mehr als 50 Generationen angegeben (Delles et al., 2010). Parallel wird ein Referenzstamm ohne diesen Phänotyp gezüchtet (Kontrollpopulation). Bei der Untersuchung des Bluthochdrucks bedeutet das die gleichzeitige Verwendung eines hyper- und eines normotensiven Rattenstamms (Kosegregationsanalyse). Der SHR-

Stamm wurde ausgehend von Wistar-Ratten selektiv für die Entwicklung spontaner hoher Blutdruckwerte gezüchtet (Okamoto und Aoki, 1963). Er entwickelt im postnatalen Verlauf ab der 6. Woche eine arterielle Hypertonie, die sich ab der 10. Woche manifestiert. Dabei wird ein distinkter geschlechtsabhängiger Dimorphismus mit höheren Blutdrücken bei der männlichen Population beobachtet. Die hypertensiven Komplikationen im Tiermodell sind mit den humanen hypertensiven Komplikationen vergleichbar. Zu den hauptsächlichen pathophysiologischen Mechanismen gehören die Erhöhung des totalen peripheren Widerstands, eine verstärkte Sympathikusaktivierung und strukturelle, kardiovaskuläre Veränderungen wie Myokardhypertrophie (Volpe et al., 1990 und 1996). Die SHR-Population ist Ausgangspunkt für die Entwicklung weiterer Stämme durch selektive Züchtung. Jeder Unterstamm trägt genetische Faktoren, die für den jeweiligen Phänotyp verantwortlich sind und repräsentiert bedeutende Modelle für das Verständnis pathogenetischer Mechanismen hypertensiver Komplikationen.

#### **1.4.2.2 Stroke-Prone SHR (SHRSP)**

Stroke-prone SHR (SHRSP) sind eine Weiterentwicklung des SHR-Rattenstammes. Das wesentliche Merkmal dieses Subtyps ist das gehäufte Auftreten von Schlaganfällen. SHRSP-Populationen entwickeln früh einen systolischen Blutdruck mit außergewöhnlich hohen Werten von bis zu 240 mmHg, der neben der besonderen genetischen Veranlagung für die fast vollständige Inzidenz an Schlaganfällen verantwortlich ist. Die Hypertonie wird hier von multiplen Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Wechselwirkungen bestimmt (Delles et al., 2010). Die Überlebenszeit nach Auftreten der initialen Symptomatik eines Schlaganfalls liegt bei wenigen Tagen bis zu 24 Wochen. Die durchschnittliche Lebenserwartung beträgt für männliche Tiere 33 bis 41 Wochen und für weibliche Tiere mehr als 66 Wochen. Weibliche Tiere scheinen demnach Schlaganfällen gegenüber resistenter zu sein. Die Insultinzidenz, Endorganschäden und der letale Verlauf werden durch Salzbelastungen signifikant beeinflusst. Unter Salzbelastung zeigen die SHRSP-Tiere vor Auftreten des Insultereignisses Veränderung an den Gefäßen (Volpe et al., 1990). Die Pathogenese der vaskulären Komplikationen entwickelt sich vermutlich multifaktoriell. Die genetische Komponente für die eigentliche Insultanfälligkeit wurde durch Genomuntersuchung an einer F<sub>2</sub>-Population (SHR × SHRSP) identifiziert (Rubattu, 1996). Damit wurde die Existenz primärer, blutdruckunabhängiger genetischer Faktoren, die für das Insultgeschehen prädisponieren, nachgewiesen. Da die Population aus der Kreuzung von zwei

hypertensiven Stämmen mit identischen Zucht- und Umweltbedingungen hervorging, konnten mit der arteriellen Hypertonie und diätetischen Faktoren zwei Wege zur Beeinflussung der Schlaganfallinzidenz ausgeschlossen werden. Es wurden drei QTL-Regionen identifiziert, die die Existenz genetischer und von der Hypertonie unabhängiger Faktoren für das Insultgeschehen belegen (*STR-1* auf Chromosom 1, *STR-2* auf Chromosom 5 und *STR-3* auf Chromosom X) (Rubattu et al., 1996). Die Forschung am SHRSP-Stamm bietet den Vorteil, den Verlauf der arteriellen Hypertonie und gegebenenfalls auftretende vaskuläre Komplikationen zu beobachten und deren pathophysiologische Mechanismen zu verstehen. Zudem lassen sich hämodynamische Effekte einer antihypertensiven Therapie besser bestimmen und demzufolge Therapiemöglichkeiten ableiten.

#### **1.4.3 Normotensives Rattenmodell: Wistar-Kyoto-Ratten (WKY)**

Bei der Wistar-Ratte (*Rattus norvegicus var. albinos*) handelt es sich um die Albinofom der braunen Ratte (*Rattus norvegicus*). Nach Selektion der Albinofom sind diese Ratten von Dean King ab dem Jahr 1909 am Wistar-Institut in Philadelphia gezüchtet worden. Im Jahr 1960 hat Okamoto die Wistar Ratte aus dem Bestand der Universität Kyoto aufgrund eines spontanen Bluthochdrucks ausgewählt. Gleichzeitig nahm er die Selektion bei Tieren mit normalem Blutdruck vor, um ein Vergleichstier mit dem gleichen genetischen Hintergrund zu haben (Okamoto et al., 1963). Die Wistar-Kyoto-Ratte hat einen normalen Blutdruck und ist somit eine Inzucht-Linie. Die normotensive WKY-Ratte erreicht ein Alter von ca. 3 Jahren. Bei den vergleichenden, molekulargenetischen Versuchen werden häufig WKY als normotensive Kontrollpopulation verwendet. Sowohl die SHR- als die SHRSP-Tiere wurden aus dem WKY-Stamm durch selektive Züchtung gewonnen. Daher zeigen sie ein hohes Maß an genetischer Verwandtschaft. Durch vergleichende Kandidatengenanalysen an SHR und SHRSP sind allerdings deutliche genetische Unterschiede zwischen WKY aus unterschiedlichen Kolonien identifiziert worden (St. Lezin et al., 1992).

#### **1.4.4 Kongene Rattenmodelle**

Bei kongenen Rattenstämmen wird im Gegensatz zu konsomen Stämmen, bei denen ein komplettes Chromosom transferiert wird, lediglich ein Fragment eines Chromosoms von einem normotensiven Tier auf ein hypertensives Tier oder umgekehrt übertragen. Eine Einführung in die Zucht kongener Stämme bietet Rapp, 2000. Es sind dabei zwei

verschiedene Strategien möglich. Entweder kann das für die Blutdrucksteigerung verantwortliche Allel (Plusallel) von einem hypertensiven auf einen normotensiven Stamm übertragen werden oder das für eine Blutdrucksenkung (Minusallel) verantwortliche Allel von einem normotensiven auf einen hypertensiven Stamm. Zur Züchtung kongener Stämme wird jeweils ein Tier des Donorstammes mit einem Tier des Akzeptorstammes gekreuzt. Die heterozygote  $F_1$ -Generation wird anschließend auf den Referenzstamm zurückgekreuzt. Die serielle Rückkreuzung auf den jeweiligen Referenzstamm geht über ca. 8-10 Generationen und dient der Eliminierung des genetischen Materials des Donorstammes im restlichen Genom. Durch Genotypisierung jeder Backcross-Generation wird geprüft, ob die selektierte Region das genetische Material vom Donorstamm verlustfrei übertragen bekommen hat. Anschließend wird die Fixierung des etablierten kongenen Stammes über die Geschwister-Verpaarung durchgeführt. Der den Blutdruck beeinflussende QTL gilt als erfolgreich isoliert, wenn sowohl der QTL als auch der Phänotyp des Donorstammes im kongenen Stamm etabliert wurden. Ist der Phänotyp bestätigt, kommen alle Gene innerhalb des übertragenen Abschnitts als Kandidatengene in Frage. Im nächsten Schritt wird eine vergleichende Expressionsanalyse an normo- und hypertensiven Tieren vorgenommen. Gene, die einen Unterschied in der Expression zwischen hypertensiven und normotensiven Tieren bewirken, werden näher untersucht.

Die Konzeption kongener Stämme galt anfangs als ideal, da frühe Schätzungen von der Beteiligung relativ weniger Basisgene (*major effect genes*) ausgingen und eine einfache Kontrolle des Phänotyps suggerierten. Die genomweite Kartierung in den vergangenen Jahren indizierte jedoch die Komplexität größerer QTL-Abschnitte. Die Feinkartierung mit Hilfe kongener Stämme minimiert den Abstand zwischen den QTL, senkt so die Anzahl der zu betrachtenden Gene und erleichtert deren Identifizierung. Andererseits weist der gelegentliche Verlust des Phänotyps bei der Einzelgenanalyse auf das konzertierte Wirken multipler Gene hin. Zu den Nachteilen der kongenen Stämme gehört die zeitaufwändige positionelle Feinkartierung in den verkleinerten kongenen Stämmen (*minimal congenic strains*). Selbst sehr minimale Sublinien können multiple Gene in ihren relevanten Abschnitten aufweisen (Pravenec und Kurtz, 2010).

## 2. ZIELSTELLUNG

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der erhöhten ACE-Genexpression und der erhöhten ACE-Aktivität auf die Entwicklung der arteriellen Hypertonie in einem kongenen Rattenmodell. Dazu wurden der kongene Stamm und die entsprechenden Parentalstämme WKY und SHRSP miteinander verglichen.

Vor diesem Hintergrund sollten in dieser Arbeit die folgenden Aspekte untersucht werden:

- Die Auswirkung des aus WKY-Ratten übertragenen *Ace*-Genlocus auf die Entwicklung des arteriellen Bluthochdrucks im hypertensiven Rattenstamm.
- Bestimmung der jeweiligen ACE-Genexpression und der ACE-Aktivität im Plasma und in den pulmonalen, renalen und kardialen Geweben der drei untersuchten Rattenstämme und der Zusammenhang auf die Entwicklung der arteriellen Hypertonie und der assoziierten Organveränderungen.
- Der Zusammenhang zwischen Ang I- und Ang II-Konzentration und der ACE-Genexpression und ACE-Aktivität im kardialen Gewebe.
- Die Abhängigkeit zwischen plasmatischer Reninkonzentration und der ACE-Aktivität im Plasma und in den Organen (Lunge, Niere, Herz).

Für die vorhergehenden Fragestellungen soll in einem experimentellen Versuchsaufbau ein kongener Rattenstamm aus einer normotensiven WKY und einer hypertensiven SHRSP-Ratte mit einem definierten *Ace*-Locus etabliert werden. Durch mehrfache Rückkreuzungen soll der *Ace*-Genlocus auf 10 cM eingegrenzt werden, um den potentiellen Einfluss anderer Gene auf die Entwicklung der Hypertonie zu minimieren.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Material und Chemikalien

Substanz	Firma
10x Polymerasereaktions-Puffer (10x PCR-Puffer)	Radiozym, Promega
10x Tris-Borat-EDTA-Lösung (10x TBE-Puffer)	Gibco BRL
Aceton	J.T.Baker
Acrylease	Stratagene
Agarose zur DNA/RNA Elektrophorese	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau, Natriumsalz	Merck
n-Butanol	Sigma-Aldrich
Century™ Marker Template (RNA-Längenmarker)	Ambion
Chloroform	Sigma-Aldrich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Diethylmalonsäure (98%)	Aldrich
Dinatriumcitrat	Merck
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat (Titrierkomplex III, MG=372,24)	Roth
dNTPs (2,5 mM)	Rapidozym, Promega
dNTPs, Ultrapure Solution (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Pharmacia Biotech
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Formamid (HCONH <sub>2</sub> )	Merck

<b>Substanz</b>	<b>Firma</b>
Formaldehyd (37%)	J.T.Baker
Glycerin (99%)	Janssen Chimica
Harnstoff	Roth
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kaliumhydroxid	Aldrich
Kinase-10x-Puffer	Promega
Magnesiumchlorid (1,5 mM)	Rapidozym, Promega
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Aldrich
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Merck
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1	Sigma-Aldrich
Polyacrylamidgel (PAA-Gel) (Rotiophorese® Gel 40)	Roth
Primer und Sonden	Genset Oligos, Life Technologies, TIB MOLBIOL
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Renin-Inhibitor Ro 42,5893	Hoffmann-La Roche
Rotiophorese (40% Acrylamid, 2% Bisacrylamid)	Roth
Salzsäure (37%)	Merck
Schwefelsäure (96%)	Merck
SDS (Sodium Lauryl Sulfate)	Sigma-Aldrich
Szintillationsflüssigkeit	Packard
RT-qPCR 2x Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems
Temed (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
TRIzol™	Sigma-Aldrich

<b>Substanz</b>	<b>Firma</b>
Wasserstoffperoxid (30%)	Promega
Xylen Cyanol FF	Sigma-Aldrich

### 3.1.2 Radionukleotide

<b>Radionukleotid</b>	<b>Firma</b>
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP (50 $\mu$ Ci, 3000 Ci/mmol, wässrige Lösung)	Amersham
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]dATP (1 mCi, 3000 Ci/mmol, wässrige Lösung)	Amersham

### 3.1.3 Kits

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>
Advantage cDNA Polymerase mix	Clontech
Bio-Rad DC Protein Assay Kit®	Bio Rad
DNA Sequencing Kit®	Applied Biosystems
Qiaex II	Qiagen
Qiagen Plasmid Kit® (Plasmid Mini)	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit®	Qiagen
ACE-Kit®	Trinity-Biotech
Sigma ACE-Kit	Sigma Diagnostics
cDNA Synthesis Kit®	Fermentas

### 3.1.4 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Aktivität</b>	<b>Firma</b>
AmpliTaq® DNA-Polymerase	5 U/l	Perkin Elmer
Angiotensin Converting Enzyme (ACE)	50 U/l	Trinity biotech

Enzym	Aktivität	Firma
Proteinase K	34 U/mg	Sigma-Aldrich
T4-Polynukleotidkinase	5 U/μl	Promega
Taq-Polymerase	5 U/μl	Rapidozym, Promega

### 3.1.5 Basenpaarleitern für die Agarosegel-Elektrophorese

Marker	Firma
1 kb-Leiter (1 μg/μl)	Gibco BRL
100 bp-Leiter (1 μg/μl)	Gibco BRL

### 3.1.6 Primer und Sonden für die RT-qPCR

#### Primer und Sonden von Referenzgenen

Gen	Name	Sequenz
18S	18S-F	GGAGCCTGCGGCTTAATTT
	18S-R	CAACTAAGAACGGCCATGCA
	18S-Sonde	FAM-CAATCTGTCAATCCTGTCCGTGTCCG-TAMRA
PBGD	PBGD-F	TGAAAACCTTGTACCCTGGCATA
	PBGD-R	TCCAATCTTAGAGAGTGCAGTATCAAGA
	PBGD-Sonde	FAM-TTGAAATCATTGCTATGTCCACCACAGG-TAMRA

#### Primer und Sonden für RT-qPCR

Gen	Name	Sequenz
ACE	ACE-F	TTGTCTGTCACTGGAGCCTGGA
	ACE-R	GAAGAATTGCTTTGGGTGTGG
	ACE-Sonde	FAM-TGACAAATATAATGGCCACGTCCCGGT-TAMRA
ANP	ANP-F	GCGAGACAAGAGAGAGCAGG

Gen	Name	Sequenz
	ANP-R	CAAAAGCAAGAAATAGGCTATG
	ANP-Sonde	FAM-TCCCAGGCCATATTGGAGCAAATCC-TAMRA

### Primer für die Genotypisierung s. Anhang 9.1 bis 9.5

#### 3.1.7 Internetbasierte Literatur

Internetseite	Anwendung
<a href="http://ratmap.gen.gu.se/">http://ratmap.gen.gu.se/</a>	Genet. Marker/Karten Rattengenom
<a href="http://rgd.mcw.edu/">http://rgd.mcw.edu/</a>	Genet. Marker/Karten Rattengenom
<a href="http://www-genome.wi.mit.edu/rat/puplic/">http://www-genome.wi.mit.edu/rat/puplic/</a>	Polymorphe Marker
<a href="http://www.informatics.jax.org/">http://www.informatics.jax.org/</a>	Gen. Marker/Karten Rattengenom
<a href="http://www.invitrogen.com/vectors">http://www.invitrogen.com/vectors</a>	Produktinformation und Gensequenzen der Vektoren
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubMed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubMed/</a>	National Library of Medicine, Literatur
<a href="http://www.niams.nih.gov/rtbc/ratgbase/index.htm">http://www.niams.nih.gov/rtbc/ratgbase/index.htm</a>	Gen. Marker/Karten Rattengenom
<a href="http://www.nih.gov/rtbc/ratgbase/index.htm">http://www.nih.gov/rtbc/ratgbase/index.htm</a>	Gen. Marker/Karten Rattengenom
<a href="http://www.ensembl.org/">http://www.ensembl.org/</a>	Gendatenbank
<a href="http://gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/fact_sheets/fact_sheet_006/ace.html">http://gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/fact_sheets/fact_sheet_006/ace.html</a>	modlab Datenbank

### 3.1.8 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteil	Zusammensetzung / Konzentration
10 x Laufpuffer	Glycerin Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat Bromphenolblau Xylen Cyanol FF	50 % 10 mM (pH 7,0) 0,25 % 0,25 %
10x PCR Puffer	Tris-HCl (pH 9,0) KCL Triton®X-100	100 mM 600 mM 1 %
10x TAE-Puffer	Tris Essigsäure (100 %) EDTA (0,5 M, pH 8,0) Aqua bidest.	48,4 g 11,4 ml 20 ml ad 1 l
10x TBE-Puffer	Tris-Base Borsäure EDTA (0,5 M, pH 8,0) Aqua bidest.	108 g 55 g 40 ml ad 1 l
10x Transkriptions- Puffer	Tris-HCl (pH 8,0) KCl	100 mM 500 mM
30x Formamid- Laufpuffer (Gelladepuffer)	Bromphenolblau Xylen Cynol FF Di-Natrium-EDTA-Dihydrat Formamid	100 mg 100 mg 200 µl (0,5 M, pH 8,0) 10 ml
Denaturierungslösung	Natriumhydroxid Natriumchlorid	0,5 M 1,5 M
DEPC-Wasser	Diethylcarbonat Aqua bidest.	1 ml ad 1000 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	Ethylendiaminessigsäure Aqua bidest	93,05 g ad 500 ml, auf pH 8,0 mit NaOH einstellen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Bestandteil</b>	<b>Zusammensetzung / Konzentration</b>
Homogenisierungspuffer für Membranfraktionen	Natriumhydrogenphosphat Sucrose MgCl <sub>2</sub> -hexahydrat Aqua bidest.	20 mM 25 mM 5 mM ad 900 ml, auf pH 7,5 titrieren, ad 1 l autoklavieren
Neutralisierungspuffer	Tris-HCl Natriumchlorid	0,5 M, pH 7,5 1,5 M
Polyacrylamidgel-Lösung	Harnstoff 10x TBE Rotiphorese (40 % Acrylamid) Aqua bidest.	31,5 g 7,0 ml 10,5 ml 27,0 ml
Puffer A	Diethylmalonsäure Natriumchlorid Di-Natrium-EDTA-Dihydrat ad 800 ml Aqua bidest. pH 7,4 mit 1 M Kaliumhydroxid ad 1 l Aqua bidest. Gelatine	20 mM 150 mM 0,1 mM, pH 8,0    5 g
Substrat	3,3,5,5 TMB Aqua bidest. Puffer A Wasserstoffperoxid 30 %	2 Tabletten 10 ml 10 ml 4 µ
Tail-Puffer	Tris-Puffer (1 M), pH 8,0 NaCl-Lösung (2 M) EDTA (0,5 M) Aqua bidest. 10 % SDS	10 ml 10 ml 40 ml 120 ml 20 ml

### 3.1.9 Sonstige Materialien und Futtermittel

Produkt	Firma
12 ml-Greiner-Rörchen	Sarsted
BioMax MR-Röntgenfilme	Kodak
Edelstahlklemmen	Peq Lab
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell
Gelschlitten, Dichtungen, Kämmen, Agarosegel	Biometra
Glasplatten, Spacer für Polyacrylamidgele	Peq lab
Haltungsfutter für Ratten (Normalfutter)	Altromin
Haifischzahnkamm Mikrotiterformat	Peq Lab
Histoacryl-Gewebekleber	Braun
Hybond N-Membranen	Amersham/Pharmacia
Lochzange für Labortiere	Esculap
Makrolonkäfige Typ III und Typ IV	Ebeco
Mehrkanal-Spritze (8-Kanal, 0-0,1 µl)	Hamilton
Micro Amp Reaction Tube with Cap (0,2 ml, dünnwandig)	Perkin Elmer GeneAmp
Mikrotiterplatten 96-er Qualilab (F)	Merck
Paketklebeband	Tesa
Phosphoimagerplatten	Raytest
Polystyrol-Rörchen	Thermo Scientific
Polystyrol Immulon™ Mikroplatten	Nunc, Maxisorp, F96
Quick Spin-Säulen	Boehringer
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf
RNAse AWAY®	M&P-Molekular Bio-Products
Röntgenkassetten, Typ G, 35 x 43 cm	Peq lab
Rundboden-Rörchen aus Polypropylen	Falcon

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
Schweissfolie	GENTEX
Selbstklebende Plastikfolie Thermowell™	Costar
Standardpipetten	Eppendorf
Standartips 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf
Sterilfilter Tips 0,5-10 µl ART20E	Fisher Scientific
Sterilfilter Tips 10-100 µl ART100E	Fisher Scientific
Sterilfilter Tips 100-1000 µl ART20E	Fisher Scientific
Stoffwechselfäfige für Ratten bis 300 g	Ehret
Thermo-Fast 96-Mikrotiterplatten (ohne Rand)	ABgene
Verpackungsfolie	Saran™
Watman Ppier	3M
Weithalsflaschen aus Polyethylen	Roth

### 3.1.10 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
<sup>32</sup> P-Counter 1219 Rackbeta	LKB Wallace
377 DNA Sequencer	ABI Prism
ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystem
Agarosegelkammer	Bio Rad
Analysenwaage BP 610	Sartorius
Autoclav Varioclab®	H+P Labortechnik
Automat für Filmentwicklung X-OMAT 5000 RA	Kodak
Blutdruckmessgerät	TSE
Brutschrank	Heraeus Instruments
Brutschüttler	Eppendorf

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Elektrophoresekammer für Agarosegel	Biometra
Elektrophoresekammer für große PAA-Gele	Stratagene, Peqlab
ELISA-MRX-Plate-Reader	Dynex
Folienschweißgerät	MDC
Hybridisierungssofen	Biometra
Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf
Küvetten	Peq lab
Magnetrührer MR 2002	Heidolph
Mikrotiterplattenschüttler	Roth
Minifuge RF (Zentrifuge)	Eppendorf
PCR-Cycler	MJ Research
pH-Meter	Knick
Photometer UV 1202	Schimadzu
Polytron Homogenisator Ultra Turrax T25	Janke & Kunkell Labortechnik
Polyacrylamid-Elektrophoresekammer	Peq Lab
Schüttelwasserbad	Köttermann
Stromversorgungsgerät für Elektrophoresekammer	Biometra, Life Technologies
Szintillations-Zähler	LKB Wallace
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf
UV-Stratalinker	Stratagene
Vortex VF2	Janke & Kunkell Labortechnik
Wasserbad	GFL

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tierhaltung

Die Tierzucht erfolgte in Absprache mit dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM/Charite). Die Ratten wurden nach Geschlecht getrennt in Gruppen zu je 6 Tieren in Makrolonkäfigen (Typ IV) untergebracht. Zur Paarung wurden die Tiere in Makrolonkäfige des Typs III umgesetzt und mit Trinkwasser und Standardfutter (0,2 % NaCl) versorgt. Eine automatische Lichtschaltung regelte einen 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus bei einer konstanten Temperatur von 22 °C. Jungtiere wurden im Alter von ca. 3 Wochen von der Mutter getrennt und erhielten mit einer Lochzange eine Markierung am Ohr mit systematisch laufender Nummerierung. Tierexperimentelle Arbeiten wurden unter Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes über die Genehmigungs-Nr. G 0368/97 des Landesamts für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) vorgenommen.

### 3.2.2 Zucht des kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace (D10Rat99-D10Rat3)

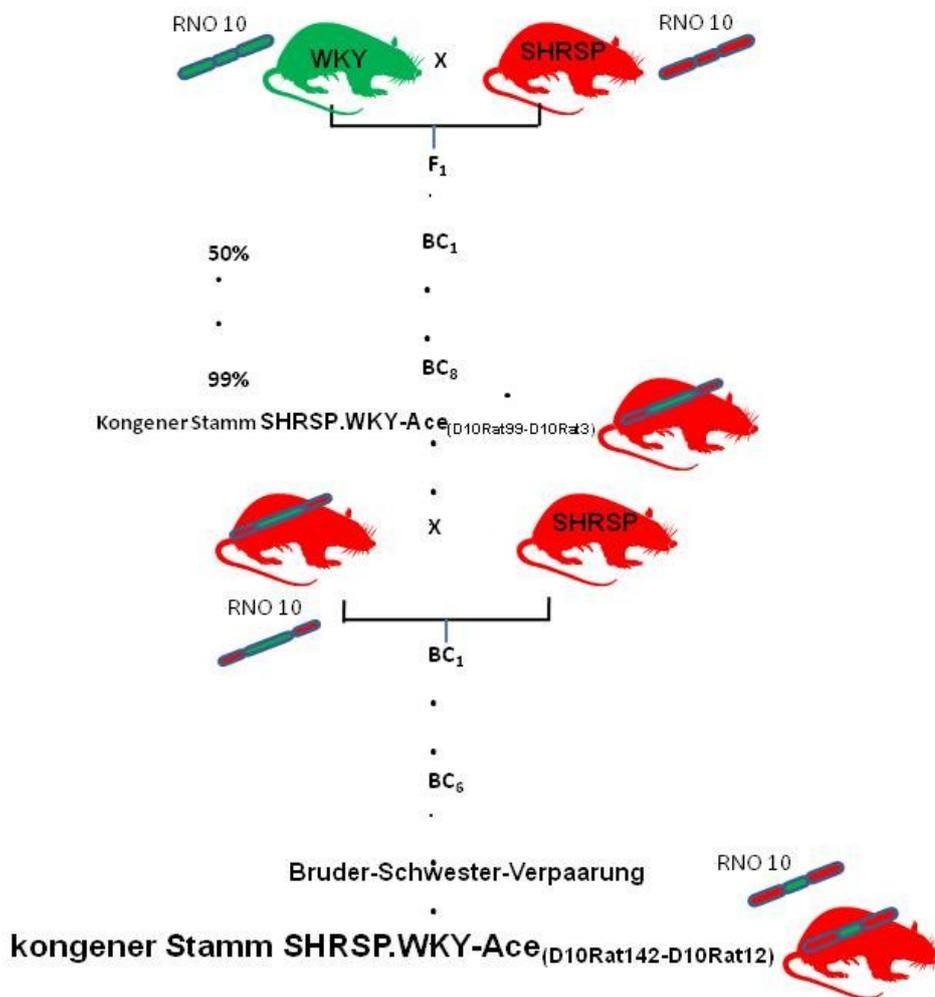
Die Zucht des kongenen Stammes SHRSP.WKY-ACE<sub>(D10Rat99-D10Rat3)</sub> erfolgte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Kreutz durch Paarung normotensiver Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) mit hypertensiven SHRSP-Ratten. Die Ursprungskolonien beider Parentalstämme SHRSP<sub>HD</sub> und WKY<sub>HD-0</sub> wurden an der Universität Heidelberg (HD) ingezüchtet. Die SHRSP<sub>HD</sub>-Linie stammt von der ursprünglichen Kolonie von Yamori und Aoki (Okamoto et al., 1963). Diese und die WKY<sub>HD-0</sub>-Linie wurden seit 1974 an der Universität Heidelberg (HD) gezüchtet. Die WKY- und SHRSP-Stämme wurden als eigene Kolonien bereits im Arbeitskreis von Prof. Kreutz verwendet und molekulargenetisch charakterisiert (Schulz und Kreutz, 2012; Kreutz et al., 1995a und 1995b). Für diese kongene Zucht wurde eine männliche SHRSP-Ratte mit zwei weiblichen WKY-Ratten gepaart. Die Tiere der resultierenden F<sub>1</sub>-Generation sind heterozygot und damit untereinander genetisch identisch. Vier bis fünf weibliche F<sub>1</sub>-Tiere wurden mit dem jeweils entsprechenden parental SHRSP-Individuum (Vatertier) zurückgekreuzt. Im Rahmen der seriellen Backcross-Verpaarung über 8 Zyklen und anschließende Geschwister-Verpaarung über mehrere Generationen (Abb. 6) wurde der

ursprüngliche kongene Stamm SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat99-D10Rat3)</sub> fixiert. Der übertragene Ace-Locus betrug 27,3 cM.

