

Aus dem Institut für Pathophysiologie Abteilung Versuchstierkunde
Leitung: Prof. Dr. agr. habil. Dr. rer. med. habil. Ingrid Klötting
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Phänotypische Selektion auf Bluthochdruck

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2010

vorgelegt von:

Frank Fleischer

geboren am: 25.03.1986

in Wolgast

Dekan: Herr Prof. Dr. med. dent. R. Biffar

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. agr. habil. Dr. rer. med. habil. I.Klötting

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. N. Gretz

Ort, Raum: 17495 Karlsburg, SR 213 des Institutes für Physiologie

Tag der Disputation: 25.Juni 2014

Gliederung

1. Einleitung.....	5
1.1 Bluthochdruck.....	5
1.2 Genetische Grundlagen der Hypertonie.....	6
1.3 Modelltiere – ein repräsentatives Werkzeug zur molekulargenetischen Untersuchung der Hypertonie.....	8
2. Material und Methoden.....	10
2.1 Rattenstämme / Zucht.....	10
2.2 Phänotypische Selektion	12
2.2.1 Systolische Blutdruckmessung.....	12
2.3 Genetische Untersuchung	12
2.3.1 Genomanalyse mittels Mikrosatellitenmarker.....	12
2.4 PCR.....	14
2.5 Agarosegel – Elektrophorese.....	16
2.6 DNA-Sequenzierung.....	17
3. Ergebnisse	19
3.1 Phenotypische Selektion eine erfolgreiche Strategie um Hypertonie auf Ratten zu fixieren – Vorarbeit.....	19
3.2 Eigene Arbeiten.....	21
3.3 QTL-Analysen.....	29
4. Diskussion.....	30
5. Literaturverzeichnis.....	37
6. Anhang.....	42
Verwendete Chemikalien und Geräte.....	42
Tabellen.....	44
Chromosomenkarten.....	47
Mikrosatellitenmarker.....	58
Eidstattliche Erklärung.....	68
Danksagung.....	69

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Vergleich eines heterozygoten Mikrosatellitenmarkers mit einem homozygoten Marker.....	20
Abb. 2: Chromosomenkarte 14.....	22
Abb. 3: Chromosomenkarte 1, 18.....	23
Abb. 4: Zwei heterozygote Mikrosatellitenmarker	25
Abb. 5: Gelelektrophorese des Primers D3Rat80.....	25
Abb. 6: unklares Ergebnis der Gelelektrophorese	26
Abb. 7: Chromosom 2, 3.....	47
Abb. 8: Chromosom 4.....	48
Abb. 9: Chromosom 5.....	49
Abb. 10: Chromosom 6.....	50
Abb. 11: Chromosom 7, 8.....	51
Abb. 12: Chromosom 9, 10	52
Abb. 13: Chromosom 11, 12.....	53
Abb. 14: Chromosom 13, 15.....	54
Abb. 15: Chromosom 16, 17.....	55
Abb. 16: Chromosom 19, 20.....	56
Abb. 17: Chromosom X.....	57

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Kreuzungs – Schema:.....	11
Tab. 2: Abbildung PCR-Ansatz:.....	14
Tab. 3: Thermocycler-Programme:.....	15
Tab. 4: Ansatz Sequenzierungs – PCR:	18
Tab. 5: Veränderung der DNA-Sequenzen:.....	27
Tab. 6: Vergleich der DNA-Sequenzen:.....	28
Tab. 7: Basenveränderungen der BC7-Generation.....	29
Tab. 8: Loci Studied in Backcross Parents.....	44
Tab. 9: Proximale Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 14.....	45
Tab. 10: QTLs Bluthochdruck.....	46

1. Einleitung

1.1 Bluthochdruck

Die arterielle Hypertonie zählt zu einer der häufigsten chronischen Erkrankungen des Menschen [Janhsen et al. 2008]. Sie stellt im Europäischen Raum den Hauptrisikofaktor bei der Morbidität und Mortalität dar [World Health Report 2002]. Weltweit wurde in großen epidemiologischen Studien bewiesen, dass die unbehandelte Hypertonie ein Risikofaktor erster Ordnung für das Auftreten verschiedener kardiovaskulärer und verwandter Erkrankungen darstellt [Kjeldsen et al. 2001], [Lewington et al. 2002]. Gemäß dem Gesundheitssurvey 1998 sind in der BRD 44 Prozent der Frauen und 51 Prozent der Männer im Alter zwischen 19 und 75 Jahren betroffen [World Health Report 2002].

Erhöhte arterielle Blutdruckwerte sind mit einem größeren kardiovaskulären Risiko assoziiert [Chobanian et al. 2003]. Eine allgemeine Klassifizierung der Hypertonie gestaltet sich schwierig. Schon 1971 machen Evans und Rose [1971] auf den individuellen Hintergrund der Person aufmerksam: *„Hypertension should be defined in term of a blood pressure level above which investigation and treatment do more good than harm.“* (*“Hypertonus sollte definiert werden als Grenzblutdruckwert, ab dessen Übersteigen seine Untersuchung und Behandlung mehr Nutzen als Schaden bringt.“*)

Nach einer Richtlinie der WHO von 1999 lässt sich die arterielle Hypertonie nach der Blutdruckhöhe, dem kardiovaskulären Risiko und der Ätiologie unterscheiden. In den internationalen Leitlinien Europas [Mancia et al. 2007] und des JNC VIII in den USA [Chobanian et al. 2003] wird bei Erwachsenen ein systolischer Blutdruck von unter 120 mmHg und ein diastolischer von unter 80 als optimal angesehen. Die Diagnose arterielle Hypertonie wird anhand des individuellen

Risikoprofils ab einen Blutdruck systolisch 140 mmHg oder diastolisch 90 mmHg gestellt.

Ätiologisch lässt sich der Bluthochdruck in eine primäre und sekundäre Form einteilen.

Bei der sekundären Hypertonie, die nur in etwa 5% der Fälle vorliegt, kann ein ursächlicher pathogenetischer Mechanismus identifiziert werden. In diesem Fall ist der Behandlungsansatz die Bekämpfung der Ursache. In 95% der Fälle liegt eine primäre oder essentielle Hypertonie vor. Hier ist der Pathomechanismus noch nicht geklärt und es kann daher nur symptomatisch behandelt werden [Baumgart et al. 2001]. Diskutiert werden umweltbedingte, demographische und genetische Faktoren, die zur Manifestation der Erkrankung führen.

1.2 Genetische Grundlagen der Hypertonie

Die Grundlagen für das Verständnis über die Vererbung von Bluthochdruck wurden bereits 1923 von Weitz postuliert. Bei Familienuntersuchungen stellte er fest, dass der prozentuale Anteil der an Hypertonie erkrankten Nachkommen, bei betroffenen Familien höher war als in der Gesamtbevölkerung [Weitz 1923].

Die Frage um den Mechanismus der Vererbung konnte Weitz nicht klären. Die Annahme, dass es sich bei dem Bluthochdruck um die Vererbung von quantitativen Eigenschaften handelt, wurde ausgiebig diskutiert. Der Begriff des quantitativen Merkmals bezeichnet alle Phänotypen, die nicht nach dem klassischen Mendelschen Vererbungsregeln übertragen werden. Quantitative Traits sind Merkmale, deren Werte eine kontinuierliche Verteilung zeigen und bei allen Eukaryoten vorkommen. Durch ein Zusammenspiel von sowohl genetischen Faktoren als auch Umwelteinflüssen wird die natürliche Variation zwischen den einzelnen Individuen verursacht. Die chromosomalen Orte (Loci), die

quantitative Merkmale (Trait) bestimmen, bezeichnet man als Quantitative Trait Loci (QTLs).

George Pickering [1972] versuchte in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts seine Ansicht zu implementieren, dass der genetische Hintergrund der arteriellen Hypertonie nicht auf ein einzelnes Gen zurückzuführen sei.

Der britische Forscher Robert Platt [1963] war hingegen der Auffassung, dass Hypertonie eine monogene, nach den Mendelschen Regeln autosomal rezessiv vererbte Erkrankung sei.

Inzwischen konnte mithilfe großer Familienstudien, wie der Framingham Heart Study [Brown et al. 2003], der Antonio Family Heart Study [Mitchell et al. 1996], oder der Quebec Family Study [Rice et al. 2000] die Erbllichkeit der Hypertonie belegt werden.

Gegenwärtig geht man davon aus, dass die Hypertonie als quantitatives Merkmal vererbt wird. Die genetischen Ursachen der Erkrankungen liegen oft in den summierten Effekten mehrerer verschiedener Genorte, die den Phänotyp des Hochdrucks manifestieren [Rapp 2000].

Es sind viele Genorte identifiziert worden, die an der Ausprägung der Hypertonie beteiligt sind. Im Genom des Modelltieres Ratte wurden bereits rund 300 verschiedene QTLs, die den Blutdruck beeinflussen, gefunden. Diese Befunde bekräftigen die Annahme, dass die Hypertonie durch die wechselseitigen Beeinflussungen verschiedener Genorte verursacht wird.

Andererseits konnte Okamoto 1966 durch Kreuzung von Wistar Kyoto Ratten mit leicht erhöhten Blutdruckwerten nach wenigen Rückkreuzungsgenerationen eine spontan-hypertensive Rattenlinie (SHR) etablieren. Die Tatsache, dass nur wenige Rückkreuzungen den Hochdruck im Genom der Ratten fixierten, spricht für das Wirken weniger Gene, die zur Manifestation des Bluthochdrucks führen. Die Entscheidung darüber, welche von beiden Annahmen die richtige ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht getroffen werden.

1.3 Modelltiere – ein repräsentatives Werkzeug zur molekulargenetischen Untersuchung der Hypertonie

Hypertensive Modelltiere stellen in der Molekulargenetik eine gute Alternative dar, da sie eine umfassende Betrachtung komplexer Phänotypen erlauben [Rubattu et al. 1995].

Äußere Einflüsse und genetische Veränderungen lassen sich durch Kontrolle der Zucht- und Umweltbedingungen vermeiden. Die Modelltiere wurden ursprünglich zur Erforschung der physiologischen Mechanismen der Hypertonie entwickelt. In den letzten Jahrzehnten konnten mithilfe verschiedener Kreuzungsvarianten, kongene, transgene oder rekombinante Modelle entwickelt werden. Diese dienen hauptsächlich der Suche nach hypertonierelevanten Genorten. Seitdem sind verschiedene Genorte identifiziert worden, die an der Blutdruckregulation beteiligt sind [Luft et al. 1999][Cusi & Bianchi 1998]. Ihre Funktion und pathophysiologische Bedeutung sind noch immer nicht eindeutig geklärt.

Durch eine kurze Generationszeit und optimale Zucht- und Haltungsbedingungen hat sich die Ratte zum wichtigsten Modelltier der kardiovaskulären Forschung entwickelt [Pinto et al. 1998].

Im Laufe der Forschungsarbeiten gelangen die vollständige Entschlüsselung des Rattengenoms und die Erarbeitung detaillierter Chromosomenkarten mit dichter Markeranordnung. Erst durch die genaue Kartierung ist es möglich geworden, mittels Genomscreening blutdruckrelevante Kandidatengene zu lokalisieren. Zum jetzigen Zeitpunkt konnten mit Hilfe der Kosegregationsanalyse zahlreiche QTLs auf beinahe allen Chromosomen identifiziert werden. Da diese bei unterschiedlichen Rattenmodellen gefunden wurden und teilweise auch beim Menschen von Bedeutung sind, ist zu vermuten, dass einige von diesen eine bedeutende Relevanz bei der Blutdruckregulation besitzen.

Um mit Hilfe des homologen Konzeptes die gefundenen Genorte auf den humanen Chromosomensatz zu extrapolieren, müssen die Gene nach der Entdeckung beschrieben und ihre Funktion in den humanen Kontext übertragen werden. Wenn die homologe Region beim Menschen identifiziert worden ist, müssen Populationsstudien durchgeführt werden, um die Rolle bei der Hypertonie im menschlichen Kontext zu klären [Julier et al. 1997].

2. Material und Methoden

2.1 Rattenstämme / Zucht

Für die Versuche wurden normotensive BB/OK Ratten spezifiziert und unter pathogenfreien Bedingungen gezüchtet und gehalten wie bereits beschrieben [Klötting I., Vogt L. 1991]. Die hypertensiven SHR/Mol Ratten wurden vom Mollegaard Breeding Centre LTD in Dänemark kommerziell erworben und in der gleichen Tierräumen wie die BB/OK Ratten gehalten. Alle Tiere erhielten eine Labor-Diät nach Ssniff R., Soest, FRG und Wasser ad libitum. Die Haltung der Tiere erfolgte unter einem Lichtrhythmus von 12 Stunden hell zu 12 Stunden dunkel.

Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, wurde ein diabetischer BB/OK Bock mit einem Blutdruckwert von 121 mmHg mit einem hypertensiven SHR/Mol Weibchen (196 mmHg) verpaart. Aus dieser Paarung sind elf Nachkommen entstanden. Diese hatten einen Mitteldruck von 192 mmHg +/- 10 mmHg, welcher wiederholt im Alter zwischen 10 und 15 Wochen mit Hilfe der Tail-Cuff Methode gemessen wurde. Keines der elf F1-Tiere entwickelte einen Diabetes, was für einen rezessiven Erbgang des Diabetes Typ 1 und für Dominanz für Bluthochdruck der SHR spricht. Ein weibliches F1-Tier mit einem Blutdruck von 196 mmHg wurde selektiert und auf einen diabetischen BB/OK Bock zurückgekreuzt. Aus dieser Paarung resultierten 31 erste Rückkreuzungshybriden (BC1; first backcross). Ein männliches Tier mit Diabetes und einem Mitteldruck von 160 mmHg aus dieser Nachkommenschaft wurde mit einem normotensivem BB/OK Weibchen gekreuzt. Es wurden die zweiten Rückkreuzungshybriden geboren (BC2). Dieses Prozedere wurde (siehe Tabelle 1) acht mal wiederholt (BC8). Anfangs wurden nur männliche Tiere rückgekreuzt. Im späteren Verlauf erwiesen sich Weibchen aufgrund kürzerer Generationszeiten besser für die kommende Rückkreuzung.

Die Blutdruckwerte der Rückkreuzungsgenerationen zwischen weiblichen und männlichen Tieren schwankten nur in einem kleinen Bereich.

Es konnte kein signifikanter Blutdruckunterschied zwischen diabetischen und nichtdiabetischen Rückkreuzungshybriden nachgewiesen werden

(siehe Tabelle 1).

<i>Paarung</i>	<i>Generation</i>	<i>Diabetes- Prävalenz/ Total¹</i>	<i>Blutdruck (mmHg)</i>	<i>Parameter des BC-Elternteils</i>		
				<i>Geschlecht</i>	<i>Blutdruck</i>	<i>Alter²</i>
<i>d BB x SHR</i>	<i>F1 / N1</i>	<i>0 / 11</i>	<i>192 ± 10</i>	<i>weibl.</i>	<i>196</i>	<i>-</i>
<i>d BB x F1</i>	<i>BC1 / N2</i>	<i>3 / 31</i>	<i>142 ± 29</i>	<i>männl.</i>	<i>180</i>	<i>131</i>
<i>d BC1 x d BB</i>	<i>BC2 / N3</i>	<i>7 / 10</i>	<i>168 ± 12</i>	<i>männl.</i>	<i>160</i>	<i>73</i>
<i>d BC2 x d BB</i>	<i>BC3 / N4</i>	<i>6 / 11</i>	<i>177 ± 29</i>	<i>männl.</i>	<i>165</i>	<i>151</i>
<i>d BC3 x d BB</i>	<i>BC4 / N5</i>	<i>4 / 7</i>	<i>173 ± 16</i>	<i>männl.</i>	<i>188</i>	<i>153</i>
<i>d BB x d BC4</i>	<i>BC5 / N6</i>	<i>6 / 10</i>	<i>174 ± 11</i>	<i>weibl.</i>	<i>175</i>	<i>161</i>
<i>d BB x d BC5</i>	<i>BC6 / N7</i>	<i>5 / 10</i>	<i>160 ± 16</i>	<i>weibl.</i>	<i>191</i>	<i>74</i>
<i>d BB x d BC6</i>	<i>BC7 / N8</i>	<i>6 / 9</i>	<i>185 ± 10</i>	<i>weibl.</i>	<i>177</i>	<i>70</i>
<i>d BB x d BC7</i>	<i>BC8 / N9</i>	<i>7 / 7</i>	<i>177 ± 10</i>			

Tab. 1: Kreuzungs – Schema:

Blutdruckmittel: diabetische Ratten 170±15mmHg, nicht-diabetische Ratten 175±20mmHg

¹Anzahl diabetischer Tiere unter allen Nachkommen des Wurfes

²Alter in Tagen mit denen die Tiere einen Diabetes entwickelten

2.2 Phänotypische Selektion

2.2.1 Systolische Blutdruckmessung

Ab einem Alter von 30 Tagen wurden alle Versuchstiere zweimal wöchentlich auf Glucosurie mittels Teststreifen (Diabur Teststreifen, Roche Deutschland), wie beschrieben, untersucht [Klötting I. et al 1997]. Die Hyperglykämie wurde bestätigt durch Messung der Blut-Glucose an zwei aufeinander folgenden Tagen. Die diabetischen Ratten erhielten ein Insulin-Implantat (LINPLANT™ LINSHIN, Canada, Scarborough, Ontario, Canada), welches die Tiere drei bis vier Wochen kontinuierlich mit Insulin versorgte.

Für die Auswahl der Zuchttiere wurde der Blutdruck wiederholt an drei verschiedenen Zeitpunkten zwischen 9 und 11 Uhr vom gleichen Untersucher nach der tail-cuff Methode (Kent Scientific Corporation, Kent England) durchgeführt. Diese Methode ist umfassend erklärt in [Klötting I. et al 1995].

2.3 Genetische Untersuchung

2.3.1 Genomanalyse mittels Mikrosatellitenmarker

Mikrosatelliten sind kurze, repetitive Sequenzmotive mit einer unterschiedlichen Anzahl von Basenpaaren, die ubiquitär im Genom verteilt sind [Field D., Wills C. 1996]. Sie weisen eine überdurchschnittlich hohe Mutationsrate in Bezug auf die Anzahl der Wiederholungen des repetitiven Elements und somit Längenpolymorphismen auf [Ellegren H. 2000].

Da sich die flankierenden Regionen von Mikrosatelliten in ihrer Sequenz als stabil erwiesen haben, eignen sie sich für die Polymerasekettenreaktion (PCR). Eine Sequenzierung der amplifizierten Fragmente ist nicht erforderlich, da sich die Allele vor allem durch Längenpolymorphismen unterscheiden. Die Differenzierung erfolgt durch Gelelektrophorese oder Fragmentanalyse.

Insgesamt wurden 768 polymorphe Mikrosatellitenmarker zwischen BB/OK und SHR/Mol genutzt, um den Genotyp der BC-Generationen zu bestimmen. In der Arbeit von 1999 [Klötting I. et al 1999] wurden 259 Mikrosatellitenprimer an jeder BC-Generation geprüft. Diese Primer Sequenzen wurden bereitgestellt von Serikawa et al. [Serikawa et al 1992], Jacob et al. [Jacob et al 1995], und Bihoreau et al. [Bihoreau et al 1997].

Da auch in der BC8-Generation noch stabile hypertonische Blutdruckwerte zu finden waren, erscheint es ausreichend, nur die BC7 und BC8 Generation mit BB/OK und SHR/Mol zu vergleichen. Im Laufe dieser Arbeit wurden 509 polymorphe Mikrosatellitenmarker, die von der Firma Invitrogen hergestellt wurden, getestet.

Mit den zusätzlichen Markern wurde es möglich, einen Großteil des Genoms der Ratte abzudecken und Lücken in den Chromosomenkarten weitestgehend zu schließen. Ziel dabei war es, Loci in den BC7 und BC8 Generationen zu finden, die heterozygot für BB/OK und SHR/Mol sind, beziehungsweise homozygot für SHR/Mol.