### 3.2.3 Zucht des kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>

Nach der in der Arbeitsgruppe Kreuzt erfolgten Zucht des kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat99-D10Rat3)</sub> sollte im Rahmen dieser Arbeit durch weiterführende Züchtung der Ace-kodierende Abschnitt auf Chromosom 10 im Bereich 10q32.1 von bislang 27,3 cM weiter eingengt werden. Die serielle Rückkreuzung zweier Stämme führt dabei durch schrittweise Eliminierung des Donorgenoms zur Isolierung einer chromosomalen Region. Die QTL-Region wurde selektiv vom Donor auf den Akzeptor übertragen und anschließend mit flankierenden Markern geprüft.

Zunächst wurde eine Backcross-Verpaarung (BC) von 8 Weibchen des kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat99-D10Rat3)</sub> mit zwei Männchen des parental hypertensiven SHRSP-Akzeptors (SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat99-D10Rat3)</sub> x SHRSP) zur BC<sub>1</sub>-Generation (Abb. 6) durchgeführt. Die Tiere der für den Ace-Locus heterozygoten BC<sub>1</sub>-Generation wurden miteinander zur Generation G<sub>1</sub> verpaart (BC<sub>1</sub> x BC<sub>1</sub>). Die Tiere der G<sub>1</sub>-Generation wurden mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern genotypisiert. Die resultierenden homozygoten Tiere für den Ace-kodierenden Abschnitt der G<sub>1</sub>-Generation wurden mit den väterlichen hypertensiven SHRSP-Tieren erneut zurückgekreuzt (G<sub>1</sub> x SHRSP) zur BC<sub>2</sub>. Dieser Zuchtzyklus wurde mehrmals wiederholt bis zur Generation BC<sub>6</sub>. Dabei wurde jede neue Generation mittels Genotypisierung geprüft und Tiere, die heterozygot für den Ace-kodierenden Abschnitt waren und zugleich den höchsten homozygoten Anteil für den SHRSP-Hintergrund enthielten zur jeweils weiteren Zucht ausgewählt. Die abschließende Fixierung des kongenen Stammes erfolgte über zwei Intercrosse mittels Bruder-Schwester-Verpaarung. Der neu etablierte kongene Stamm SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> trägt den Ace-Locus des Chromosoms 10 vom WKY-Donor vor dem Hintergrund des SHRSP-Akzeptors. Die Bezeichnung SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> folgt den Nomenklatur-Richtlinien des *Rat Genome Nomenclature Committee* (RGNC) für kongene Stämme, die auf der Homepage der Rat Genome Database ([www.rgd.mcw.edu](http://www.rgd.mcw.edu)) aufgeführt sind.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der Zucht und Etablierung des neuen kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>. Erster Schritt: Etablierung des ersten kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat99-D10Rat3)</sub> mit Hilfe von 8 Backcrossgenerationen zwischen Wistar-Kyoto (WKY, grün)- und stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP, rot)-Ratten und anschließender Bruder-Schwester-Verpaarung. Zweiter Schritt: Etablierung des neuen kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> über 6 Backcrossgenerationen zwischen SHRSP- (rot) und kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat99-D10Rat3)</sub>-Ratten (rot-grün) und anschließender Bruder-Schwester-Verpaarung. RNO10, Rattenchromosom 10; F1, Filialgeneration; BC, Backcross; G1, Generation; Ace-Locus (grün).

### 3.2.4 Präparation

Für die DNA-Isolierung wurde den Ratten im Alter von 4 Wochen ein ca. 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt. Die Wunde wurde mit Histoacryl-Gewebekleber verschlossen. Bei den 16 Wochen alten Tieren aller drei Stämme SHRSP, WKY und SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> (jeweils n= 6-12) wurde das Körpergewicht gemessen. Die Blutentnahme erfolgte durch Dekapitieren der Tiere, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch stressbedingte Aktivierung des RAS-Systems zu vermeiden. Nach dem Ausbluten wurde die Bauchhöhle der Tiere geöffnet und es erfolgte die Entnahme des Herzens, das in den linken und den rechten Ventrikel separiert wurde, der Nieren, deren Cortex von der Medulla getrennt wurde, und der Lunge. Zur Bestimmung der Organgewichte wurden die Präparate ausgewogen. Für die spätere Bestimmung der Renin-Konzentration und der ACE-Aktivität im Plasma wurden 5 ml des aufgefangenen Blutes in ein mit 5000 IE/ml Heparin versetztes gekühltes Eppendorf-Röhrchen überführt. Das Herz wurde in eine 1,0 mol/l Kaliumchloridlösung gegeben. Die Organe wurden unmittelbar nach der Entnahme in ein frisches 2 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebeproben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Für die Evaluierung des Herzphänotyps wurden die Tiere bezüglich des linksventrikulären Gewichts als Maß für die Hypertrophie untersucht. Insgesamt wurden versuchsabhängig für jeden der drei Stämme 6-12 männliche Tiere analysiert.

### 3.2.5 DNA-Isolierung

DNA wurde aus dem Rattenschwanz isoliert. Die Gewebeprobe wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 700 µl Lysis-Puffer (Tail-Puffer) und 40 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und anschließend über Kopf drehend bei 55 °C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Ansatz aus dem Ofen entnommen und für 5 min auf Eis gestellt. Zur Fällung von Proteinen wurde der Ansatz bei 4 °C mit 300 µl gesättigter 6 molarer NaCl-Lösung versetzt, intensiv durchmischt und bei 15 min, 14.000 U/min, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein 2,0 ml-Eppendorf-Gefäß dekantiert, zur Fällung von DNA mit 1 ml Isopropanol versetzt und gut durchmischt. Im Anschluss wurden die Proben für 50 min inkubiert und erneut zentrifugiert bei 15 min, 14.000 U/min und 4 °C. Der Überstand wurde abgetrennt und das DNA-Pellet mit 500 µl kaltem 70%igem Ethanol (-20 °C kalt) gewaschen und noch einmal zentrifugiert. Nach Abtrennung des Überstandes wurde das DNA-Pellet 30 min

bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 200 µl Aqua bidest. aufgenommen und bei 4 °C über Nacht vollständig aufgelöst. Zur Bestimmung von Reinheit und Konzentration wurde die Probe 1:20 mit Aqua bidest. verdünnt und photometrisch die optische Dichte ( $\lambda$  260-280 nm) bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde in der Einheit µg/µl angegeben.

Zur Festlegung einer einheitlichen Reihenfolge und für eine effiziente genotypische Charakterisierung der Tiere wurden DNA-Mikrotiter-Stockplatten für die später durchzuführende PCR angelegt. Pro Loch wurden jeweils 5 µl DNA-Lösung (10 ng/µl) mit zusätzlicher Negativkontrolle mit Aqua bidest. pipettiert. Die Platten wurden 2 Stunden bei 55 °C getrocknet und anschließend bei -20 °C aufbewahrt. Das Volumen des verdunsteten Wassers wurde bei der Pipettierung zur PCR wieder ergänzt.

### **3.2.6 Genomanalyse mit Mikrosatellitenmarkern**

Die Genomanalyse (Genotypisierung) der Tiere basiert auf der Nutzung von Mikrosatellitenmarkern (*short tandem repeats* / STR, *simple sequence length polymorphism* / SSLP, oder *simple sequence repeats* / SSR). Bei den Markern handelt es sich um kurze, repetitive, ein bis vier Nukleotide umfassende Sequenzen vorwiegend in nicht-kodierenden DNA-Abschnitten. Aufgrund ihres ausgeprägten Polymorphismus dienen sie in Verbindung mit elektrophoretischen Trennverfahren zur Unterscheidung genetischer Individuen oder Stämme mittels PCR (Beckman und Weber, 1992). So kann ein zwischen den Parentalstämmen als polymorph identifizierter DNA-Abschnitt (z. B. ein repetitives Dinukleotid  $(CA)_n$  mit radioaktiv markierten Primern, deren Lokalisierung aufgrund von Kartierungen bekannt ist) mit der PCR vervielfältigt und anschließend zur Trennung der Amplifikate in Abhängigkeit ihrer Größe auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden. Über ein Autoradiographie-Verfahren ergibt sich z. B. für die Individuen einer  $G_2$ -Population der entsprechenden Parentalstämmen ein Bandenmuster, bei dem wahlweise für das Vater- oder Mutter-Allel jeweils homozygote, für beide Allele heterozygote Amplifikate nachzuweisen sind.

Die Angaben für polymorphe Mikrosatellitenmarker zwischen den Parentalstämmen WKY und SHRSP wurden dem *Whitehead Institute for Biomedical Research* (<http://www.broadinstitute.org/rat/public/>) entnommen. Für die Lokalisierung der einzelnen Marker wurde die Datenbank Rat Genome Database ([www.rgd.mcg.edu](http://www.rgd.mcg.edu)) verwendet (Anhang 9.5).

### 3.2.7 Radiomarkierung mit einer Polynukleotidkinase

Zum Nachweis des Hybridisierungsprodukts wurden radioaktiv markierte Oligonukleotidsonden für den jeweiligen Primer erstellt. Dazu wurde die zu markierende Sequenz am 5'-Ende dephosphoryliert und anschließend mit radioaktiv markiertem Phosphat rephosphoryliert. Die T<sub>4</sub>-Polynukleotidkinase diente als Katalysator für den Transfer von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP. Für die Primer-Kinasierung wurde von jedem Primerpaar der Sense-Primer am 5'-Ende durch radioaktives Phosphat in  $\gamma$ -Stellung markiert, um die in der PCR-Reaktion entstehenden Amplifikate mittels Autoradiographie sichtbar zu machen. In einem Eppendorf-Röhrchen wurden 0,04  $\mu$ l 10x Kinase-Puffer, 0,017  $\mu$ l T<sub>4</sub>-Polynukleotidkinase (10 U/ $\mu$ l) und 0,0583  $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (3000 Ci/mmol) gemischt. Von diesem Gemisch wurden 0,011  $\mu$ l zu 0,22  $\mu$ l von dem 6  $\mu$ M Sense-Primer gegeben und anschließend für 45 min bei 37 °C und für 10 min bei 65 °C im PCR-Gerät inkubiert.

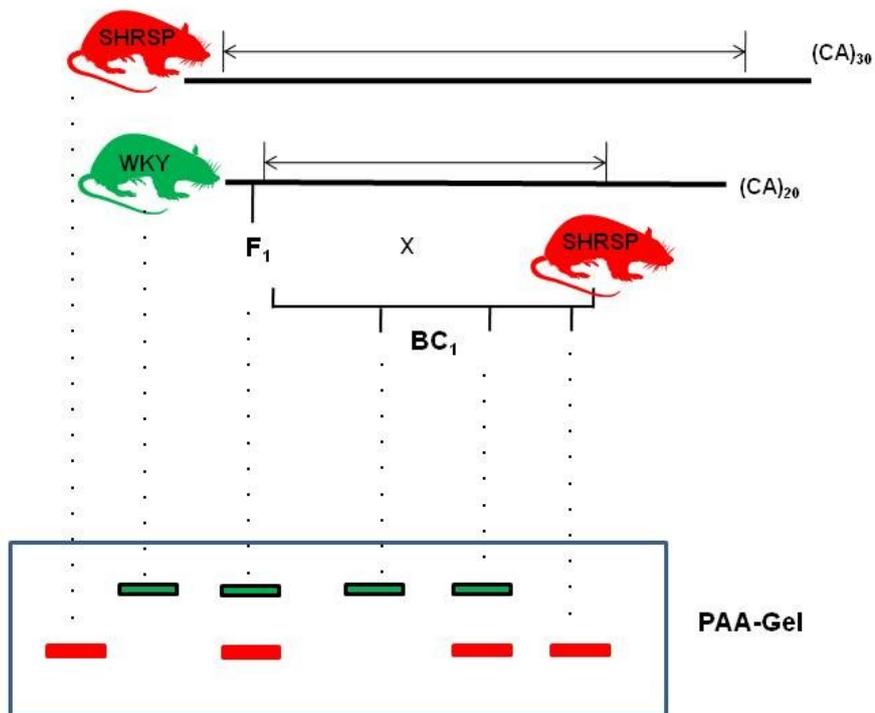
### 3.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vorbereitung der PCR wurde zunächst eine Mischung aus 1,3  $\mu$ l 10x PCR-Puffer, 0,39  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,1  $\mu$ l 2,5 mM dNTPs, 0,07  $\mu$ l Taq-Polymerase, 0,22  $\mu$ l 6  $\mu$ M Antisense-Primer, 8,91  $\mu$ l Aqua bidest. und dem kinasierten Sense-Primer hergestellt. Pro Ansatz wurden 50 ng genomischer DNA in die Mikrotiterplatte vorgelegt und 10  $\mu$ l der vorbereiteten Mischung zugesetzt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend mit Schweißfolie verschlossen und der PCR unterzogen. Die Amplifikation begann mit einer initialen Denaturierung bei 92 °C für 2 min, gefolgt von 30 Zyklen bestehend aus 15 sec bei 92 °C, 1 min bei der primerspezifischen Annealing-Temperatur und 1 min bei 72 °C. Die finale Elongation erfolgte bei 72 °C für 7 min. Für bestimmte Primer wurden Touch-Down-Programme verwendet. Diese Programme laufen nach folgendem exemplarisch angegebenen Schema ab: 94 °C für 3 min, 55 °C für 45 sec, 72 °C für 45 sec, 94 °C für 30 sec, 53 °C für 45 sec, 72 °C für 45 sec, 94 °C für 30 sec, 52 °C für 45 sec, 72 °C für 45 sec, 94 °C für 30 sec, 51 °C für 45 sec, 72 °C für 45 sec, 94 °C für 30 sec, 50 °C für 45 sec, 72 °C für 45 sec, 94 °C für 30 sec, weitere 29 Zyklen bestehend aus 50 °C für 45 sec, 72 °C für 45 sec, 94 °C für 30 sec und anschließend 5 min bei 72 °C. Im Anschluss wurden die Proben bei 4 °C aufbewahrt.

### 3.2.9 Gelelektrophorese

Die PCR-Amplifikate wurden elektrophoretisch unter Verwendung 0,4 mm dicker denaturierender Polyacrylamid (PAA)-Gele (Abb. 7) getrennt. Zur Herstellung des Gels

dienten zwei Glasplatten (35 x 45 cm). Eine der Glasplatten wurde mit Ethanol (70 %) und Aceton behandelt, die andere wurde nach der Reinigung mit Ethanol (70 %) zusätzlich mit wasserabweisender Acrylease™ imprägniert. Nach der Reinigung wurden die Platten mit zwei seitlich eingelegten 0,4 mm dicken Spacern zusammengefügt und an den Seiten mit Paketklebeband und Klammern fixiert. Die flüssige PAA-Gelmischung wurde umgehend luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm umgekehrt an der oberen Schmalseite ca. 5 mm in die Gelflüssigkeit des Gels platziert. Nach Beginn der Polymerisation (ca. 1-2 h bei Raumtemperatur) wurden das Klebeband und die Klammern entfernt, der Kamm gezogen und umgedreht, so dass dessen Spitzen ca. 1-2 mm ins Gel ragten und Geltaschen bildeten. Die Gelplatten wurden in die Elektrophoresekammer gelegt und die Gelkammern mit 1x TBE-Puffer gefüllt. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 10 µl 2x Formamid-Gelladepuffer versetzt und im PCR-Gerät denaturiert (5 min, 94 °C). Die Geltaschen wurden mit einer 8-Kanal-Glaspipette mit ca. 3 µl der jeweiligen Probe beladen. Dann erfolgte die elektrophoretische Trennung für 2-3 Stunden bei 60-70 Watt. Im Anschluss wurde das Gel entnommen und die mit Acrylease™ imprägnierte Glasplatte abgehoben. Das Gel wurde auf Gel-Blotting-Papier übertragen und mit Saran™-Folie verpackt. Zur Darstellung der radioaktiv markierten DNA-Abschnitte wurde das Gel zusammen mit Biomax-Filmen in eine Röntgenkassette gelegt und bei -20 °C für 8-16 h je nach Signalstärke exponiert.



**Abb. 7:** Prinzip der Genotypisierung mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker. Dargestellt ist exemplarisch ein Dinukleotidrepeat  $(CA)_n$  unterschiedlicher Länge bei den Parentaltieren SHRSP und WKY und bei den Filial- und Backcross-Tieren. Der Kasten unten symbolisiert das Polyacrylamidgel (PAA). Die Auftrennung der PCR-Amplifikate ergibt ein homozygotes Bandenmuster für SHRSP (rot) bzw. für WKY (grün) und ein heterozygoties Bandenmuster für ein Filial- oder Backcross-Tier (rot und grün).  $(CA)_n$ , CA-Repeat mit stammspezifischer Länge; BC, Backcross; F<sub>1</sub>, 1. Filialgeneration.

### **3.3 Phänotypisierung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden männliche Tiere der beiden Parentalstämme WKY, SHRSP und des neu etablierten kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> im Alter von 16 Wochen untersucht.

#### **3.3.1 Blutdruckmessung mittels Tail-Cuff-Verfahren**

Bei der nicht-invasiven Tail-Cuff-Methode und computergestützter Oszillation (TSE Blutdruck-Monitor, Mehrkanal-System) wird der systolische Blutdruck der WKY-Ratten mit Hilfe einer aufblasbaren Manschette am Rattenschwanz ermittelt. Ein spezieller Pulssensor registriert hierbei Druckschwankungen in den arteriellen Gefäßen. Diese werden in elektrische Signale umgewandelt, aus denen ein Computer mit der entsprechenden Software die Werte des systolischen Blutdrucks und die Herzfrequenz errechnet. In Vorbereitung der Messungen des systolischen Blutdrucks erfolgte eine Trainingsphase über zwei Tage mit dem Ziel, die Ratten (n= 6) an die Messsituation zu gewöhnen. Die Untersuchung ist nichtinvasiv und wird an wachen und nicht narkotisierten Tieren durchgeführt. Die Tiere wurden in einem Restraîner innerhalb einer auf 32 °C temperierten transparenten Box aus Kunststoff fixiert, um Bewegungen zu verhindern. Zur Gewährleistung einheitlicher, vergleichbarer Werte wurden die Messungen dem zirkadianen Rhythmus entsprechend zu gleichen Tageszeiten durchgeführt. Zur eigentlichen Werteermittlung erfolgten an drei aufeinander folgenden Tagen drei Messdurchgänge mit je zwei Messungen. Die Ergebnisse aller Messungen wurden anschließend gemittelt.

#### **3.3.2 Blutdruckmessung mittels Radiotelemetrie**

Die radiotelemetrische Messung erfolgte extern in Zusammenarbeit mit Ralph Plehm, MDC-Berlin. Die Blutdruckwerte des SHRSP und des kongenen Stammes im Alter von 16 Wochen wurden radiotelemetrisch erfasst. Dazu wurde ein Druck-Transducer in die Abdominalhöhle der 12 Wochen alten Tiere verbracht und ein mit dem Transducer verbundener Kapillarschlauch im Lumen der Aorta abdominalis verankert. Nach einer Regenerationszeit von 4 Wochen wurde die eigentliche Blutdruckmessung vorgenommen. Die Messung erfolgte in individuellen Käfigen an 10 Tagen über 24 Stunden im 2-Minuten Intervall für jeweils 10 Sekunden. Die Käfige standen jeweils auf einem Empfänger für die implantierten Sender. Der Empfänger wandelte das

empfangene Signal in ein digitales Signal um, das mit einem Computersystem ausgewertet wurde. Aus drei zufällig gewählten Perioden der Tag- und Nachtaufzeichnungen wurden die Werte gemittelt.

### 3.3.3 ACE-Aktivität im Plasma und Gewebe (Membranproteine)

Die spektralphotometrische Dokumentation der kinetischen ACE-Aktivität basiert auf der Verwendung des synthetischen Tripeptids N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-L-phenylalanyl-glycyl-glycin (Synonym N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-Phe-Gly-Gly, kurz FAPGG) (Holmquist et al., 1979). Das Verfahren basiert auf der katalytischen Wirkung des ACE bei der hydrolytischen Spaltung des FAPGG unter Abbau zu Furylacryloyl-Phenylalanin (FAP) und Glycylglycin (GG). Die Hydrolyse bewirkt eine der enzymatischen Aktivität proportionale Abnahme der Absorption bei  $\lambda = 340$  nm. Die Aktivität im Probenansatz wird durch Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeit in der Probe mit der des ACE-Kalibrators ermittelt. Eine Einheit ACE-Aktivität entspricht definitionsgemäß der Enzymmenge, die unter den konkreten Bedingungen der Untersuchung die Bildung eines Mikromols ( $\mu\text{mol}$ ) FAP pro Minute katalysiert. Der ACE-Kalibrator ist ein lysophilisiertes Präparat; es enthält tierisches ACE (Schwein) auf gepufferter Humanserumbasis mit Stabilisatoren und Konservierungsmitteln.



Bei der Messung der ACE-Aktivität sollte die Temperatur des Reaktionsgemisches in einem konstanten Bereich zwischen 30 und 37 °C liegen. Nach Überführung der Plasma- oder Proteinproben in Einmalküvetten wurden sie in einem Thermoblock 5 min bei 37 °C inkubiert und die erste photometrische Messung ( $\lambda = 340$  nm) der Probe und des ACE-Kalibrators durchgeführt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 5 min wurden beide Proben erneut gemessen. Für die Berechnung der Aktivität wurde bei jeder Bestimmungsserie ein Kalibrator mitgeführt. Die Einheit der ACE-Aktivität im Plasma wurde in U/l, für das Gewebe in U/g angegeben. Für die Messung wurde zunächst 1 ml ACE-Reagenz in eine Einmalküvette pipettiert und im Thermoblock auf die Reaktionstemperatur von 37 °C erwärmt. 0,1 ml der Probe wurden in das vorgewärmte ACE-Reagenz pipettiert, die Lösung durchmischt und anschließend in die Messküvette überführt. Die Inkubationszeit betrug 5 min bei 37 °C. Die Absorption (A) der Probe und des Kalibrators wurden bei einer Wellenlänge von 340 nm gegen Wasser

als Referenz bestimmt. Diese ersten OD-Werte ergaben INTIAL A. Nach 5 min erfolgte die zweite OD-Messung. Diese Werte ergaben FINAL A.

Berechnung:

$\Delta A$  pro 5 min (Probe) = INTIAL A Probe – FINAL A Probe

$\Delta A$  pro 5 min (Kalibrator) = INTIAL A Kalibrator – FINAL A Kalibrator

ACE-Aktivität des Kalibrators bei 37 °C beträgt 50 U/l (für Sigma Kit: 67 U/l)

ACE (U/l) =  $\Delta A / 5$  min Probe /  $\Delta A / 5$  min Kalibrator x ACE-Aktivität des Kalibrators

### **3.3.4 ACE-mRNA**

#### **3.3.4.1 Bestimmung der Gesamt-RNA (TRIzol™)**

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte aus bei -80 °C tiefgefrorenem Gewebe (Lunge, linker Ventrikel, Nierencortex und Nierenmark) mit der TRIzol™-Methode (Chomczynski et al., 1993). Die Materialien, die nicht autoklavierbar sind, wurden zur Reinigung mit RNase AWAY® oder mit autoklaviertem DEPC-H<sub>2</sub>O behandelt. In einem 20 ml Greiner-Zentrifugenröhrchen wurden 100 mg der Organprobe in 1 ml Trizol für 3x 30 sec. auf Eis homogenisiert. Das Gemisch wurde anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 5000 U/min für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, um grobe Partikel zu entfernen. Der Überstand wurde separiert und zur vollständigen Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Die Phasenseparation erfolgte durch Zugabe eines Gemisches aus 200 µl Chloroform, Inkubation bei Raumtemperatur für 2-3 min und anschließendem Zentrifugieren für 15 min, bei 12.000 U/min, 4 °C. Als Resultat der Zentrifugation definierten sich drei Phasen. Aufgrund der Unlöslichkeit in der sauren phenolischen Phase verblieb die RNA in der oberen wässrigen Phase. In der weißen Interphase befand sich die DNA, in der unteren roten Phase die Proteine, die für die ACE-Aktivitätsbestimmung der jeweiligen Gewebe verwendet wurden. Die obere durchsichtige Phase mit der RNA wurde abpipettiert, in ein Eppendorf-Röhrchen transferiert und zur Präzipitation mit 500 µl Isopropanol / 1 ml Trizol Gemisch versetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA für 10 min bei 12.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml 75%igem -20 °C kaltem Ethanol gewaschen und für 10 min bei 4900 U/min und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert und die Proben auf Eis gelagert. Nach erneutem Waschen mit 1 ml 75%igem -20 °C kaltem Ethanol und Zentrifugieren für 10 min bei 4900 U/min und 4 °C, wurde das RNA-Pellet 5 min luftgetrocknet und dann in 0,1% DEPC-H<sub>2</sub>O durch Inkubation für 5 min bei 65 °C gelöst. Für die Konzentrationsbestimmung wurden die Proben 1:200 mit RNase-freiem Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) verdünnt. Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte mit einem UV-Spektralphotometer bei  $\lambda = 260$  nm und 280 nm. Der berechnete Quotient aus den Absorptionsmaxima (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, Verhältnis RNA zur Proteinkonzentration) ist ein Kennzeichen für die Reinheit des Produkts. Die Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurde mittels Gelelektrophorese durchgeführt. 1  $\mu$ l (500 ng) RNA-Probe wurde mit 1  $\mu$ l Laufpuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarose-Ethidiumbromid-Gel aufgetragen. Das Agarosegelgemisch bestand aus 30 ml 1x TAE und 3  $\mu$ l Ethidiumbromid (10 mg/ml). Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 75 V und einer Stromstärke von ca. 200 mA über etwa 40 min. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt. Die Berechnung wurde folgendermaßen vorgenommen:

$$C_{\text{RNA}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = E (260 \text{ nm}) \cdot \varepsilon (\text{RNA} = 40) \cdot \text{Verdünnung} (200) / 1000$$

$\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient

OD = 1 bei 260 nm ( $E_{260}$ ) entspricht 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNA

Zur Bestimmung der Reinheit erfolgte die Messung bei 280 nm.

### 3.3.4.2 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT-PCR)

Die Expressionen der ACE-mRNA in den verschiedenen Gewebeproben wurden mit der Reversen-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wird durch die RT-PCR zu jedem mRNA-Molekül in der Probe die cDNA (complementary DNA) mittels des Retrovirenzyms Reverse Transkriptase erstellt. Die cDNA dient in der anschließenden quantitativen PCR als Matrix. Für die Synthese der cDNA wurden 1  $\mu\text{g}$  RNA-Probe mit 0,1%igem DEPC-Wasser auf 20  $\mu$ l aufgefüllt. Desweiteren wurden 2  $\mu$ l Random-Hexamer zur Primerhybridisierung zugesetzt. Die Probe mit einem Gesamtvolumen von 22  $\mu$ l wurde im PCR-Gerät zunächst für 5 min auf 70 °C erhitzt und danach für weitere 5 min auf 4 °C abgekühlt. Für die Überschreibung der RNA in cDNA wurden anschließend

8 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl RNase-Inhibitor, 4 µl 10 mMol dNTP-Mix und zudem 4 µl Reverse Transkriptase (M-MULV) zu einem Gesamtvolumen von 40 µl zugegeben. Die Inkubation erfolgte in mehreren Schritten: 10 min 25 °C, 60 min bei 37 °C, 10 min bei 70 °C und 10 min bei 4 °C. Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden 1 µl cDNA, 5 µl 10 x PCR-Puffer, 4 µl dNTP (2,5 mM), 3 µl Magnesiumchlorid (25 mM), 2,5 µl Sense-Primer (6 mM), 2,5 µl Antisense-Primer (6 mM), 1 µl Taq-Polymerase mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte zur initialen Denaturierung 3 min bei 90 °C, 30 sec bei 94 °C, 45 sec bei 57 °C, für das Annealing 1 min bei 72 °C, für die finale Elongation 6 min bei 72 °C, 10 min bei 4 °C über insgesamt 39 Zyklen. Die Qualitätskontrolle der cDNA erfolgte mittels 2%igem Agarosegel. Dazu wurden 5 µl Probe mit 3 µl Loading-Blaupuffer versetzt und aufgetragen.

### **3.3.4.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)**

Die Genexpressionsanalyse im Gewebe der einzelnen Rattenmodelle wurde durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion nach dem RT-qPCR-Prinzip durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden quantitativ über die Hybridisierung mit einer fluorogenen Sonde bestimmt. Im ABI Prism 7000 Sequence Detection System wird bei jedem Zyklus die Fluoreszenz des Reporters, die proportional zur Menge der gebildeten PCR-Produkte ansteigt, gemessen.

Die *Ace*-Genesequenz (NM 012544) zum Design des Primers für den *Ace*-kodierenden Genabschnitt sowie die Informationen zu Exons und Introns wurden der Datenbank Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) und National Center for Biotechnological Information (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) entnommen. Die ACE Primer-Sequenz ist intronüberspannend (Exon 15 - Intron 16 - Exon 16) mit einer Produktlänge von 76 Basenpaaren (s. Anhang 9.4). Zur Auswertung des PCR-Assays wurde eine relative Quantifizierung mit Hilfe von Standardkurven vorgenommen. Mit Hilfe der Expression eines sog. Referenzgens (Housekeeper) werden daraufhin die Expressionslevel des zu untersuchenden Gens auf die Expressionslevel des Referenzgens normiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Referenzgene 18S rRNA und PBGD für die Untersuchung von Gewebeproben verwendet (Fink et al., 1999). Die Verwendung einer Standardkurve beinhaltet sieben serielle 1:10-Verdünnungen bekannter Konzentration. Die relative Expression (rE) des zu untersuchenden Gens wurde berechnet nach der

Formel:

$$rE_{ACE} = E_{ACE} / E_{PBGD} \text{ oder}$$

$$rE_{ACE} = E_{ACE} / E_{18S}$$

Jeweils 2  $\mu$ l cDNA, 12,5  $\mu$ l TaqMan 2x Universal PCR MasterMix, je 2,25  $\mu$ l 10  $\mu$ M Sense-Primer und Antisense-Primer in einer Endkonzentration von 900 nM, 0,5  $\mu$ l 10  $\mu$ M Sonde der Endkonzentration 200 nM und nukleasefreies Wasser wurden zu einem Reaktionsvolumen von 25  $\mu$ l angesetzt. Jede Probe wurde drei Mal gemessen und aus den Messungen der Mittelwert gebildet. Da der Quotient einheitslos ist, wurde zur Auswertung der Mittelwert der Kontrollgruppe (WKY-Stamm) als 100 Prozent definiert und die Mittelwerte der anderen Gruppen relativ dazu als Expression zur Kontrolle angegeben. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels ABI Prism 7000 SDS Software.

### **3.3.5 Bestimmung der plasmatischen Reninkonzentration**

Die Bestimmung der plasmatischen Reninkonzentration erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Danser in Rotterdam, Niederlande. Das Blut wurde unmittelbar nach dem Dekapitieren der Tiere gewonnen. Die Probe wurde in ein Dinatriumcitrat-Polystyrol-Röhrchen mit 0,2 ml Citratlösung in 10 ml Blut (Endkonzentration 0,013 mol/l) überführt. Die Probe wurde bei 1000 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Plasma wurde bei -70 °C gelagert und innerhalb einer Woche untersucht. Die plasmatische Reninkonzentration wurde in Anlehnung an van Kats et al., 1998 durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte mittels Enzym-Assay mit einem Renin-Substrat, wobei die Bildung von Angiotensin I bei pH 7,4 und Inkubation auf 37 °C unter gleichzeitiger Inhibition der Serinprotease, ACE und Angiotensinase gemessen wurde.

### **3.3.6 Bestimmung von Angiotensin I und II im Herzen**

Die Bestimmung der Angiotensinkonzentration erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Danser in Rotterdam, Niederlande. Das linksventrikuläre Gewebe wurde wie nachfolgend beschrieben aufgearbeitet, mittels HPLC aufgetrennt und mittels eines Radioimmunassays vermessen (Danser et al., 1994).

## **Extraktion, Trennung mittels HPLC und Messung von Angiotensin I und II**

Das mit Flüssigstickstoff gefrorene Herzgewebe wurde mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten und mit einem Polytron Homogenisator Ultra Turrax T25 in einer Eislösung von 0,1 mol/l HCl / 80% Ethanol homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 20.000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand für 12 h bei -20 °C aufbewahrt. Das Pellet wurde verworfen. Der nach einer weiteren Zentrifugation bei 20.000 g für 20 min bei 4 °C erhaltene Überstand wurde im Verhältnis 1:1 mit 0,1 % Phosphorsäure verdünnt und für 4-6 Stunden bei 4 °C gelagert. Der verdünnte Überstand wurde erneut bei 20.000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde weiter verdünnt mit 0,02 % Phosphorsäure und anschließend mittels reversibler Adsorption an Octadecylsilylsilikat (Sep-Pak C18) konzentriert. Die Sep-Pak Kartusche wurde mit 4 ml Methanol aufbereitet und zweimal mit 4 ml kaltem Aqua bidest. äquiliert. Die Proben wurden bei 4 °C durch die Kartusche gegeben und diese anschließend 2x mit 4 ml kaltem Wasser gespült. Das adsorbierte Angiotensin wurde mit 3 ml Methanol unter Vakuum-Rotation bei 4 °C in einem Speed-Vac-Gerät verdampft. Die Trennung erfolgte mittels HPLC mit Phasenumkehr. Die gewonnene Fraktion, die Ang I und Ang II enthält, wurde mit 0,5 mol/l Natriumhydroxid neutralisiert und bei 4 °C vakuumgetrocknet. Die Ang I- und II-Konzentrationen wurden mittels Radioimmunoassay bestimmt. Die Bestimmung der Angiotensine nach der Homogenisierung, der Extraktion und HPLC-Trennung erfolgte durch Zusatz von  $^{125}\text{I}$  Ang I oder  $^{125}\text{I}$  Ang II zum Gewebe (ca. 10.000 cpm/g) vor dem Homogenisieren. Die Konzentrationen von intaktem  $^{125}\text{I}$  Ang I und  $^{125}\text{I}$  Ang II in den HPLC-Fraktionen wurden mittels Gammazähler bestimmt.

### **3.4 Statistik**

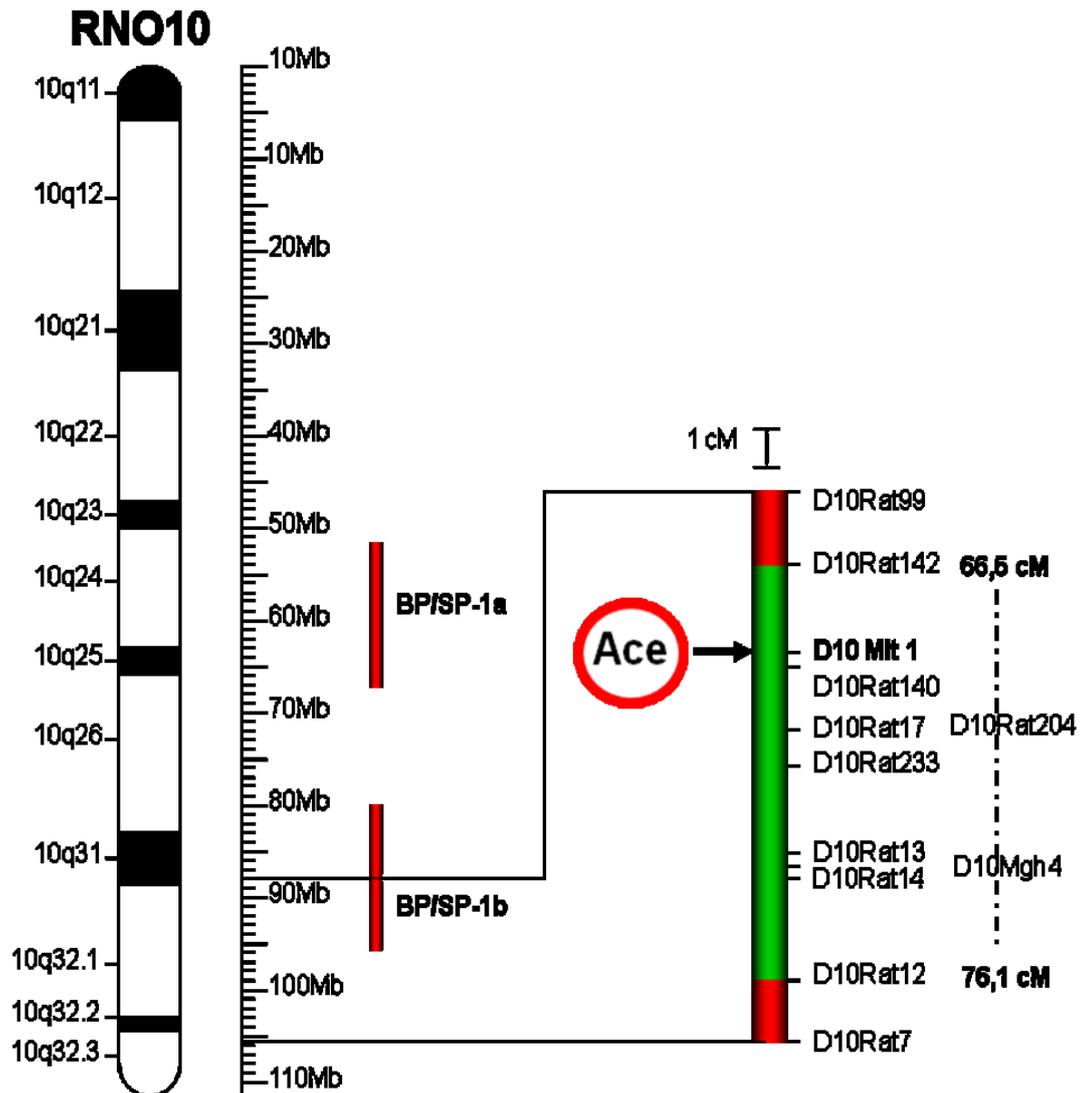
Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde die Software IBM SPSS 17.0 Statistics verwendet. Ist keine Normalverteilung nach Logarithmierung festgestellt, wird zur Auswertung der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Bei normalverteilten Ergebnissen wurde zwischen zwei Gruppen der t-Test durchgeführt. Bei Vergleich von drei Gruppen wurde die Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem post-hoc-Test nach Bonferroni angewandt. Als Signifikanzschwelle wurde ein p-Wert < 0,05 festgelegt. Für die graphische Darstellung der Meßwerte wurde die Software GraphPad Prism 6 verwendet.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Genotypisierung des kongenen Stamms

Die Etablierung des kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> baut auf Erkenntnissen aus der Arbeitsgruppe um Prof. Kreuz auf. Das Ace-Gen befindet sich auf Chromosom 10, Position 68,71 cM (Abb. 8, Anhang 9.5). Das Ace-Fragment auf Chromosom 10 der kongenen Ratten konnte in den vorangegangenen Arbeiten mit den flankierenden Markern D10Rat99 (64,3 cM) und D10Rat3 (91,5 cM) für SHRSP homozygot auf 27,3 cM verkleinert werden (Dissertation Junge, 2009).

Um weitere Verkleinerungen des betreffenden Intervalls zu erreichen, wurde zunächst die Reinheit des kongenen Stamms mit dem genannten Ace-Fragment bestätigt. Dafür wurden insgesamt 170 Mikrosatellitenmarker getestet, die polymorph zwischen SHRSP und WKY sind und sich über das gesamte Genom erstrecken. Sie weisen einen Abstand von ca. 1-10 cM voneinander auf. Der neue kongene Stamm wurde über 6 Backcrossgenerationen und 2 Bruder-Schwester-Verpaarung erweitert und verfügt über einen Ace-Locus von 9,63 cM. Das übertragene Fragment wird mit den Markern des homozygoten WKY von D10Mit1 (68,71 cM) bis D10Mgh4 (73,41 cM) flankiert und trägt das Ace-kodierende Gen. Die nächsten angrenzenden Marker für den homozygoten SHRSP sind D10Rat142 (66,5 cM) und D10Rat12 (76,13 cM), Abb. 8 und Abb. 9. Insgesamt wurden für den Ace-Locus mehr als 30 polymorphe Marker getestet.



**Abb. 8:** Chromosomenkarte zum Rattenchromosom 10. Rechts der untersuchte Ace-Locus mit den flankierenden Markern D10Rat142 und D10Rat12 (Angabe in cM), in der Mitte die beiden Blutdruck-relevanten Genloci BP/SP-1a und BP/SP-1b (rote Balken).

cM	Chromosom 10	Männchen	Weibchen
64,27	D10Rat99	SHRSP	SHRSP
66,5	D10Rat142	SHRSP	SHRSP
68,71	D10Mit1	WKY	WKY
69,01	D10Rat204	WKY	WKY
73,35	D10Rat13	WKY	WKY
73,41	D10Mgh4	WKY	WKY
76,13	D10Rat12	SHRSP	SHRSP
		erhaltene Zucht	erhaltene Zucht

**Abb. 9:** Detaillierter Ausschnitt der Chromosomenkarte aus Abb. 8 für Männchen und Weibchen der erhaltenen Zucht; in grün das übertragene *Ace*-Fragment beinhaltet das *Ace*-Gen (D10Mit1) und in rot die flankierenden Marker für homozygot SHRSP.

## 4.2 Phänotypisierung des kongenen Stammes

### 4.2.1 Körper- und Organgewichte

Im Zuge der Phänotypisierung wurden bei den 16 Wochen alten männlichen Tieren das Körpergewicht sowie die Organgewichte des gesamten Herzens, des linken Ventrikels (LV) und der Nieren ermittelt. Die Organgewichte wurden in Relation zum Körpergewicht gesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Generell wiesen die normotensiven Ratten des WKY-Stammes ein höheres Körpergewicht auf als die SHRSP- und die kongenen Tiere. Das durchschnittliche Gewicht der SHRSP-Ratten betrug  $256 \pm 5$  g und lag damit um 14,7 % niedriger im Vergleich zu den WKY-Tieren ( $300 \pm 7$  g), während der kongene Stamm SHRSP.WKY-*Ace*<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> mit  $278 \pm 14$  g nur um 7,3 % vom WKY-Stamm abwich. Der Unterschied zwischen dem WKY- und dem SHRSP-Stamm ist signifikant ( $p < 0,05$ ). Einen gegenteiligen Verlauf nahmen die relativen Gewichte der Organe. Das Herzgewicht der hypertensiven SHRSP-Ratten ( $4,44 \pm 0,11$  g) sowie der Tiere der kongenen Linie ( $4,33 \pm 0,19$  g) zeigte im Vergleich zu den normotensiven Parentaltieren ( $3,07 \pm 0,88$  g) signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die SHRSP-Ratten demonstrierten ein um 44,6 % und die kongenen Ratten ein um 41,0 % höheres Herzgewicht als die WKY-Tiere. Das relative linksventrikuläre Gewicht des kongenen SHRSP.WKY-*Ace*<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Stammes betrug  $3,24 \pm 0,12$  mg/g und des SHRSP-Stammes  $3,21 \pm 0,89$  mg/g. Beide Stämme zeigten damit um 43,4 % bzw. 42,0 % erhöhte Werte

( $p < 0,05$ ) als der WKY-Stamm ( $2,26 \pm 0,24$  mg/g). Das relative Nierengewicht lag mit  $4,21 \pm 0,08$  mg/g für SHRSP um 22,4 % und mit  $4,24 \pm 0,13$  mg/g für SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> um 23,3 % höher im Vergleich zum Parentalstamm WKY ( $3,44 \pm 0,07$  mg/g). Insgesamt liegen die Werte für den SHRSP- und den kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Stamm für die drei betrachteten Organe jeweils signifikant über den Werten für den Parentalstamm WKY ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2 Blutdruck, Herzfrequenz

Neben der Messung der Körper- und Organgewichte ist die Bestimmung des Blutdrucks ein wichtiger Parameter im Zuge der Phänotypisierung. Die radiotelemetrisch ermittelten Blutdrücke (Tab. 1) lagen erwartungsgemäß bei den SHRSP-Ratten im hypertensiven Bereich ( $235 \pm 3$  mmHg systolisch,  $176 \pm 4$  mmHg diastolisch). Die kongene Linie wies Werte von  $233 \pm 7$  mmHg (systolisch) und  $178 \pm 6$  mmHg (diastolisch) auf und zeigte damit ein sehr ähnliches Muster wie der Parentalstamm SHRSP. Beide Parameter demonstrierten bezüglich des SHRSP- und des kongenen Stammes über einen Zeitraum von 24 Stunden keine signifikante Änderung hinsichtlich der durchschnittlichen Werte. Auch ein signifikanter Einfluss des 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus wurde nicht beobachtet.

Die Bestimmung des Blutdrucks bei den normotensiven WKY-Parentaltieren (Tab. 1) erfolgte mit der Tail-Cuff-Methode; das Ergebnis von  $124 \pm 3$  mmHg (systolisch) bestätigte die Erwartungen. Dagegen wurde bei den SHRSP-Tieren und dem kongenen Stamm ein signifikant erhöhter systolischer Blutdruck im Vergleich zu den WKY-Tieren ( $p < 0,05$ ) detektiert, was ebenfalls den Erwartungen entspricht. Im Zusammenhang mit der Blutdruckmessung wurde die Herzfrequenz dokumentiert (Tab. 1). Dabei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den drei untersuchten Stämmen festgestellt. Die durchschnittlichen Werte lagen bei  $361 \pm 18$  Herzschlägen pro Minute für die SHRSP-Parentaltiere,  $363 \pm 14$  für SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> und  $353 \pm 9$  für die WKY-Parentaltiere.

**Tab.1:** Generelle Charakteristik der normotensiven WKY-, der kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> und der hypertensiven SHRSP-Tiere; Mittelwerte  $\pm$  SE für 6-12 männliche Versuchstiere pro Gruppe. KG, Körpergewicht; Herzgewicht (HG), LV + S/KG, relatives Feuchtgewicht des linken Ventrikels (LV) inklusive Septum (S); NG/KG, relatives Feuchtgewicht der Niere (NG); Hf, Herzfrequenz; SBD, systolischer Blutdruck; DBD diastolischer Blutdruck; \*p<0.05 vs. SHRSP, #p<0.05 vs. SHRSP und SHRSP.WKY- Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>.

	WKY	SHRSP.WKY-Ace <sub>(D10Rat142D10Rat12)</sub>	SHRSP
KG [g]	300 $\pm$ 7*	278 $\pm$ 14	256 $\pm$ 5
HG/KG [mg/g]	3,07 $\pm$ 0,88 <sup>#</sup>	4,33 $\pm$ 0,19	4,44 $\pm$ 0,11
LV+S/KG [mg/g]	2,26 $\pm$ 0,24 <sup>#</sup>	3,24 $\pm$ 0,12	3,21 $\pm$ 0,89
NG/KG [mg/g]	3,44 $\pm$ 0,07 <sup>#</sup>	4,24 $\pm$ 0,13	4,21 $\pm$ 0,08
Hf [1/min]	353 $\pm$ 9	363 $\pm$ 14	361 $\pm$ 18
SBD [mmHg]	124 $\pm$ 2,7 <sup>#</sup>	233 $\pm$ 7	235 $\pm$ 3
DBD [mmHg]	nicht ermittelt	178 $\pm$ 6	176 $\pm$ 4

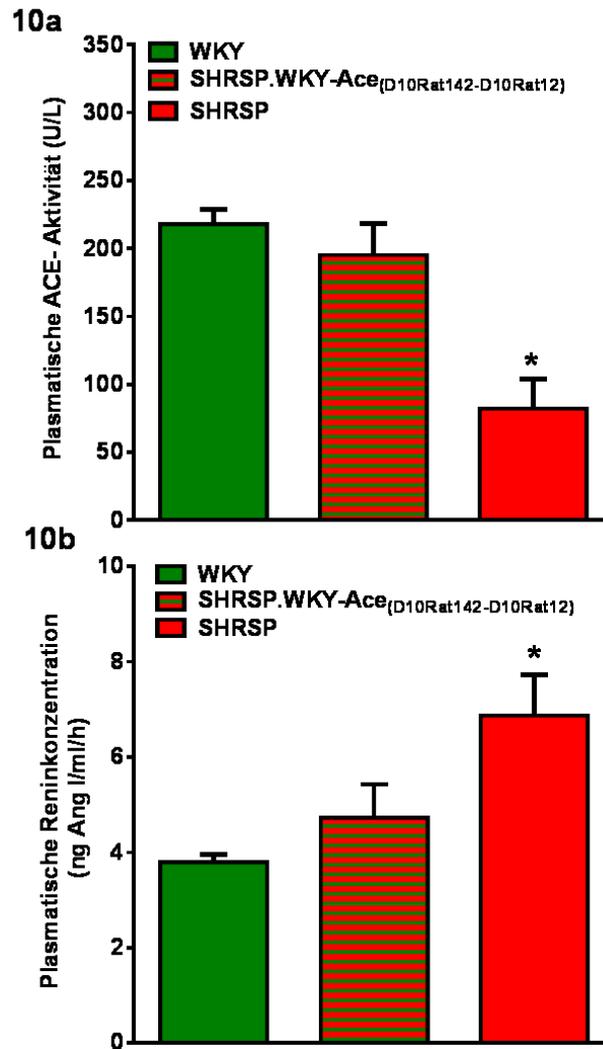
#### 4.2.3 ACE-Aktivität im Plasma

Die plasmatische ACE-Aktivität bei den normotensiven WKY-Tieren war im Vergleich zu den hypertensiven SHRSP-Parentaltieren deutlich mehr als doppelt so hoch (217,7  $\pm$  11,7 vs. 82,2  $\pm$  6,3 U/l, p<0,05) (Abb. 10a). Einen ähnlichen hohen Anstieg der plasmatischen ACE-Aktivität zeigten die kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Tiere (195,2  $\pm$  23,0 U/l, p<0,05), wohingegen die SHRSP-Tiere nur Werte von 82,2  $\pm$  6,3 U/l aufwiesen. Somit befand sich die plasmatische ACE-Aktivität im kongenen Stamm in etwa auf dem Niveau des WKY-Parentalstammes.

#### 4.2.4 Reninkonzentration im Plasma

Die plasmatische Reninkonzentration (Abb. 10b) fällt beim normotensiven WKY-Stamm mit 3,79  $\pm$  0,64 ng Ang I/ml/h am niedrigsten aus und ist demgegenüber beim

hypertensiven SHRSP-Stamm mit  $6,78 \pm 1,55$  ng Ang I/ml/h nahezu verdoppelt. Interessanterweise nimmt der kongene Stamm mit  $4,72 \pm 1,44$  ng Ang I/ml/h hier eine mittlere Position ein. Der Unterschied ist signifikant zwischen WKY und SHRSP ( $p < 0,05$ ).