Alle Marker wurden vor der Genotypisierung der BC-Tiere auf Polymorphismus zwischen BB/OK und SHR/Mol verifiziert. Dazu wurden Tests mit vier verschiedenen Annealingtemperaturen (50, 55, 60, 65 Grad Celsius) pro Marker nach dem unten beschriebenen Standardprotokoll für die PCR durchgeführt. Die Annealingtemperatur mit dem stärksten PCR-Signal auf dem Agarose-Gel wurde für die anschließende PCR mit den DNA-Proben der Versuchstiere verwendet.

Im Anhang findet sich eine Auflistung aller angewendeten Mikrosatellitenmarker mit entsprechenden Positionsangaben und der Chromosomenkarten.

2.4 PCR

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Hierzu benötigt man eine thermostabile DNA-Polymerase, einen zu verlängernden DNA-Strang und zwei passende Oligonukleotidprimer. Diese Primer müssen komplementär zu dem zu amplifizierenden DNA-Segment sein. Typischerweise besteht das Programm der Polymerasenkettenreaktion aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Bei dem Denaturierungsschritt wird der Mix aus DNA, Primern und Puffern auf 94 Grad Celcius erhitzt. Hierbei kommt es zur Auftrennung des DNA-Doppelstranges. Die Einzelstrang-DNA dient im nachfolgenden Schritt als Matrize.

Durch das Absenken der Temperatur auf den für den Primer spezifischen Wert, können sich die Oligonukleotidstränge an das DNA-Segment anlagern. Die im Reaktionsgemisch vorhandene DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) und Desoxynukleotide verlängern nun bei einer spezifischen Temperatur die Primersequenz komplementär zur Matrize. In dem darauf folgenden Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation dient dieser entstandene komplementäre Strang zusätzlich als Matrize. Am Ende der Kettenreaktion ist das gewünschte DNA-Segment exponentiell amplifiziert.

	<u>H2O</u>	<u>Puff (-)</u>	<u>Mg (50mM)</u>	<u>Tween</u>	<u>Primer</u>	<u>Mix</u>	<u>DNA</u>	<u>Taq (1U/µl)</u>
<u>1 mM</u>	7	2,5	0,5	2,5	2,5 / 2,5	2,5	3,8	1,2
<u>1,5 mM</u>	6,75	2,5	0,75	2,5	2,5 / 2,5	2,5	3,8	1,2
<u>2 mM</u>	6,5	2,5	1	2,5	2,5 / 2,5	2,5	3,8	1,2

Tab. 2: Abbildung PCR-Ansatz:

Diesem Protokoll entsprechend, wurden die den Primer analogen DNA-Sequenzen zur Vervielfältigung vorbereitet. Die jeweiligen Bedingungen der Mikrosatellitenprimer sind im Anhang zu finden. (alle Angaben in µl)

<u>Programm und Temp.</u>	<u>Grad Celsius</u>	<u>Dauer</u>	
Prg. 1-3: 55°C+ 30min72°C	1	01 Zyklus	
		94°	3min
	2	35 Zyklen (a,b,c)	
	<i>a</i>	94°	30sek
	<i>b</i>	55°	1min
	<i>c</i>	72°	45sek
Prg. 4-6: 50°C+ 30min72°C	3	01 Zyklus	
		72°	3min
		4°	Hold
	4	01 Zyklus	
		94°	3min
	5	35 Zyklen (a,b,c)	
<i>a</i>	94°	30sek	
<i>b</i>	50°	1min	
<i>c</i>	72°	45sek	
Prg. 7-9: 60°C+ 30min72°C	6	01 Zyklus	
		72°	3min
		4°	Hold
	7	01 Zyklus	
		94°	3min
	8	35 Zyklen (a,b,c)	
<i>a</i>	94°	30sek	
<i>b</i>	60°	1min	
<i>c</i>	72°	45sek	
Prg. 7-9: 60°C+ 30min72°C	9	01 Zyklus	
		72°	3min
		4°	Hold

Tab. 3: Thermocycler-Programme:

Nach diesen Programmen verlief die PCR je nach spezifischer Temperatur der entsprechenden Primer. Die jeweiligen Bedingungen der Mikrosatellitenprimer sind im Anhang zu finden.

2.5 Agarosegel – Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine einfache und effektive Methode, DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 kb Länge zu trennen und zu identifizieren.

Hierzu wurde die Agarose im Elektrophoresepuffer aufgeköcht, bis sie sich gelöst hatte. Anschließend wurde das Gemisch aus Puffer und Gel in eine Kammer gegossen. Mit einem Kamm wurden in dem noch flüssigen Gel Taschen eingefügt. Durch Abkühlung kommt es zum Erstarren des Gels. Nach ca. 2 Stunden wird es in eine Elektrophoresekammer gegeben und mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. In die durch den Kamm gefertigten Taschen wurden 18 µl der mit Farbstoff markierten DNA-Proben pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung von 100 – 120 Volt wanderten die DNA-Proben entsprechend ihrer Basenpaarlänge vom Plus zum Minuspol. Nach drei und fünf Stunden wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und für die Auswertung fotografiert. Einige DNA-Amplifikate liefen acht Stunden für ein optimales Ergebnis. Nicht eindeutige Versuche wurden solange wiederholt, bis sie auswertbar waren. Für die Versuche wurden 3%ige Gele aus Agarose und 1% prozentigem Elektrophoresepuffer Tris-Borat-EDTA-Puffer hergestellt. Für die Luminisenz der DNA-Proben unter UV-Licht wurden diese zu 0,0001% mit Ethidiumbromid versetzt.

Es standen Gelkammern mit 15, 21 und 25 Taschen zur Verfügung. Pro Primer wurden insgesamt sechs DNA-Proben getestet (siehe Ergebnisse), so dass in der Kammer mit 15 Taschen zwei Primer, in der mit 21 Taschen drei Primer und in der großen Kammer vier Primer gleichzeitig untersucht werden konnten. Die Auswertung der Proben unter UV-Licht und die Fotodokumentation erfolgten mit BioDocAnalyse.

2.6 DNA-Sequenzierung

Die Analyse der DNA-Sequenzen wurde mit dem ABI 377-DNA Sequencer nach der Methode von Sanger durchgeführt. Hierbei kommt es zum Einbau von verschiedenen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden, die bei der Elongation zum Kettenabbruch führen. Da alle vier Nukleotide unterschiedlich fluoreszenzmarkiert sind, lässt sich die Sequenzierung für alle Basen gleichzeitig in einem Ansatz durchführen.

Vor der eigentlichen Sequenzierung erfolgt eine Standard-PCR (60 Grad / 35Zyklen +30min 72Grad) nach oben genannter Methode (siehe Tab. 2). 5 µl dieser Standard-PCR werden für eine Kontrollelektrophorese auf einem 2% Agarose-Gel verwendet (siehe Gelelektrophorese). Anschließend wird der restliche PCR-Ansatz nach Herstellerangaben mit einem Kit von Amersham Biosciences aufgereinigt. 3-5 µl dieses gereinigtem PCR-Produktes werden mit 4 µl PREMIX, 2 µl Puffer und 0,5 µl DMSO sowie 1 µl des jeweiligen Primers und anschließend 9,5 µl H₂O versetzt. Mit diesem Ansatz erfolgt dann eine Sequenzierungs-PCR, bestehend aus 25 Zyklen. Pro Zyklus erfolgen 10 Sekunden Denaturierung bei 96 Grad, 4 Minuten Hybridisierung mit Extension der Primer bei 60 Grad. Nach Ende des Programms werden die Proben bis zur Entnahme bei 4 Grad gelagert. Im folgenden Arbeitsschritt wird die DNA mit Alkohol gefällt. Abschließend erfolgt eine Vakuum-Trocknung der DNA. Die entstandenen Pellets werden in 4 µl Lösung Formamid/Loading Buffer (5:1) gelöst, gemischt, zentrifugiert und vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel zwei Minuten bei 90 Grad denaturiert.

Zur Herstellung des Gels wurden 21g Harnstoff bei ca. 45 Grad Celsius in 6 ml 10 x TBE, 20 ml HPLC-H₂O und 30%igem Polyacrylamid gelöst. Anschließend wurde diese Lösung mithilfe eines Filters gereinigt und 5 Minuten entgast. Vor dem Gießen in die Gelvorrichtung wurden 20 µl TEMED und 300 µl 10%ige APS-Lösung zur Polymerisation hinzugegeben. Vor dem Gießen des Gels wurden die Glasscheiben gesäubert und passgenau in ein unten geschlossenes Gestell eingelegt. Zwischen beide Scheiben werden Abstandshalter eingebracht.

Die Gellösung wurde luftblasenfrei in die entstandene Kammer gegossen. Mit dem Probenkamm wird die obere Öffnung des Gels verschlossen. Für mindestens zwei Stunden polymerisiert das Gel. Abschließend wurde der Kamm entfernt und erneut in das Gel geführt, so dass im Kamm nun die Spuren für die DNA-Proben bereitstehen. Nach der Beladung des Sequencers mit dem Gel wurde in die obere und untere Probenkammer des ABI Prism 377 DNA - Sequencer ausreichend 1xTBE Puffer hinzugefügt und die Heizplatte, Kathode und Anode angeschlossen. Anschließend wurde 1 µl der denaturierten Sequenzier-Produkte in die jeweiligen Spuren gegeben und die Elektrophorese bei zirka 45°C, 2,25 kv, 23,1 bis 50 mA und einer Laserpower von 40 mWatt gestartet.

Die gewonnenen Sequenzierdaten wurden im Internet mit Hilfe des BLAST server des National Center for Biotechnology mit bekannten Sequenzen der Ratte verglichen.

Da es sich bei der DNA-Sequenzierung um eine zeit- und kostenintensive Methode handelt, wurde sie ausschließlich bei unklaren Ergebnissen der Gelelektrophorese eingesetzt.

<i>Puffer</i>	<i>Mg</i>	<i>Tween</i>	<i>Mix</i>	<i>Primer</i>	<i>H2O</i>	<i>DNA</i>	<i>Taq (1U/µl)</i>	<i>Gesamt</i>
5	1,5	5	5	5 / 5	13,5	7,6	2,4	50

Tab. 4: Ansatz Sequenzierungs – PCR:

Entsprechend dieser Anweisung wurde das Substrat für die Sequenzierungs-PCR vorbereitet. (alle Angaben in µl)

3. Ergebnisse

3.1 Phenotypische Selektion eine erfolgreiche Strategie um Hypertonie auf Ratten zu fixieren – Vorarbeit

1997 wurden für die Genomanalyse zwischen BB/OK und SHR/Mol 259 polymorphe Mikorsatellitenmarker verwendet [Klötting I. et al 1999]. Anhand der gewonnenen Daten war ersichtlich, dass die BC1-Generation (siehe Tabelle 8) schon auf Chromosom 4, 20 und X homozygot für BB/OK war. In dieser BC-Generation waren noch 140 von 221 Loci heterozygot für BB/OK und SHR/Mol. Vergleicht man die Anzahl der heterozygoten Loci auf den verschiedenen Chromosomen, so lässt sich schlussfolgern, dass die Chromosomen 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17 und 18 die meiste Heterozygotie aufwiesen.

Der für die Kreuzung selektierte Bock der BC2-Generation zeigte einen Druck von 160 mmHg und war bereits homozygot auf allen Loci der Chromosomen 3, 8, 10, 11, 13, 15.

Alle Loci auf Chromosom 14 und 16 waren bei diesem Tier noch heterozygot, auf den anderen Chromosomen (1,2,5,11,10, 12,17,18,19) fanden sich heterozygote und homozygote Loci.

Das für die Kreuzung bestimmte Männchen der BC3-Generation (165mmHg) wies auf den Chromosomen 1, 7, 12, 14, 16, 18 und 19 heterozygote Loci auf. Im weiteren Verlauf der BC-Generationen konnte man einen zunehmenden Verlust der Heterozygotie bei stabiler Hypertonie nachweisen.

Das in der BC6-Generation ausgewählte Weibchen mit einem Mitteldruck von 177 mmHg war heterozygot für zwei Loci auf Chromosom 14 (AFP, Alb) und Chromosom 18 (D18Kyo1, Ttr). Aus der Rückkreuzung dieses Tieres mit einem BB/OK Bock entstanden sieben Nachkommen. Drei Nachkommen (ein männl., zwei weibl.) waren heterozygot für die Loci von Alpha-Fetoprotein und Albumin. Die restlichen vier Nachkommen (3 männl., 1 weibl.) waren homozygot für die Loci für BB/OK.

Obwohl für diese vier Nachkommen Homozygotie nachgewiesen werden konnte, ließ sich bei ihnen ein Blutdruckmittelwert von 173 +/- 7 mmHg feststellen. Die drei Nachkommen mit Heterozygotie auf Alpha-Fetoprotein und Albumin zeigten hinsichtlich der Höhe des Blutdruckes keine signifikanten Veränderungen (180mmHg +/- 11mmHg) im Vergleich mit den homozygoten Tieren.

Daraus konnte man schlussfolgern, dass die Loci Afp und Alb keinen direkten Einfluss auf die Höhe des Blutdruckes haben.

Alle Tiere der BC7 Generationen hatten im Mittel einen um 56 mmHg höheren Blutdruck gegenüber den BB/OK Ratten. Mit diesen Druckwerten liegen sie im unteren Grenzbereich der SHR/ Mol Ratten, die ein Druckmittel von 196 mmHg zeigten. Lässt man spontane Mutationen außer Betracht, so kommen nur heterozygote Loci für die signifikanten Blutdruckerhöhungen in Frage, da Bluthochdruck dominant von SHR vererbt wird. Von dieser Annahme ausgehend scheinen Loci auf den Chromosomen 1, 14, und 18 mitverantwortlich für die Vererbung von Hypertonie zu sein. Auf diesen Chromosomen konnte man am längsten eine Heterozygotie feststellen.

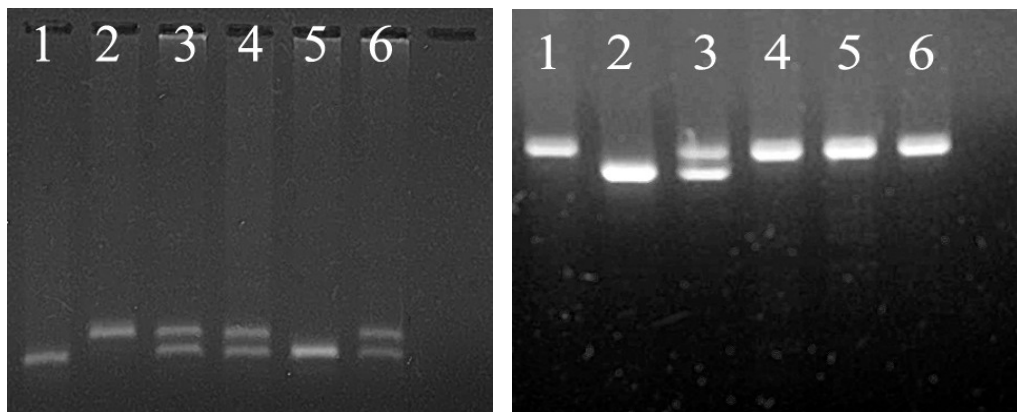


Abb. 1: Vergleich eines heterozygoten Mikrosatellitenmarkers mit einem homozygoten Marker
links=AFP, rechts:D4Rat136
(DNA: Spur 1=BB/OK, Spur 2=SHR/Mol, Spur 3=F1, Spur 4=BC7 Nr.1076, Spur 5=BC8 Nr.1174, Spur 6=BC8 Nr.1175)

3.2 Eigene Arbeiten

Für die eigenen Untersuchungen wurden weitere 509 polymorphe Marker, hergestellt von der Firma Invitrogen, genutzt, um heterozygote Loci im Genom der BC-Generationen zu finden. Da auch in den letzten BC-Generationen noch eine stabile Hypertonie vorhanden war, wurde nur im Genom von BC7 und BC8 nach heterozygoten Loci gesucht. Das Genom von sechs verschiedenen Tieren wurden verglichen. Dazu wurden die PCR-Amplifikate von BB/OK, SHR/MOL, der F1-Generation, der BC7-Generation (Tier Nr.1076) und die Amplifikate von zwei Tieren der BC8-Generation (Tier Nr. 1174, 1175) verwendet.

Die bereits in der ersten Arbeit [Klötting I. et al 1999] gewonnene Erkenntnis, dass in der BC7 und BC8-Generation nur noch wenige Loci heterozygot waren, bestätigte sich auch mit der deutlich größeren Anzahl von Mikrosatellitenmarkern. Aus diesem Grund waren insbesondere die Chromosomen 1, 14, 18 von Bedeutung. Hier wurde 1997 über die meisten Generationen Heterozygotie festgestellt. Wie aus den Abbildungen 2 und 3 ersichtlich wird, wurde insbesondere bei diesen Chromosomen versucht, die vorhandenen Lücken in den Chromosomenkarten zu füllen.

Mithilfe der Genbank NW 047419 wurden acht neue Marker im Anfangsbereich des Chromosom 14 vor den Markern Alpha-Fetoprotein und Albumin erstellt. Diese Mikrosatellitenmarker wurden als heterozygot analysiert. Die Positionsangaben der entsprechenden Primer (D14HGot6, D14Got11, D14Got17, D14Rat80, D14Got12, D14Rat6, D14Got19, D14Rat78) sind der Abbildung 2 zu entnehmen.