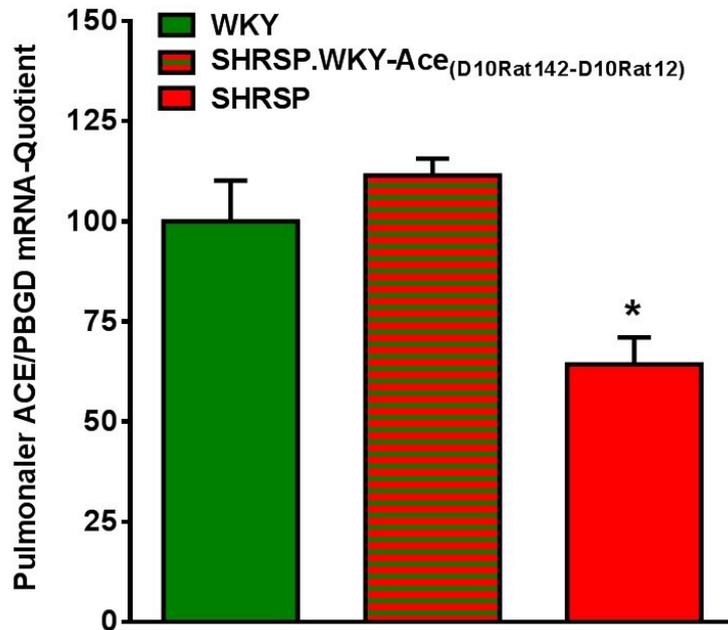
**Abb. 10:** Plasmatische ACE-Aktivität (**10a**) und plasmatische Reninkonzentration (**10b**) des normotensiven WKY-Stammes (links), des kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Stammes (Mitte) und des SHRSP-Stammes (rechts). Mittelwerte  $\pm$  SE für 10-12 männliche Tiere pro Versuchsgruppe für die ACE-Aktivitätsmessung und 6 männliche Tiere pro Versuchsgruppe für die Bestimmung der plasmatischen Reninkonzentration. Plasmatische ACE-Aktivität: \* $p < 0,05$  SHRSP vs. WKY bzw. SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Ratten. Plasmatische Reninkonzentration: \* $p < 0,05$  SHRSP vs. WKY; SHRSP vs. kongene SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Ratten ( $p = 0,12$ ).

#### **4.2.5 ACE-mRNA- und ANP-mRNA-Expression, ACE-Aktivität und Ang I- und Ang II -Konzentration in den Organen und im Gewebe**

Die differentielle Genexpressionsanalyse erfolgte mittels Real-Time-PCR. Bei der Darstellung der Messwerte präsentieren die Daten zum WKY-Stamm die Basis (Vergleichreferenz) und nehmen bei der Angabe der relativen Werte den relativen Mittelwert von 100% an (z. B. Mittelwert von ACE/PBGD).

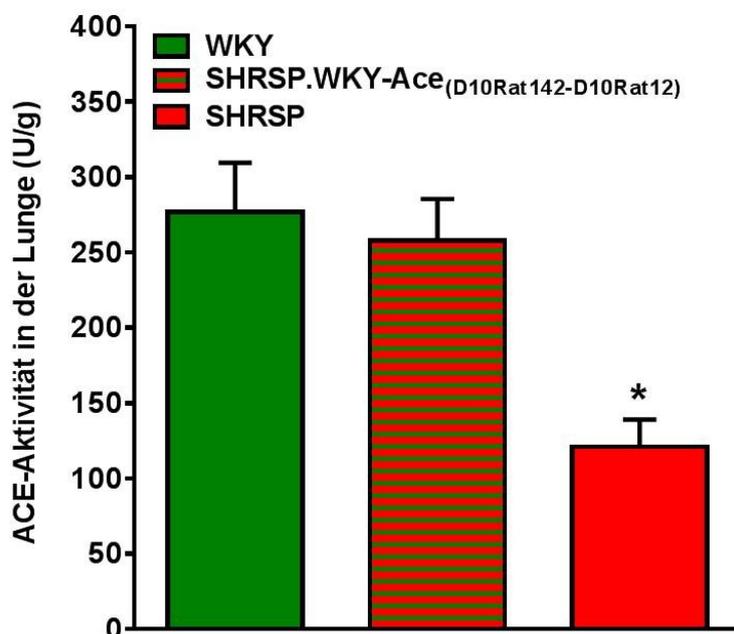
##### **4.2.5.1 ACE-mRNA und ACE-Aktivität in der Lunge**

Die Ergebnisse der mittels Real-Time-PCR gemessenen differentiellen Expression von ACE-mRNA in der Lunge der drei untersuchten Stämme WKY, SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> und SHRSP zeigt Abb. 11. Die gemessenen Werte wurden auf die entsprechenden parallel gemessenen Porphobilinogendeaminase (PBGD) mRNA-Spiegel normiert. Die normierte pulmonale ACE-mRNA-Expression betrug im normotensiven WKY-Parentalstamm  $46,6 \pm 17,3$  und lag 61% über dem entsprechenden Wert der hypertensiven SHRSP-Tiere ( $29,0 \pm 13,7$ ,  $p < 0,05$ ). Interessanterweise unterschied sich die ACE-mRNA-Expression von  $52,5 \pm 10,8$  der kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Tiere nicht signifikant vom WKY-Parentalstamm, lag jedoch bei dem 1,8-fachen des Expressionswertes der SHRSP-Tiere ( $p < 0,05$ ).



**Abb.11:** Relative ACE-mRNA-Expression in der Lunge von WKY- (links), kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>- (Mitte) und SHRSP-Ratten (rechts). Mittelwerte ± SE für jeweils 10-12 männliche Tiere pro Versuchsgruppe; \*p<0,05 vs. WKY bzw. kongene SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Ratten. Auf Porphobilinogendeaminase (PBGD) mRNA normierte ACE-mRNA-Spiegel wurden verglichen.

Abbildung 12 zeigt die gemessenen pulmonalen ACE-Gesamtaktivitäten. Es fanden sich vergleichbar hohe Aktivitäten bei normotensiven WKY-Ratten ( $276,8 \pm 108,5$  U/g) und den kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Tieren ( $257,9 \pm 87,0$  U/g), während bei hypertensiven SHRSP-Tieren nur 47 bzw. 50% dieser Aktivitäten nachweisbar waren. Die kongenen und normotensiven Tiere wiesen einen signifikanten Unterschied zu den hypertensiven Parentaltieren auf (\* $p < 0,05$ ).

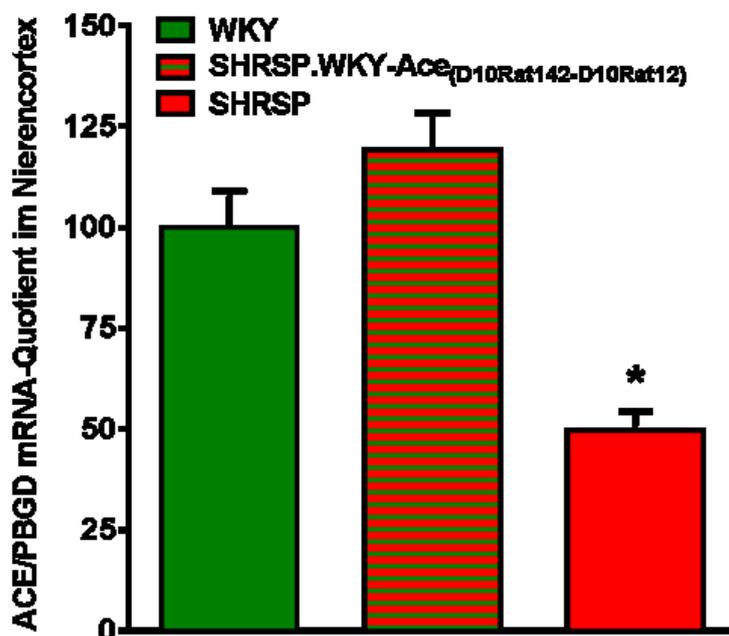


**Abb. 12:** Pulmonale ACE-Gesamtaktivität von normotensiven WKY- (links), kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>- (Mitte) und hypertensiven SHRSP-Ratten (rechts). Mittelwerte  $\pm$  SE für jeweils 10-12 männliche Tiere pro Versuchsgruppe; \* $p < 0,05$  vs. WKY bzw. SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Ratten.

#### 4.2.5.2 Renale ACE-mRNA und ACE-Aktivität

##### Nierencortex

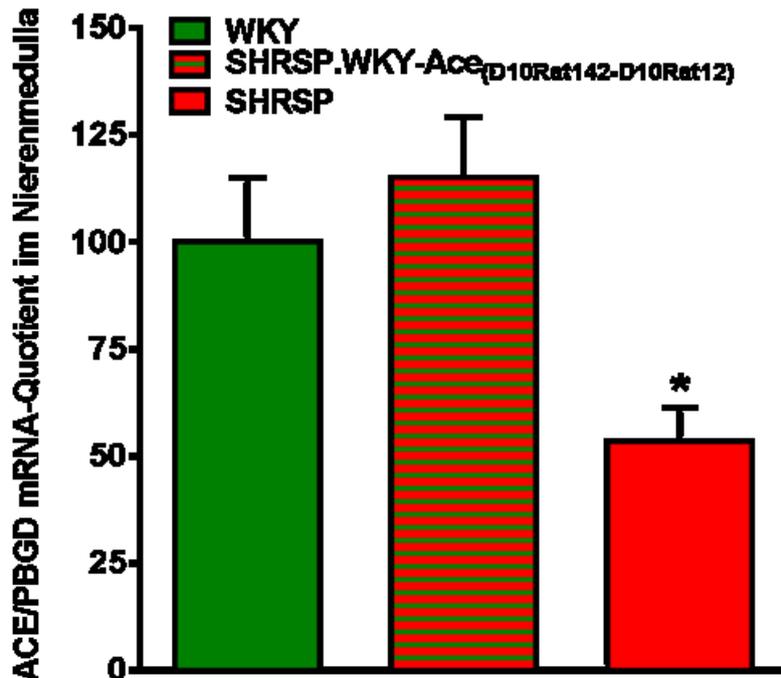
Ebenfalls mittels Real-Time-PCR wurde die differentielle Expression von ACE-mRNA im Nierencortex bestimmt. Die Ergebnisse für die drei untersuchten Stämme WKY, SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> und SHRSP zeigt Abb. 13. Die gemessenen Werte wurden auch hier auf die entsprechenden parallel gemessenen Porphobilinogendeaminase (PBGD) mRNA-Spiegel normiert. Die normierte renale ACE-mRNA-Expression des Nierencortex betrug im normotensiven WKY-Parentalstamm  $0,69 \pm 0,17$  und lag 2,1-fach über dem entsprechenden Wert der hypertensiven SHRSP-Tiere mit  $0,33 \pm 0,09$  ( $p < 0,05$ ). Die ACE-mRNA-Expression von  $0,73 \pm 0,21$  der kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Tiere unterschied sich nicht signifikant vom WKY-Parentalstamm, lag jedoch 2,2-fach über dem Expressionswert der SHRSP-Tiere ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 13:** Relative ACE-mRNA-Expression im Nierencortex von WKY- (links), kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>- (Mitte) und SHRSP-Ratten (rechts). Mittelwerte  $\pm$  SE für jeweils 10-12 männliche Tiere pro Versuchsgruppe; \* $p < 0,05$  vs. WKY bzw. kongene SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Ratten. Auf Porphobilinogendeaminase (PBGD) mRNA normierte ACE-mRNA-Spiegel wurden verglichen.

## Nierenmedulla

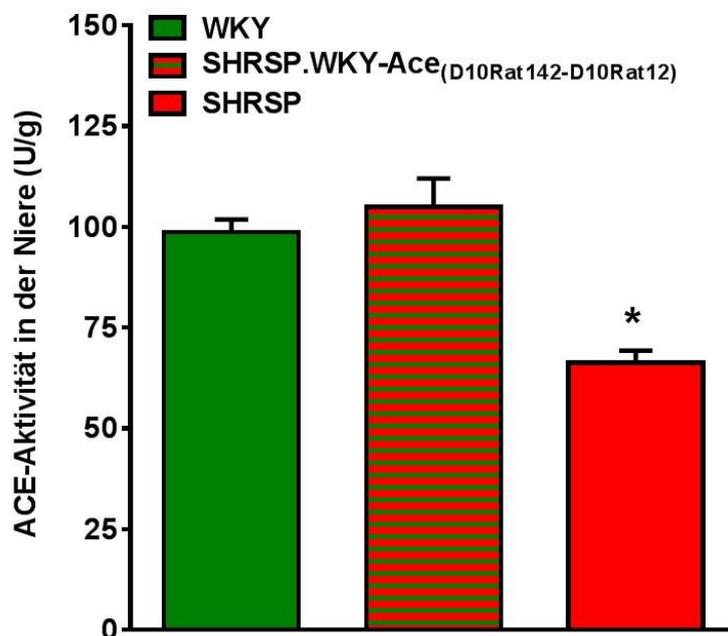
Die Ergebnisse der mittels Real-Time-PCR gemessenen differentiellen Expression von ACE-mRNA in der Nierenmedulla der drei untersuchten Stämme WKY, SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> und SHRSP zeigt Abb. 14. Die auf die parallel gemessenen Porphobilinogendeaminase (PBGD) mRNA-Spiegel normierte renale ACE-mRNA-Expression der Nierenmedulla betrug im normotensiven WKY-Parentalstamm  $0,61 \pm 0,21$  und lag 45% über dem entsprechenden Wert der hypertensiven SHRSP-Tiere mit  $0,42 \pm 0,16$  ( $p < 0,05$ ). Somit unterschied sich die ACE-mRNA-Expression von  $0,69 \pm 0,30$  der kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Tiere nicht signifikant vom WKY-Parentalstamm, lag jedoch 64% über dem Expressionswert der SHRSP-Tiere ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 14:** Relative ACE-mRNA-Expression in der Nierenmedulla von WKY- (links), kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>- (Mitte) und SHRSP-Ratten (rechts). Mittelwerte  $\pm$  SE für jeweils 10-12 männliche Tiere pro Versuchsgruppe; \* $p < 0,05$  vs. WKY bzw. kongene SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Ratten. Auf Porphobilinogendeaminase (PBGD) mRNA normierte ACE-mRNA-Spiegel wurden verglichen.

## ACE-Aktivität in der gesamten Niere

Die renale ACE-Gesamtaktivität wird in Abb. 15 gezeigt. Bezogen auf die gesamte Niere fand sich eine erhöhte ACE-Aktivität sowohl bei den WKY-Tieren als auch bei den kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Tieren mit Messwerten von  $98,7 \pm 7,6$  U/g bzw.  $104,8 \pm 18,8$  U/g. Der hypertensive SHRSP-Stamm zeigte Werte von  $66,2 \pm 7,9$  U/g. Somit waren für den hypertensiven SHRSP-Stamm nur 67% bzw. 63% der Aktivitäten der beiden oben genannten Stämme nachweisbar. Dieser Unterschied war jeweils signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 15:** Renale ACE-Gesamtaktivität von normotensiven WKY- (links), kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>- (Mitte) und hypertensiven SHRSP-Ratten (rechts). Mittelwerte  $\pm$  SE für jeweils 10-12 männliche Tiere pro Versuchsgruppe; \* $p < 0,05$  vs. WKY bzw. kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Ratten.

### 4.2.5.3 ACE-mRNA und ACE-Aktivität im linken Ventrikel

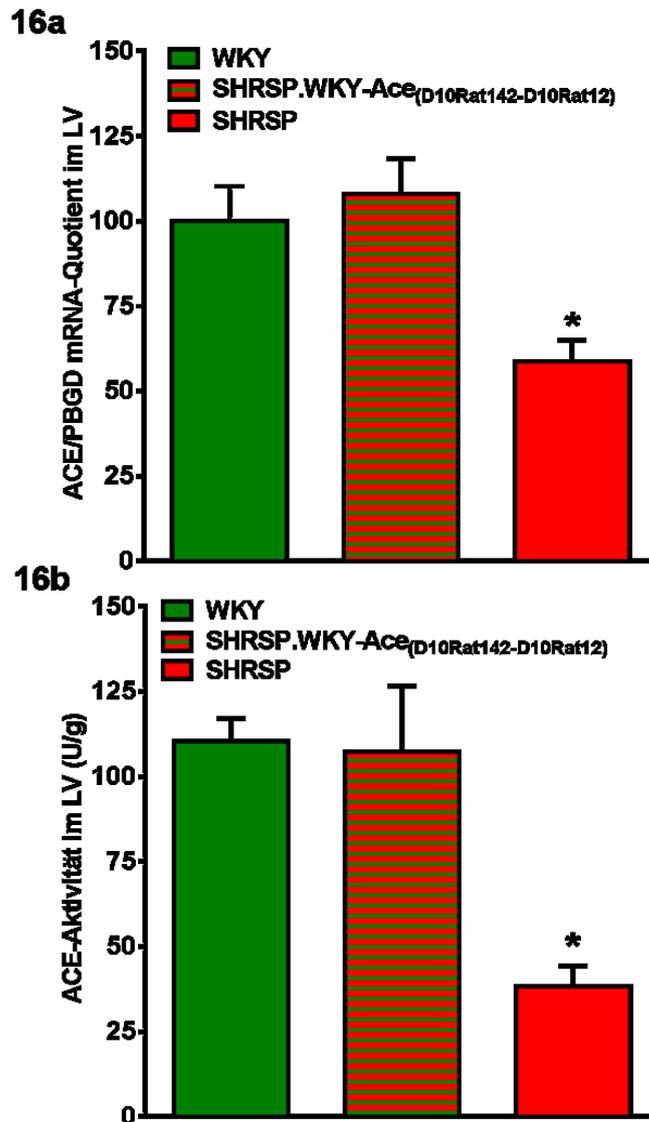
#### ACE-mRNA-Expression im linken Ventrikel

Weiterhin mittels Real-Time-PCR wurde die differentielle Expression von ACE-mRNA im linken Ventrikel ermittelt. Die Ergebnisse für die drei untersuchten Stämme WKY, SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> und SHRSP zeigt Abb. 16a. Die gemessenen Werte wurden auch hier auf die entsprechenden parallel gemessenen Porphobilinogendeaminase (PBGD) mRNA-Spiegel normiert. Die normierte kardiale ACE-mRNA-Expression des linken Ventrikels betrug im normotensiven WKY-Parentalstamm  $0,50 \pm 0,15$  und lag 62% über dem entsprechenden Wert der hypertensiven SHRSP-Tiere mit  $0,31 \pm 0,09$  ( $p < 0,05$ ). Die ACE-mRNA-Expression von  $0,53 \pm 0,16$  der kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Tiere unterschied sich nicht signifikant vom WKY-Parentalstamm, lag jedoch bei dem 1,7-fachen des Expressionswertes der SHRSP-Tiere ( $p < 0,05$ ).

#### ACE-Aktivität im linken Ventrikel

Die linksventrikuläre ACE-Aktivität (Abb. 16b) zeigte Werte von  $110,3 \pm 17,7$  U/g für den WKY-Parentalstamm,  $107,2 \pm 54,6$  U/g für den kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Stamm und  $38,2 \pm 13,2$  U/g für den hypertensiven SHRSP-Stamm. Damit weisen sowohl der normotensive Stamm als auch die kongenen Tiere signifikant höhere Werte als die hypertensiven Ratten auf ( $p < 0,05$ ). Die ACE-Aktivität der SHRSP-Tiere betrug nur etwa ein Drittel der gemessenen ACE-Aktivitäten des normotensiven WKY-Parentalstammes und des kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Stammes.

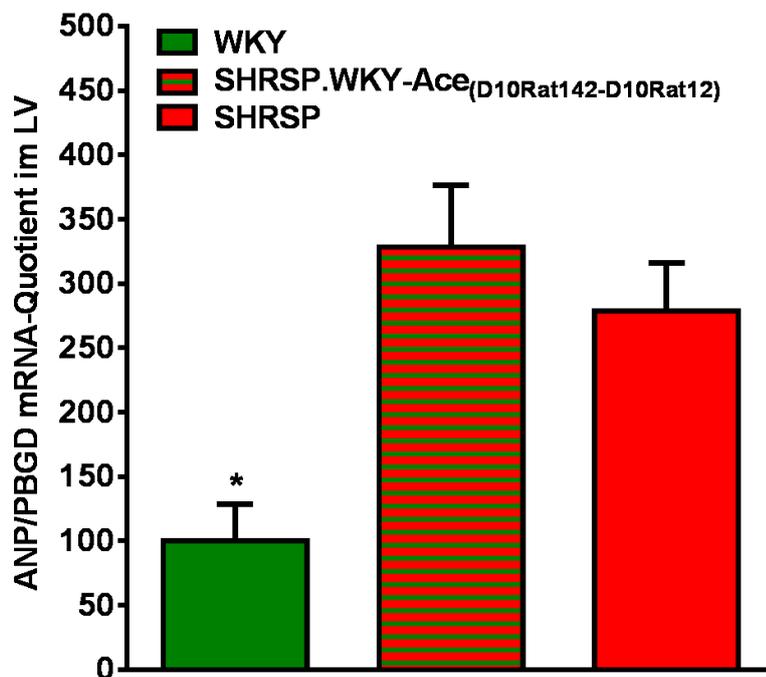
Die ermittelten Werte zur ACE-Aktivität für die verschiedenen Organe Lunge, Niere und Herz sind miteinander vergleichbar, wenn auch die absoluten Werte in der Reihenfolge Lunge, Herz und Niere abnehmen.



**Abb. 16:** Relative ACE-mRNA-Expression im linken Ventrikel (LV) (**16a**) und linksventrikuläre ACE-Aktivität (**16b**) von WKY- (links), kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>- (Mitte) und SHRSP-Ratten (rechts). Mittelwerte  $\pm$  SE für jeweils 10-12 männliche Tiere pro Versuchsgruppe für die Messung der ACE-mRNA-Expression und 6-8 männliche Tiere für die Bestimmung der ACE-Aktivität; \* $p < 0,05$  vs. WKY bzw. kongene SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Ratten. Auf Porphobilinogendeaminase (PBGD) mRNA normierte ACE-mRNA-Spiegel wurden verglichen.

## ANP-mRNA-Expression im linken Ventrikel

Die Ergebnisse der mittels Real-Time-PCR gemessenen differentiellen Expression von ANP-mRNA im linken Ventrikel der drei untersuchten Stämme WKY, SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> und SHRSP zeigt Abb. 17. Die auf die parallel gemessenen Porphobilinogendeaminase (PBGD) mRNA-Spiegel normierte kardiale ANP-mRNA-Expression im linken Ventrikel betrug im SHRSP-Parentalstamm  $35,4 \pm 8,2$  und lag 2,8-fach über dem normotensiven WKY-Parentalstamm mit  $12,7 \pm 7,3$  ( $p < 0,05$ ). Damit unterschied sich die ANP-mRNA-Expression von  $41,8 \pm 12,2$  der kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Tiere nicht signifikant vom SHRSP-Parentalstamm, lag jedoch 3,3-fach über dem Expressionswert der WKY-Tiere ( $p < 0,001$ ).



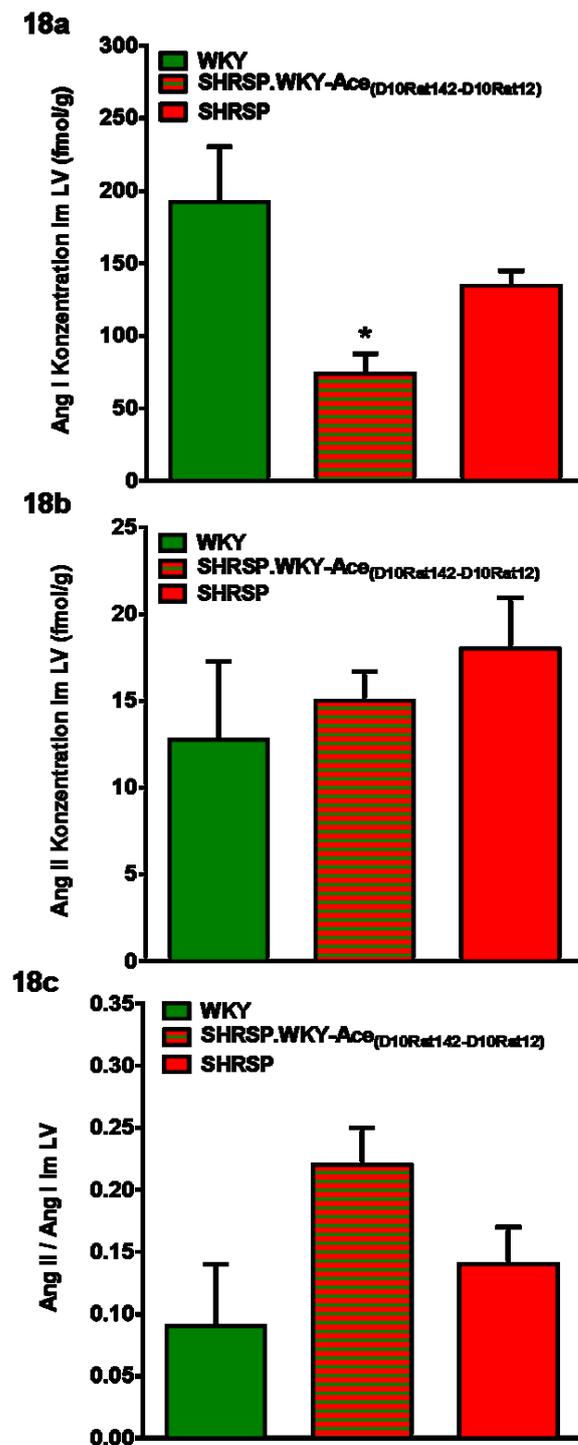
**Abb. 17:** Relative ANP-mRNA-Expression im linken Ventrikel von WKY- (links), kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>- (Mitte) und SHRSP-Ratten (rechts). Mittelwerte  $\pm$  SE für jeweils 6-8 männliche Tiere pro Versuchsgruppe; \* $p < 0,001$  vs. SHRSP bzw. kongene SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Ratten. Auf Porphobilinogendeaminase (PBGD) mRNA normierte ANP-mRNA-Spiegel wurden verglichen.

#### 4.2.5.4 Angiotensin I- und Angiotensin II-Spiegel im linken Ventrikel

Die Ergebnisse der Ang I-Konzentration im linken Ventrikel wurden mittels Radioimmunassay nach HPLC-Trennung bestimmt und sind in Abb. 18a dargestellt. Die Ang I-Konzentration beträgt beim normotensiven WKY-Stamm  $199,3 \pm 76,9$  fmol/g, dagegen zeigten die hypertensiven SHRSP-Ratten eine um ein Drittel geringere Ang I-Konzentration ( $134,4 \pm 21,1$  fmol/g). Die Ang I-Konzentration der kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Ratten lag mit  $60,8 \pm 28,6$  fmol/g nochmals niedriger. Dieser Messwert machte nur 45% der Ang I-Konzentration der hypertensiven SHRSP-Parentaltiere und nur 31% der Konzentration der normotensiven WKY-Parentaltiere aus. Es konnte ein signifikanter Unterschied sowohl zwischen den WKY- und den kongenen Tieren als auch zwischen den SHRSP- und kongenen Tieren verzeichnet werden ( $p < 0,05$ ).

Abb. 18b zeigt die ebenfalls mittels Radioimmunassay nach HPLC-Trennung untersuchte Ang II-Konzentration. Ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg ist in der Reihenfolge normotensiver WKY-Parentalstamm mit  $12,8 \pm 7,9$  fmol/g, kongener Stamm SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> mit  $15,0 \pm 3,4$  fmol/g und hypertensiver SHRSP-Parentalstamm mit  $18,0 \pm 5,9$  fmol/g feststellbar.