Chromosom 14

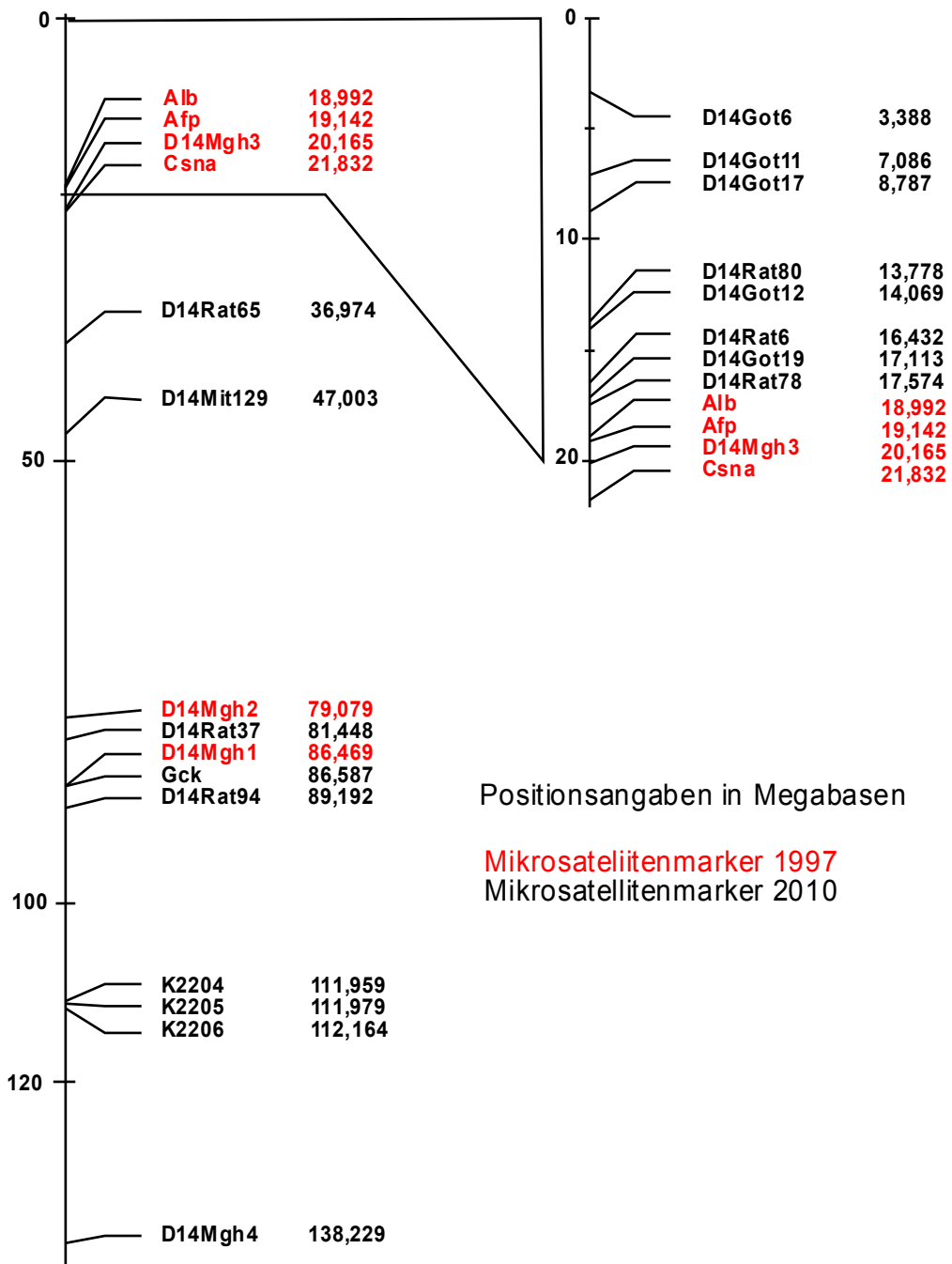


Abb. 2: Chromosomenkarte 14

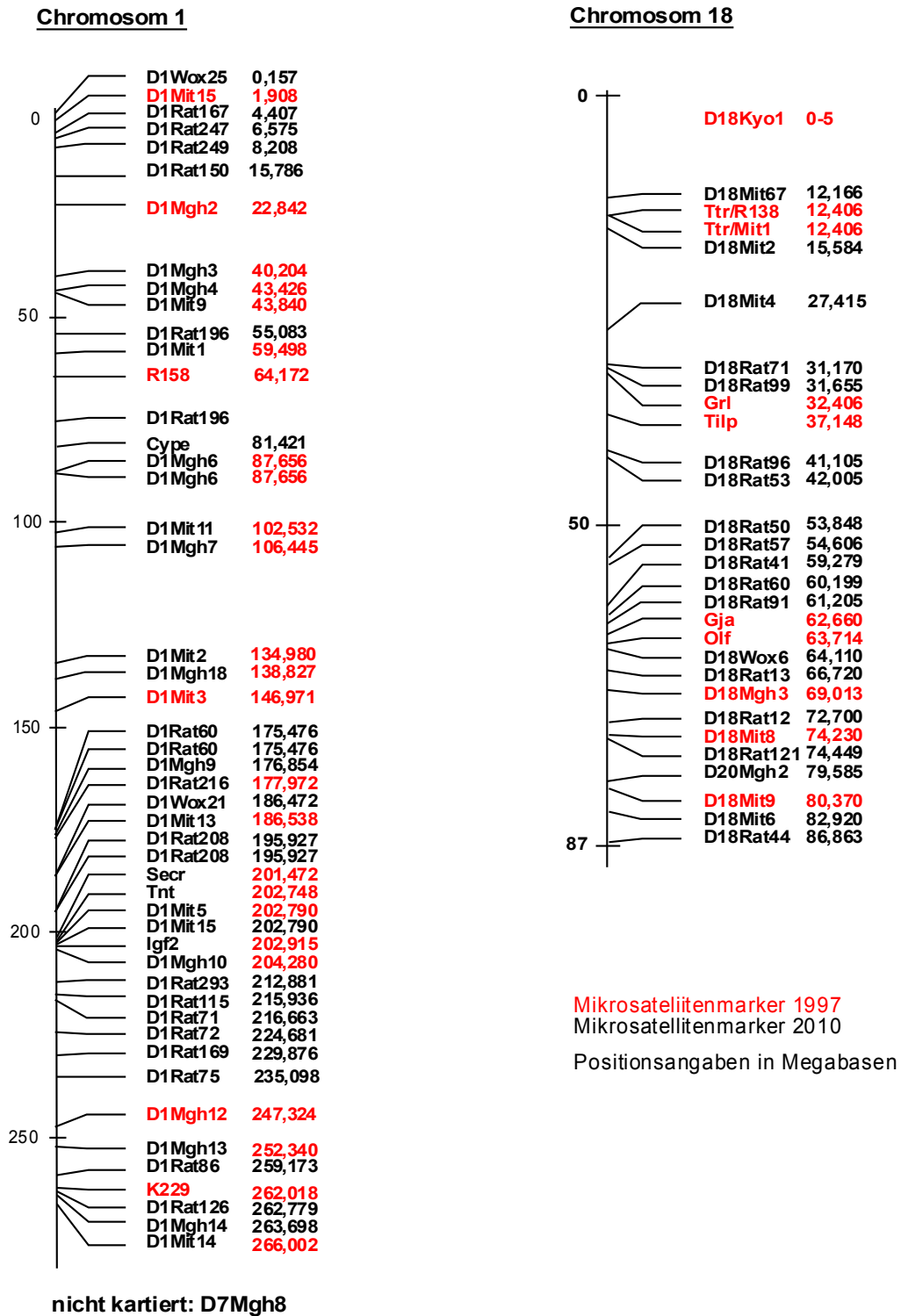


Abb. 3: Chromosomenkarte 1, 18

Als Positivkontrolle dienten zusätzlich die Primer für die Loci von Alb und AFP auf den Positionen 18,992 und 19,142 Megabasen. Während diese in der BC7-Generation heterozygot zu finden sind, kann man mindestens bei einem Tier der BC8-Generation (Tier 1175) die Heterozygotie feststellen. Bei den neu entwickelten Markern, proximal von AFP und Alb, konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Diese waren alle heterozygot für die BC7-Generation (Tier 1076) sowie heterozygot für ein Tier der BC8-Generation (Tier 1175). Untersuchungen der DNA von weiteren Tieren der BC7-Generation zeigten unwillkürlich verteilte Muster der Heterozygotie. Alle neu entwickelten Marker wiesen eine Heterozygotie bei den Tieren 4903 und 4905 auf. Die Tiere 4904 und 4906 der BC7-Generation waren jedoch homozygot BB/OK für die überprüften Mikrosatellitenmarker. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese für die acht Marker am proximalen Ende von Chromosom 14 finden sich in der Tabelle 9.

Für die Züchtung der BC8-Generation wurde 1997 ein Weibchen der BC7-Generation mit Heterozygotie für die proximalen Marker verwendet. Aus der Kreuzung dieses Tieres sind unter anderem die untersuchten Tiere 1174 und 1175 entstanden, die jedoch unterschiedliche Eigenschaften für die Marker auf Chromosom 14 besitzen. Das Tier 1175 entspricht dem Muttertier und ist heterozygot für die acht neu entwickelten Primern, während bei dem Tier 1174 Homozygotie für BB/OK bei den acht untersuchten Markern nachgewiesen werden konnte.

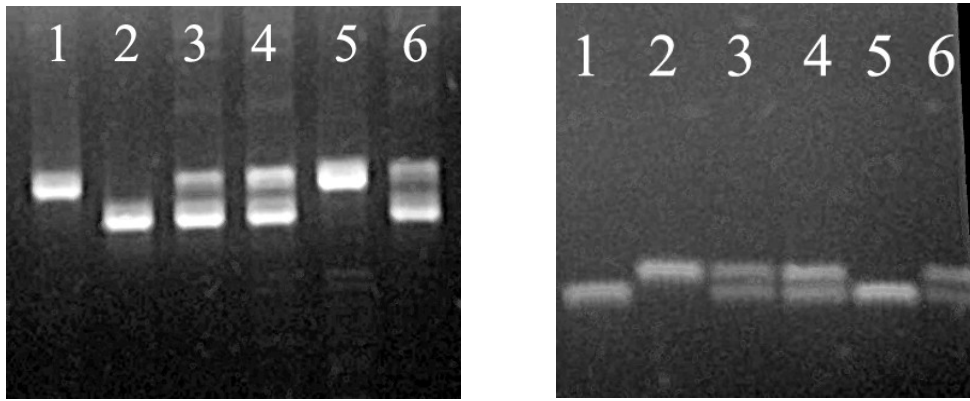


Abb. 4: Zwei heterozygote Mikrosatellitenmarker
D14Got6, D14Rat78 auf Chromosom 14 mit den Positionen 3,388 und 17,575 Megabasen
(DNA: Spur 1=BB/OK, Spur 2=SHR/Mol, Spur 3=F1, Spur 4=BC7, Spur 5=BC8 [Tier 1174], Spur 6=BC8 [Tier 1175])

Auf Chromosom 3 konnten an der Position 32,056 Mb mit dem Marker D3Rat80 Veränderungen im Genom der BC7 und BC8-Tiere identifiziert werden. (siehe Abb. 5 und Abb. 6)

Da nicht erkenntlich war, ob es sich um Heterozygotie hinsichtlich BB/OK und SHR/Mol handelt, wurde die DNA-Sequenzierung in diesem Bereich durchgeführt.

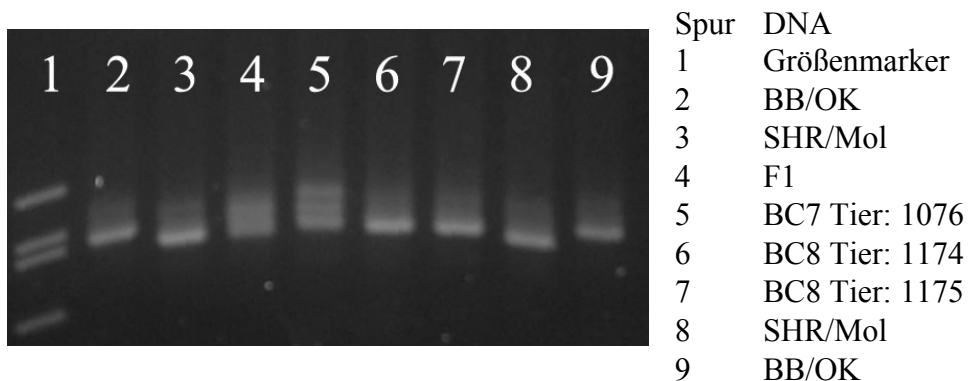
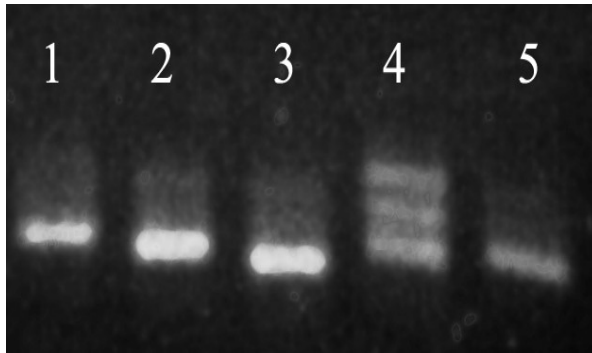


Abb. 5: Gelelektrophorese des Primers D3Rat80



Spur	DNA
1	BB/OK
2	BC8 Tier: 1174
3	SHR/MOL
4	BC7 Tier: 1076
5	BB/OK

Abb. 6: *unklares Ergebnis der Gelelektrophorese*
 Mikrosatellitenmarker D3Rat80. Tiere der BC7 und BC8-Generation
 sind nicht eindeutig BB/OK oder SHR/Mol zu zuordnen.

Auf Chromosom 3 wurden Primer in der Genbank des NCBI (UniSTS) um den Marker D3Rat80 gesucht, um diesen Bereich auf Chromosom 3 zu sequenzieren und die Unterschiede erklären zu können. Es wurden 2 Bereiche auf Chromosom 3 Contig NW_047655.1 der Genbank NCBI wie folgt sequenziert: K2350 entspricht 1.221.904 bis 1.222.572bp (D3Rat80 kartiert in diesem Sequenzierprodukt zwischen 1.222.241 bis 1.222.451bp) und K2352 markiert für 1.236.241 bis 1.236.659 bp.

Der Vergleich der Basenabfolge der einzelnen Tiere mit der Genbank des BLAST server des National Center for Biotechnology ergab einige Unterschiede. Wie Tabelle 5 zu entnehmen, finden sich im Bereich von K2352 im Contig NW 047655.1 auf Chromosom 3 Änderungen der Basenabfolgen.

Im Bereich zwischen 1236382 - 1236392 Basen sind vier neue Nukleotide (zweimal Adenin, einmal Cytosin, einmal Thymin) im DNA-Strang aller getesteten Tiere identifiziert worden. Diese neuen Nukleotide sowie die Veränderungen im Bereich zwischen 1236453 - 1236464 Basen (ein Thymin mehr) und zwischen den Basen 1236543 - 1236552 (ein Cytosin statt Adenin) deuten auf Fehler in der Genbank hin.

Position: 1236382 -1236392			
<i>Genbank vs. BB/OK</i>	<i>Genbank vs. SHR/Mol</i>	<i>Genbank vs. BC7</i>	<i>Genbank vs. BC8</i>
CACTA - -T -T -	CACTA - -T -T -	CACTA - -T -T -	CACTA - -T -T -
CACTA ACT A TT	CACTA ACT A TT	CACTA ACT A TT	CACTA ACT A TT

Position: 1236453-1236464			
<i>Genbank vs. BB/OK</i>	<i>Genbank vs. SHR/Mol</i>	<i>Genbank vs. BC7</i>	<i>Genbank vs. BC8</i>
ATTTTTTTTT-C	ATTTTTTTTT-C	ATTTTTTTTT-C	ATTTTTTTTT-C
Atttttttt c	Atttttttt c	Atttttttt c	Atttttttt c

Tab. 5: Veränderung der DNA-Sequenzen:

DNA-Sequenzen liegen auf Chromosom 3 im Contig: NW 047655.1 (nach NCBI). Positionsangaben in Basen. Grau unterlegt entspricht den veränderten Basen im Genom der getesteten Tiere, klein geschriebene Buchstaben stehen für nichtkodierende Bereiche (A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin).

Wie aus der Tabelle 6 ersichtlich, findet sich eine Punktmutation an der Position 1236549, die nur BB/OK, BC7 und die BC8-Tiere betrifft. An dieser Stelle erfolgte ein Basentausch zwischen Adenin und Thymin. Ein Basentausch von Adenin zu Cytosin konnte zwischen der Sequenz der Genbank und der DNA von BB/OK, BC7 und BC8 an der Position 1236763 nachgewiesen werden.

Das Tier der BC7-Generation lässt noch drei weitere Abweichungen erkennen (siehe Tab. 7). Im Bereich zwischen 123659 - 1236605 sind Thymin und Adenin in der Basenabfolge durch zweimal Cytosin ersetzt. An der Position 1236739 fand eine Veränderung der Basenabfolge von Guanin zu Cytosin statt. Zwischen den Basen 1236817 - 1236823 liegt eine Triplet-Modifikation vor. Das Triplet GGG ist im Genom von Tier 1076 verändert zu TCT.

Position: 1236543-1236552			
<i>Genbank vs. BB/OK</i>	<i>Genbank vs. SHR/Mol</i>	<i>Genbank vs. BC7</i>	<i>Genbank vs. BC8</i>
<i>CACGACCAGT</i>	<i>CACGACCAGTA</i>	<i>CACGACCAGT</i>	<i>CACGACCAGT</i>
<i>cccgACTAGT</i>	<i>cccgaccagt</i>	<i>cccgACTAGT</i>	<i>cccgACTAGT</i>

Position: 1236759-1236769			
<i>Genbank vs. BB/OK</i>	<i>Genbank vs. SHR/Mol</i>	<i>Genbank vs. BC7</i>	<i>Genbank vs. BC8</i>
<i>TTCTAACAGA</i>	<i>TTCTAACAGA</i>	<i>TTCTAACAGA</i>	<i>TTCTAACAGA</i>
<i>TTCTCAACAGA</i>	<i>TTCTAACAGA</i>	<i>TTCTCAACAGA</i>	<i>TTCTCAACAGA</i>

Tab. 6: Vergleich der DNA-Sequenzen:

grau: Basenänderungen, die alle untersuchten Proben betreffen
gelb: Veränderungen im Genom von BB/OK, BC7 und BC8

Weitere Abweichungen der Basenabfolge ließen sich bei der Sequenzierung der Primer K1672 (D3Rat80), K2350 und K2352 nicht nachweisen. Um weitere Erkenntnisse über diese Mutationen zu erlangen, wurden in weiteren Versuchen die DNA von anderen Tieren der Züchtung analysiert. In der Auswertung der Gelelektrophorese des Primer D3Rat80 konnten bei den Tieren 1174 und 1175 der BC8-Generation und bei dem Tier 1076 der BC7-Generationen eine veränderte Basenabfolge aufgezeigt werden. Das entstandene Sequenzierprodukt entsprach nicht mehr dem von BB/OK, SHR/Mol oder der F1-Generation. Dieses Ergebnis ließ sich auch für die DNA der Tiere der BC7-Generation und BC6-Generation feststellen. Auch in der BC5-Generation wurde diese Mutation gefunden.

Bei den Untersuchungen der Tiere der BC4 und aller anderen BC-Generationen traten noch keine Veränderungen auf. Die Mutation, in deren Folge in der Gelelektrophorese ein verändertes Sequenzierprodukt analysiert wurde, muss schlussfolgernd bei der Kreuzung der BC4-Generation mit BB/OK entstanden sein.

In der Gelelektrophorese konnten keine Unterschiede in der Größe des sequenzierten Produktes zwischen männlichen und weiblichen Tieren analysiert werden.

<i>Pos.:1236597-1236605</i>	<i>Pos.:1236737-1236742</i>	<i>Pos.:1236817-1236823</i>
<i>Genbank vs. BC7</i>	<i>Genbank vs. BC7</i>	<i>Genbank vs. BC7</i>
<i>CAGTATTC</i>	<i>GGGAGA</i>	<i>CAGGGCT</i>
<i>CAGCTTTC</i>	<i>GGCAGA</i>	<i>CATTCTCT</i>

Tab. 7: Basenveränderungen der BC7-Generation

3.3 QTL-Analysen

Auf Grundlage der QTL-Datenbank des „The Rat Genome Database“ [Twigger SN. et al 2006] wurden 29 Trait Loci des Rattenstammes SHR/Mol auf Heterozygotie überprüft. Weitere 43 QTLs für Bluthochdruck aller bei RGD gelisteten Rattenstämme konnten mit den 510 Mikrosatellitenmarkern überprüft werden. Bei den analysierten Loci konnte keine Veränderung festgestellt werden. Die untersuchten QTLs stehen somit in keinem Zusammenhang mit der Hypertonie der untersuchten Tiere.

Eine Liste mit den entsprechenden QTLs und deren Markern findet sich im Anhang (siehe Tabelle 10).

4. Diskussion

Genetische, demografische und Umweltfaktoren bestimmen die Prädisposition der primären Hypertonie. Die komplexe Interaktion der einzelnen Faktoren und die noch nicht genau geklärten Pathomechanismen der Erkrankung erschweren die Beschreibung der Ursachen.

Gegenwärtig entdecken Forschungsgruppen immer wieder neue Loci, die bei Hypertonie eine veränderte Basenabfolge aufweisen. Experimente mit Ratten, bei denen gezielt nur diese gefundenen Loci verändert wurden, bestätigen den Einfluss auf den Blutdruck. Wie in [Aneas I. et al. 2009] beschrieben, gelingt es QTLs zu isolieren und nur diese veränderten Bereiche auf normotensive Ratten zu transferieren.

Ähnliche Versuche sind in der Arbeit [Klötting I. et al 1997 (2)] beschrieben. Ausgehend von fünf verschiedenen Blutdruck - QTLs wurden 5 kongene Rattenstämme gezüchtet. Diese Experimente verfolgten das gleiche Ziel wie diese Arbeit. Es wurde nach Loci gesucht, die verantwortlich für die Manifestation der Hypertonie sind. Hierzu wurden QTLs von SHR der Chromosomen 1, 10, 18, 20 und X auf das Genom von BB/OK transferiert. Bei den kongenen Nachkommen aller Versuche konnten Blutdruckerhöhungen bestätigt werden. Es konnte aber bei keinem Tier ein Blutdruckmittel, ähnlich dem der SHR/Ratte erreicht werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die beschriebenen QTLs zwar einen Beitrag bei der Ausprägung der Hypertonie besitzen, aber nicht die Hauptursache sind.

Als Folge der Arbeit [Klötting I. et al 1997 (2)] wurde mit [Klötting I. et al 1999] der Versuch gestartet, über die phänotypische Selektion hypertensive Ratten zu generieren und deren Genom auf Ähnlichkeiten mit SHR/Mol zu analysieren.

Im Laufe der Arbeiten wurden 768 Mikrosatellitenmarker getestet. Wie im Anhang aus den Chromosomenkarten ersichtlich, konnte mit diesen Primern ein Großteil des Genoms der Ratte abgedeckt werden. Auf Chromosom 14 konnten wenige heterozygote Loci entdeckt werden.

Entsprechend den Befunden von AFP und Alb konnte die Heterozygotie in der BC7-Generation und für das Tier 1175 der BC8-Generation nachgewiesen werden. Beide Tiere der BC8-Generation weisen jedoch ähnlich hohe Blutdruckwerte auf. Im Zusammenhang mit der Erkenntnis, dass die heterozygoten Loci bisher in keiner Arbeit über Hypertonie beschrieben wurden und sich keine wichtigen Gene in diesem Bereich feststellen lassen, kann man schlussfolgern, dass diese Abschnitte für die Manifestation der Hypertonie nur bedingt verantwortlich sind. Da die gefundenen Loci am proximalen Ende des Chromosoms liegen, kann es sich auch um eine Rekombination handeln. Insbesondere an den Enden von Chromosomen besteht bei der 1. Reifeteilung der Meiose die Gefahr der intrachromosomalen Rekombination. Diese Möglichkeit muss in Betracht gezogen werden und konnte mit den durchgeführten Versuchen nicht ausgeschlossen werden.

Wie aus den Chromosomenkarten ersichtlich, finden sich noch Lücken, die mit den Primern nicht abgedeckt werden konnten. Im Bereich dieser Lücken könnten sich wenige Gene befinden, die zur Hypertonie führen. Es konnte mit dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob es sich um ein einzelnes Gen oder um mehrere Gene handelt. Man kann nur vermuten, dass es sich um einige wenige Gene handeln muss. Bekräftigt wird diese Annahme durch die Kreuzungsergebnisse der Wistar Kyoto Ratten, aus denen die SHR-Linie entstanden ist. Der SHR-Stamm wurde im Jahre 1966 durch Okamoto gezüchtet. Es wurde ein männlicher Wistar-Kyoto Bock mit milder Hypertonie und ein Weibchen mit hohem Blutdruck gekreuzt. Nach dieser Kreuzung erfolgte eine Bruder-Schwester Inzucht der Nachkommen, mit dem Zweck die Hypertonie in den folgenden Generationen zu fixieren. Nur Nachkommen, die länger als einen Monat mit erhöhtem Blutdruck lebten, wurden weiter gekreuzt. In den nächsten Generationen konnte man so einen stetigen Blutdruckanstieg mit einer Plateauphase in der F6-Generation verzeichnen. Es wurde so lange verpaart, bis Nachkommen entstanden, die Druckwerte über 180 mmHg entwickelten. Bereits in der F13-Generation konnte eine stabile Hypertonie manifestiert werden. Die neu entstandenen Ratten wurden als spontan hypertensive Ratten (SHR) bezeichnet.

Sie eignen sich gut für Ursachenforschung von Hypertonie. Die schnelle Manifestation der Erkrankung legt die Vermutung nahe, dass nur wenige Genorte für den Ausbruch der Hypertonie eine Rolle spielen [Udenfriend S. et al 1976].

Diese Annahme kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit erhärtet werden. Analysen des Rattenstammes SHR/Mol konnten 25 QTLs (RGD) aufzeigen, die an der Blutdruckregulation beteiligt sind. Ziel der Kreuzungsversuche von 1997 war es, nur die wenigen Anteile des Genoms von SHR/Moll auf BB/OK zu übertragen, die eine Rolle bei der Hypertonie besitzen. Aus den Ergebnissen konnte man erkennen, dass im Laufe der BC-Generationen immer weniger Anteile des Genoms von SHR/Mol gefunden wurden. Schließlich ließen sich in den hypertensiven BC7 und BC8-Generationen nur noch einige wenige Loci nachweisen, die von SHR/Mol stammen. Keiner der gefundenen Loci deckt sich mit den beschriebenen QTLs. In diesen Bereichen hat sich trotz der Hypertonie das Genom von BB/OK etabliert. Daraus kann man schlussfolgern, dass die bisher beschriebenen QTLs bei diesem Rattenmodell nicht ursächlich für die Hypertonie sind. Dass diese Loci an der Regulation des Blutdrucks beteiligt sind, kann man allerdings nicht ausschließen.

Durch die Sequenzierung des Markers D3Rat80 konnten Basenabweichungen im Genom aufgezeigt werden. Einige Abweichungen betreffen die DNA aller getesteten Tiere im Vergleich zur Sequenz der Genbank. Es handelt sich bei diesen Veränderungen meist um eine zusätzliche Insertion einer Base. Diese Fehler können vorkommen und deuten wahrscheinlich auf kleinere Sequenzfehler im Bereich der Genbank hin.

In der BC7-Generation konnten weitere Variationen festgestellt werden (siehe Tab. 7). Da diese ausschließlich in der BC7-Generation erscheinen, ist hier mit einer Mutation zu rechnen. Mutationen sind im Genom von Säugetieren häufig. Normalerweise beheben umfassende Reparaturwerkzeuge diese Fehler. Betrachten wir die Abweichungen in der BC7-Generation. In drei Fällen kam es zum Austausch verschiedener Basen. Da keine Insertion oder Deletion stattgefunden hat, kommt es nicht zur Verschiebung des Leserasters.

Somit sind die Mutationen wahrscheinlich von geringer Bedeutung. Die kodierten Produkte weisen wahrscheinlich nur eine geringere oder leicht gesteigerte Funktionalität auf. Zwischen den Basen 1236817 - 1236823 finden wir eine Tripletteränderung. Die Sequenz GGG ist verändert zu TCT.

Das Leseraster ist nicht verschoben und es könnte zum Einbau einer falschen Aminosäure in das kodierte Produkt kommen. Wenn man davon ausgeht, dass GGG im Leseraster liegt, kodiert dieses Triplet für Glycin, während TCT für die proteinogene Aminosäure Serin steht. Würde GGG nicht direkt im Leseraster für ein Triplet liegen, könnten maximal zwei Aminosäuren falsch kodiert werden. Selbst dieser Fehler kann vom Organismus toleriert werden. Es kann keine Aussage über eine eventuelle Schädigung getroffen werden. Die Mutationen liegen in einem kodierenden Bereich der DNA. In der Nähe befindet sich der Locus für das Protein Rnd3 (bei ca. 32,959 Mb). Dieses Protein gehört zur Familie der Rho-GTPasen und spielt eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus [Chardin P. 2006].

Weitere Aufgaben dieses Proteins sind das Zellwachstum [Villalonga P. et al 2004] und, wie alle kleinen GTPasen, eine Beteiligung an der Signalweiterleitung. Eine wichtige Funktion von RND3 ist es, die Ausbildung von Stressfasern zu hemmen [Nobes C.D. et al 1998].

Stressfasern entstehen als Reaktion der Zelle auf einwirkende Scherkräfte. Die Fasern inserieren über Adaptoren, wie Alpha-Actinin, Vinculin oder Talin, an der Plasmamembran und verankern diese über Fokalkontakte an der Unterlage. Diese Konstrukte aus Stressfasern und Adaptoren kommen insbesondere zwischen dem Gefäßendothel von Arterien und deren Basallamina vor. Andererseits dienen sie auch der Anheftung von Zellen an Fremdmaterialien. Sie sind am Muskel-Sehnen-Übergang und in der Skelett- und Herzmuskulatur zu finden [Lüllmann-Rauch R. 2003].

Eine Mutation im Bereich dieses Gens könnte dementsprechend eine gesteigerte oder herabgesetzte Funktion des Proteins zur Folge haben. Eine übersteigerte Produktion würde eine verminderte Ausbildung von Stressfasern nach sich ziehen. Dies könnte zum Kollabieren von Blutgefäßen oder Abrissen von Muskeln führen. Aufgrund des Vorkommens von Stressfasern am Herzen könnten Myokardschädigungen auftreten.

Eine Unterfunktion hingegen würde zum vermehrten Einbau von Stressfasern, und daraus resultierend zu einer vermehrten Bildung von Fokalkontakten führen. Aufgrund vermehrter Fokalkontakte könnte es bei betroffenen Gefäßen zu einer erhöhten Steifigkeit mit verminderter Elastizität kommen.

Bezogen auf die Aorta führt die geringere Elastizität während der Systole wahrscheinlich zu erhöhten Druckspitzen und damit zur Hypertonie. Daraus resultierend, muss der linke Ventrikel einen höheren Druck aufbauen, um das Blut in den Kreislauf zu pumpen, und es kommt zur Linksherzhypertrophie.

Eine erhöhte Steifigkeit des Gefäßsystems kann einen erhöhten peripheren Widerstand, mit der daraus resultierenden Hypertonie, bewirken.

Mit den gewonnenen Ergebnissen kann keine Aussage über den Umfang der Mutation getroffen werden. Nicht außer Acht zu lassen sind des Weiteren Geninteraktionen, die bei Mutationen des Loci auftreten können. Um diese Frage zu klären und die Aktivität von *Rnd3* nachzuweisen, müssten von den untersuchten Ratten Proben genommen werden. Es sind keine Arbeiten bekannt, in denen der Genort für *Rnd3* im Zusammenhang mit Hypertonie beschrieben wird.

Proteine werden nicht nur durch ein einzelnes Gen kontrolliert. Oftmals sind für eine verminderte oder verstärkte Expression mehrere Faktoren verantwortlich. Äußere Einflüsse, wie die wirkenden Scherkräfte, spielen ebenfalls eine Rolle bei der Ausbildung von Stressfasern, beziehungsweise Fokalkontakten.

Mit diesem Wissen können anhand der gewonnenen Ergebnisse nur Vermutungen angestellt werden, wie sich die veränderte Expression auswirken könnte und ob es zu einer vollständigen Fehlregulation von Stressfasern und damit unter Umständen zu einer Hypertonie kommen kann.

Anhand der Versuche konnte gezeigt werden, dass sich die Mutation bereits in der fünften Rückkreuzungsgeneration manifestiert hat.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass bei den durchgeführten Experimenten *Rnd3* eine Rolle für die Hypertonie spielen könnte. Gestützt wird diese Vermutung durch die physiologische Rolle bei der Verankerung von Zellen an der Basalmembran.

Da bei den durchgeführten Experimenten nur wenige Unterschiede im Genom der Rückkreuzungshybriden aufgedeckt werden konnten, bekräftigt die Hypothese, dass für die Vererbung der Hypertonie nur wenige Genorte verantwortlich sind. Bereits in der Arbeit von 1999 wurde von dieser Hypothese ausgegangen und sie wurde anhand der gewonnenen Ergebnisse nicht verworfen.

Mit den umfangreicheren Experimenten dieser Arbeit ist kein Gen identifiziert worden, das eindeutig für die Hypertonie verantwortlich ist. Es konnten auch nur wenige Unterschiede im Genom der Rückkreuzungshybriden im Vergleich zu den normotensiven BB/OK-Ratten gefunden werden. Nach der Hypothese, dass die essentielle Hypertonie durch viele verschiedene Genprodukte vererbt wird, müssten so auch vermehrt Mutationen beziehungsweise Eigenschaften der SHR/Mol-Ratten im Genom der Rückkreuzungsgenerationen identifiziert werden. Betrachtet man die erstellten Chromosomenkarten, so kann man feststellen, dass mit der großen Anzahl von Mikrosatellitenmarkern weite Bereiche des Genoms der Ratte abgedeckt werden konnten. Auch am Ende dieser Arbeit verbleiben Lücken im Genom, die noch groß genug sind, um größere Gene zu beinhalten. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist nun weitaus geringer, dass innerhalb dieser Lücken eine Vielzahl von Genen liegt, die zur Ausprägung von Hypertonie führen. Vielmehr verstärkt sich die Annahme, dass Hypertonie nur durch wenige Genorte vererbt wird.

Mit dem Gen *Rnd3* ist ein Genort gefunden worden, der mit hoher Wahrscheinlichkeit bei diesen Experimenten zur Hypertonie geführt hat. Bewiesen werden kann die Hypothese allerdings mit diesen Experimenten nicht. Für die Verifikation der These müssten dementsprechend weitere Experimente durchgeführt werden. So könnte in weiteren Studien versucht werden, kongene Ratten auf dem Hintergrund von normotensiven BB/OK zu züchten, die nur die gefundenen Veränderungen im Bereich von Chromosom 3 und 14 aufweisen.

Würden diese gezüchteten Hybriden eine Hypertonie oder einen signifikanten Blutdruckanstieg aufweisen, so könnte unsere These weiter bekräftigt werden.

Dass bisher im Genom von Ratten nur Genorte gefunden wurden sind, die zu einem Blutdruckanstieg von wenigen mmHg führen, bekräftigt die These der Vererbung durch wenige essentielle Gene.

Bis keine weiteren Untersuchungen vorliegen, die unsere Ergebnisse bestätigen und für unsere gefundenen Mutationen einen signifikanten Druckanstieg beweisen, existieren weiterhin beide Hypothesen über die Vererbung der essentiellen Hypertonie.

5. Literaturverzeichnis

1. Aneas I. et al. 2009: Aneas I., Rodrigues M., Pauletti B., Silva G., Carmona R., Cardoso L., Kwitek A., Jacob H., Soler J., Krieger J., Congenic strains provide evidence that four mapped loci in chromosomes 2,4, and 16 influence hypertension in the SHR, *Physiol genomics*, 2009, Vol. 37, 52-57
2. Baumgart et al. 2001: Baumgart P., Bönner G., Faulhaber H.-D., Böhm M., Schmieder R., Stolte P., Rationelle Diagnostik sekundärer Hypertonieformen, *Management Hypertonie - Journal by Fax*, 2001, ,
3. Bihoreau et al 1997: Bihoreau MT., Gauguier D., Kato N., Hyne G., Lindpainter K., Rapp JP., James MR. Lathrop GM., A linkage map of rat genome derived from three F2 crosses, *Genome Res.*, 1997, Vol. 7 No. 5, 434-440
4. Brown et al. 2003: Brown W., Beck S., Lange E., Davis C., Kay C., Langefeld C., Rich S., , Age-stratified heritability estimation in the Framingham Heart Study families, *4 Suppl 1*, 2003, , 32
5. Chardin P. 2006: Chardin P., Function and regulation of Rnd proteins, *Cell Biol*, 2006, Vol. 7, 54-62
6. Cusi & Bianchi 1998: Cusi D., Bianchi G., A primer on the genetics of hypertension, *Kidney International*, 1998, Vol. 54 No. 2, 328-342
7. Ellegren H. 2000: Ellegren H., Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference, *Trends in Genetics*, 2000, Vol. 16 No. 12, 551-558
8. 1971: Evans JG., Rose G., Hypertension, *Br.Med.Bull*, 1971, Vol 27 No 1, 37-42

9. Field D., Wills C. 1996: Field D., Wills C., Long, polymorphic microsatellites in simple organisms, *Proceedings of the Royal Society of London*, 1996, Vol. 263 No. 1367, 209-215

10. Jacob et al 1995: Jacob HJ., Brown DM., Bunker RK., Daly MJ., Dzau VJ., Goodman A., Koike G., Kren V., Kurtz T., Lernmark A., Levan G., Mao YP., Pettersson A., Pravenec M., Simon JS., Szpirer C., Szpirer J., Trolliet MR., Winer ES., Lander ES., A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*, *Nature Genet*, 1995, Vol. 9 No. 1, 63-69

11. Janhsen et al. 2008: Janhsen K., Strube H., Starker A., Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 43, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 43, 2008,,7-38

12. Julier et al. 1997: Julier C., Deleohine M., Keaveny B., Twenwillinger J., Davis S., Weeks D. et al., Genetic susceptibility for human familial essential hypertension in a region of homology with blood pressure linkage in the rat chromosome 10, *Hum Mol Genet*, 1997, Vol. 6 No. 12, 2077-2085

13. Kjeldsen et al. 2001: Kjeldsen Se., Julius S., Hedner T., Hansson L., Stroke is more common than myocardial infarction in hypertension: analysis based on 11 major randomized intervention trials, *Blood Press*, 2001, Vol 10, No 4, 190-192

14. Klötting I. et al 1997: Klötting I, Kovacs P, Kuttler B, Phenotypic consequences after restoration of lymphopenia in the diabetes-prone BB/OK rat, *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, Vol. 239 No. 1, 106-110

15. Klötting I. et al 1997 (2): Klötting I., Berg S., Kovacs P., Voigt B., Vogt L., Schmidt S., Diabetes and Hypertension in Rodent Models, *Ann N Y Acad Sci*, 1997, Vol. 20 No. 827, 64-84

16. Klötting I. et al 1999: Klötting I., Kovacs P., van den Brandt J., Phenotypic selection: a successful strategy to fix major genes of hypertension, *BiochemMol Bio Int.*, 1999, Vol. 47 No. 5, 735-742

17. Klöting I. et al 1995: Klöting I., Stielow M., Vogt L., Development of new animal models in diabetes research: spontaneously hypertensive-diabetic rats, *Diabetes Res.*, 1995, Vol. 29, 127-138
18. Klöting I., Vogt L. 1991: Klöting I., Vogt L., BB/OttawaK(arysburg) rats: features of a subline of diabetes-prone BB rats, *Diabetes Res*, 1991, Vol. 18, 79-87
19. Lewington et al. 2002: Lewington S., Clarke R., Qizilbash N., Peto R., Collins R., Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies, *Lancet*, 2002, Vol 360 No 9349, 1903-1913
20. Luft et al. 1999: Luft F. C., Mervaala E., Müller D. N., Gross V. et al., Hypertension-induced end-organ damage: A new transgenic approach to an old problem, *Hypertension*, 1999, Vol. 33 No. 1, 212-218
21. Lüllmann-Rauch R. 2003: Lüllmann-Rauch R., Histologie: Verstehen-Lernen-Nachschlagen,, 2003,,
22. Nobes C.D. et al 1998: Nobes C.D., Lauritzen I., Mattei Mg.G., Paris S., Hall A., Chardin P.J., A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and less of cell adhesion, *Cell. Biol.*, 1998, Vol. 141 No. 1, 187-197
23. 1972: Pickering G., Hypertension. Definitions, natural histories and consequences, *AM J Med.*, 1972, Vol. 52 No. 5, 570-583
24. Pinto et al. 1998: Pinto Y., Paul M., Ganten D., Lessons from hypertension: from Goldblatt to genetic engineering, *Cardiovasc Res*, 1998, Vol. 39 No. 1, 77-88
25. 1963: Platt R., Heredity in hypertension, *Lancet*, 1963, Vol. 1, 899-904
26. Rapp 2000: Rapp J., Genetic analysis of inherited hypertension in the rat, *Physiol Rev.*, 2000, Vol. 80 No. 1, 135-172

27. Rice et al. 2000: Rice T., Rao R., Perusse L., Bouchard C., Rao D.,
Tracking of familial resemblance for resting blood pressure over time in the
Quebec Family Study, *Hum Biol.*, 2000, 72, 415-431

28. Rubattu et al. 1995: Rubattu S., Struk B., Kreutz R., Volpe M., Lindpaintner
K., Animal Models of genetic Hypertension: What can we learn from
Hypertension?, *Clin. Exp. Pharm. Phys.*, 1995, Vol. 22 No. 12, 386-393

29. Serikawa et al 1992: Serikawa T., Kuramoto T., Hilbert P., Mori M., Yamada
J., Dubay CJ., Lindpaintner K., Ganten D., Guenet JL., Lathrop GM.,
Beckmann JS., Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites,
Genetics, 1992, Vol. 131, 701-721

30. Twigger SN. et al 2006: Twigger, SN, Shimoyama M, Bromberg S, Kwitek
AE, Jacob HJ; RGD Team, The rat Genome Database, update 2007-Easing the
path from disease to data and back again,, 2006,,

31. Udenfriend S. et al 1976: Udenfriend S., Bumpus F.M., Foster H.L., Freis
E.D., Hansen C.T., Lovenberg W.M., Yamori Y., Spontaneously hypertensive
(SHR) rats: Guidelines for breeding, care, and Use, *ILAR News*, 1976, , G5-G7

32. Villalonga P. et al 2004: Villalonga P., Guasch R.M., Riento K., Ridley A.J.,
RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation, *Mol.
Cell. Biol.*, 2004, Vol. 24 No. 18, 7829-7840