Bei der Betrachtung des Verhältnisses Ang II/ Ang I (Abb. 18c), welches als Maß für die ACE-Aktivität zu verstehen ist, zeigte der kongene Stamm SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> den höchsten Wert mit  $0,22 \pm 0,03$ , wobei der Wert für den hypertensiven SHRSP-Parentalstamm  $0,14 \pm 0,03$  und für den normotensiven WKY-Parentalstamm  $0,09 \pm 0,05$  beträgt.



**Abb. 18:** Angiotensin I-Konzentration (**18a**), Angiotensin II-Konzentration (**18b**) und das Verhältnis Ang II/Ang I (**18c**) im linken Ventrikel (LV) des normotensiven WKY-Parentalstammes (links), des kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Stammes (Mitte) und des hypertensiven SHRSP-Parentalstammes (rechts). Mittelwerte  $\pm$  SE für jeweils 6 männliche Tiere pro Versuchsgruppe; \*p<0,05 vs. WKY- und SHRSP-Tiere.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Allgemeine Aspekte

Die komplexe, multifaktorielle und polygenetische Natur der primären Hypertonie erschwert die Analyse der genetischen Ursachen und pathophysiologischen Mechanismen von Hypertonie-Erkrankungen deutlich (Hübner et al., 1994). Eine japanische Arbeitsgruppe, die sich ebenfalls mit der Etablierung kongener Rattenstämme zur Untersuchung der Hypertonie befasste, wies explizit darauf hin, dass in Abhängigkeit der Größe des kongenen Intervalls auf einem Chromosom – mehr als ein blutdruckregulierendes Gen im betreffenden Abschnitt enthalten sein kann, sowie hunderte andere, nicht mit dem Blutdruck zusammenhängende Gene (Wang et al., 2008). Voneinander unabhängige Studien an hypertensiven Rattenmodellen weisen auf mindestens fünf unterschiedliche, den Blutdruck beeinflussende QTL auf RNO10 hin (Saad et al., 2007). Die chromosomale Region auf RNO10 zeigt im Vergleich zu den Eigenschaften des humanen Chromosoms 17q eine hochkonservierte Syntenie und enthält neben dem Gen *Ace* auch das Gen Serin/Threonin-Protein-Kinase (*Wnk4*), für das ebenfalls ein Einfluss auf die Entwicklung einer Hypertonie angenommen wird (Monti et al., 2003). So verursachen Mutationen des humanen *Wnk4* eine monogenetisch bedingte arterielle Hypertonie infolge eines Typ-II-Pseudohypoaldosteronismus (Wilson et al., 2001). Davor wurde durch Kopplungsanalysen am Humanmodell (primäre Hypertonie) eine Verbindung zum Chromosom 17q nachgewiesen (Baima et al., 1999; Julier et al., 1997; Levy et al., 2000). Das auf den neuen kongenen Stamm SHRSP.WKY-*Ace*<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> übertragene chromosomale Fragment ist im Vergleich zur Größe des ursprünglichen QTL BP/SP-1b sehr klein (Kreutz et al., 1995b).

Innerhalb der komplexen Regelkreise der Blutdruckregulation hat sich das *Ace*-Kandidatengen als bedeutender Parameter für die Blutdruckhomöostase erwiesen. Rigat et al. waren durch die Entdeckung des Insertions/Deletions-Polymorphismus für zahlreiche nachfolgende Forschungsarbeiten zur genetischen Bedeutung des *ACE*-Gens vor dem Hintergrund kardiovaskulärer Erkrankungen wegbereitend (Rigat et al., 1990). So ist dieser Insertions-Deletions-(I/D)-Genpolymorphismus auf Intron 16 des für die Expression des *ACE* (Angiotensin-Converting-Enzym) verantwortlichen Gens beim Menschen ein zentraler Gegenstand der modernen kardiovaskulären Forschung

sowie wichtig für die Aufklärung der genetischen Ursachen der Hypertonie. ACE ist ein Schlüsselenzym des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und katalysiert die hydrolytische Spaltung von Angiotensin I (Ang I) zu Angiotensin II (Ang II), das über seine Rezeptoren auf die Vasokonstriktion der Blutgefäße wirkt und damit die Regulierung des Blutdrucks beeinflusst. Daher wird dem I/D-Polymorphismus als genetische Basis des Blutdrucks bei der Begünstigung von Hypertonie eine maßgebende Rolle zugeschrieben, doch sind die genauen molekulargenetischen Mechanismen bislang nur unzureichend verstanden. Tiermodelle sind in diesem Sinne bei der Aufklärung ausgesprochen hilfreich, da zur Analyse der genetischen Ursachen des Bluthochdrucks selektiv ingezüchtete, hypertensive Rattenmodelle zur Verfügung stehen.

In der Literatur finden sich zahlreiche Berichte über die Beziehung zwischen I/D-Polymorphismus und der plasmatischen ACE-Aktivität, dem Blutdruck sowie kardiovaskulären Erkrankungen. Frühere wichtige Hinweise für die Abhängigkeit zwischen I/D-Polymorphismus und der plasmatischen ACE-Aktivität ergeben sich aus den Arbeiten von Rigat et al., 1990; Tiret et al., 1998; und Abraham et al., 2002. Diese Arbeiten zeigten eine Assoziation zwischen D-Allel und einer erhöhten plasmatischen ACE-Aktivität. Ein direkter Zusammenhang zwischen I/D-Polymorphismus und Blutdruck konnte bislang nicht belegt werden (Berge und Berg, 1994; Harrap et al., 1993; Barley et al., 1996). Hinsichtlich der Assoziation zwischen dem I/D-Polymorphismus und anderweitigen kardiovaskulären Erkrankungen existieren unterschiedliche Berichte wie linksventrikuläre Hypertrophie (Pan et al., 2007; Tiret et al., 1998), Myokardinfarkt (Lindpaintner et al., 1995), diabetische Nephropathie (Miller et al., 1997). Darüber hinaus gibt es Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen dem I/D-Polymorphismus und der salzabhängigen Hypertonie. So stellte sich heraus, dass die Patienten mit dem II-Genotyp einen signifikant höheren Blutdruck nach Salzbelastung hatten als Studienteilnehmer mit dem ID- oder DD-Genotyp (Giner et al., 2000; Hiraga et al., 1996).

Die ersten Beiträge aus der ersten Hälfte der 1990er Jahre beinhalteten die Identifizierung eines Blutdruck-regulierenden QTL anhand von SHRSP-Ratten (Hilbert et al., 1991). Nachfolgend wurden unterschiedliche plasmatische ACE-Aktivitäten im Vergleich zwischen SHRSP- und WKY-Ratten beobachtet (Fernandez-Alfonso et al., 1994). Die ACE-Aktivität im normotensiven Referenzstamm WKY war um etwa das Doppelte erhöht, was in nachfolgenden Arbeiten auf allelische Variationen des *Ace*-Locus zurückgeführt wurde (Kreutz et al., 1995a). Die Ergebnisse entsprachen

denen, die aus Studien am Menschen (Humanmodell) abgeleitet wurden (Kreutz et al., 1995a). Die F<sub>2</sub>-Mischpopulation (Rattenstamm SHRSP x WKY) in dem Beitrag der Arbeitsgruppe Kreutz et al. wies eine signifikant höhere plasmatische ACE-Aktivität auf, obwohl keine Unterschiede des Blutdrucks festgestellt wurden. Im Rahmen der genetischen Analyse konnte ein kodominantes Vererbungsmuster, das für 89% der Gesamtvarianz verantwortlich ist, nachgewiesen werden (Kreutz et al., 1995b).

Auch andere Tiermodelle lieferten Erkenntnisse zur genetischen Regulierung der ACE-Expression und -Aktivität (Paul et al., 2006). Krege et al. fanden mittels Gentitrations am Knock-out-Mausmodell des *Ace*-Gens, dass die Zahl der *Ace*-Loci (1-3) mit der ACE-Aktivität im Serum korreliert, wobei der Blutdruck sich ebenfalls neutral verhielt (Krege et al., 1997). Neuere Ergebnisse zum Zusammenhang zwischen I/D-Polymorphismus, plasmatischer ACE-Aktivität und zirkulierender ACE-mRNA-Expression hinsichtlich der primären Hypertonie weisen auf einen signifikanten Einfluss der ersten beiden Parameter auf die Entwicklung von Hypertonie beim Menschen hin (He et al., 2013). Daher stellt sich die Frage nach der eindeutigen Dissoziation der genetischen Determinanten für den Blutdruck und die plasmatische ACE-Aktivität. Dies sollte in weiterführenden Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit durch die kontrollierte Zucht eines kongenen Stammes aus den bisher gut untersuchten SHRSP- und WKY-Parentalstämmen eruiert werden. Die Zucht des neuen kongenen Stammes SHRSP.WKY-*Ace*<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> gelang durch Paarung normotensiver Wistar-Kyoto- (WKY)- (Donorstamm) mit hypertensiven SHRSP-Ratten (Akzeptorstamm). Auf diesem Weg wird der *Ace*-Locus auf Chromosom 10 von den normotensiven WKY-Tieren erfolgreich auf den hypertensiven SHRSP-Hintergrund übertragen. Somit unterscheidet sich der kongene Stamm vom hypertensiven Parentalstamm SHRSP lediglich durch das Vorhandensein der *Ace*-kodierenden Region auf Chromosom 10.

Die Züchtung erfolgte gemäß Zuchtvorschriften und Zuchtprotokollen für kongene Stämme. Die Integrität der Übertragung wurde durch ein Genomscreening bestätigt. Die Reinheit konnte durch Verwendung verschiedener polymorpher Marker nachgewiesen werden. Der ursprünglich übertragene Abschnitt im Rahmen einer Vorarbeit betrug 27,3 cM (Junge, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde durch weitere Verkleinerung durch mehrfache Rückkreuzung und Geschwisterverpaarungen das *Ace*-Fragment bis auf 10 cM von D10Rat12 (76,13 cM) bis D10Rat142 (66,5 cM) erfolgreich verkürzt und damit der neue kongene Stamm SHRSP.WKY-*Ace*<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> etabliert.

Dies erfolgte vor dem Hintergrund der Isolierung des *Ace*-Gens, um weitere mögliche Wechselwirkungen mit anderen Genen oder anderen chromosomalen Regionen, die den Blutdruck beeinflussen könnten, zu minimieren. Das *Ace*-Gen liegt bei 68,71 cM und damit innerhalb des übertragenen Abschnitts. Die Etablierung und Genotypisierung des kongenen Stammes erschien sinnvoll, um durch die Verkleinerung des *Ace*-Locus verschiedene Wechselwirkungen und Einflüsse anderer Gene auszuschließen.

## 5.2 Blutdruck

Die radiotelemetrische Bestimmung des Blutdrucks ergab vergleichbare Werte für den kongenen Stamm SHRSP.WKY- $Ace_{(D10Rat142-D10Rat12)}$  im Vergleich zum normotensiven Referenz- und hypertensiven SHRSP-Stamm. Nach Literaturangaben pendelt sich der Blutdruck bei hypertensiven Ratten wie SHR und SHRSP ab einem Alter von etwa 12 Wochen auf ein konstantes Niveau ein. Die Tiere zeigen nur eine unwesentliche Zunahme des Blutdrucks bis zur 16. Woche. Für WKY-Ratten normalisiert sich der Blutdruck ab etwa 8 Wochen mit ebenfalls nur unwesentlichen Steigerungen mit fortschreitendem Alter. Zahlreiche Studien (Chiba et al., 2012; Kochi et al., 2013) vernachlässigen den diastolischen Blutdruck und beschränken sich auf den systolischen Wert. Für zehn Wochen alte Tiere findet sich ein durchschnittlicher Blutdruck von  $122 \pm 7$  bzw.  $127 \pm 13$  für WKY,  $165 \pm 7$  für SHR und  $190 \pm 9$  bzw.  $188 \pm 13$  mmHg für SHRSP (Chiba et al., 2012; Kochi et al., 2013). Der systolische Blutdruck ist ebenfalls altersabhängig. Der Vergleich der Ergebnisse aus der vorliegenden Dissertation mit denen von Chiba et al. zeigten, dass bei der WKY-Linie spätestens nach zehn Wochen ein ausgereiftes und nahezu identisches Blutdruck-Niveau erreicht wird, während der systolische Blutdruck der SHRSP-Linie auch nach einem Alter von zehn Wochen weiter steigt (Chiba et al., 2012). Die kongenen Tiere haben ähnliche Blutdrücke wie der hypertensive SHRSP-Parentalstamm. Schlussfolgernd ist zu vermuten, dass für den Blutdruck und die damit zusammenhängenden Organveränderungen der hypertensive Hintergrund ausschlaggebend ist und nicht der übertragene *Ace*-Locus. Eine Einschränkung in der vorliegenden Dissertation stellt die fehlende Salzbelastung unter der radiotelemetrischen Blutdruckmessung dar. Wegen der Neigung zu teilweise letalen Schlaganfällen im Fall der hypertensiven Stämme SHRSP und SHRSP.WKY- $Ace_{(D10Rat142-D10Rat12)}$  bei Salzbelastung (Kreutz et al., 1995c) wurde auf diese Intervention in dieser Arbeit verzichtet. Daher kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass das in dem kongenen Stamm übertragene Fragment einen Blutdruck-relevanten QTL enthält,

der den salzabhängigen Blutdruck in der SHRSP-Linie beeinflusst. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang der Einfluss einer verhältnismäßig hohen ACE-Expression auf Organschädigungen im SHRSP-Stamm als Folge einer Salzbelastung (Stier et al., 1989).

### **5.3 Plasmatische ACE-Aktivität**

In einer früheren Arbeit wurde auf der Grundlage von F<sub>2</sub>-Populationen, die aus der Kreuzung von WKY-0<sub>HD</sub> und SHRSP<sub>HD</sub> hervorging, abgeleitet, dass 89 Prozent der erfassbaren ACE-Aktivität vom *Ace*-Locus beeinflusst werden (Kreutz et al., 1995a). Dagegen weist der direkte Vergleich der Parentalstämme WKY und SHRSP im Rahmen der vorliegenden Dissertation, bei der das genetische Muster wesentlich detaillierter erfasst werden konnte, auf einen vollständigen Einfluss des *Ace*-Locus hin. In dieser Hinsicht kann die Existenz weiterer genetischer Einflüsse (d. h. konkrete, potentielle Allel-Variation auf QTL außerhalb des *Ace*-Locus) auf die Expression und Regulierung von ACE nicht gestützt werden (Kammerer et al., 2004). Dieser Sachverhalt stände in Einklang mit Ergebnissen, die auf der Grundlage eines anderen kongenen Rattenmodells, das auf der Kreuzung zweier normotensiver Parentalstämme mit einander abweichenden allelischen ACE-Expressionen basiert, abgeleitet wurden (Pueyo et al., 2004). Darüber hinaus läge ein Widerspruch zu humanen Studien vor, in denen Hinweise auf den Einfluss eines zweiten QTL (auf Chromosom 4) auf die ACE-Expression beobachtet werden konnten (Kammerer et al., 2004).

Die plasmatische ACE-Aktivität fiel im normotensiven WKY-Stamm verglichen mit dem hypertensiven SHRSP-Stamm ( $217,7 \pm 11,7$  U/l vs.  $82,2 \pm 6,3$  U/l,  $p < 0,05$ ) mehr als doppelt so hoch aus, während der kongene SHRSP.WKY-*Ace*<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Stamm ähnliche Werte wie die normotensiven Ratten aufwies ( $195,2 \pm 23,0$  U/l). Dies ist ein Beleg für den erfolgreichen Transfer des WKY-*Ace*-Locus in das Genom des SHRSP-Stammes und damit für die Etablierung des neuen kongenen Stammes. Als Grund für die niedrigere plasmatische ACE-Aktivität im hypertensiven SHRSP-Parentalstamm im Vergleich zum normotensiven WKY-Parentalstamm käme eine Herunterregulierung bei erhöhtem Blutdruck in Frage. In diesem Falle müssten die kongenen Tiere eine vergleichbare plasmatische ACE-Aktivität wie die des SHRSP-Stammes aufweisen, was jedoch nicht beobachtet wurde. Stattdessen ergeben sich zwei vom Phänotyp hypertensive Stämme mit unterschiedlichen plasmatischen ACE-Aktivitätslevel. Das

würde belegen, dass die plasmatische ACE-Aktivität zwar mit dem *Ace*-Genotyp korreliert, jedoch keine Verbindung zum Blutdruck aufweist. Eine sekundäre Beeinflussung der plasmatischen ACE-Aktivität durch den Blutdruck kann damit ausgeschlossen werden. Der Sachverhalt wurde auf der Basis eines Mausmodells bestätigt (Krege et al., 1997). In dieser Studie wurde eine Gentitation an transgenen Mäusen mit jeweils einer, zwei oder drei Kopien des *Ace*-Gens durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die ACE-Aktivität im Serum mit jeder weiteren Kopie linear anstieg, während der Blutdruck unverändert blieb. Die Autoren gaben eine homöostatische Kompensation innerhalb des RAS als mögliche Ursache für den unveränderten Blutdruck an. Derartige Mechanismen zur Beibehaltung eines normotensiven Blutdrucks wurden auch in Zusammenhang mit anderen Genexperimenten (*gene targeting*, Mausmodell) als Ursache bestätigt (Cole et al., 2003; Bernstein, 2006).

#### **5.4 Körper- und Organgewichte**

In der vorliegenden Arbeit weisen die hypertensiven Stämme ein niedrigeres Körpergewicht auf als der normotensive Donorstamm. Der Unterschied zwischen den Parentalstämmen WKY und SHRSP war signifikant. Literaturangaben sind wegen des abweichenden Alters für einen Vergleich nur bedingt geeignet (Stier et al., 1989). Werden nur aktuellere Beiträge berücksichtigt, wird in qualitativer Hinsicht der Trend, wonach Tiere des normotensiven WKY-Stammes signifikant bis zu 30 Prozent schwerer werden als Tiere des SHRSP-Stammes, bestätigt (Akasaki et al., 2006: WKY, SHRSP, Alter: 32 Wochen; Chiba et al., 2012: WKY, SHR, SHRSP, 4 und 10 Wochen; Inomata et al., 2005: WKY, SHR, SHRSP, 13 Wochen, männlich/weiblich; Kochi et al., 2013: WKY, SHRSP, 10 Wochen; Sekiguchi et al., 2002: Wistar, WKY, SHRSP, 16-18 Wochen; Tanase et al., 1982a: alle gängigen Rattenstämme im Alter von 10 Wochen). Auch in Beiträgen, bei denen jüngere (Inomata et al., 2005; Chiba et al., 2012; Kochi et al., 2013) und ältere Ratten (Akasaki et al., 2006) verwendet wurden, sind die WKY-Ratten signifikant schwerer als die SHRSP-Ratten. Bei Sekiguchi et al. wiegen WKY-Tiere im Alter von 16 Wochen durchschnittlich 368 g, deutlich mehr im Vergleich zu den eigenen Ergebnissen (durchschnittliches Gewicht:  $300 \pm 7$ g) (Sekiguchi et al., 2002). Die Körpergewichte der WKY-Tiere lagen um 14,7% höher im Vergleich zu SHRSP mit durchschnittlich  $256 \pm 5$  g, während der kongene Stamm SHRSP.WKY-*Ace*<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> einen zwischen den beiden Parentalstämmen liegenden Mittelwert von  $278 \pm 14$  g einnahm, und damit um 7,3 % leichter als WKY war.

Somit zeigte der WKY-Stamm einen signifikanten Unterschied zum SHRSP-Stamm ( $p < 0,05$ ) aber nicht zum kongenen Stamm. Das Gewicht der SHRSP-Tiere in der Arbeit von Sekiguchi et al. stimmt mit durchschnittlich 254 g mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Akasaki et al. geben für 32 Wochen alte Individuen durchschnittliche Körpergewichte von 451 g für WKY bzw. 336 g für SHRSP an (Akasaki et al., 2006).

Für das Herzgewicht stehen wenige für einen Vergleich geeignete Studien zur Verfügung, da Tiere in unterschiedlichen Altersklassen untersucht wurden. Das Herzgewicht scheint bei der Ratte unabhängig vom Stamm ab einem Alter von etwa 16 Wochen ausgereift zu sein, wobei der Anteil des linken Ventrikels im Vergleich zum rechten unabhängig vom Stamm  $>80\%$  des Gesamtherzgewichts erreicht. Die Werte für die SHRSP-Tiere übersteigen diejenigen für die WKY-Tiere, was durch Literaturangaben bestätigt werden kann (Tanase et al., 1982b). Bei hypertensiven Stämmen steigt das Herzgewicht im Verhältnis zum Blutdruck, bei normotensiven Stämmen hingegen nicht (Tanase et al., 1982a). Der genetische Einfluss für dieses Phänomen wurde von den Autoren auf 65 - 75 % geschätzt. Die Generationen, die aus der Paarung verschiedener Rattenstämme hervorgingen, waren von hoher Variabilität in Bezug auf das Herzgewicht, was zu 45 - 65 % genetisch bedingt ist. Aus diesem Grund wurde auf eine Erbllichkeit des Herzgewichts bei der Ratte geschlossen (Tanase et al., 1982a). Von Interesse sind die Angaben bei Inomata et al., die eine Anhebung des relativen Herzgewichts für 13 Wochen alte SHRSP-Ratten um 64 % verglichen mit WKY-Tieren beobachten konnten (Inomata et al., 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen für das relative Herzgewicht einen höheren Wert von 44,6 %. Das Körpergewicht und das relative Herzgewicht sind auch hier ein phänotypisches Schlüsselkriterium bei der Bewertung von  $F_2$ -Populationen vom Typ WKY x SHRSP.

Das Verhältnis des linksventrikulären Herzgewichts zum Körpergewicht ist ein Indikator für die Myokardiale Hypertrophie. Hypertonie ist die wichtigste Ursache für linksventrikuläre Hypertrophie (LVH), wenngleich der Zusammenhang zwischen dem arteriellen Blutdruck und der Schwere der Hypertrophie eher gering ist. Hypertonie stellt durch eine hämodynamische Belastung einen bedeutenden Faktor für die Entstehung einer kardiovaskulären Hypertrophie dar. Allerdings ist lediglich ein kleiner Teil der interindividuellen Variabilität der LVH durch einen erhöhten Blutdruck erklärbar. Auch in

dieser Arbeit wurde das linksventrikuläre Herzgewicht bestimmt und in Relation zum Körpergewicht ermittelt. Das relative linksventrikuläre Herzgewicht des kongenen SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>-Stammes und des SHRSP-Stammes zeigten daher um 43,4 % bzw. 42,0 % signifikant höhere Werte ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zum WKY-Stamm. Dieses Ergebnis deutet auf einen Einfluss des hypertensiven Hintergrunds auf die beobachteten kardialen Veränderungen hin (SHRSP und kongen im Vergleich zu WKY). Durch Induktion der Enzymkaskade besitzt Ang II eine inotrope Wirkung und löst somit eine Zellproliferation hinsichtlich einer Hypertrophie der Myozyten aus. Da das kardiale RAS eine Homöostase zwischen Induktion und Inhibition von Zellwachstum und Proliferation aufrechterhält, führt die erhöhte ACE-Aktivität im kongenen Stamm zu keiner weiteren Zunahme der linksventrikulären Hypertrophie. Da in vitro-Studien an primären Zellkulturen eine eingeschränkte Extrapolation der Ergebnisse zur phänotypischen Regulierung auf reale Organismen gestatten, sind in vivo-Untersuchungen an Tiermodellen zuverlässiger bei der Beurteilung von Blutdruck-beeinflussenden Komponenten (Tanase et al., 1982b; Harrap et al., 2002; Feron et al., 1996). In diesem Zusammenhang wurden QTL-Regionen identifiziert, die das linksventrikuläre Herzgewicht in Abhängigkeit vom Blutdruck beeinflussen (Grabowski et al., 2013; Innes et al., 1998).

## 5.5 ACE-Genexpression

Die Untersuchung der ACE-mRNA-Expression erfolgte auf lokaler Ebene zur Ermittlung des Expressionsverhaltens in den verschiedenen Blutdruck-relevanten Organen im hypertensiven kongenen Stamm. Die relative ACE-mRNA-Expression der kongenen Tiere auf pulmonaler, renaler und kardialer Ebene zeigte ein sehr ähnliches Expressionsmuster in jedem der drei Gewebearten und ist vergleichbar mit dem bei den WKY-Tieren. Die höhere ACE-Aktivität im Falle des WKY- und des neuen kongenen Stammes war signifikant höher im Vergleich zum SHRSP-Stamm ( $p < 0,05$ ). Das bestätigt die genetische Determinierung der ACE-mRNA-Expression des *Ace*-Locus. Auch andere tierexperimentelle Studien zeigten, dass die ACE-mRNA-Expression auf lokaler Ebene demselben genetischen Einfluss wie die plasmatische ACE-Aktivität unterliegt. Costerousse et al. untersuchten die ACE-mRNA-Expression und die ACE-Aktivität in der Lunge, im Herzen, in der Niere und im Duodenum (Costerousse et al., 1999). Analog zu den Ergebnissen dieser Dissertation wurden auch dort signifikant höhere ACE-mRNA-Expressionen und ACE-Aktivitäten bei WKY<sub>HD</sub> im Vergleich zu

SHRSP<sub>HD</sub> festgestellt (Costerousse et al., 1999). Die kongenen Tiere in den vorliegenden Ergebnissen verhielten sich bezüglich ACE-mRNA-Expression als auch ACE-Aktivität in allen untersuchten Geweben wie die WKY-Parentaltiere und hinsichtlich der Hypertonie wie die SHRSP-Parentaltiere. Durch die ermittelten gleichen Blutdruckwerte von SHRSP und kongenen Tieren lässt sich feststellen, dass trotz zweifach erhöhter ACE-Genexpression kein Einfluss auf die Entwicklung einer spontanen Hypertonie erkennbar ist. Diese Feststellung bestätigt die bereits nachgewiesene blutdruckunabhängige genetische Determinierung der ACE-Aktivität (Kreutz et al., 1995a). Die signifikant höhere plasmatische ACE-Aktivität bei WKY-Tieren im Vergleich zu SHRSP bestätigen frühere Ergebnisse von Kreutz und Mitarbeitern (Fernández-Alfonso et al., 1994). Allerdings weist die mittlere Positionierung des kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> aus der vorliegenden Arbeit auf einen regulierenden Effekt des Ace-Locus auf die ACE-Aktivität in allen vier untersuchten Geweben hin. Nach Fernández-Alfonso et al. spiegelt das Ausmaß der ACE-Aktivität deren Wichtigkeit im jeweiligen Gewebe wider; die Autoren weisen explizit auf die Wichtigkeit von ACE in größeren Gefäßen hin. Die Analyse des neuen kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>, der durch Transfer des WYK-Ace-Locus in den hypertensiven SHRSP-Stamm erfolgreich etabliert wurde, belegt eine analoge hohe plasmatische ACE-Aktivität im Vergleich zum normotensiven WKY-Donorstamm. Die Expression von ACE-mRNA und die enzymatische ACE-Aktivität in der Lunge, in der Niere und im kardialen Gewebe zeigen ebenfalls kongruente Muster im direkten Vergleich von WKY und dem kongenen Stamm SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>.

## 5.6 Renin Angiotensin System

Neuere experimentelle Ergebnisse suggerieren, dass die Vorstellung, nach der Ang I ausschließlich durch enzymatische Einwirkung von Renin gebildet wird, aufgegeben werden muss (Agata et al., 2006 und Bérard et al., 2014). Am schrittweisen Abbau der Angiotensine sind verschiedene, sich überlagernde Mechanismen beteiligt. Dieser Vorgang ist daher äußerst komplex. So hängt das Schicksal von Ang I zwar von der ACE-Aktivität, jedoch auch von anderen Enzymen ab. Ang I kann zu Ang II oder Ang-(1-9) oder Ang-(1-7) abgebaut werden, wobei ACE bekanntermaßen die Bildung von Ang II bewirkt. Andere Enzyme hingegen wie Neprilysin (Endopeptidase) in der Niere, Cathepsin A im Herzen, ACE2, Chymase sowie Enzyme mit einer Wirksamkeit vergleichbar der Carboxypeptidase führen zu Ang-(1-9). Ang-(1-9) wiederum wird durch

ACE und die Endopeptidase Neprilysin zu Ang-(1-7) abgebaut, das wiederum durch ACE2 aus Ang II entsteht. Ang-(1-12) wird zu Ang II im Blutkreislauf transformiert, dagegen wird es in der Niere durch Neprilysin via Ang-(1-9) in Ang-(1-7) umgewandelt (Agata et al., 2006; Bérard et al., 2014). Wegen der komplexen und sich teilweise überlagernden Abbauvorgänge sind experimentelle Ergebnisse, die sich auf die Dokumentation von ACE und auf wenige Angiotensine (gewöhnlich Ang I und Ang II) beschränken, nur eingeschränkt aussagekräftig, da die Konzentration von Ang I und Ang II nicht ausschließlich von der ACE-Aktivität abhängt und umgekehrt ACE an der Spaltung anderer Angiotensine (Bérard et al., 2014 und Ocaranza et al., 2006) und an anderen Prozessen („Kinin-Kallikrein-Kaskade“, Sayed-Tabatabaei et al., 2006) beteiligt ist. Abweichungen in der Literatur werden methodisch begründet, da die Bestimmung von Ang II und anderer Angiotensine experimentell aufwändig ist (Ocaranza et al., 2006). Ocaranza et al. ermittelten, dass der ACE-Genpolymorphismus in der Ratte nicht nur mit der ACE-Aktivität und dem Ang II-Level, sondern auch mit Ang-(1-7) im Blutkreislauf assoziiert ist. Danach verursachen höhere ACE-Level, die auf den ACE-Genpolymorphismus zurückgehen, höhere Ang II- (und niedrigere Ang-(1-7)-) Level und umgekehrt. Allerdings wurde bis dahin kein Zusammenhang zwischen Polymorphismen und plasmatischen Ang II-Levels weder beim Menschen noch im Rattenmodell nachgewiesen. Eine höhere ACE-Genexpression geht aber mit einer erhöhten Ang II-Konzentration einher (Ocaranza et al., 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation stützen die Annahme ausgeprägter homöostatischer Effekte innerhalb des RAS. Die puffernde Wirkung und die Fähigkeit zur Regulierung der genetischen Variation und deren Folgen (Steuerung der ACE-Ausschüttung, Einstellung des Blutdrucks) und die multigenetischen Grundlagen der Hypertonie sind belegt (Smithies et al., 2000). Im Unterschied zu den angeführten Studien, die sich auf Mausmodelle stützen, zielt die vorliegende Arbeit auf natürliche genetische Variationen und auf die ACE-Expression im SHRSP-Modell. Darüber hinaus unterscheiden sich die hier angewandten Maßstäbe und experimentellen Rahmenbedingungen beträchtlich von denen bei Smithies et al., 2000; Cole et al., 2003 und Bernstein, 2006. Im Gegensatz zu den genannten Arbeiten, bei denen Mäuse als Versuchstiere eingesetzt wurden, erfolgten die vorliegenden Untersuchungen ausschließlich an Ratten. Die Ergebnisse sind daher nur bedingt miteinander vergleichbar, da durch potenzielle Spezies-Unterschiede zwischen Maus und Ratte

verschiedene physiologische Mechanismen aktiviert werden, die in ihrer kombinierten Wirkung und Dynamik das Gesamtbild verändern können.

## **5.7 Das Lokale RAS in der Niere und im linken Ventrikel**

Die Aufgabe der verschiedenen lokalen Renin-Angiotensin-Systeme (RAS) besteht vor allem in der Regulation und Kompensation der organspezifischen Blutdruckhomöostase. In der Niere wird im Falle eines niedrigen Arteriendrucks kurzfristig Renin freigesetzt und damit die plasmatische Renin-Aktivität stark erhöht. Durch Aktivierung der RAS-Kaskade kommt es zur Bildung von Ang II und Aldosteron und anschließender Blutdruckerhöhung (Klinke und Silbernagel, 2009). Eine vermehrte Bildung von Ang II wird mit Nierenschädigungen in Verbindung gebracht (Mervaala et al., 2000; Luft, 2002). Ang II hat neben den hämodynamischen und mikrohämodynamischen Effekten (z. B. Plasmafluss, Ischämie, Zentraler Venendruck) einen wichtigen zusätzlichen Einfluss auf nichthämodynamische Faktoren. Die Aktivierung nichthämodynamischer Faktoren wie inflammatorischer Zytokine und Chemotaktischer Faktoren führt demnach zur Nierenfibrose und Glomerulosklerose und letztendlich zu irreversiblen Nierenschädigungen (Weir et al., 1999). Aufgrund der ermittelten erhöhten plasmatischen Reninkonzentration im kongenen Stamm im Vergleich zum normotensiven Stamm und der damit ebenfalls zu erwartenden erhöhten Ang II-Konzentration, ist die Wahrscheinlichkeit für Nierenschäden durch die vom Ang II angestoßenen nichthämodynamischen Effekte bei den kongenen Tieren erhöht. Die ermittelte plasmatische Reninkonzentration im kongenen Stamm war zwar niedriger als im SHRSP-Stamm, jedoch nicht statistisch signifikant. In den Messungen sind die ACE-mRNA-Expression und die ACE-Aktivität in der Niere bei den kongenen Tieren signifikant höher als bei den SHRSP-Tieren. Analog zu den im kardialen Gewebe ermittelten Werten (s. u.) ist daher zu vermuten, dass auch hier die verstärkte ACE-mRNA-Expression und die ACE-Aktivität insofern kompensiert werden, dass es zu einem ähnlichen Ang II-Level in der Niere wie bei den SHRSP-Tieren kommt. Diese Kompensation auf lokaler Ebene könnte allerdings langfristig nicht aufrechterhalten werden. Somit kann vermutet werden, dass es mit höherem Alter der kongenen Tiere zu einem weiteren Anstieg der Ang II-Konzentration und somit zusätzlich zu der hämodynamischen Wirkung zu weiteren Endorganschäden kommen wird. Ähnliche Ergebnisse zeigten tierexperimentelle Untersuchungen, die die Aktivierung des lokalen RAS bei herzkranken Tieren nachwiesen (Schunkert et al., 1993).

In Übereinstimmung mit anderen Studien (Ichihara et al., 2006) fiel in der vorliegenden Dissertation die plasmatische Renin-Konzentration beim SHRSP-Stamm höher aus als bei den normotensiven WKY-Ratten, wohingegen sie im kongenen Stamm intermediäre Werte aufwies. Das kann als Hinweis auf eine kompensatorische Downregulation der renalen Renin-Ausschüttung gewertet werden. Da die Ausschüttung von Ang I und Ang II im Herzen an die Expression des Renins in der Niere gekoppelt ist (Danser et al., 1994; Katz et al., 1997), bot sich die Untersuchung der Angiotensin-Peptide im linken Ventrikel an, um daraus Rückschlüsse auf die Folgen dieser kompensierenden Effekte zu ziehen, wenngleich dieses Vorgehen zwangsläufig gewebeabhängig ist.

Das Herz ist für derartige Untersuchungen prädestiniert, da das Gewebe des linken Ventrikels am ehesten der systemischen Hypertonie ausgesetzt ist. Die herausragende Bedeutung des kardialen RAS besteht in der Aufrechterhaltung einer Homöostase innerhalb der verschiedenen kardialen Prozesse, z.B. der Zellproliferation. Das ACE kommt im kardialen Gewebe von Epikard, Endokard und Klappen und in den Gefäßen der Koronarien vor (Lu et al., 2015). Die hypertensiven Stämme SHRSP und SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> weisen neben vergleichbar hohen Blutdrücken auch ähnliche ANP-mRNA-Expressionen (Atriales natriuretisches Peptid) sowie eine identische Hypertrophie des linken Ventrikels auf. Gestützt durch die These, dass die Ang I-Ausschüttung im LV an die renale Renin-Expression gekoppelt ist, zeigten sich beim kongenen Stamm signifikant geringere Werte für Ang I im Vergleich zum SHRSP-Stamm. Für Renin waren ebenfalls geringere Werte für den kongenen Stamm im Vergleich zum SHRSP-Parentalstamm nachweisbar, wenngleich der beobachtete Trend nicht signifikant war. Trotz der niedrigeren Werte beim Ang I des kongenen Stammes im Vergleich zu SHRSP weist beim Ang II der kongene Stamm ähnliche Werte wie der SHRSP-Stamm auf. Dies kann mit der erhöhten ACE-mRNA-Expression des kongenen Stammes im LV im Vergleich zum SHRSP-Stamm begründet werden. Die erhöhte ACE-mRNA Expression führte im kongenen Stamm in Kombination mit niedrigem Ang I-Level zur vollständigen Kompensation und damit zu einem gleichwertigen Ang II-Niveau wie bei den SHRSP-Ratten. Das Verhältnis Ang II / Ang I ist bei den kongenen Tieren im linken Ventrikel am höchsten, so dass das Verhältnis als Maß für die ACE-Aktivität betrachtet werden kann. Dagegen fielen die Ang I- und Ang II-Niveaus im linken Ventrikel bei den WKY- und SHRSP-Tieren trotz der unterschiedlichen Renin-Konzentrationen bei beiden Stämmen ähnlich aus. Als mögliche Erklärungen für diese Diskrepanz können Unterschiede in der Reninaufnahme

und im Vorhandensein von Angiotensinogen und / oder Angiotensin I abbauenden Enzymen z. B. Chymase, Endopeptidase und ACE2 zwischen WKY und SHRSP in Betracht gezogen werden.

Unter der Annahme, dass die Renin-Expression im Herzen gering ist, erfolgt die Umwandlung von Angiotensinogen zu Ang I durch Renin aus dem zirkulierenden System und anschließender organspezifischer Bildung von Ang II durch lokales ACE (Katz et al., 1997). Die lokale Synthese von Ang II im Myokard-Gewebe könnte unter bestimmten pathophysiologischen Verhältnissen durch die Produktion von Renin und Angiotensinogen reguliert werden. Diese These baut auf der Annahme, dass die kardiale Ang II-Bildung teilweise ohne Rückkopplung auf die systemischen RAS-Komponenten erfolgt. Lokal bindet Ang II an seine beiden Rezeptoren AT<sub>1</sub> und AT<sub>2</sub> und moduliert somit verschiedene Prozesse. So initiiert Ang II über die Bindung an seinen AT<sub>1</sub>-Rezeptor in den Koronargefäßen vasokonstriktorische Effekte. Das Herz ist in der Lage, im Falle einer Schädigung oder im pathologischen Zustand kompensierende Mechanismen und Adaptionsprozesse, wie eine Myozytenhypertrophie einzuleiten, um die kardiale Funktion weiterhin zu gewährleisten (Enseleit et al., 2001). Dies führt auf Dauer dennoch zu irreversiblen Schäden bis hin zum Herzinfarkt und Herzversagen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass trotz der zweifach erhöhten ACE-Genexpression im kongenen Stamm SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> hauptsächlich kompensatorische Mechanismen innerhalb des RAS für den unveränderten Blutdruck verantwortlich sind. Es lassen sich allerdings alternative Puffersysteme im Rahmen des RAS und/oder andere blutdruckregulierende Systeme nicht sicher ausschließen. Da das RAS bislang nicht vollständig aufgeschlüsselt ist, sind unbekannte Feinmechanismen, die innerhalb des RAS wirken, möglicherweise ebenfalls beteiligt. Unabhängig von den bislang nicht aufgedeckten Mechanismen, die im kongenen Stamm SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> vorliegen, bestätigen die Ergebnisse dieser Dissertation, dass ein offensichtlich hypertensives Tier dennoch eine angeborene erhöhte ACE-Genexpression durchaus kompensieren kann.

Die Diskussion in der aktuellen Literatur suggeriert die Existenz bislang nicht identifizierter Einflüsse, Faktoren und dynamischer Mechanismen innerhalb des RAS. So wird erstens der Einfluss weiterer Enzyme wie z. B. ACE2 und Chymase neben ACE auf die Blutdruckregulierung vermutet. Zweitens sind mit hoher Wahrscheinlichkeit

bislang unbekannte physiologische Puffersysteme beteiligt. Möglich ist auch die Beteiligung anderer Puffersysteme außerhalb des RAS. Einen dritten Punkt stellen potenzielle Folgemechanismen dar, die als Antwort auf den Bluthochdruck und spezifische, grundlegende RAS-Mechanismen ausgelöst werden und die eine Wiedereinstellung (Re-Justierung) des Blutdrucks auf normotensive Werte bewirken könnten. Ein Beispiel sind Enzyme aus der Reihe der Nox-Familie, die als Folge einer Ang II-Typ-1-Rezeptoraktivierung verstärkt exprimiert werden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass durch funktionelle und strukturelle Veränderungen die arterielle Hypertonie langfristig zu Endorganschäden und weiter bis hin zur Manifestation von Folgeerkrankungen, insbesondere kardialer, renaler, zerebraler und vaskulärer Art führen kann. Durch die chronische Druckbelastung bei der arteriellen Hypertonie am Herzen kommt es zur vermehrten Bildung von Bindegewebe zwischen den Muskelfasern. Hierdurch können sich strukturelle Veränderungen wie z. B. Minderdurchblutung, erhöhte Herzfestigkeit bis hin zur linksventrikulären Funktionsstörung entwickeln, in deren Folge sich eine linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) manifestiert (Grabowski et al., 2015).

## 6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die essentielle arterielle Hypertonie stellt eine komplexe und multifaktorielle Erkrankung dar, welche dem Einfluss einer polygenen Veranlagung als auch diverser Umwelteinflüsse unterliegt. Die arterielle Hypertonie ist mit Folgeerkrankungen kardiovaskulärer, renaler und zerebrovaskulärer Art assoziiert und zeigt eine sehr hohe Prävalenz. Die Charakterisierung der beteiligten Gene ist ein wichtiger Schritt bei der Erforschung der pathogenen Prozesse. Bei der Suche nach Kandidatengenen spielt das *Angiotensin-Converting-Enzym*-(ACE)-Gen eine zentrale Rolle. Als ein wichtiges Schlüsselenzym des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) katalysiert ACE die hydrolytische Spaltung von Angiotensin I zu Angiotensin II, das über seine Rezeptoren auf die Vasokonstriktion der Blutgefäße einwirkt und somit die Regulierung des Blutdrucks beeinflusst. Die Verwendung von Tiermodellen ermöglicht es, durch die Kontrolle der Zucht- und Umweltbedingungen genetische und exogene Einflüsse gezielt zu selektieren, so dass komplexe phänotypische Merkmale einer vereinfachten Betrachtung unterliegen können. Insofern stellen bei der Erforschung des Blutdruckes hypertensive Tiermodelle eine Alternative zu Untersuchungen beim Menschen dar. Zur Identifizierung Hypertonie-relevanter Genorte wurden verschiedene Rattenmodelle etabliert, darunter das kongene Rattenmodell. Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation aus einem hypertensiven Rattenstamm (*stroke prone hypertensive rat*, SHRSP) als Akzeptor und einem normotensiven Rattenstamm (*Wistar Kyoto rat*, WKY) als Donor, der eine genetisch erhöhte ACE-Expression aufweist, ein neuer kongener Stamm SHRSP.WKY-Ace<sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub> etabliert. Dieser verfügt sowohl über die hypertensiven Eigenschaften als auch über die erhöhte ACE-Genexpression der beiden Parentalstämme. Zur Optimierung der phänotypischen Ergebnisse wurde der auf dem Rattenchromosom 10 liegende *Ace*-Locus durch mehrfache Rückkreuzung und Bruder-Schwester-Verpaarungen auf 10 cM verkürzt. Mithilfe des kongenen Rattenmodells wurde der Zusammenhang zwischen der erhöhten ACE-Genexpression und der erhöhten ACE-Aktivität im Plasma und in den pulmonalen, renalen und kardialen Geweben auf die Entwicklung der arteriellen Hypertonie untersucht sowie Organveränderungen betrachtet. Desweiteren erfolgte die Bestimmung der Ang I- und Ang II-Konzentrationen im kardialen Gewebe sowie der Reninkonzentration im Plasma. Auf der Grundlage der experimentellen Untersuchungen können folgende Ergebnisse formuliert werden: In der phänotypischen Analyse besitzt der kongene Stamm zum

einen eine zweifach höhere ACE-Aktivität im Plasma, im linken Ventrikel, in der Lunge und in der Niere sowie eine zweifach erhöhte ACE-mRNA-Expression in der Lunge, in der Niere und im linken Ventrikel vergleichbar mit dem WKY-Stamm. Andererseits zeigt der kongene Stamm die hypertensiven Eigenschaften des SHRSP-Stammes. Trotz der zweifach erhöhten ACE-Genexpression unterscheiden sich die Blutdruckwerte sowie die linksventrikulären Gewichte und die ANP-mRNA-Expression des kongenen Stammes nicht signifikant von den Werten des SHRSP-Parentalstammes. Die plasmatische Reninkonzentration fällt beim normotensiven WKY-Stamm am niedrigsten aus und ist beim hypertensiven SHRSP-Stamm nahezu verdoppelt. Der kongene Stamm nimmt hier eine mittlere Position ein. Die erhöhte ACE-mRNA-Expression im linken Ventrikel führt im kongenen Stamm in Kombination mit erstaunlich niedriger Ang I-Konzentration zu vollständiger Kompensation und damit nahezu gleichwertigen Ang II-Konzentrationen wie beim SHRSP-Parentalstamm. Die Ergebnisse, die im Zuge dieser Dissertation gewonnen wurden, suggerieren einen vollständigen Einfluss des *Ace*-Locus auf die erfassbare ACE-Aktivität. Da die Übertragung des ACE-Fragments keine weitere Steigerung des Bluthochdrucks im Vergleich zu SHRSP bewirkte, wird die Existenz puffernder Eigenschaften im Rahmen des RAS postuliert. Die Kompensationsmechanismen des RAS tragen dazu bei, dass trotz der verdoppelten ACE-Expression keine Erhöhung der spontanen Hypertonie bei den kongenen Tieren zu beobachten ist. Die homöostatische Kompensation des Blutdrucks könnte möglicherweise auf bislang unentdeckte Mechanismen des RAS zurückzuführen sein. Damit ergibt sich folgendes Gesamtbild: Es kommt im kongenen Stamm durch die Übertragung des *Ace*-Locus von WKY in den hypertensiven Hintergrund der SHRSP-Ratte zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der ACE-Genexpression in allen untersuchten Geweben im Vergleich zum WKY-Parentalstamm. Darüber hinaus ist trotz der Übertragung des *Ace*-Locus keine Veränderung des Bluthochdrucks im Vergleich zu SHRSP zu beobachten. Die Kompensationsmechanismen innerhalb des Renin-Angiotensin-Systems tragen dazu bei, dass es trotz einer durchschnittlich verdoppelten ACE-Genexpression zu keiner weiteren Erhöhung der spontanen Hypertonie bei den kongenen Tieren kommt. Die genauen molekulargenetischen Mechanismen, die den homöostatischen Effekten zugrunde liegen und auf die Regulierung des Blutdrucks ausstrahlen, bedürfen weiterer Aufklärung. Da die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt haben, dass das Renin-Angiotensin-System über Feinmechanismen der Kompensation verfügt, ist die Erforschung weiterer Details in dieser Hinsicht von Bedeutung.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

**Abraham MR**, Olson LJ, Joyner MJ, Tumer ST, Beck KC, Johanson BD: Angiotensin-converting enzyme genotype modulates pulmonary function and exercise capacity in treated patients with congestive stable heart failure. *Circulation* **2002**, 14:1794-1799.

**Abadir PM**, Foster DB, Crow M, Cooke CA, Rucker JJ, Jain A, Smith BJ, Burks TN, Cohn RD, Fedarko NS, Carey RM, O'Rourke B, Walston JD: Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, 108:14849-14854.

**Agata J**, Ura N, Yoshida H, Shinshi Y, Sasaki H, Hyakkoku M, Taniguchi S, Shimamoto K: Olmesartan is an Angiotensin II Receptor Blocker with an Inhibitory Effect on Angiotensin-Converting Enzyme. *Hypertens. Res.* **2006**, 29:865-874.

**Agerholm-Larsen B**, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A: ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2000**, 20:484-492.

**Akasaki T**, Ohya Y, Kuroda J, Eto K, Abe I, Sumimoto H, Iida M: Increased Expression of gp91phox Homologues of NAD(P)H Oxidase in the Aortic Media during Chronic Hypertension: Involvement of the Renin-Angiotensin System. *Hypertens. Res.* **2006**, 29:813-820.

**Alreja G**, Joseph J: Renin and cardiovascular disease - Worn-out path, or new direction. *World J. Cardiol.* **2011**, 3:72-83.

**Auterhoff H**, Knabe J, Höltje HD: Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* **1999**, 14. Auflage.

**Baima J**, Nicolaou M, Schwartz F, DeStefano AL, Manolis A, Gavras I, Laffer C, Elijovich F, Farrer L, Baldwin CT, Gavras H: Evidence for linkage between essential hypertension and a putative locus on human chromosome 17. *Hypertension* **1999**, 34:4-7.

**Barley J**, Blackwood A, Miller M, Markandu ND, Carter ND, Jeffery S, Cappuccio FP, MacGregor GA, Sagnella GA: Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism, blood pressure and the renin-angiotensin system in Caucasian and Afro-Caribbean peoples. *J. Hum. Hypertens.* **1996**, 10:31-35.

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

**Bérard E**, Niel O, Rubio A: Is the renin-angiotensin system actually hypertensive? *Pediatr. Nephrol.* **2014**, 29:951-960.

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

**Bernstein KE**: Views of the renin-angiotensin system: brilling, mimsy, and slithy tove. *Hypertension* **2006**, 47:509-514.

**Binder A**: A review of the genetics of essential hypertension. *Curr. Opin. Cardiol.* **2007**, 22:176-184.

**Burson JM**, Aguilera G, Gross KW, Sigmund CD: Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am. J. Physiol.* **1994**, 267:E260-E267.

**Cambien F**, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S: Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* **1992**, 359:641-644.

**Cat AND**, Touyz RM: A new look at the renin-angiotensin system – Focusing on the vascular system. *Peptides* **2011**, 32:2141-2150.

**Caulfield M**, Munroe P, Pembroke J, Samani N, Dominiczak A, Brown M, Benjamin N, Webster J, Ratcliffe P, O'Shea S, Papp J, Taylor E, Dobson R, Knight J, Newhouse S, Hooper J, Lee W, Brain N, Clayton D, Lathrop GM, Farrall M, Connell J; MRC British Genetics of Hypertension Study: Genome-wide mapping of human loci for essential hypertension. *Lancet.* **2003**, 361:2118-2123.

**Chiba T**, Itoh T, Tabuchi M, Nakazawa T, Satou T: Interleukin-1 $\beta$  accelerates the onset of stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Mediat. Inflamm.* **2012**, 2012:701976.

**Chomczynski P**: A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **1993**, 15:532-534, 536-537.

**Cole JM**, Khokhlova N, Sutliff RL, Adams JW, Disher KM, Zhao H, Capecchi MR, Corvol P, Bernstein KE: Mice lacking endothelial ACE: normal blood pressure with elevated angiotensin II. *Hypertension* **2003**, 41:313-321.

**Collins R**, MacMahon S: Blood pressure, antihypertensive drug treatment and the risks of stroke and of coronary heart disease. *Br. Med. Bull.* **1994**, 50:272-298.

**Costerousse O**, Allegrini J, Lopez M and henc-Gelas F: Angiotensin I-Converting Enzyme in Human Circulating Mononuclear Cells: Genetic Polymorphism of Expression in T-Lymphocytes. *Biochem. J.* **1993**, 290:33-40.

**Costerousse O**, Lindpaintner K, Paul M, Ganten D, Kreutz R: Interstrain differences in angiotensin I-converting enzyme mRNA and activity levels. Comparison between stroke-prone spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats. *Clin. Exp. Hypertens.* **1999**, 21:377-393.

**Cowley AW Jr**: The genetic dissection of essential hypertension. *Nature Reviews Genetics* **2006**, 7:829-840.

**Danser AH**, van Kats JP, Admiraal PJ, Derkx FH, Lamers JM, Verdouw PD, Saxena PR, Schalekamp MA: Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* **1994**, 24:37-48.

**Danser AH**, Schalekamp MADH, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GAJ, Schunkert H: Angiotensin-Converting Enzyme in the Human Heart: Effect of the Deletion/Insertion Polymorphism. *Circulation* **1995**, 92:1387-1388.

**Danser AH**, Batenburg WW, van den Meiracker AH, Danilov SM: ACE phenotyping as a first step toward personalized medicine for ACE inhibitors. Why does ACE genotyping not predict the therapeutic efficacy of ACE inhibition? *Pharmacol. Ther.* **2007**, 113:607-618.

**de Gasparo M**, Levens NR: Pharmacology of angiotensin II receptors in the kidney. *Kidney Int.* **1994**, 6:1486-1491.

**de Gasparo M**, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T: The angiotensin II receptors. *International union of pharmacology* **2000**, 52:415-472.

**Delles C**, McBride MW, Graham D, Padmanabhan S, Dominiczak AF: Genetics of hypertension: From experimental animals to humans. *Biochimica et Biophysica Acta* **2010**, 1802:1299-1308.

**Delles C**, Padmanabhan S: Genetics and hypertension: is it time to change my practice? *Can J Cardiol.* **2012**, 28:296-304.

**Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL®**: Leitlinien für das Management der arteriellen Hypertonie. *Börm Bruckmeier Verlag GmbH* **2014**.

**Doggrella SA**, Brown L: Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research* **1998**, 39:89-105.

**Dorer FE**, Kahn JR, Lentz KE, Levine M, Skeggs LT: Hydrolysis of bradykinin by angiotensin-converting enzyme. *Circ. Res.* **1974**, 24:824-827.