33. Weitz 1923: Weitz W., Zur Ätiologie der genuinen oder vaskulären
Hypertonie, *Z.klin.Med*, 1923, Vol. 96, 151-183

34. World Health Report 2002: , Reducing risk, promoting healthy life, Can J
Cardiol , 2002, Vol 22 No 7, 553-554

35. Chobanian et al. 2003: Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC,
Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr,
Roccella EJ, The Seventh Report of the Joint National Committee on
Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure
(JNC 7) , *JNC 7*, 2003, , 1-104

36. Mancia et al. 2007: Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G et al., Guidelines for the Management of Arterial Hypertension, *Eur Heart*, 2007, Vol 28 No. 12, 1462-1536
37. Mitchell et al. 1996: Mitchell B., Kammerer C., Blangero J., Mahaney M., Rainwater D., Dyke B., Hixson J., Henkel R., Sharp R., Comuzzie A., VandeBerg J., Stern M., MacCluer J., Genetic and environmental contributions to cardiovascular risk factors in Mexican Americans, *Circulation*, 1996, 94, 2159-2170

6. Anhang

Verwendete Chemikalien und Geräte

<u>Substanz</u>	<u>Firma</u>
PCR - Primer - PCR-Kit (Puffer, Mg, Taq-Polymerase) - Tween - Farbstoff-Lösung - Mix	Invitrogen Invitrogen Roche Genaxis
Agarose-Gelelektrophorese - Agarose - Ethidiumbromid (10mg/ml) - 1xTBE (verd. 10xTBE)	Serva Merck (siehe unten)
Sequenzier-PCR - Premix - Puffer - DMSO - Formamid - Loading Buffer	ABI ABI ABI ABI ABI
5% Polyacrylamidgel - 21 g Harnstoff - 8,4 ml 30% PAA - 6 ml 10xTBE - 20 ml HPLC-H ₂ O - 20 µl TEMED - 300 µl 10% APS-Lösung	BIO-RAD (siehe unten) (siehe unten) J.T.Baker Amresco (siehe unten)
10x TBE (Tris-Borat-EDTA-Lösung) - 108 g Tris Base - 55g Borsäure - 7,4g Na ₂ EDTA	AppliChem Roth Amresco
30% PAA - 29g Acrylamid - 1g Bis - 73ml HPLC-H ₂ O	BIO-RAD BIO-RAD J.T.Baker
10% APS (Ammonium Persulfat) - 1g APS - 10ml HPLC-H ₂ O	Amresco J.T.Baker

<i>Gerät</i>	<i>Firma</i>
<i>Agarosegelkammern/Elektropherese-kammern</i>	<i>VWR</i>
<i>PCR-Thermocycler</i>	<i>Techne, Thermo</i>
<i>Wasserbad</i>	<i>Omnilab</i>
<i>Magnetrührer</i>	
<i>Tischzentrifuge</i>	<i>Sigma, Hettich</i>
<i>Vortex</i>	<i>GLW</i>
<i>BioDocAnalyzer</i>	<i>Biometra</i>
<i>Waage</i>	<i>Sartorius</i>
<i>DNA-Sequenzierer 377</i>	<i>ABI</i>
<i>Vakuum-Trockner-Speedvac</i>	<i>Speedvac</i>

Tabellen

Table 2. Loci Studied in Backcross Parents

Chr	PC*	N	Polymorphic Loci between BB/OK and SHR/Mol Rats Names of loci	No. of Heterozygous Loci in Backcross Parents						
				BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC6	BC7
1	94%	27	<i>D1Mit15, DiMgh2, D1Mgh3, D1Mit9, D1Mgh4, D1Mit1, D1Mgh18, Pkc, D1Mgh6, D1Mgh7, D1Mit11, D1Mit2, D1Mit3, Sa, Lsn, Mt1pa, D1Mit5, Secr, Igf2, D7Mgh8, D1Mgh10, Tnt, Pbpc2, D1Mgh12, D1Mgh13, D1Mit14, D1Mgh15</i>	13	8	8	4	4	0	
2	93%	22	<i>D2Mit2, D2Mgh2, D2Mgh14, Mt1pb, D2Mit4, D2Mit5, D2Mit6, D2Mgh4, D2Mit7, D2Mgh6, D2Mit8, D2Mit9, D2Mit10, D2Mit11, Nkaal1b, Fgg, D2Mgh9, Atp1a1, D2Mit14, D2Mgh12, D2Mit15, D2Mit6</i>	10	10	0				
3	100%	16	<i>D3Mit1, D3Mgh10, D3Mgh1, Svp4, D3Mit2, D3Mit4, D3Mgh15, D3Mgh11, Cat, D3Mgh6, Scn2a, D3Mgh7, D3Mgh8, D3Mit10, D3Mgh16, D3Mgh17</i>	4	0					
4	92%	20	<i>Il6, D4Mgh1, D4Mit9, D4Mgh16, D4Mit6, D4Mit7, Npy, D4Mit15, Spr, Fabp1, D4Mgh17, D4Mit17, D4Mit16, D4Mgh6, D4Mgh7, D4Mgh8, D4Mgh19, Eno2, D4Mit14, D4Mgh11</i>	0						
5	100%	16	<i>D5Mgh1, D5Mgh2, D5Mgh5, D5Mit1, D5Mit9, D5Mgh6, A2ug, D5Mit3, C-jun, Glut1, Cyp4a2, D5Mgh14, D5Mgh7, D5Mgh15, D5Mgh9, Ednoe</i>	4	4	0				
6	100%	14	<i>Ckb, Ighe, D6Mgh2, D6Mgh9, D6Mgh4, D6Mit8, D6Mit1, D6Mit2, D6Mgh5, D6Mit3, D6Mit4, D6Mit9, D6pas1, D6Mit5,</i>	10	6	0				
7	100%	11	<i>Igf1, Perf, D7Mit9, D7Mit16, D7Mgh4, D7Mgh7, D7Mgh10, D7Mgh8, D7Mit7, D7Mgh9, D7Mgh11</i>	5	4	3	3	0		
8	100%	14	<i>Acaa, D8Mgh10, D8Mgh11, D8Mit1, D8Mgh4, Pkata, Cyp1a1, D8Mit2, Thy1g, Apoc2, D8Mit3, D8Mit4, D8Mit5, D8Mit6</i>	14	0					
9	87%	10	<i>D9Mit1, D9Mgh1, D9Mgh2, Inhab1, D9Mit5, Crygy, Glut, D9Mgh4, D9Mit3, D9Mit4</i>	1	0					
10	92%	18	<i>D10Mgh1, D10Mgh2, D10Mgh3, Gh, Ace, Aep, Ppy, D10Mgh5, Abp, Il4, D10Mgh6, Syb2, D10Mgh8, D10Mgh10, D10Mit9, D10Mgh11, D10Mit10, D10Mgh12</i>	18	2	0				
11	100%	8	<i>Smst, D11Mgh2, D11Mgh3, D11Mgh5, D11Mit1, D11Mit2, D11Mit4, D11Mit5</i>	8	0					
12	88%	12	<i>D12Mit8, D12Mit5, D12Mit1, D12Mit2, D12Mgh2, Plahn, Mdh2, D12Mit3, D12Mgh3, D12Mgh4, D12Mgh5, D12Mit4</i>	12	2	2	0			
13	100%	11	<i>D13Mit1, D13Mgh1, D13Mgh2, D13Mgh3, Ren, D13Mit2, D13Mgh5, D13Mgh7, Atp1a2, D13Mgh8, D13Mgh6</i>	6	0					
14	97%	6	<i>Afp, Alb, Gc, Csna, D14Mgh2, D14Mgh1</i>	6	6	6	6	6	2	2
15	96%	7	<i>D15Mit2, D15Mgh2, D15Mgh3, Eib, Ednr, D15Mgh5, D15Mgh6</i>	7	0					
16	53%	3	<i>D16Mit4, D16Mgh4, D16Mit2</i>	3	3	3	3	0		
17	92%	8	<i>D17Mgh1, D17Mit7, D17Mgh2, D17Mgh3, D17Mgh5, Acrm, D17Mit4, D17Mit5</i>	8	3	0				
18	100%	10	<i>D18Kyo1, Tr, D18Mit1, Grl, Tilp, Gjal, Olf, D18Mit8, D18Mgh3, D18Mit9</i>	10	4	4	4	2	2	0
19	85%	8	<i>D19Mgh4, D19Mit2, D19Mgh1, D19Mit5, Tat, D19Mgh6, D19Mit7, D19Mgh3</i>	1	1	1	0			
20	96%	6	<i>RT1.A, Trf, Prkacn, D20Mgh1, D20Mgh2, D20B</i>	0						
X	92%	12	<i>DXMgh1, DXMgh3, Mycs, Pfkfb1, Ar, DXWox25, DXWox26, DXWox29, DXWox17, DXWox20, DXWox21, DXWox24</i>	0						
Total	93%	259		140	53	27	20	12	4	2

* Percentage coverages of the chromosomes by studied linkage groups according to the genetic linkage map reported by Jacob et al. (1995).

Tab. 8: Loci Studied in Backcross Parents

Ergebnisse der Arbeit „Phenotypic selection a successful way to fix major genes in hypertension“ [Klötting I. et al 1999]

<i>Tier Nr.</i>	<i>Mikrosatellitenmarker</i>							
	<i>K2337</i>	<i>K2339</i>	<i>K2340</i>	<i>K2344</i>	<i>K2349</i>	<i>K2346</i>	<i>K2347</i>	<i>K2348</i>
<i>4903 (BC7)</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>
<i>4904 (BC7)</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>
<i>4905 (BC7)</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>
<i>4906 (BC7)</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>
<i>1076 (BC7)</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>
<i>1174 (BC8)</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>	<i>BB</i>
<i>1175 (BC8)</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>	<i>F1</i>

Tab. 9: Proximale Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 14

Tiere einer Generation zeigen unterschiedliche Eigenschaften bezüglich der durchgeführten Analysen. (F1: Eigenschaften von BB/OK und SHR/Mol sind im Genom vorhanden, BB: das Gen von BB hat sich durchgesetzt)

QTL`s blood pressure

Name	Chr.	Start	Stop	Marker
Bp255	1	195927908	240927908	D1Rat208, D1Rat307
Bp259	1	216662939	247322277	D1Rat71, D1Rat304, D1Mgh12
Bp260	1	154075310	231726050	D1Got228, D1Rat71, D1Rat140
Bp96	1	22842898	102532417	D1Mgh2, D1Mit1, D1Mit11
Bp322	2	156142685	210636169	D2Mgh8, D2Mgh7, D2Mgh12
Bp36	2	3429900	105503269	Agtr1b, D2Mco19, D2Mit1
Bp74	2	179302449	191378271	D2Mgh8, D2Mgh9
Bp140	3	16185366	32056774	D3Rat53, Kynu, D3Rat80
Bp151	3	14051872	44551542	D3Rat52, D3Rat130
Bp177	3	30253942	58764827	D3Rat98, D3Rat227, D3Rat180
Bp251	3	10267741	121619110	D3Rat54, D3Rat186, D3Rat17
Bp320	3	147852788	168149595	D3Rat61, D3Wox1
Bp92	3	1	38709732	D3Rat53, D3Rat53, D3Rat45
Bp178	4	5437007	36612108	D4rat2, D4Rat126, D4Mgh2
Bp179	4	15744638	36612108	D4Rat12, D4Rat126, D4mgh2
Bp330	4	456799	149181446	Dil6, D4Mit24, D4Mgh8
Bp79	4	456799	78039637	Il6, D4Mit6, D4Mit24
Bp139	5	135877124	173096209	D5Wox12, D5Wox20
Bp254	5	61080077	134872385	D5Rat9, D5Rat156, D5Rat108
Bp49	5	62555131	103059258	D5Mit9, Nppa, D5Wox4
Bp7	5	62555131	168174140	D5Mit9, Edn2, D5Mco10
Bp212	6	97561873	134379784	D6Mit8, D6Rat163, D6Mit16
Bp213	6	134379600	138919812	D6Mgh4, D6Rat78, D6Mit16
Bp61	7	108875615	123635849	D7Uia1, D7Mit11
Bp262	8	28414004	103684785	D8Rat164, D8Rat35, D8Mgh3
Bp187	11	9053659	50435443	D11Rat22, d11Rat15, D11Rat61
Bp83	12	16535858	39626712	D12Wox8, D12Wox16, D12Mit3
Bp321	16	1	819369	D16Chm66, D16Rat88
BpQTLcluster1	17	14575011	38353858	D17Mit2, Drd1a, D17Mit7
Bp224	18	32105822	77105822	D18Mit5, D18Rat57, D18Mit8
Bp225	18	32105822	77105822	D18Mit5, D18Rat57, D18Mit8
Bp226	18	32105822	77105822	D18Mit5, D18Rat57, D18Mit8
Bp227	18	48759354	60452290	D18Rat18, D18Rat57, D18Mit8
Bp228	18	32105822	77105822	D18Mit5, D18Rat57, D18Mit8
Bp229	18	48759354	72901291	D18Rat18, D18Rat57, D18Rat9
Bp230	18	15852436	72901291	D18Mgh8, D18Rat57, D18Rat9
Bp231	18	54605912	80277473	D18Mit1, D18Mit3, D18Rat57
Bp232	18	22353754	86857890	D18Mgh7, D18Rat57, D18Rat1
Bp233	18	25620884	72901291	D18Mgh9, D18Rat57, D18Rat9
Bp238	18	48759354	60452290	D18Rat18, D18Rat57, D18Mit8
Bp340	18	1	31654862	D18Rat113, D18Rat99
Bp195	20	3660638	9534510	D20Uw1, D2oUw1, D20Rat2
Bp290				D2Mgh11
Bp87				D10Mgh1, D10Mit11, Gnrhr

Tab. 10: QTLs Bluthochdruck

rot= den QTLs entsprechende getestete Mikrosatellitenmarker (RGD)

Chromosomenkarten

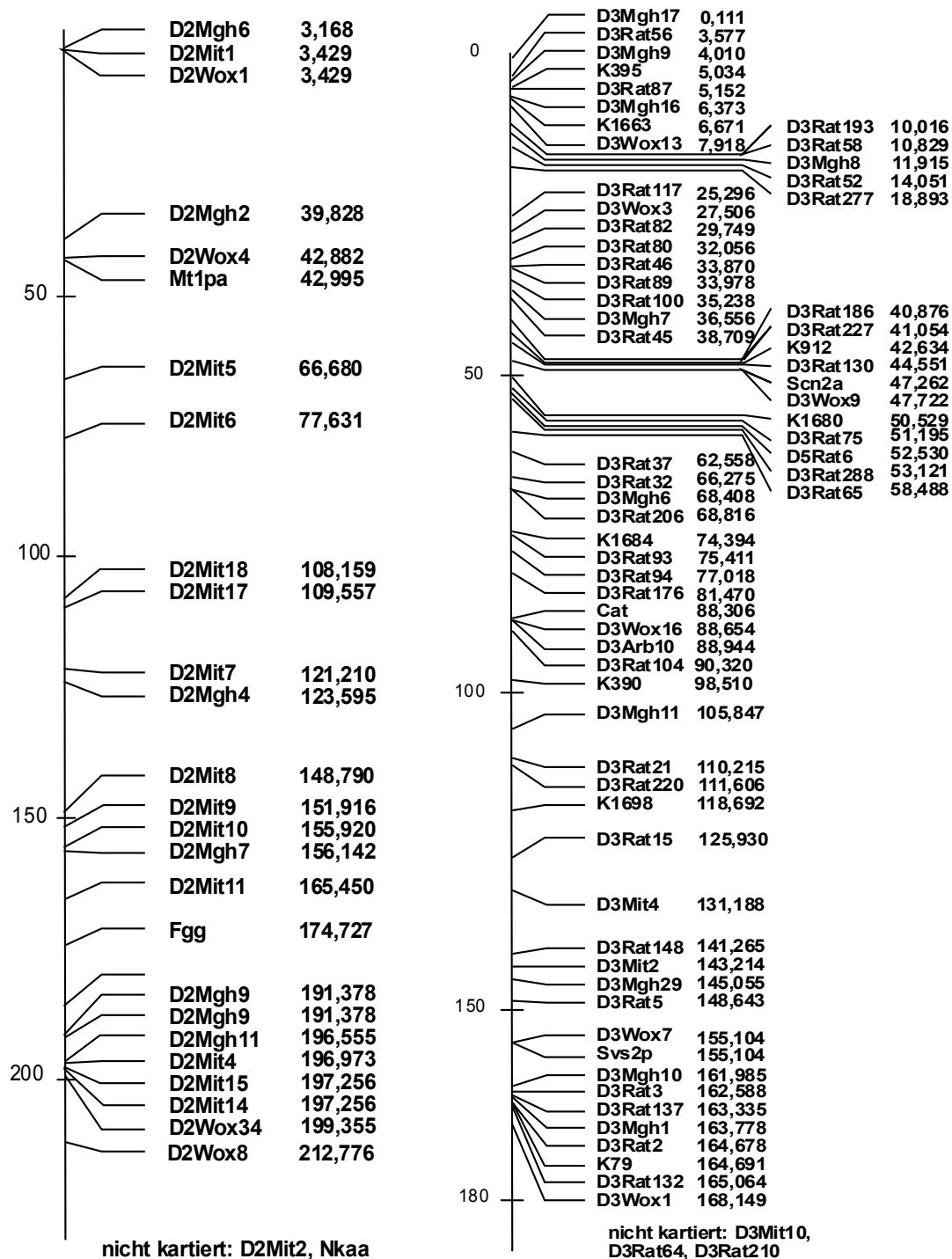


Abb. 7: Chromosom 2, 3
(Positionsangaben in Megabasen)

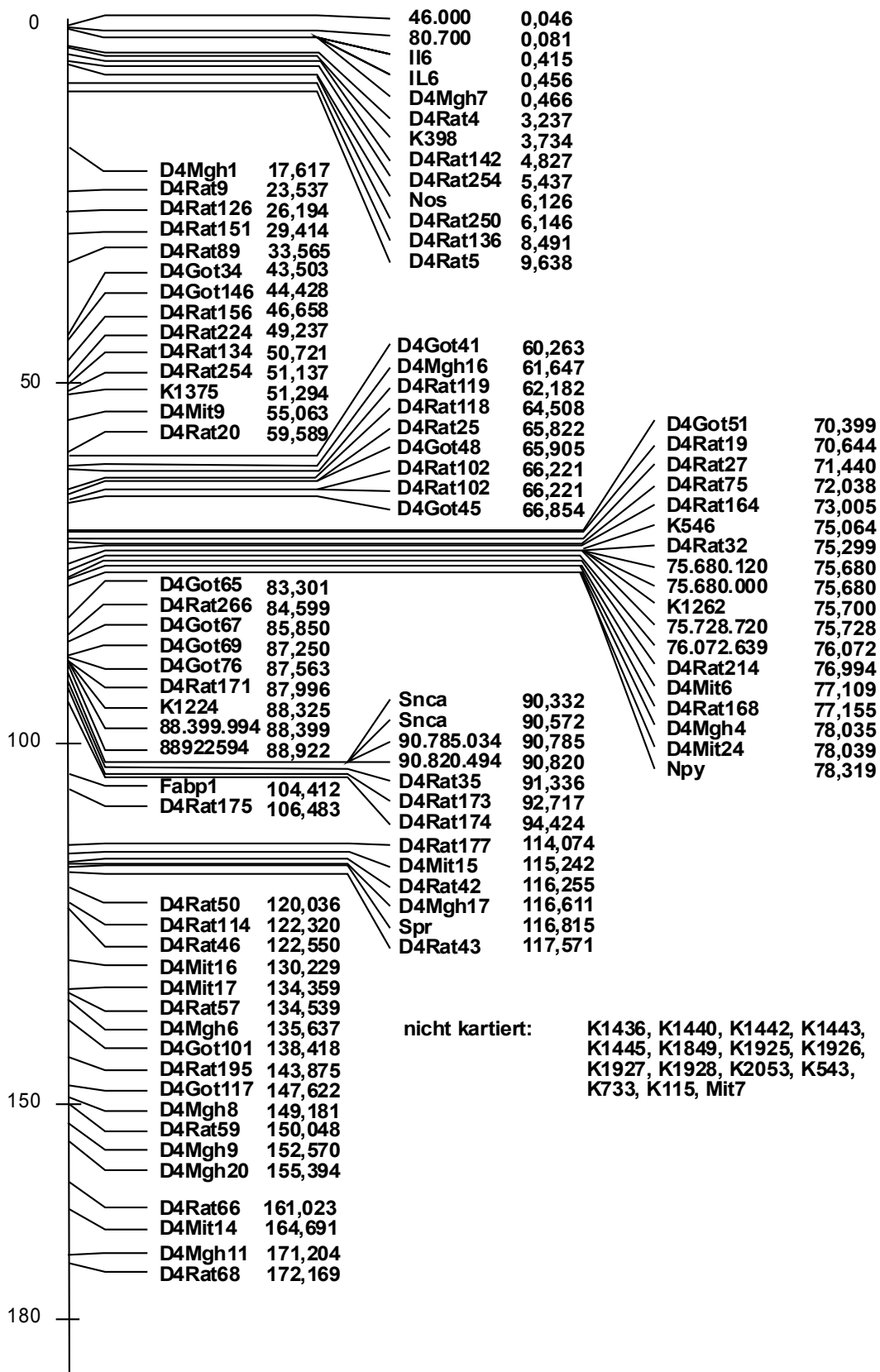


Abb. 8: *Chromosom 4*
(Positionangaben in Megabasen)