**Dornas WC**, Silva ME: Animal models for the study of arterial hypertension. *J. Biosci.* **2011**, 36:731-737.

**Ehret GB**, Caulfield MJ: Genes for blood pressure: an opportunity to understand hypertension. *Eur. Heart J.* **2013**, 34:951-961.

**Enseleit F**, Hürlimann D, Lüscher TF: Vascular protective effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and their relation to clinical events. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2001**, 1:21-30.

**Feinleib M**, Garrison RJ, Fabsitz R, Christian JC, Hrubec Z, Borhani NO, Kannel WB, Rosenman R, Schwartz JT, Wagner JO: The NHLBI twin study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary of results. *American Journal of Epidemiology* **1977**, 106:284-285.

**Fernández-Alfonso MS**, Kreutz R, Zeh K, Liu Y, Ganten D, Paul M: Differential regulation of vascular angiotensin I-converting enzyme in hypertension. *Hypertension* **1994**, 24:280-286.

**Feron O**, Salomone S, Godfraind T: Action of the calcium channel blocker lacidipine on cardiac hypertrophy and endothelin-1 gene expression in stroke-prone hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology* **1996**, 118:659-664.

**Fink L**, Stahl U, Ermert L, Kummer W, Seeger W, Bohle RM: Rat porphobilinogen deaminase gene: a pseudogene-free internal standard for laser-assisted cell picking. *Biotechniques*. **1999**, 26:510-516.

**Fleming I**: Signaling by the Angiotensin-Converting Enzyme. *Circulation Research*. **2006**, 98:887-896.

**Ganten, Detlev und Eberhard Ritz**: Lehrbuch der Hypertonie, Pathophysiologie, Klinik, Therapie, Epidemiologie. *Verlag Schattauer GmbH*, **1998**.

**Giner V**, Poch E, Bragulat E, Oriola J, González D, Coca A, De La Sierra A: Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* **2000**, 35:512-517.

**Glazier AM**, Nadeau JH, Aitman TJ: Finding Genes That Underlie Complex Traits. *Science* **2002**, 29:2345-2349.

**Göbel R**: Pharmazeutische Beratung von Patienten mit Hypertonie. *Pharmazie in unserer Zeit* **2012**, 41:332-342.

**Grabowski K**, Koplín G, Aliu B, Schulte L, Schulz A, Kreutz R: Mapping and confirmation of a major left ventricular mass QTL on rat chromosome 1 by contrasting SHRSP and F344 rats. *Physiol. Genomics*. **2013**, 45:827-833.

**Grabowski K**, Riemenschneider M, Schulte L, Witten A, Schulz A, Stoll M, Kreutz R: Fetal-adult cardiac transcriptome analysis in rats with contrasting left ventricular mass reveals new candidates for cardiac hypertrophy. *PLoS. One*. **2015**, 10:e0116807.

**Harrap SB**: Genetic analysis of blood pressure and sodium balance in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **1986**, 8:572-582.

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

**He Q**, Fan C, Yu M, Wallar G, Zhang ZF, Wang L, Zhang X, Hu R: Associations of ACE Gene Insertion/Deletion Polymorphism, ACE Activity, and ACE mRNA Expression with Hypertension in a Chinese Population. *Plos. One*. **2013**, 8:e75870.

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

**Hiraga H**, Oshima T, Watanabe M, Ishida M, Ishida T, Shingu T, Kambe M, Matsuura H, Kajiyama G: Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* **1996**, 27:569-572.

**Holmquist B**, Bünning P, Riordan JF: A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Anal Biochem.* **1979**, 95:540-8.

**Hübner N**, Kreutz R, Takahashi S, Ganten D, Lindpaintner K: Unlike Human Hypertension, Blood Pressure in a Hereditary Hypertensive Rat Strain Shows No Linkage to the Angiotensinogen Locus. *Hypertension* **1994**, 23:797-801.

**Ichihara A**, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Suzuki F, Nakagawa T, Nishiyama A, Inagami T, Hayashi M: Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. *Hypertension* **2006**, 47:894-900.

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

**Inomata H**, Watanabe T, Iizuka Y, Liang YQ, Mashimo T, Nabika T, Ikeda K, Yanai K, Gotoda T, Yamori Y, Isobe M, Kato N: Identification of quantitative trait loci for cardiac hypertrophy in two different strains of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertens. Res.* **2005**, 28:273-281.

**Iwai N**, Inagami T: Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS. Lett.* **1992**, 298:257-260.

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

**Julier C**, Delépine M, Keavney B, Terwilliger J, Davis S, Weeks DE, Bui T, Jeunemaître X, Velho G, Froguel P, Ratcliffe P, Corvol P, Soubrier F, Lathrop GM: Genetic

susceptibility for human familial essential hypertension in a region of homology with blood pressure linkage on rat chromosome 10. *Hum. Mol. Genet.* **1997**, 6:2077-2085.

**Junge C**: Etablierung, Phänotypisierung und Genotypisierung des kongenen Rattenstammes SHRSP.WKY-Ace. Dissertation Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin, **2009**.

**Kamble A**, Mohod K, Kumar S: Are Genetic factors really predisposing for essential hypertension. *Int. J. Biol. Med. Res.* **2011**, 2:1198-1203.

**Kamilic J**, Hamming I, Kreutz R, Bolbrinker J, Siems WE, Nassar I, Sluimer JC, Walther T, Navis GJ, van Goor H: Renal ACE2 expression and activity is unaltered during established hypertension in adult SHRSP and TGR(mREN2)<sup>27</sup>. *Hypertens. Res.* **2010**, 33:123-128.

**Kammerer CM**, Gouin N, Samollow PB, VandeBerg JF, Hixson JE, Cole SA, MacCluer JW, Atwood LD: Two quantitative trait loci affect ACE activities in Mexican-Americans. *Hypertension* **2004**, 43:466-470.

**Kario K**, Kanai N, Saito K, Nago N, Matsuo T, Shimada K: Ischemic Stroke and the Gene for Angiotensin-Converting Enzyme in Japanese Hypertensives. *Circulation.* **1996**, 93:1630-1633.

**Katz SA**, Opsahl JA, Lunzer MM, Forbis LM, Hirsch AT: Effect of bilateral nephrectomy on active renin, angiotensinogen, and renin glycoforms in plasma and myocardium. *Hypertension* **1997**, 30:259-266.

**Kearny PM**, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J: Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The Lancet* **2005**, 365, 217-223.

**Klinke und Silbernagel**: Lehrbuch der Physiologie, *Thieme Verlag* **2009**, 6. Auflage.

**Kochi T**, Shimizu M, Ohno T, Baba A, Sumi T, Kubota M, Shirakami Y, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H: Enhanced Development of Azoxymethane-Induced Colonic Preneoplastic Lesions in Hypertensive Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14:14700-14711.

**Kokkonen JO**, Lindstedt KA, Kuoppala A, Kovanen PT: Kinin-degrading pathways in the human heart. *Trends. Cardiovasc. Med.* **2000**, 10:42-45.

**Krege JH**, Kim HS, Moyer JS, Jennette JC, Peng Li, Hiller SK, Smithies O: Angiotensin-Converting Enzyme Gene Mutations, Blood Pressures, and Cardiovascular Homeostasis. *Hypertension* **1997**, 29:150-157.

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

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

**Kreutz R**, Fernandez-Alfonso MS, Liu Y, Ganten D, Paul M: Induction of cardiac angiotensin I-converting enzyme with dietary NaCl-loading in genetically hypertensive and normotensive rats. *J. Mol. Med. (Berl)*. **1995c**, 73:243-248.

**Kreutz R**: Therapy of hypertension. *Clin. Res. Cardiol*. **2006**, 95:VI34-40.

**Lawes CM**, Vander Hoorn S, Rodgers A: Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. International Society of Hypertension. *Lancet*. **2008**, 10.1016/S0140-6736(08)60655-8.

**Levy D**, DeStefano AL, Larson MG, O'Donnell CJ, Lifton RP, Gavras H, Cupples LA, Myers RH: Evidence for a gene influencing blood pressure on chromosome 17. Genome scan linkage results for longitudinal blood pressure phenotypes in subjects from the framingham heart study. *Hypertension* **2000**, 36:477-483.

**Levy BI**: How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am. J. Hypertens*. **2005**, 18:134S-141S.

**Lindpaintner K**, Pfeffer MA: Molecular genetics crying wolf? The case of the angiotensin-converting enzyme gene and cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol*. **1995**, 25:1632-3.

**Lu L**, Guo L, Xie TT, Xin HL: Angiotensin converting enzyme is involved in the cardiac hypertrophy induced by sinoaortic denervation in rats. *Cardiovasc. Pathol*. **2015**, 24:41-8.

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

**Manaka K,** Makita N, Iiri T: Angiotensin receptor 1b. *UCSD. Molecule. Pages.* **2011.**

**Markus HS,** Barley J, Lunt R, Bland J M, Jeffery S, Carter ND and Brown MM: Angiotensin-Converting Enzyme Gene Deletion Polymorphism: A New Risk Factor for Lacunar Stroke but Not Carotid Atheroma. *Stroke* **1995**, 26:1329-1333.

**Mein CA,** Caulfield MJ, Dobson RJ, Munroe PB: Genetics of essential hypertension. *Human Molecular Genetics* **2004**, 13:R169-R175.

**Mervaala E,** Müller DN, Schmidt F, Park JK, Gross V, Bader M, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC: Blood pressure-independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* **2000**, 35:587-594.

**Miller JA,** Scholey JW, Thai K, Pei YP: Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and renal hemodynamic function in early diabetes. *Kidney Int.* **1997**, 51:119-124.

**Mizuri S,** Yoshikawa H, Tanegashima M, Miyagi M, Kobayashi M, Sakai K, Hayashi I, Aikawa A, Ohara T, Hasegawa A: Renal ACE immunohistochemical localization in NIDDM patients with nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* **1998**, 31:301-307.

**Mongeau JG,** Biron P, Sing CF: The influence of genetics and household environment upon the variability of normal blood pressure: the Montreal Adoption Survey. *Clin Exp. Hypertens. A.* **1986**, 8:653-660.

**Monti J,** Zimdahl H, Schulz H, Plehm R, Ganten D, Hubner N: The role of Wnk4 in polygenic hypertension: a candidate gene analysis on rat chromosome 10. *Hypertension* **2003**, 41:938-942.

**Morgan K,** Wharton J, Webb J, Keogh BE; Smith PLC, Taylor KM, Oakley CM, Polak JM, Cleland JGF: Co-expression of renin-angiotensin system component genes in human atrial tissue. *Journal of Hypertension* **1994**, 12:S11-19.

**Mosterd A,** Hoes AW, de Bruyne MC, Deckers JW, Linker DT, Hofman A, Grobbee DE: Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population. *European Heart Journal* **1999**, 20:447-455.

- Nara Y**, Nabika T, Ikeda K, Sawamura M, Endo J and Yamori Y: Blood Pressure Cosegregates With a Microsatellite of Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) in F2 Generation From a Cross Between Original Normotensive Wistar-Kyoto Rat (WKY) and Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat (SHRSP). *Biochem Biophys. Res. Commun.* **1991**, 181:941-946.
- Natesh R**, Schwager SL, Sturrock ED, Acharya KR: Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature* **2003**, 421:551-554.
- Ocaranza MP**, Palomera C, Román M, Bargetto J, Lavandero S, Jalil JE: Effect of hypertension on angiotensin-(1-7) levels in rats with different angiotensin-I converting enzyme polymorphism. *Life Sciences* **2006**, 78:1535-1542.
- Okamoto K**, Aoki K: Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* **1963**, 27:282-293.
- Padmanabhan S**, Delles C, Dominiczak AF: Genetic factors in hypertension. *Arch. Med. Sci.* **2009**, 5:S212-S219.
- Padmanabhan S**, Newton-Cheh C, Dominiczak AF: Genetic basis of blood pressure and hypertension. *Trends in Genetics* **2012**, 28:397-408.
- Pan M**, Zhu JH, Liu ZH, Jiang WP, Cui ZC, Yu XH, Li HM, Yang XJ: Angiotensin-converting enzyme gene 2350 G/A polymorphism is associated with left ventricular hypertrophy but not essential hypertension. *Hypertens. Res.* **2007**, 30:31-37.
- Paul M**, Poyan Mehr A, Kreutz R: Physiology of local reninangiotensin systems. *Physiol. Rev.* **2006**, 86:747-803.
- Peters TK**, Ein neues Verfahren zur Behandlung der medikamentös therapierefraktären Hypertonie. *Journal für Hypertonie - Austrian Journal of Hypertension* **2008**, 12: 22-27
- Pinto YM**, Paul M, Ganten D: Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular Research* **1998**, 39:77-88.
- Poulter N**, Khaw KT, Hopwood BEC, Mugambi M, Peart WS, Rose G, Sever PS: Blood Pressure and Associated Factors in a Rural Kenyan Community. *Hypertension* **1984**, 6:810-813.

**Pravenec M**, Churchill PC, Churchill MC et al.: Identification of renal Cd36 as a determinant of blood pressure and risk for hypertension. *Nat. Genet.* **2008**, 40:952-954.

**Pravenec M**, Kurtz TW: Recent Advances in Genetics of the Spontaneously Hypertensive Rat. *Curr. Hypertens. Rep.* **2010**, 12:5-9.

**Premier C**, Lamondin C, Mitzey A, Speth RC, Brownfield MS: Immunohistochemical Localization of AT1a, AT1b, and AT2 Angiotensin II Receptor Subtypes in the Rat Adrenal, Pituitary, and Brain with a Perspective Commentary. *International Journal of Hypertension* **2013**, 2013:175428.

**Pueyo ME**, Challah M, Gauguier D, Louedec L, Philippe M, Gaertner R, Marre M, Michel JB, Jacob MP: Transforming growth factor-beta 1 production is correlated with genetically determined ACE expression in congenic rats: a possible link between ACE genotype and diabetic nephropathy. *Diabetes* **2004**, 53:1111-1118.

**Rapp JP**: Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiological Reviews* **2000**, 80:135-172.

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

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

**Saad Y**, Garrett MR, Manickavasagam E, Yerga-Woolwine S, Farms P, Radecki T, Joe B. Fine-mapping and comprehensive transcript analysis reveals nonsynonymous variants within a novel 1.17 Mb blood pressure QTL region on rat chromosome 10. *Genomics* **2007**, 89:343-353.

**Samani NJ**, Thompson J R, O'Toole L, Channer K and Woods KL: A Meta-Analysis of the Association of the Deletion Allele of the Angiotensin-Converting Enzyme Gene With Myocardial Infarction. *Circulation* **1996**, 94:708-712.

**Sasamura H**, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Koblika BK, Dzau VJ: Cloning, characterization and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 185:253-259.

**Savoia C**, Ebrahimian T, He Y, Gratton JP, Schiffrin EL, Touyz RM: Angiotensin II/AT2 receptor-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats involves nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. *J. Hypertens.* **2006**, 24:2417-2422.

**Sayed-Tabatabaei FA**, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Witteman CJM. ACE Polymorphisms. *Circ. Res.* **2006**, 98:1123-1133.

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

**Schulz A**, Kreutz R: Mapping genetic determinants of kidney damage in rat models. *Hypertens. Res.* **2012**, 35:675-694.

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

**Sekiguchi F**, Yamamoto K, Matsuda K, Kawata K, Negishi M, Shinomiya, Shimamura K, Sunano S. Endothelium-Dependent Relaxation in Pulmonary Arteries of L-NAME-Treated Wistar and Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Smooth Muscle Res.* **2002**, 38:131-144.

**Shapiro R**, Holmquist B, Riordan JF: Anion activation of angiotensin converting enzyme. Dependence on nature of substrate. *Biochemistry* **1983**, 22:3850-3857.

**Smithies O**, Kim HS, Takahashi N, Edgell MH: Importance of quantitative genetic variations in the etiology of hypertension. *Kidney International* **2000**, 58:2265-2280.

**St. Lezin E**, Simonet L, Pravenec M, Kurtz TW. Hypertensive strains and normotensive 'control' strains. How closely are they related? *Hypertension* **1992**, 19:419-424.

**Staessen JA**, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra Ap, Soubrier F, Vlietinck R, Fagard R: The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascularrenal risk. *J. Hypertens.* **1997**, 15:1579-1592.

**Stier Jr CT**, Benter IF, Ahmad S, Zuo HL, Selig N, Roethel S, Levine S, Itskovitz HD: Enalapril prevents stroke and kidney dysfunction in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **1989**, 13:115-121.

**Tanase H**, Yamori Y, Hansen CT, Lovenberg W: Heart size in inbred strains of rats. Part 1. Genetic determination of the development of cardiovascular enlargement in rats. *Hypertension* **1982a**, 4:864-872.

**Tanase H**, Yamori Y, Hansen CT, Lovenberg W: Heart size in inbred strains of rats. Part 2. Cardiovascular DNA and RNA contents during the development of cardiac enlargement in rats. *Hypertension* **1982b**, 4:872-880.

**Tiret L**: Epidemiological and genetic approach to cardiovascular disease. *Pathol. Biol. (Paris)*. **1998**, 46:715-716.

**Tschafary A**, Oertelt-Prigione S: Geschlechterunterschiede in der kardiovaskulären Prävention. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **2014**, 139:2451-2455.

**Urata H**, Nishimura H, Ganten D: Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *Am. J. Hypertens.* **1996**, 9:277-284.

**Van Kats JP**, Danser AH, van M Jr, Sassen LM, Verdouw PD, Schalekamp MA: Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. *Circulation* **1998**, 98:73-81.

**Verheijen I**, Vanderheyden PML, De Backer JP, Vauquelin G: AT1 Receptor Antagonists. *Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular&Hematological Agents* **2004**, 2:69-77.

**Volpe M**, Camargo MJF, Mueller FB, Campbell Jr. WG, Sealey JE, Pecker MS, Sosa RE, Laragh JH: Relation of Plasma Renin to End Organ Damage and to Protection of K<sup>+</sup> Feeding in Stroke-Prone Hypertensive Rats. *Hypertension* **1990**, 15:318-326.

**Volpe M**, Iaccarino G, Vecchione C, Rizzoni D, Russo R, Rubattu S, Condorelli G, Ganten U, Ganten D, Trimarco B, Lindpaintner K: Association and cosegregation of stroke with impaired endothelium-dependent vasorelaxation in stroke prone, spontaneously hypertensive rats. *J. Clin. Invest.* **1996**, 98:256-261.

**Wang T**, Takabatake T, Kobayashi Y, Nabika T. Sympathetic regulation of renal function in stroke-prone spontaneously hypertensive rats congenic for chromosome 1 blood pressure quantitative trait loci. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2008**, 35:1365-1370.

**Weir MR**, Dzau VJ: The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am. J. Hypertens.* **1999**, 12:205S-213S.

**Whelton PK**: Epidemiology of hypertension. *Lancet* **1994**, 344:101-106.

**Wilson FH**, Disse-Nicodème S, et al.: Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* **2001**, 293:1107-1112.

**Wolf-Maier K**, Cooper RS, Banegas JR, et al.: MFPHM Hypertension Prevalence and Blood Pressure Levels in 6 European Countries, Canada, and the United States. *The Journal of American Medical Association* **2003**, 289:2363-2369.

**WTCCC** (The Wellcome Trust Case Control Consortium): Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **2007**, 447:661-678.

**Xu X**, Ding X, Zhang X, Su S, Treiber FA, Vlietinck R, Fagard R, Derom C, Gielen M, Loos RJF, Snieder H, Wang X: Genetic and environmental influences on blood pressure variability: a study in twins. *J. Hypertens.* **2013**, 31:690-697.

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

**Yates CJ**, Masuyer G, Schwager SLU, Akif M, Sturrock ED, Acharya KR: Molecular and Thermodynamic Mechanisms of the Chloride-dependent Human Angiotensin-I-converting Enzyme (ACE). *J. Biol. Chem.* **2014**, 289:1798-1814.

**Yayama K**, Okamoto H: Angiotensin II-induced vasodilation via type 2 receptor: role of bradykinin and nitric oxide. *Int. Immunopharmacol.* **2008**, 8:312-318.

**Yoshida H**, Kakuchi J, Guo DF, Furuta H, Iwai N, van der Meer-de Jong R, Inagami T, Ichikawa I: Analysis of the evolution of angiotensin II type 1 receptor gene in mammals (mouse, rat, bovine and human). *Biochem. Biophys. Res. Commun* **1992**, 186:1042-1049.

**Zhuo JL**, Li XC: New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: Focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides* **2011**, 32:1551-1565.

## 8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Darstellung zur Blutdruckregulierung beim Menschen
Abb. 2	Schematische Darstellung der ersten molekularen Schritte der Renin-Angiotensin-Kaskade und Effekte von ACE
Abb. 3	Einfluss übergreifender Komponenten und deren Zusammenhänge im Renin-Angiotensin-System (RAS)
Abb. 4	Molekulare Struktur des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE)
Abb. 5	Molekulargenetische Verfahren zur Analyse des Blutdrucks
Abb. 6	Schematische Darstellung der Zucht und Etablierung des neuen kongenen Stammes SHRSP.WKY-Ace <sub>(D10Rat142-D10Rat12)</sub>
Abb. 7	Prinzip der Genotypisierung mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker
Abb. 8	Chromosomenkarte zum Rattenchromosom 10
Abb. 9	Detaillierter Ausschnitt der Chromosomenkarte aus Abb. 8 für Männchen und Weibchen der erhaltenen Zucht
Abb. 10a	Plasmatische ACE-Aktivität
Abb. 10b	Plasmatische Reninkonzentration
Abb. 11	Relative ACE-mRNA-Expression in der Lunge
Abb. 12	Pulmonale ACE-Gesamtaktivität
Abb. 13	Relative ACE-mRNA-Expression im Nierencortex
Abb. 14	Relative ACE-mRNA-Expression in der Nierenmedulla
Abb. 15	Renale ACE-Gesamtaktivität
Abb. 16a	Relative ACE-mRNA-Expression im linken Ventrikel
Abb. 16b	ACE-Aktivität im linken Ventrikel
Abb. 17	Relative ANP-mRNA-Expression im linken Ventrikel
Abb. 18a	Angiotensin I-Konzentration im linken Ventrikel
Abb. 18b	Angiotensin II-Konzentration im linken Ventrikel
Abb. 18c	Verhältnis Ang II/Ang I im linken Ventrikel

## 9. ANHANG

### 9.1 Mikrosatellitenmarker für die Genomanalyse

Marker	Sequenz Sense-Primer	Sequenz Antisense-Primer
D1Rat1	GCAATGCCATGGGTTTACTC	AAAAGTTATCCCCTTCCCCC
D1Rat13	AACAATGCTTGAATGGGTC	TTCCACAGGAACCTGAGCTT
D1Rat20	GGCCCTCACACTGTCTTCTT	GTTCCGGAGGACAAACCAGAA
D1Rat261	TTGGTCTTGAGCAGGAGTGA	TTCTCGCCGAACAAGAATCT
D1Rat37	AGGGCAATAGGGGCAGTATC	TGATTCCCCTCATGGATCAT
01Rat40	TGCACATGGTGCACATACAT	GGTGGAGATTGGACTTCTCG
D1Rat51	CCCTCAGTTCAAGAGTAACCTCA	TTGCCTGAGAGACTGTGCC
D1 Rat68	TTCTGCAATGGGTCAGACAA	TTCGGAAATGTAACCGCTTT
D1Rat71	TCTCTCCTTCTTCTTTACTGCCA	GTACACCGGTCAGGTCAGGT
D1Rat75	GCAGTTTGTCTTGTGATGAATA	TGTTTCCAAATTTGAATACACTGA
D1Rat90	AACCTAAGGTGAAGGGAGGC	AATTAACTTCCTCAGAAGTAAGG
D2Rat1	AGAATCTGGTCACTGGGTGG	ATGTTCTCTAGCCGCCACAT
D2Rat191	CAGCAGCTGCTGTTTTCACT	AGAGTCATGGACGATCTGGC
D2Rat6	CCTGGGCCTTTAAACCTTT	TTTCCCAACCCTAAAATGGTC
D2Rat10	CGTGCCACACCTACCACTAC	CATCCCAGGCCTCTTTTAAA
D2Rat17	TATCCTGAAAGGGCAACACC	TCACACACACTCAGGCTCGT
D2Rat75	TGCATGTTTCTATCTGCCCA	GGTGGGTGGATGAATGGATA
D2Rat33	TCTAAACTGGGTTAGCAGCCA	CATCAGAAATGCCCCTTCAT
D2Rat115	GAGCGAACTGCCATAGGATT	CAAGTTTTGGGGAATTCTTCC
D2Rat126	GGCAGGTTTCTACGGTTTGA	CACCCTTTTCTTGCATCCAT
D2Rat55	AAAGGGTAGGGCTTAGGTGG	TTCTGTTACCTGCTTGGCAA
D2Rat106	CCTTTTTAGGTCCTAGACTGAAC	TCTGGAGTTTATGTTATCCGTCA
D2Rat70	CATGGGAACATAAACGCACA	TGCTACTGGAAAATCTGGCA
D3Rat47	CACATACGCACACACACAGAA	ACAAGTAGCACAGTGTGCCC
D3Rat110	GGAGGAAATACTGCATGCTTT	CCCAAATGGCTCCTCTTTCT
D3Rat38	TGCTTCCAGTTACAGCAGTGA	AGGCGCTCAATACCAGATAGA
D3Rat35	GTAAGTGGCTCCAGTTTGGG	CCTGGGTTCGATTCCTAACA
D4Rat3	GGATGTGGACTATGGTTGGG	TTGTGACTGACAGCCTCAGG

<b>Marker</b>	<b>Sequenz Sense-Primer</b>	<b>Sequenz Antisense-Primer</b>
D4Rat125	AGAATACTTTTGAATAGGGCTTT	TGTCACCTCTGTGTCTCGCT
D4Rat11	CTGTCTTCCTCTGAACCCCA	TGCAATACTGTTTCAGTGAAGGA
D4Rat154	TGCGTATCCAAGTAGACACTGG	TCAACAAGTAAATTTCTCTCAAGG
D4Rat33	GACACAAGAGAGCCTGCCTC	TGATTGTTTTAACAATGACGATTT
D4Rat34	CCCTGTAGTTTAATTCTCCAAAT	AAGAGCATAAGCACGTGCG
D4Rat54	GAGCCCCTCATGTGAGGATA	CAGGCCAGACGTCTAAGATG
04Rat60	TTTTCGAACTAATCCCAGGC	CTCTGCCTTAGAGTTTTGTGCA
D4Rat67	GTCTGAGCCATCTCCTCAGC	AACCACCAGTTTCACATGCA
D4Rat71	CCTCAAAGACACTAAAGGATGAA	AGAAGGCTCCTTCCTTTTGC
D5Rat116	TCTGTTGATGGACTTGGGTG	GGGAATAGTCTGGTGGTCTTAAA
D5Mgh1	TCTAGACCAACCCTAGCTTTGC	TGAGTATGGAACCTTTCTTTAGGGG
D5Rat189	CATGGGCTCAAGAAATCAAA	CCAAAATCCTCAGAGAAGGC
D5Rat4	TCTGAGCATTGAGGGTTATTGTT	AACACAAGACCTCAGGAGCG
D5Rat154	CAACTGTCTCCAACCTTCGCA	CCAACTGCGATCCCTTTAAA
D5Rat35	CAGCCAGAGAAAAAGCCAAG	GTGTGGGAGGGACTGAGAGA
D5Rat43	AGCCCTTAAGCTGAGCTACAGA	GGCACCAGGCATACTCATG
D5Rat204	GACTCCCTCAGGAAGATCCC	TTTCCAATTCCATCCCTTTT
D5Rat49	AAAATGACAGCAGCCAAAGG	CCCCTTTAACCTTTTGCAA
D6Rat36	ACCTGAACATCCCCTCCC	CTGATGGCATTTCAGCAGA
D6Rat30	TCTCAGATGTCAGATGATAGTGC	TATTGGCACAGGTCAGCTTG
D6Rat24	CAGCAGGAGTCATACTCACCC	GTCTTCTTCCTCTCCACCC
D6Rat63	CCAAGTGGACCAATAGGCAC	TGCACCATTTTAACCCCTTC
D6Rat9	GGTACAGCATATCCCTTCTGC	ACCAGCACACTGCTGTGAAC
D6Rat4	CTAATTTCCCTTCCTTAGACACC	TTCCACCCACCTCTATCTGG
D7Rat63	TTGCATAACACCAGTTACAGGG	CCAAGCCATGGGTAGCTAAC
D7Rat29	CTCCTCCATTTGTGGAAAGG	GCCATAAGGATATGGTTTGGAA
D7Rat103	GTGTCAAACCTGTGGGGATCC	CTGGTGCTTTTGGGTCTGTT
D7Rat145	CCATAGACAAATGCTACTCTCAG	ATGTCTTCCAGATTCACCGC
D7Rat86	AAAGACACTTTTCAATCCCCC	TGTAGAAATCCTTCACAACTTGA
D7Rat15	AACCCACTTGTCTAGAGACCAAA	TTTGACACATGGCAATTCCA
D7Rat118	CATGAGTGAGAAGAGAGAGAGA	TGACAAGTTCAGGGATAGTGAAG

<b>Marker</b>	<b>Sequenz Sense-Primer</b>	<b>Sequenz Antisense-Primer</b>
D7Rat94	GCCTTATTTAACTTTTTGCTTCTC	AACTTATGAGGGCATTGCG
D8Rat53	TCCCAGGATGCTAATGAAGG	CGCACAGGTAGGTATGCACA
D8Rat162	TCACTGGCAGCAATTTACCA	TCTGAGACCTCTTCAACTCTGTTG
D8Rat157	AGCCAGCACAGCACTAAACC	CCAAGATGAATCTCCCCAAA
D8Rat30	CCTCCAGAGTCTCCAGTGCT	TCCTCACCATGTGATCCAGA
D9Rat29	TTTTTGTACTAGGGTGGGGG	AACATCACATTAACCCATGGC
D9Rat57	TGGGTACAACTGACAGGCA	TGTGCACGCATGTAGAGGTT
D9Rat26	ACTCGTGACCAAAGTCCCAG	AACCTGCAGACAAGCACCTC
D9Rat65	CTAGCAGGTCAGCTGCCTTT	CCCTGGGTTCAATAACCTGT
D9Rat4	TTGCTGCTGTCCTAGTTCCA	GTCCAAACCTATGCAGGCAT
D9Rat109	GCCTGGAAATTAGCTTGACG	CAAGGCTTTCATGGGTACA
D9Rat1	AACTGTGGGTCAGAAATTCTGTT	GATCTCACAAACATGCACGC
D11Rat22	CCATTCTACTTAAGAAGCACACA	AGGTTGAGAAACCTCCAGGG
D11Rat17	GCATATGGGAGTTTTGCCTG	CCAGTTGCAGATGATTTCCA
D11Rat44	GGTCTACTTCAATCTAAAAAGGG	TCCGTTGTACTGTCTCATGGA
D11Rat7	ACATGGAGGACACATGATGG	GTGTACCAGGAAGCCGAGTG
D11Rat47	GTGCAGCCATAACCATTCAA	TCTGGGGATTTGAAAGATGC
D11Rat37	GGCATAAGGCCAAGCACATA	TTTTATCCTGCCTTAGGAGATACA
D11Rat32	GGTGGCTCTTCATCCTAGCA	ACTCTGAGACTCTTGACTGTGGG
D11Rat33	TGGGGTCCTGGTCTTTGATA	CAGCAATTTTCAGACCTTTCC
D12Rat89	GCAGTGAGAGACAGATGTGCA	CCTTGAAATTGGTTCTTGGC
D12Rat7	GGCGACTCTGCTTCAATAGG	CACATTTTCTGCAACTCTGGG
D12Mit4	TGTGTGAGACTGTATGCATGTG	GGCTCCAGAGGAATGACATC
D12Rat23	TTTCTGAATCATTCTGGAGAA	CTAAGACTTCCTGCATGGGG
D12Rat55	CGTCTTGAGTTGGAGGACTATG	CACAGCAGCAATCAAGGGTA
D13Rat2	TGTTACTCAGTGGGAAGCCC	AAGACACAAGCACATGCACG
D13Rat37	CAATCTTCGAGGGACTCTGC	CAAACACAAATACACAGATGCA
D13Rat87	CATGGTGAGGCAAACCTCTT	TTCAAGTGTGGAAGTCTGG
D13Rat88	TACAGCAAAGGGGTTGAGG	AGCAAGGTGTGAAGCCTGAT
D13Rat30	TGCACGAATCAGGTTGATGT	CCAGGCTGGTCTTGATTGAT
D13Rat63	CACTTGATGTGTGTATGCATG	CGGGGTGACATTAAGGTT

<b>Marker</b>	<b>Sequenz Sense-Primer</b>	<b>Sequenz Antisense-Primer</b>
D13Rat131	TATCGACTTGCCATTGTTTCG	CAGAATCTTGTGCCTCCTGA
D13Rat132	TACCTCCCCACACAGCTCTC	CTGTCATACATGTGCATGCG
D13Rat133	AAAGACAACCTGCCAGATGGG	TCTTAACCACTGAGCCATTTTT
D13Rat54	CTTAGATGTGAAGGCCCTGG	TTGAGGGCATGTATAAGGGG
D13Rat50	GGATGCAGCCTCCCTACATA	GGACATTCTGAGGAACCTGC
D14Rat1	CAGTCCCTGGGTTTTACAT	CTCCAAGACACAAAACGATCA
D14Rat75	GCACACTGCAGTGAGACAAAA	TGACCCTTCAGTTGCAAATTC
D14Rat6	CAGGAACCAACTCATTGCA	TTGTCTTGTGATGTTCTGTCAGG
D14Rat4	GTGTGTTTTCGCCGAGAAGCAC	ACTAATCTTTCAAAGTCCCCC
D14Rat55	GCAAATTTTTGATGGGTTTG	CACAAATTTCAACCTTGGGC
D14Rat16	AGAGCTGCAGAGATTTTCCA	GTGTGAAAACCATAATCTAAAGGA
D14Rat90	CCTGGGAATGTTAGGTCAATTC	TGACAGTTTTTCCCCTGCA
D15Rat2	GGGGAGGGGAAGAGAAAAA	TGCAGAGTTCAGGACACACA
D15Rat5	GCTTCGTGTGTATTCTTCCTGA	GCCTATTGATCGGAGTTCCA
D15Rat30	GAAGGTTGGTTGGTAGCCAA	AATACCACTGTCTGCCAGAGAA
D15Rat13	AAGAAGGTCATATCCCCTCTCA	TCCAGTGTACCCTGTTTCAAAA
D15Rat21	TTGGTGGTCAAAGCTCTCCT	TGCCAAGAAGCTGGATATCAGG
D15Rat29	TGACCTATTTGCATTTGGCA	AGAGGTGATGCCAAGTGCTT
D15Rat103	TCAGTCCCATTTCAGGGTCTC	AGAGGGATTGAGGACACCAG
D16Rat31	CTTTTAATACCTGGTAGAAAACG	TTTTCTGGCAAAGTCAGTGAA
D16Rat70	ACCCTGGTCCTAGCCATTTTC	CCTCTGGCTTCTCCACAGTC
D16Rat18	GTTGTGACATGCCTGGTTTTG	TAGCCCAAGAGAACGCTTGT
D16Rat64	CCAGCCAGAGAAAGTTTGTTG	TGCTGGTGGGACACTGTCTA
D16Rat58	CCCTGCTGTTGTGTTAAACCT	TGCTCTTTACCTGCCTTTCC
D17Rat4	AGCTGAAGATCACAATGGGC	GCCTAATTCTTGACAGGGA
D17Rat5	TACAGGTATGGGGCCTCAAC	AGAAAACCTGGGAAGGAAGG
D17Rat17	GGTCACATGTACCTGCTTGAGA	TTGAGGCTCCAGCATATGTG
D17Rat36	ATTGCCTTGCTACTCGGTGT	AGCCAATGTGGATGCATGTA
D17Rat133	CAGAATAACCAACAACAGGGAA	AGTACTGTATCCCCACAACCG
D17Rat85	TTGCAGGTGAGTTCTCAGACA	CCCTAGGTTTAATCTCCTGTACCA
D17Rat49	GCCATTGATAAGCACCCCTTT	GCACAGAGACAGACCCAGGT

<b>Marker</b>	<b>Sequenz Sense-Primer</b>	<b>Sequenz Antisense-Primer</b>
D18Rat48	GCCCAGAATGAAGTTTATTCATT	CTGGCCTTCATGATGTCTACA
D18Rat24	TCCTTCAAACAACCTGGCTTTG	GCACTGAAGTAAAATTCATAAAGG
D18Rat17	GCCAAGGCATTTTAAAATTAACC	ACTCCTTTGGTTCTTGGCAA
D18Rat41	TGGTACTTCGACCTCCCAGT	TGTGAAGTCTGTCAGATTAACGTT
D18Rat13	CCCATTTTCCCAGTCCAGTA	AGGAAGGAAGGAAGGAAGGA
D18Rat12	TGAGGTCCTGCTACAGTGGC	TTACTCACTGCCCCACAACA
D19Rat19	TGAGAGCGCTCTGCTTTTAA	ACCACTGACCTTCACATGCA
D19Rat15	GGTCTCACTGTGCTTTTCCC	GCTGAGGCTGAGAAAAGGA
D19Rat41	TGCTGGTTCAGAAATCAACG	GTCTGCACATACATGCCTGC
D19Rat70	AAGCTGGACAACCTGCTTTG	TGTGTAGGTCAGAGGACAACCT
D19Rat6	TGTGAGCATAACAAGGAACTGG	ACTGGTAGAAAGCAGGGGGT
D19Rat59	GTCTTGACCAAATGCAGGGT	GGTTTGAATTTCTTGGCTGG
D20Rat1	CATTCTTTCCTCCTCCCTTTT	CATTCTTTCCTCCTCCCTTTT
D20Rat49	TCACTGATTTAAGGTCCATCCC	GTAGGGTGCAAGGGTAGGGT
D20Rat22	GCAGGAAAATACGAGCCCTT	CCCTGTGAAAGTAGGAGGCA
D20Rat39	GAAACACATCATTTACCCAC	ATGGCGTGCATGCAGAAC
D20Rat38	CTCAGGCAGTGAGGAAGAGC	TGATGCTAAGAGTCATCGGCT
D20Rat19	TGGTTTTCTTGAGCACAGCA	CCAGGCTGTCAGCCTTAGTT
DXWox17	ACCATGTAACCCCTCTCATG	TGGAGGATAGACTCCCCTAGG
DXWox27	CTGACTCCAGAAAGTTGTCCTC	GATCTTTCAGTTTTAAGTG
DXMit4	ACTCCAACACCCAGTCAACC	GCCAAAGCATCTCCCTATCA
DXWox28	GTCGCGGATAGCATAGGC	TTCACTGGGGGCCTCTAGTGC

## 9.2 Untersuchte Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 10

Marker	Position	cM Abstand zum vorhergehenden Marker	Polymorph zwischen SHRSP und WKY
D10Rat95	0,04	0,00	Ja
D10Rat96	0,08	0,04	Ja
D10Rat49	5,71	5,63	Ja
D10Rat121	9,18	3,47	Nein
D10Rat64	11,40	2,22	Ja
D10Rat46	20,45	9,05	Ja
D10Rat44	27,23	6,78	Ja
D10Rat43	27,27	0,04	Ja
D10Mit3	33,00	5,73	Nein
D10Rat72	31,76	4,49	Ja
D10Rat35	34,04	2,28	Ja
D10Rat38	34,04	0,00	Nein
D10Rat36	36,30	2,26	Nein
D10Rat73	41,90	5,60	Nein
D10Rat63	41,90	0,00	Nein
D10Rat85	41,90	0,00	Nein
D10Mgh8	44,19	2,29	Ja
D10Rat116	45,38	1,19	Nein
D10Mgh6	45,54	0,16	Ja
D10Rat30	46,57	1,03	Ja
D10Mit8	46,57	0,00	Nein
D10Mit1	46,57	0,00	Ja
D10Rat29	46,57	0,00	Ja
D10Rat69	46,57	0,00	Ja

<b>Marker</b>	<b>Position</b>	<b>cM Abstand zum vorhergehenden Marker</b>	<b>Polymorph zwischen SHRSP und WKY</b>
D10Rat28	47,61	1,04	Nein
D10Rat70	47,61	0,00	Nein
D10Rat98	47,61	0,00	Nein
D10Rat123	49,50	1,89	Nein
D10Rat27	51,00	1,50	Nein
D10Rat25	51,00	0,00	Nein
D10Rat25	51,00	0,00	Nein
D10Rat26	51,03	0,03	Nein
D10Rat92	52,00	1,46	Ja
D10Rat93	57,43	4,94	Ja
D10Rat124	58,54	1,11	Nein
D10Rat107	58,54	0,00	Ja
D10Rat20	58,54	0,00	Ja
D10Rat99	64,27	5,73	Ja
D10Rat18	66,50	2,23	Ja
D10Rat142	66,90	2,20	Ja
D10Mit7	66,90	0,00	Nein
D10Rat84	67,60	1,10	Ja
D10Mit1 (ACE)	68, 71	1,11	Ja
D10Rat17	69,01	0,30	Ja
D10Rat13	73,35	4,34	Ja
D10Rat16	73,35	0,00	Ja
D10Rat14	73,37	0,02	Ja
D10Rat12	76,13	2,76	Ja
D10Rat10	77,15	1,02	Nein

<b>Marker</b>	<b>Position</b>	<b>cM Abstand zum vorhergehenden Marker</b>	<b>Polymorph zwischen SHRSP und WKY</b>
D10Mgh3	77,15	0,00	Ja
D10Rat132	78,96	1,81	Nein
D10Mgh1	83,01	4,05	Ja
D10Rat88	83,69	0,68	Ja
D10Rat7	87,00	3,31	Nein
D10Mgh2	87,04	0,04	Ja
D10Rat6	88,11	1,07	Ja
D10Rat3	91,53	1,63	Ja
D10Rat4	95,00	3,87	Ja

### 9.3 Sequenzen der polymorphen Marker auf Chromosom 10

Rot: die flankierenden Marker des ACE-Fragments.

Marker	Sequenz Sense-Primer	Sequenz Antisense-Primer
D10Rat95	TTACACCTCTCCAACACTGCC	TCATAGGAGGGAATACGGACA
D10Rat96	CCTTTGGAGACCAGGGTCTT	GACACCTGACATGTTCCCCT
D10Rat49	CACTGACATACATGCAGACCAA	ATGCTGGGGACTAAAAGCAA
D10Rat64	TCTAACACCTAAGAAACATGTC	TCAAAGGGAAAAAAAAAAGGAGA
D10Rat46	ATGACGGTTCTGCTTGCAAG	ATCCTTTGGGTTTGAAGGCT
D10Rat44	AAAAGACATGCACGTAGGCC	CCCAACAGCAACTTCAATGA
D10Rat43	GCCACAATAATTCAGGTGGTG	CATTTGCACATTGGACCATC
D10Rat72	CTTCGAGCACCAGTGTTCAA	AACCTTGATGTCTGTGTGTAGACA
D10Rat35	TGTGTTTCCCCTCATTAGCA	CTAAGCCCCAACCTTCTCC
D10Mgh8	AAGCCTGGAGTGTTAGTAAAGG	AAGAGGCCTGTATGCTGGGT
D10Mgh6	CCTGCCTAAGTAATACAGTGGT	CCAGACCTTGTATGCTGGGT
D10Rat30	TGATAATGTGGTTAGAGGTGTG	TCCATTAACCCAATGTCCAAA
D10Mit2	GAAGTCCCGAAGCCACATAA	GCTCAAATAAAGGTGGAAGGG
D10Rat29	TGGTGACAGCTAAGCGTATG	CCCATGATTTACATGTGG
D10Rat69	TAAGTGCCTGATGGTTGCAA	AGGGGATCAGATGCTTTCCT
D10Rat92	ACCCTCAGCCTATGCAAACC	TCCCCTTTCTTCTGGGCTAT
D10Rat93	TGCCTTAAGCAGAATGCAATT	TCTGACATAAGGTCACCTTTGGAGA
D10Rat107	GTTTTCTGGGTCTTCCACA	CTTCTTCCCATTATGCCAC
D10Rat20	AGTGATTGCCATACCTGCCT	GAAATGGCCAGGATAAACCA
D10Rat99	CCTTTATCCAAAATAGTGTGC	ATGAAGTCATTGGGGGTGTG
D10Rat18	AACTAGACAGGCGGTGCTGT	CTCTGGAGGGTCCACATCAT
<b>D10Rat142</b>	<b>AAAAGGGCCAGCAAGATG</b>	<b>CTCCACGGTCTATGGTCTA</b>
D10Rat84	TTCTGTCTTGTCTCCCACCC	GCTTTATCTCCTTTCTTGGTGG
D10Mit1	ATAACACCAACATTACCATAGA	ATACTCAGTTCAGACTTTTCACCA
D10Rat17	TCTTTTCTTTGTCTTTGGGCA	CCATTCTCGTGTTGTGATGTG
D10Rat13	AGGCAATGGGGACTCTAGGT	GCATAGCAACCCAACATTGA
D10Rat16	CAGCCCTCAGCCTAAGAGAA	AGAGCCATCCAATCTCTCCA
D10Rat14	AAATCAACCTTTGGGCCTTC	TAGAGAGTTCMGGGCTGCC
<b>D10Rat12</b>	<b>CCTTGATTTTGTCTTTCTTTTCC</b>	<b>CGTCTTGAGGAAACCATTGA</b>

<b>Marker</b>	<b>Sequenz Sense-Primer</b>	<b>Sequenz Antisense-Primer</b>
D10Mgh3	TATCAGGTTGACAACCACTATG	CATTGCCTAACACAAAGATATCAA
D10Mgh1	TTTTGCTTAAGAGAAAACAATC	ACACAAGGTGGACATCTCCTG
D10Rat88	TGTGTGTCTACACATACATGTG	GGTGGATATAATCAACATACGCC
D10Mgh2	TTCCTTTCAGCATCTAAATAAG	GAGGAACACCACATGCACAC
D10Rat6	AGCTAGCACTCTAGCCCCTT	CCAGAACTCCAATCCAAGGA
D10Rat3	GGTTCAAGGTCAACATCAAGC	ACTGTACTCGGTGTGCATGC
D10Rat4	TTTCCCCACTCCAAGTTCTG	CGAGCTTGTGAGCACGAGT

## 9.4 ACE-Teil-Gensequenz (2257-2491 bp) der Ratte

Auswahl des Primerpaares für RT-PCR intronüberspannend:

### EXON15

2257 agtacaaccagatcctgctagacatggagacgacttacagtgtagccaatgtttgctaca 1316

### Sense

2317 caaatggcacttgtctgtcactggagcctgga 2346

### EXON16

### Antisense

### INTRON 16 ↑

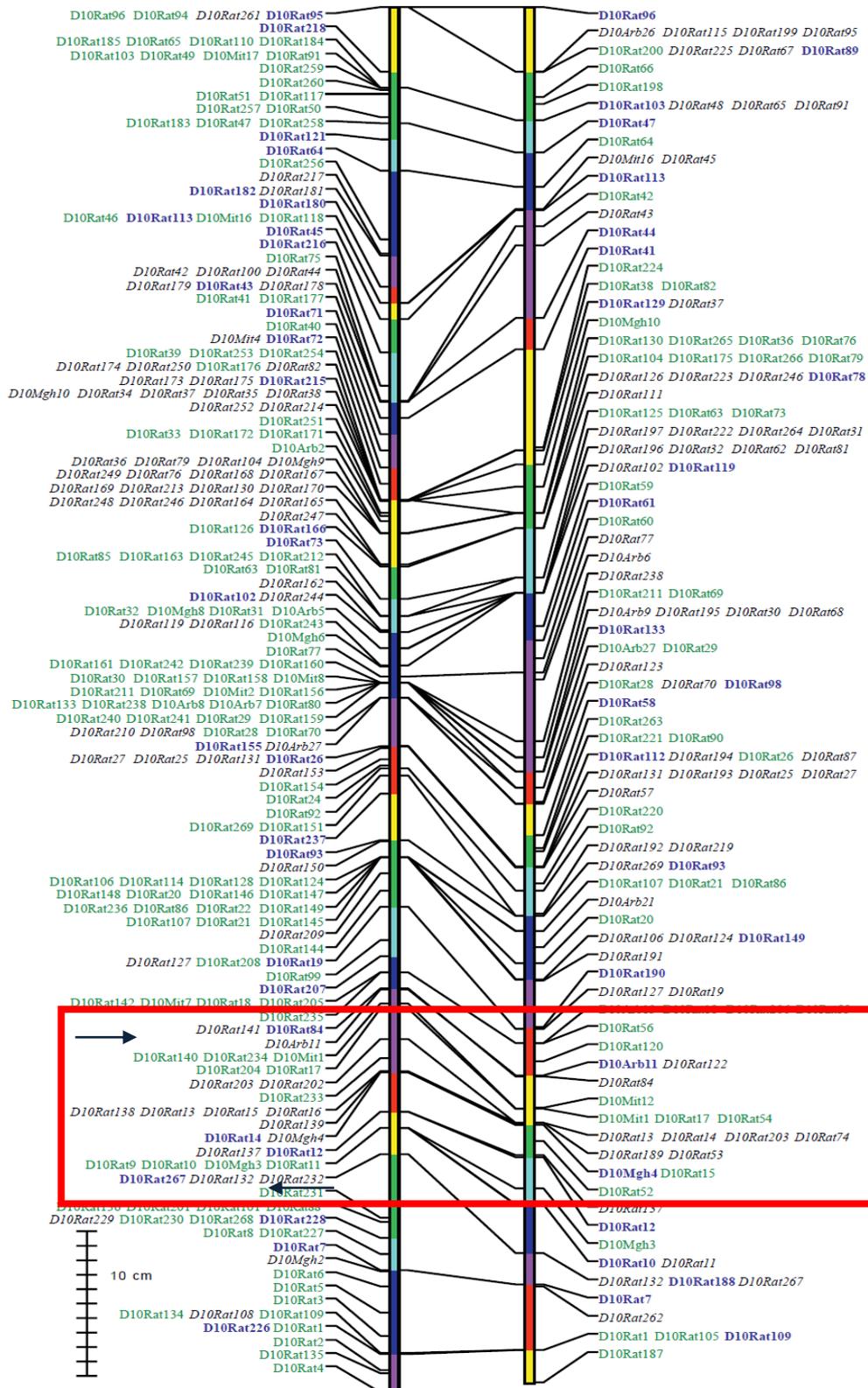
2346 tctgacaaatataatggccacgtcccggaaatacgaagaattgcttgggtgtggaag 2405

2406 agctggcgagacaagggtggggagagccatccttcctttccaagtacgtggacttc 2465

2466 tccaacaagatcgccaagctcaacgg 2491

EXON17.....

## 9.5 Genomkarte des Chromosoms 10 der Ratte



## VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile dieser Arbeiten wurden veröffentlicht bzw. vorgestellt.

### Originalarbeiten

**Nassar I**, Schulz A, Bernardy C, Garrelds IM, Plehm R, Huber M, Danser AH, Kreutz R: twofold genetic increase of ACE expression has no effect on the development of spontaneous hypertension. *Am. J. Hypertens.* **2008**, 21:200-5.

Kamilic J, Hamming I, Kreutz R, Bolbrinker J, Siems WE, **Nassar I**, Sluimer JC, Walther T, Navis GJ, van Goor H: Renal ACE2 expression and activity is unaltered during established hypertension in adult SHRSP and TGR(mREN2)27. *Hypertens. Res.* **2010**, 33:123-8.

### Poster und Vorträge

**Nassar I**, Bernardy C, Danser J, Paul M, Kreutz R: The role of genetic variability of ACE-Genexpression for cardiovascular function and organ damage in arterial hypertension: Analysis in a congenic rat model. *Graduiertenkolleg-65-Poster*, **2008**.

**Nassar I**, Bernardy C, Plehm R, Zürcher, Schulz A, Kreutz R: Die Plasma ACE-Aktivität wird genetisch determiniert und ist unabhängig von der arteriellen Hypertonie. *Graduiertenkolleg-865-Poster*, **2005**.

**Nassar I**: ACE2 activity and mRNA-expression in kidney are not different in hypertension model. *Graduiertenkolleg-865-Vortrag*, **2006**.

**Nassar I**, Bernardy C, Bolbrinker I, Wehland M, Siems W-E, Walther T, Kreutz R: Renal ACE2 mRNA- expression and activity in the spontaneously hypertensive stroke-prone rat model of hypertension. 29. Wissenschaftlicher Jahreskongress der Deutschen Hochdruckliga e. V. DHL Deutsche Hypertonie Gesellschaft, **2005**.

## **Stipendien und Auszeichnungen**

**Stipendium des Graduiertenkollegs 865**, April 2004 – November 2008 „Vaskuläre Regulationsmechanismen an der medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin der Freien Universität Berlin und der Humboldt-Universität Berlin gefördert durch die deutsche Forschungsgesellschaft“

### **Young Investigator Award 2005**

Anlässlich der 29. Wissenschaftlichen Kongresses Hypertonie 2005 der deutschen Hochdruckliga e.V. DHL/ Deutsche Hypertonie Gesellschaft in Berlin.

## **Selbstständigkeitserklärung**

### Erklärung

Ich, Ibrahim Nassar, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Untersuchung der pathophysiologischen Bedeutung der erhöhten ACE-Genexpression bei spontaner Hypertonie im kongenen Rattenmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien andere Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

## LEBENS LAUF