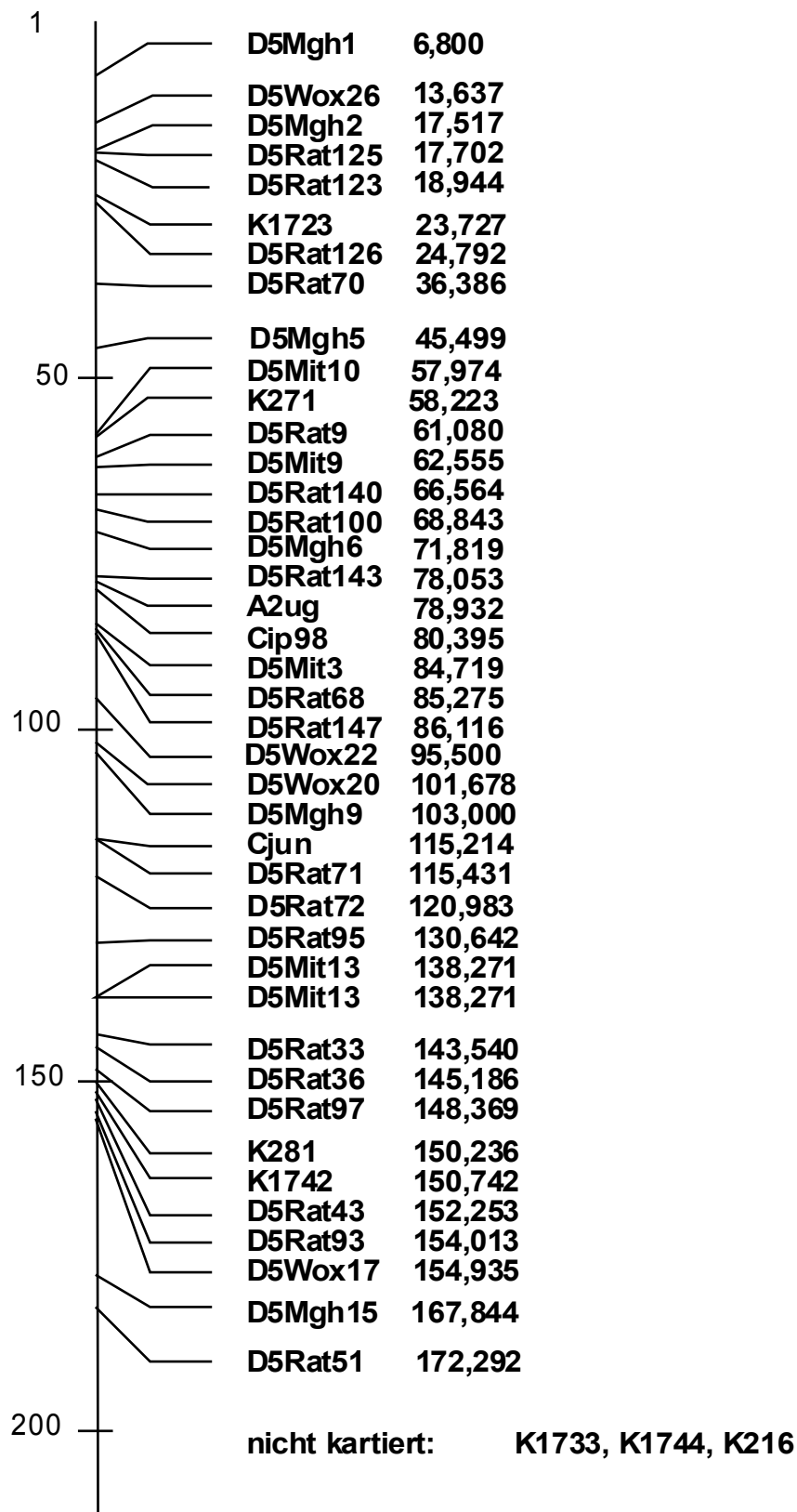


Abb. 9: *Chromosom 5*
(Positionsangaben in Megabasen)

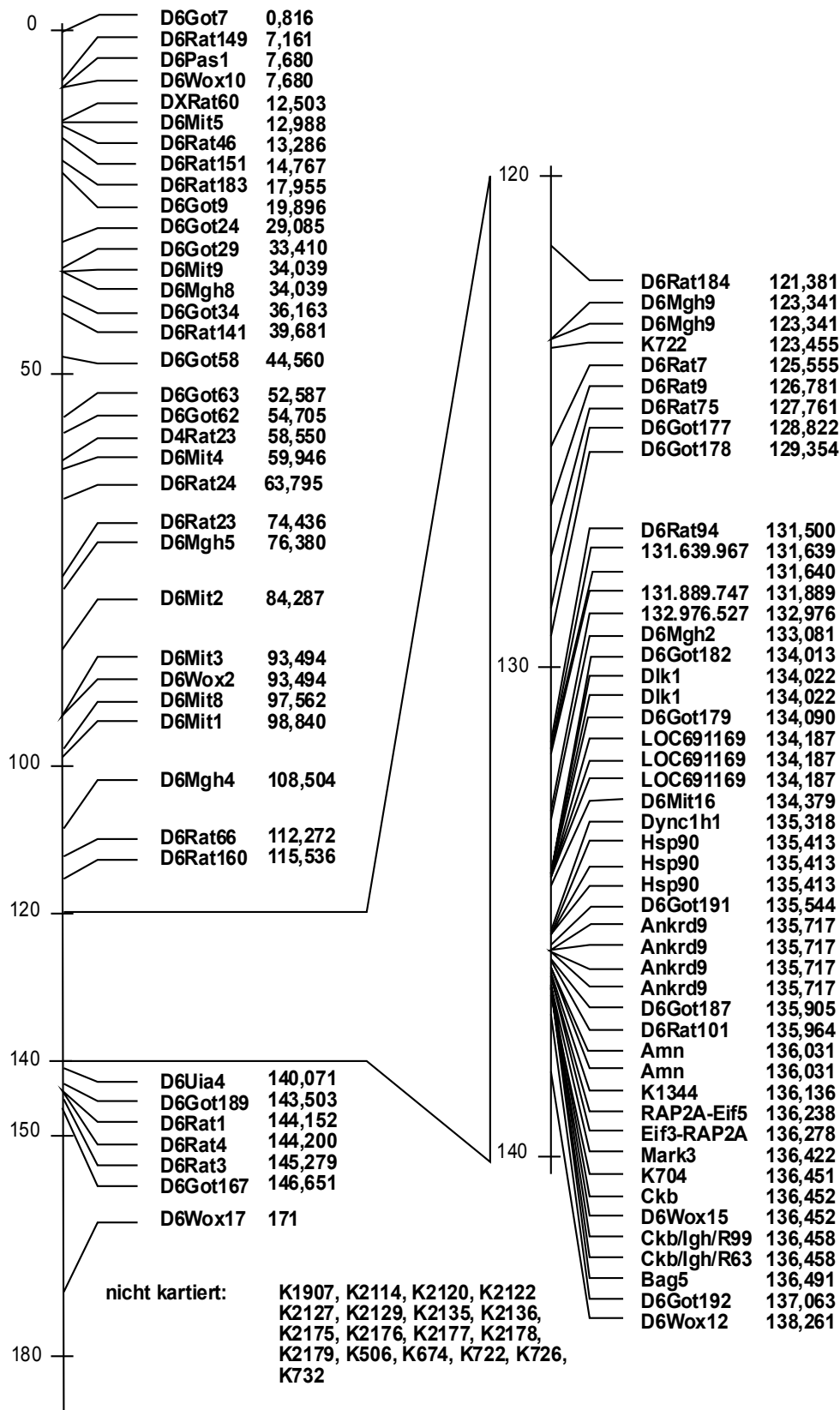


Abb. 10: Chromosom 6
(Positionsangaben in Megabasen)

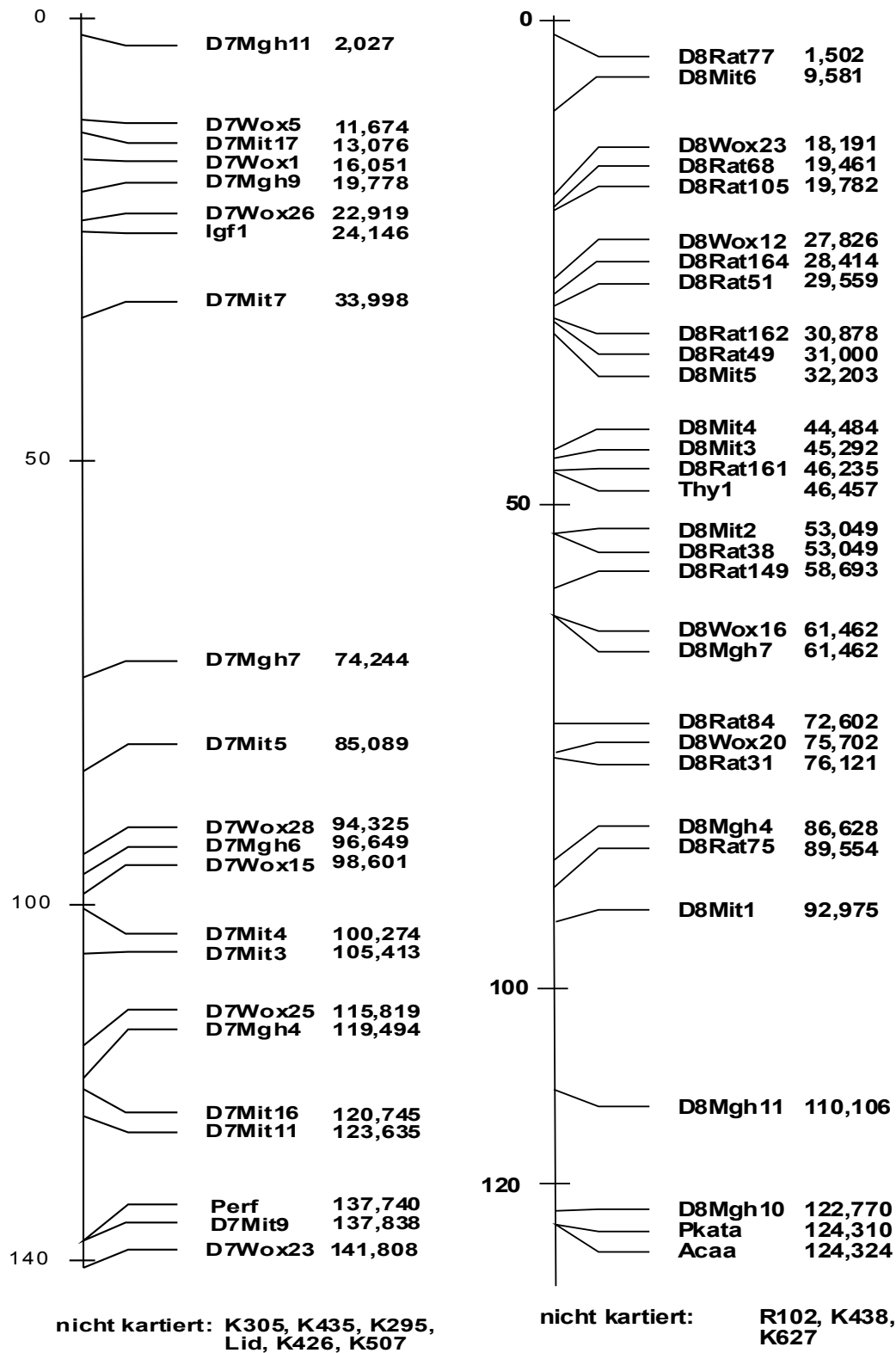


Abb. 11: Chromosom 7, 8
(Positionsangaben in Megabasen)

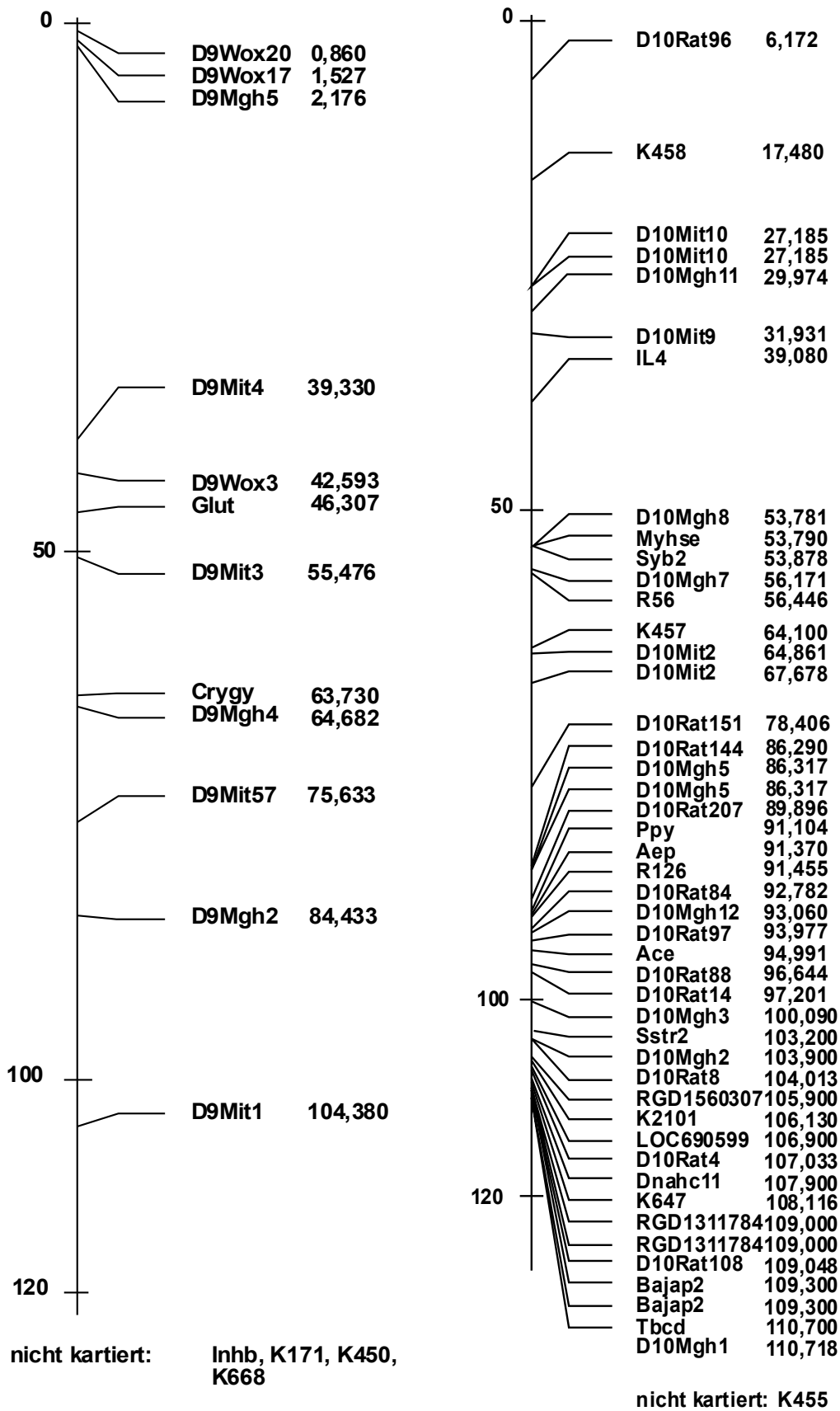


Abb. 12: Chromosom 9, 10
(Positionsangaben in Megabasen)

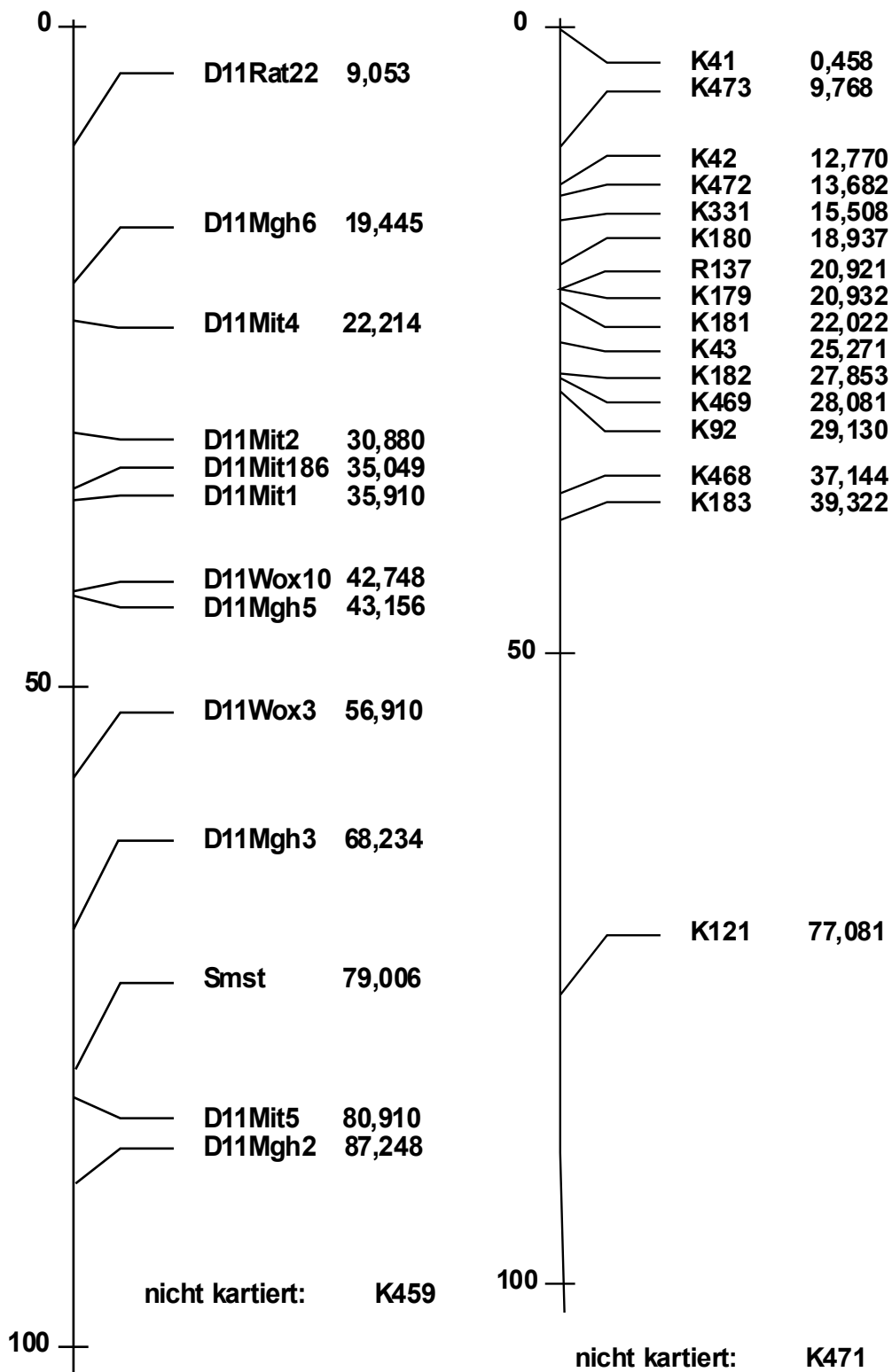


Abb. 13: *Chromosom 11, 12*
 (Positionsangaben in Megabasen)

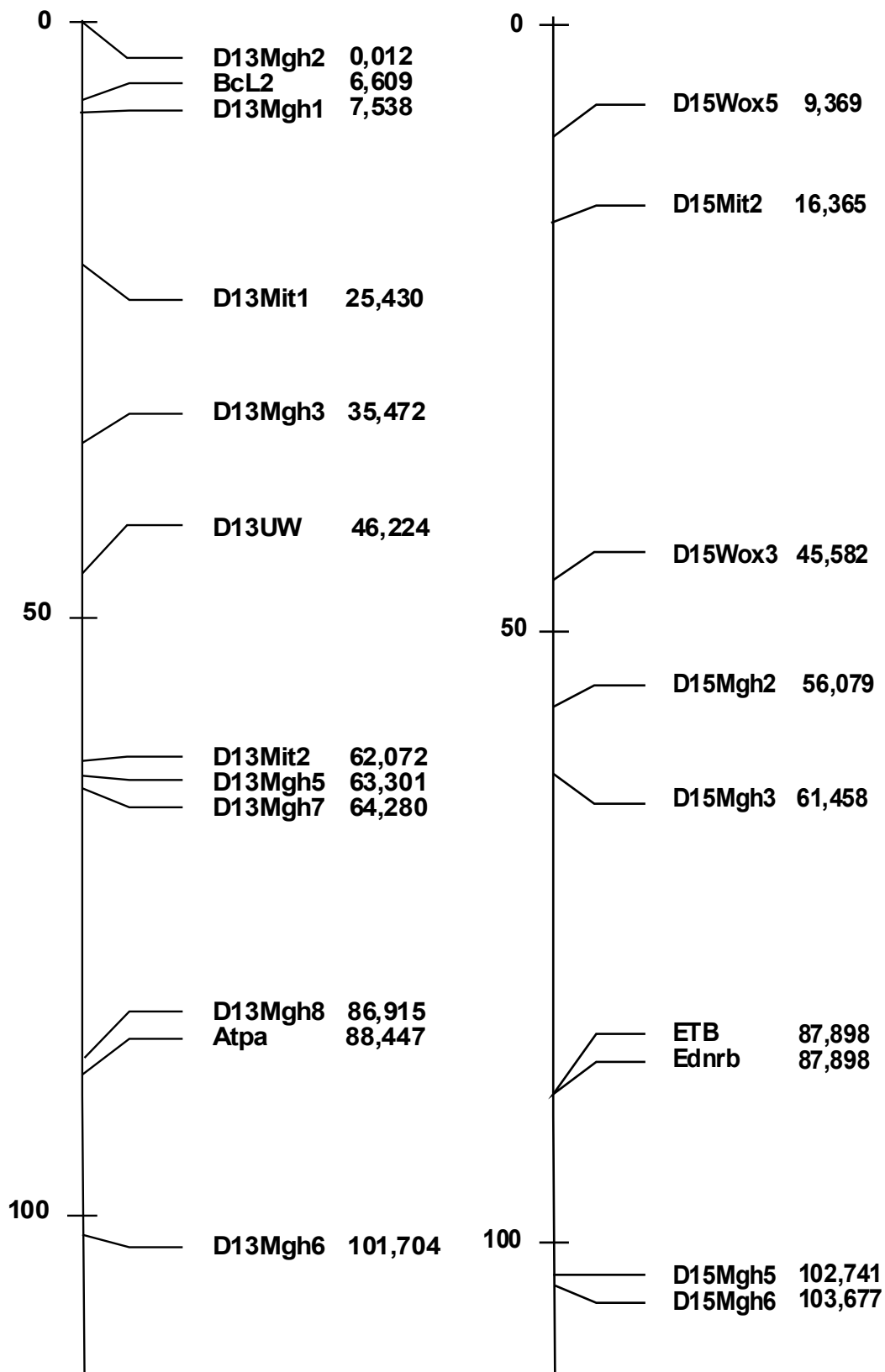


Abb. 14: Chromosom 13, 15
(Positionsangaben in Megabasen)

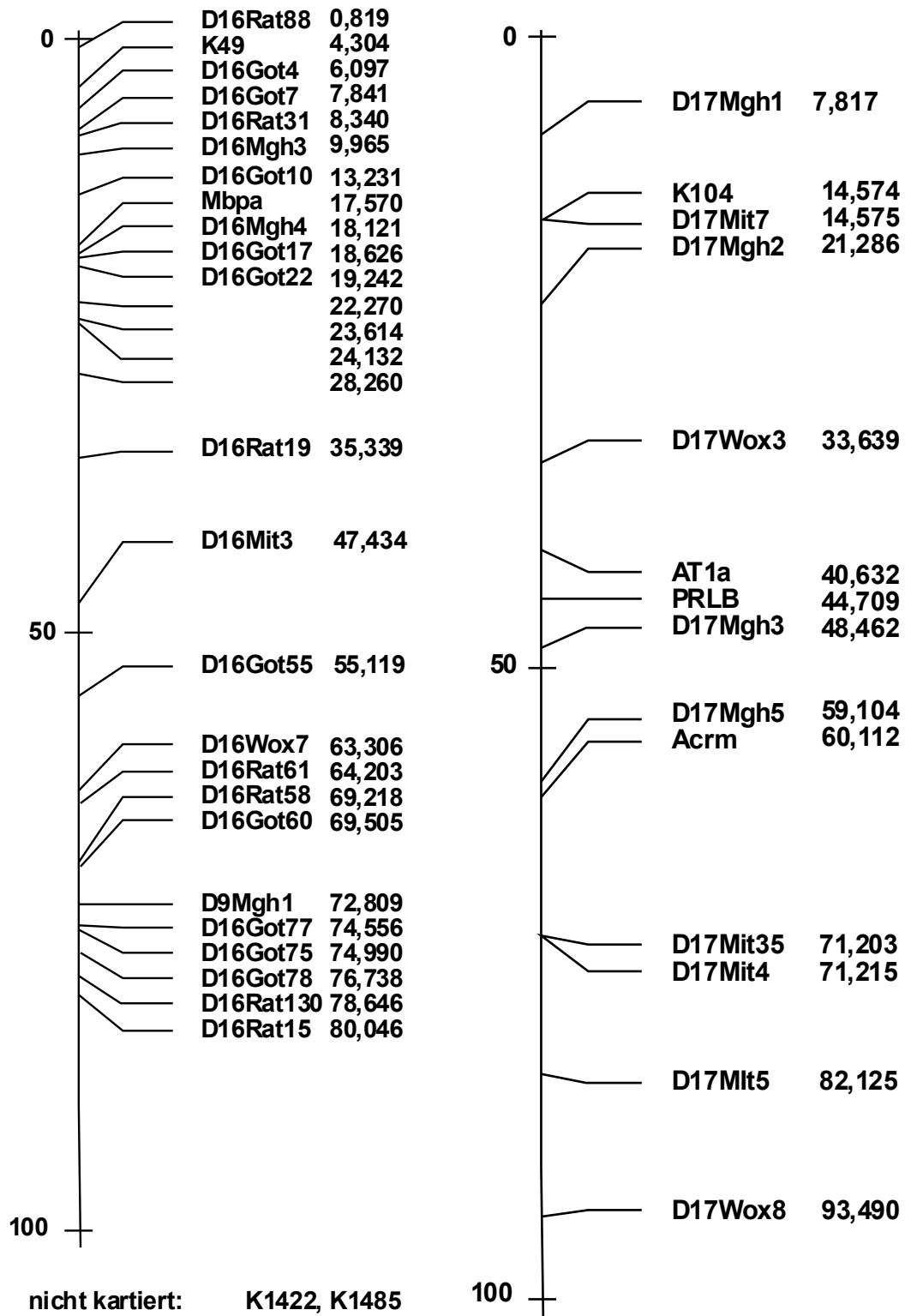


Abb. 15: Chromosom 16, 17
(Positionsangaben in Megabasen)

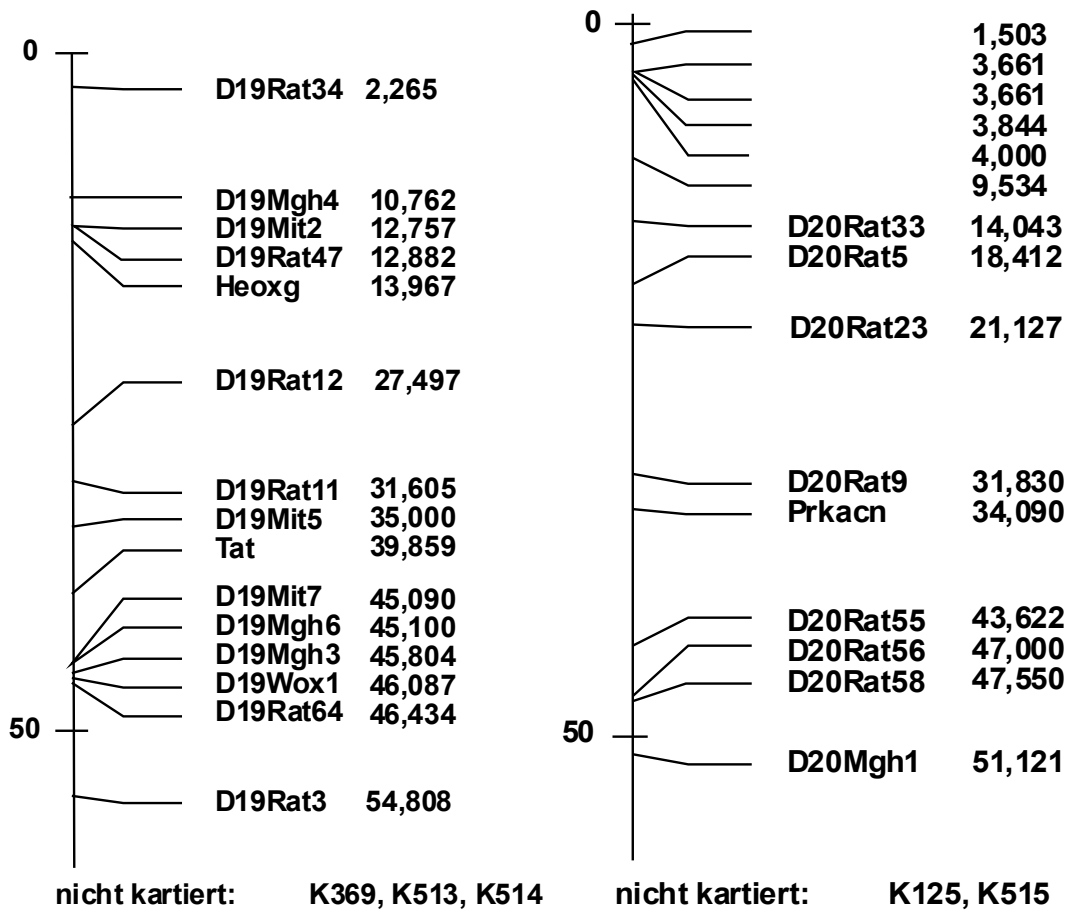


Abb. 16: Chromosom 19, 20
 (Positionsangaben in Megabasen)

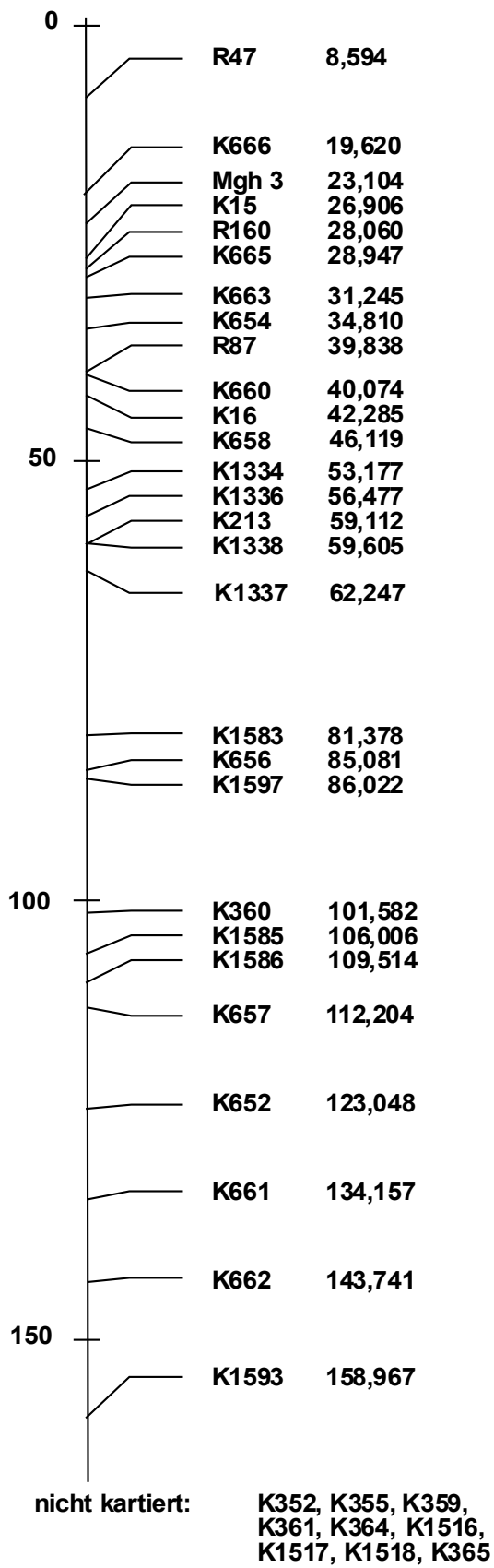


Abb. 17: Chromosom X
(Positionsangaben in Megabasen)

Mikrosatellitenmarker

Primerbedingungen

Ifd. Nr	Nr.	Marker	Chr.	Position in Mb	AT	Mg(mM)
1	K1791	D1Rat126	1	262,779	60°	1,5 + Tw.
2	K1792	D1Rat86	1	259,173	60°	1,5 + Tw.
3	K1793	D1Rat75	1	235,098	60°	1,5 + Tw.
4	K1795	D1Rat169	1	229,876	60°	1,5 + Tw.
5	K218	D1Mit9	1	43,840	55°	1,5 + Tw
6	K222	D1Mit11	1	102,532	55°	1,5 + Tw
7	K307	D7Mgh8	1		60°	1,5 + Tw
8	K370	D1Wox25	1	0,157	60°	1,5 + Tw
9	K372	D1Wox21	1	186,472	60°	1,5 + Tw
10	K523	InsR	1	2,934	55°	2 + Tw
11	K524	D1Rat249	1	8,208	55°	1 + Tw
12	K525	D1Rat150	1	15,786	55°	1 + Tw
13	K526	D1Rat167	1	4,407	55°	1,5 + Tw
14	K527	D1Rat247	1	6,575	60°	1 + Tw
15	K528	D1Rat317	1	76,439	55°	1 + Tw
16	K529	D1Rat196	1	55,083	60°	2 + Tw
17	K530	D1Rat208	1	195,927	50°	1 + Tw
18	K532	D1Rat72	1	224,681	55°	1,5 + Tw
19	K533	D1Rat60	1	175,476	55°	1 + Tw
20	K534	D1Rat293	1	212,881	55°	1,5 + Tw
21	K55	D1Mgh2	1	22,842	55°	1,5
22	K636	D1Rat71	1	216,663	60°	1,5 + Tw
23	K638	D1Rat115	1	215,936	55°	1,5 + Tw
24	K639	D1Rat60	1	175,476	55°	1 + Tw
25	K641	D1Rat208	1	195,927	55°	1,5 + Tw
26	SA 1	Sa1/D1Rat216	1	177,972	60°	1,5 + Tw
27	K111	D2Mgh9	2	191,378	55°	1,5 + Tw
28	K138	D2Mit1	2	3,429	55°	1 + Tw
29	K239	D2Mit9	2	151,916	55°	1,5 + Tw
30	K242	D2Mgh11	2	196,555	55°	1,5 + Tw
31	K374	D2Wox8	2	212,776	55°	1,5 + Tw
32	K376	D2Wox34	2	199,355	60°	1,5 + Tw
33	K377	D2Mit17	2	109,557	55°	1,5 + Tw
34	K378	D2Mit18	2	108,159	55°	1,5 + Tw
35	K381	D2Wox4	2	42,882	60°	1,5 + Tw
36	K384	D2Wox1	2	3,430	55°	1,5 + Tw
37	K61	D2Mgh7	2	156,142	55°	1,5 + Tw
38	Nkaa	Nkaa	2		55°	1,5 + Tw
39	R106	Mt1pa	2	42,995	55°	1,5
40	K1662	D3Mgh9	3	4,010	60°	1,5
41	K1663	D3Arb3	3	6,671	60°	1,5
42	K1664	D3Rat56	3	3,577	60°	1,5
43	K1665	D3Rat193	3	10,016	60°	1,5
44	K1668	D3Rat277	3	18,893	60°	1,5
45	K1670	D3Rat117	3	25,296	60°	1,5
46	K1671	D3Rat82	3	29,749	60°	1,5
47	K1672	D3Rat80	3	32,056	60°	1,5
48	K1673	D3Rat100	3	35,238	60°	1,5
49	K1674	D3Rat89	3	33,978	60°	1,5
50	K1675	D3Rat227	3	41,054	60°	1,5

lfd. Nr.	Nr.	Name	Chr.	Pos. in Mb	AT	Mg(mM)
51	K1676	D3Rat186	3	40,876	60°	1,5
52	K1677	D3Rat130	3	44,551	60°	1,5
53	K1679	D3Rat75	3	51,195	60°	1,5
54	K1680	D3Rat121	3	50,529	60°	1,5
55	K1684	D3Rat34	3	74,394	60°	1,5
56	K1685	D3Rat94	3	77,018	60°	1,5
57	K1686	D3Rat93	3	75,411	60°	1,5
58	K1687	D3Rat176	3	81,470	60°	1,5
59	K1689	D3Arb10	3	88,944	60°	1,5
60	K1690	D3Rat104	3	90,320	60°	1,5
61	K1694	D3Rat64	3		60°	1,5
62	K1695	D3Rat21	3	110,215	60°	1,5
63	K1696	D3Rat220	3	111,606	60°	1,5
64	K1698	D3Rat160	3	118,692	60°	1,5
65	K1702	D3Rat15	3	125,930	60°	1,5
66	K1703	D3Rat148	3	141,265	60°	1,5
67	K1704	D3Mgh29	3	145,055	60°	1,5
68	K1706	D3Rat210	3		60°	1,5
69	K1708	D3Rat3	3	162,588	60°	1,5
70	K1709	D3Rat137	3	163,335	60°	1,5
71	K1710	D3Rat2	3	164,678	60°	1,5
72	K2061	D3Rat58	3	10,829	65°	1,5 + Tw.
73	K2065	D3Rat288	3	53,121	60°	1,5 + Tw.
74	K2066	D3Rat65	3	58,488	65°	1,5 + Tw.
75	K2068	D3Rat32	3	66,275	55°	1,5 + Tw.
76	K251	D3Mgh17	3	0,111	55°	1,5 + Tw
77	K386	D3Wox1	3	168,149	55°	1,5 + Tw
78	K389	D3Wox7/Sys2p	3	155,104	55°	1,5 + Tw
79	K390	D3Wox23/Yy	3		55°	1,5 + Tw
80	K393	D3Wox16/Cat	3	88,654	55°	1,5 + Tw
81	K394	D3Wox9/Scn2a	3	47,722	55°	1,5 + Tw
82	K395	D3Wox25	3		55°	1,5 + Tw
83	K396	D3Wox3	3	27,506	55°	1,5 + Tw
84	K397	D3Wox13/Lip1	3	7,918	55°	1,5 + Tw
85	K537	D3Rat132	3	165,064	55°	1,5 + Tw
86	K551	D3Rat5	3	148,643	55°	1,5 + Tw
87	K552	D5Rat6	3	52,530	55°	1,5 + Tw
88	K908	D3Rat87	3	5,152	55°	1,5 + Tw
89	K909	D3Rat52	3	14,051	60°	1,5 + Tw
90	K910	D3Rat46	3	33,870	60°	1 + Tw
91	K912	D3Rat103	3	42,634	60°	1,5 + Tw
92	K913	D3Rat45	3	38,709	55°	1,5 + Tw
93	R142	Svs2p	3	155,104	55°	1,5 + Tw
94	K1012	D4Got48	4	65,905	60°	1,5 + Tw
95	K1013	D4Got45	4	66,854	60°	2 + Tw
96	K1015	D4Got51	4	70,399	60°	1,5 + Tw
97	K1016	D4Rat214	4	76,994	60°	1,5 + Tw
98	K1019	D4Got65	4	83,301	60°	1 + Tw
99	K1020	D4Rat266	4	84,599	60°	1 + Tw
100	K1021	D4Got67	4	85,850	60°	1,5 + Tw
101	K1022	D4Got69	4	87,250	60°	1,5 + Tw

lfd. Nr	Nr.	Marker	Chr.	Position in Mb	AT	Mg(mM)
102	K1023	D4Got76	4	87,563	60°	1,5 + Tw
103	K1224	88.325.179	4		60°	1,5 + Tw
104	K1225	88.399.994	4	88,399	60°	1,5
105	K1228	88922594-Snca	4	88,922	60°	1 + Tw
106	K1231	Snca	4	90,332	60°	1,5
107	K1232	Snca	4	90,572	60°	1,5
108	K1244	90.820.494	4	90,820	60°	1,5
109	K1245	75.728.720	4	75,728	60°	1,5
110	K1258	90.785.034	4	90,785	60°	1,5
111	K1260	75.680.120	4	75,680	60°	1,5
112	K1261	75.680.000	4	75,680	60°	1,5
113	K1262	75.700.120	4		60°	1,5
114	K1264	76.072.639	4	76,072	60°	1,5
115	K1277	46.000	4	0,046	60°	1,5
116	K1279	80.700	4	0,081	60°	1,5
117	K1323	D4Got34	4	43,503	60°	1,5
118	K1325	D4Rat254	4	51,137	60°	1,5
119	K1326	D4Rat142	4	4,827	60°	1,5
120	K1327	D4Rat254	4	5,437	60°	1,5
121	K1328	D4Rat250	4	6,146	60°	1,5
122	K1329	D4Rat136	4	8,491	60°	1,5
123	K1330	D4Rat5	4	9,638	60°	1,5
124	K1373	D4Got146	4	44,428	60°	1,5
125	K1374	D4Rat224	4	49,237	60°	1,5
126	K1375	D4-WASP	4	51,294	60°	1,5
127	K1436		4		60°	1,5
128	K1440		4	62,734	60°	1,5
129	K1442		4	66,909	60°	1,5
130	K1443		4	66,144	60°	1,5
131	K1445		4	67,112	60°	1,5
132	K1457	D4Rat46	4	122,550	60°	1,5
133	K1458	D4Got101	4	138,418	60°	1,5
134	K1459	D4Got106	4	140,372	60°	1,5
135	K1460	D4Got117	4	147,622	60°	1,5
136	K1484	D4Rat68	4	172,169	60°	1,5
137	K1712	D4Mit24	4	78,039	60°	1,5
138	K1713	D4Mgh4	4	78,035	60°	1,5
139	K1849	R122-2M	4		60°	1,5 + Tw.
140	K2053		4		65°	1,5+Tw.+DMSO
141	K215	Nos	4	6,126	55°	1,5 + Tw
142	K264	D4Mgh9	4	152,570	55°	1,5 + Tw
143	K398	D4Wox29	4	373,480	55°	1,5 + Tw
144	K538	D4Rat102	4	66,221	55°	1 + Tw
145	K543	D4Rat148	4		55°	1 + Tw
146	K544	D4Rat156	4	46,658	55°	1,5 + Tw
147	K545	D4Rat4	4	3,237	55°	1,5 + Tw
148	K546	D4Rat28	4		60°	1,5 + Tw
149	K547	D4Rat9	4	23,537	55°	1,5 + Tw
150	K553	D4Rat151	4	29,414	55°	1,5 + Tw
151	K605	D4Rat66	4	161,023	60°	1,5 + Tw
152	K606	D4Rat57	4	134,539	55°	1,5 + Tw
153	K607	D4Rat59	4	150,048	60°	1,5 + Tw

lfd. Nr	Nr.	Marker	Chr.	Position in Mb	AT	Mg(mM)
154	K609	D4Rat195	4	143,875	60°	1,5 + Tw
155	K610	D4Rat114	4	122,320	55°	1,5 + Tw
156	K612	D4Rat126	4	26,194	60°	1,5 + Tw
157	K613	D4Rat89	4	33,565	60°	1,5 + Tw
158	K616	D4Rat177	4	114,074	55°	1,5 + Tw
159	K617	D4Rat27	4	71,440	55°	1,5 + Tw
160	K623	D4Rat134	4	50,721	55°	1,5 + Tw
161	K733	D4Rat21	4		55°	1,5 + Tw
162	K734	D4Rat102	4	66,221	55°	1,5 + Tw
163	K736	D4Rat118	4	64,508	55°	1,5 + Tw
164	K737	D4Rat119	4	62,182	55°	1,5 + Tw
165	K739	D4Rat164	4	73,005	55°	1,5 + Tw
166	K740	D4Rat168	4	77,155	55°	1,5 + Tw
167	K742	D4Rat75	4	72,038	55°	1,5 + Tw
168	K926	D4Rat25	4	65,822	55°	1 + Tw
169	K928	D4Rat19	4	70,644	55°	1 + Tw
170	K929	D4Rat32	4	75,299	55°	1 + Tw
171	K930	D4Rat20	4	59,589	55°	1 + Tw
172	K936	D4Got41	4	60,263	55°	1 + Tw
173	K991	D4Rat171	4	87,996	55°	1,5 + Tw
174	K992	D4Rat173	4	92,717	55°	1,5 + Tw
175	K993	D4Rat174	4	94,424	60°	2 + Tw
176	K994	D4Rat175	4	106,483	60°	2 + Tw
177	K995	D4Rat42	4	116,255	60°	2 + Tw
178	K996	D4Rat43	4	117,571	55°	2 + Tw
179	K997	D4Rat50	4	120,036	55°	2 + Tw
180	K152	D5Mit3	5	84,719	55°	1
181	K1720	D5Rat125	5	17,702	60°	1,5
182	K1721	D5Rat123	5	18,944	60°	1,5
183	K1722	D5Rat126	5	24,792	60°	1,5
184	K1723	D5Rat128	5	23,727	60°	1,5
185	K1724	D5Rat70	5	36,386	60°	1,5
186	K1725	D5Rat100	5	68,843	60°	1,5
187	K1726	D5Rat143	5	78,053	60°	1,5
188	K1728	D5Rat68	5	85,275	60°	1,5+Tw.+DMSO
189	K1729	D5Rat147	5	86,116	60°	1,5
190	K1733	D5Rat159	5		60°	1,5
191	K1734	D5Rat95	5	130,642	60°	1,5
192	K1737	D5Rat33	5	143,540	60°	1,5
193	K1738	D5Rat36	5	145,186	60°	1,5
194	K1739	D5Rat97	5	148,369	60°	1,5
195	K1740	D5Rat43	5	152,253	60°	1,5
196	K1741	D5Rat93	5	154,013	60°	1,5
197	K1743	D5Rat67	5	150,742	60°	1,5
198	K1744	D5Rat205	5		60°	1,5
199	K1745	D5Rat51	5	172,292	60°	1,5 + Tw.
200	K1929	D5Rat140	5	66,564	65°	1,5 + Tw.
201	K1930	D5Rat9	5	61,080	60°	1,5 + Tw.
202	K1935	D5Rat72	5	120,983	60°	1,5 + Tw.
203	K1936	D5Rat71	5	115,431	60°	1,5 + Tw.
204	K216	Ednce	5		55°	1,5 + Tw
205	K272	D5Mit9	5	62,555	55°	1,5 + Tw
206	K281	D5Mgh14	5	150,236	55°	1,5 + Tw

lfd. Nr	Nr.	Marker	Chr.	Position in Mb	AT	Mg(mM)
207	K404	D5Wox26	5	13,637	55°	1,5 + Tw
208	K406	D5Mit10	5	57,974	55°	1,5 + Tw
209	K408	D5Wox22	5	95,500	50°	1,5 + Tw
210	K409	D5Wox20	5	101,678	55°	1,5 + Tw
211	K412	D5Wox17	5	154,935	55°	1,5 + Tw
212	R44	A2ug	5	78,932	55°	1
213	K1046	D6Got178	6	129,354	55°	1,5 + Tw
214	K1048	D6Got191	6	135,544	55°	1,5 + Tw
215	K1049	D6Got189	6	143,503	60°	2 + Tw
216	K1050	D6Got177	6	128,822	55°	1,5 + Tw
217	K1051	D6Got187	6	135,905	55°	1,5 + Tw
218	K1052	D6Got192	6	137,063	55°	1,5 + Tw
219	K1053	D6Uia4	6	140,071	55°	2 + Tw
220	K1156	Chr6-Sequenzierung	6	133,199	60°	1,5
221	K1157	Chr6-Sequenzierung	6	133,234	60°	1,5
222	K1160	Chr6-Sequenzierung	6	133,245	60°	1,5
223	K1176	Chr6-Sequenzierung	6	133,312	60°	1,5
224	K1179	Chr6-Sequenzierung	6	133,319	60°	1,5
225	K1190	Chr6-Sequenzierung	6	133,341	60°	1,5
226	K1200	Chr6-Sequenzierung	6	133,361	60°	1,5
227	K1251	131.639.967	6	131,639	60°	1,5
228	K1252		6	131,640	60°	1,5
229	K1253	131.889.747	6	131,889	60°	1,5
230	K1255	132.976.527	6	132,976	60°	1,5
231	K1269	D6Got7	6	0,816	60°	1,5
232	K1270	D6Got9	6	19,896	60°	1,5
233	K1272	D6Got29	6	33,410	60°	1,5
234	K1275	D6Rat23	6	74,436	60°	1,5
235	K1339	Mark3	6	136,422	60°	1,5 + Tw
236	K1342	Eif3-RAP2A	6	136,278	60°	1,5 + Tw
237	K1343	RAP2A-Eif5	6	136,238	60°	1,5 + Tw
238	K1344	Cdc42	6	136,136	60°	1,5
239	K1395	D6Got24	6	29,085	60°	1,5
240	K1396	D6Got34	6	36,163	60°	1,5
241	K1398	D6Got58	6	44,560	60°	1,5
242	K1400	D6Got63	6	52,587	60°	1,5
243	K1401	D6Got62	6	54,705	60°	1,5
244	K1402	D6Rat24	6	63,795	60°	1,5
245	K154	D6Mit1	6	98,840	55°	1,5 + Tw
246	K159	D6Pas1	6	7,680	60°	1,5 + Tw
247	K1907	Gtl2-S	6		60°	1,5 + Tw.
248	K2081	Ckb	6	136,452	60°	1,5 + Tw.
249	K2114	Mir370	6		60°	1 + Tw.
250	K2117	LOC691169	6	134,187	60°	1,5 + Tw.
251	K2119	LOC691169	6	134,187	60°	1,5 + Tw.
252	K2120	mir-770	6		60°	1,5 + Tw.
253	K2122(1+3)	mir-433	6		60°	1,5 + Tw.
254	K2127	mir-323	6		60°	1,5 + Tw.
255	K2129	mir-176c/-176b	6		60°	1,5 + Tw.
256	K2135	mir-453	6		60°	1,5 + Tw.
257	K2136	mir-409/12/-369	6		60°	1,5 + Tw.
258	K2175	mir136	6		60°	1,5 + Tw.
259	K2176	mir381	6		60°	1,5 + Tw.

lfd. Nr	Nr.	Marker	Chr.	Position in Mb	AT	Mg(mM)
260	K2177	LOC691169	6		60°	1,5 + Tw.
261	K2178	LOC691169	6		60°	1,5 + Tw.
262	K2179	LOC691169	6		60°	1,5 + Tw.
263	K2240		6	28,480	60°	1,5 + Tw.
264	K2242		6	28,544	60°	1 + Tw.
265	K2244		6	28,609	60°	1,5 + Tw.
266	K2246		6	28,727	60°	1,5 + Tw.
267	K2248		6	28,746	60°	1,5 + Tw.
268	K2249		6	28,791	60°	1,5 + Tw.
269	K2250		6	28,925	60°	1,5 + Tw.
270	K2251		6	29,014	65°	1,5 + Tw.
271	K2253		6	29,227	60°	1,5 + Tw.
272	K2254		6	29,296	60°	1,5 + Tw.
273	K2255		6	29,390	60°	1 + Tw.
274	K2257		6	29,444	60°	1,5 + Tw.
275	K416	D6Wox2	6	93,494	55°	1,5 + Tw
276	K417	D6Wox17	6	171,000	55°	1,5 + Tw
277	K420	D6Wox10	6	7,680	55°	1,5
278	K506	D6Kyo4	6		55°	1,5 + Tw
279	K549	D6Rat184	6	121,381	55°	1,5 + Tw
280	K554	D6Rat160	6	115,536	60°	1,5 + Tw
281	K556	D6Rat101	6	135,964	55°	1,5 + Tw
282	K557	D6Rat3	6	145,279	55°	1,5 + Tw
283	K621	D4Rat23	6	58,550	55°	1,5 + Tw
284	K625	D6Rat66	6	112,272	55°	1,5 + Tw
285	K664	DXRat60	6	12,503	55°	1,5 + Tw
286	K674	D6Rat401	6		55°	1,5 + Tw
287	K675	D6Rat149	6	7,161	55°	1,5 + Tw
288	K676	D6Rat46	6	13,286	55°	1,5 + Tw
289	K679	D6Rat141	6	39,681	55°	1,5 + Tw
290	K703	D6Wox15	6	136,452	65°	1,5 + Tw
291	K704	D6Wox13	6	136,451	55°	1 + Tw
292	K706	D6Rat151	6	14,767	55°	2 + Tw
293	K708	D6Rat1	6	144,152	55°	1,5 + Tw
294	K720	D6Wox12	6	138,261	55°	1,5 + Tw
295	K722	D6Rat6	6		55°	1,5 + Tw
296	K723	D6Rat7	6	125,555	55°	1,5 + Tw
297	K725	D6Rat9	6	126,781	55°	1,5 + Tw
298	K726	D6Rat10	6		55°	1,5 + Tw
299	K727	D6Rat75	6	127,761	55°	1,5 + Tw
300	K729	D6Rat94	6	131,500	55°	1,5 + Tw
301	K731	D6Rat183	6	17,955	55°	1,5 + Tw
302	K732	D6Rat90	6		55°	1,5 + Tw
303	K907	D6Mit16	6	134,379	60°	1,5 + Tw
304	K935	D6Got167	6	146,651	55°	1,5 + Tw
305	K960	D6Got179	6	134,090	60°	1 + Tw
306	K961	D6Got182	6	134,013	55°	1,5 + Tw
307	K161	D7Mit4	7	100,274	60°	1 + Tw
308	K162	D7Mgh7	7	74,244	55°	1,5
309	K164	Perf	7	137,740	55°	1,5 + Tw
310	K26	D7Mit9/Per	7	137,838	55°	1 + Tw
311	K300	D7Mit16	7	120,745	55°	1,5 + Tw
312	K421	D7Mit11/K27	7	123,635	55°	1,5 + Tw

lfd. Nr	Nr.	Marker	Chr.	Position in Mb	AT	Mg(mM)
313	K422	D7Wox5	7	11,674	55°	1,5
314	K423	D7Wox26	7	22,919	55°	1,5 + Tw
315	K424	D7Wox1	7	16,051	55°	1,5 + Tw
316	K426	D7Mgh10/K305	7		50°	1,5 + Tw
317	K427	D7Wox28	7	94,325	60°	1,5 + Tw
318	K428	D7Wox15/myc	7	98,601	60°	1,5 + Tw
319	K430	D7Wox25	7	115,819	55°	1,5 + Tw
320	K433	D7Wox32/Hox3	7	141,808	50°	1,5 + Tw
321	K435	D7Wox2	7		55°	1,5 + Tw
322	K507	D7Kyo3	7		55°	1,5 + Tw
323	K437	D8Wox23	8	18,191	55°	1,5 + Tw
324	K438	D8Wox18	8		55°	1,5 + Tw
325	K441	D8Wox16/D8Mgh7/K83	8	61,462	55°	1,5 + Tw
326	K443	D8Wox20	8	75,702	55°	1,5 + Tw
327	K444	D8Wox12	8	27,826	55°	1,5 + Tw
328	K558	D8Rat49	8	31,000	60°	1,5 + Tw
329	K560	D8Rat51	8	29,559	55°	1,5 + Tw
330	K563	D8Rat38	8	53,049	55°	1,5 + Tw
331	K564	D8Rat149	8	58,693	55°	1,5 + Tw
332	K565	D8Rat161	8	46,235	55°	1,5 + Tw
333	K627	D8Rat64	8		55°	1,5 + Tw
334	K628	D8Rat31	8	76,121	55°	1,5 + Tw
335	K629	D8Rat75	8	89,554	55°	1,5 + Tw
336	K630	D8Rat164	8	28,414	55°	1 + Tw
337	K631	D8Rat162	8	30,878	55°	1,5 + Tw
338	K632	D8Rat84	8	72,602	55°	1 + Tw
339	K633	D8Rat77	8	1,502	60°	1,5 + Tw
340	K634	D8Rat68	8	19,461	55°	1,5 + Tw
341	K635	D8Rat105	8	19,782	60°	1,5 + Tw
342	K83	D8Mgh7/D8Wox16/K441	8	61,462	55°	1,5
343	K171	Aep2	9		55°	1,5 + Tw
344	K445	D9Wox3	9	42,593	55°	1,5 + Tw
345	K449	D9Wox17	9	1,527	55°	1,5
346	K450	D9Wox21	9		55°	1,5 + Tw
347	K451	D9Wox20	9	0,860	55°	1,5 + Tw
348	K453	D9Mgh5	9	2,176	55°	1,5 + Tw
349	K668	Ins 1,4,5 P3 BP	9		55°	1,5 + Tw
350	K176	Myhse	10	53,790	55°	1,5 + Tw
351	K1911	D10Rat96	10	6,172	64°	1,5 + Tw.
352	K2198	Bajap2	10	109,300	60°	1,5 + Tw.
353	K2199	Sstr2	10	103,200	60°	1,5 + Tw.
354	K2201	Tbcd	10	110,700	60°	1,5 + Tw.
355	K2210	RGD1311784	10	109,000	60°	1,5 + Tw.
356	K2211	RGD1311784	10	109,000	60°	1,5 + Tw.
357	K2213	Dnahc11	10	107,900	65°	1 + Tw.
358	K2214	LOC690599	10	106,900	60°	1,5 + Tw.
359	K2215	RGD1560307	10	105,900	60°	1,5 + Tw.
360	K324	D10Mgh11/10/K32	10	29,974	55°	1,5 + Tw
361	K455	D10Wox23	10		55°	1,5 + Tw
362	K457	D10Wox6	10		55°	1,5 + Tw
363	K458	D10Wox27	10	17,480	55°	1,5 + Tw
364	K642	D10Rat108	10	109,048	55°	1,5 + Tw
365	K643	D10Rat97/4/K644	10	93,977	55°	1,5 + Tw

lfd. Nr	Nr.	Marker	Chr.	Position in Mb	AT	Mg(mM)
366	K644	D10Rat4/97/K643	10	107,033	55°	1,5 + Tw
367	K645	D10Rat88/8/K646	10	96,644	55°	1,5 + Tw
368	K646	D10Rat8/88/K645	10	104,013	55°	1,5 + Tw
369	K647	D10Rat5/108/K642	10	108,116	60°	1,5 + Tw
370	K648	D10Rat84	10	92,782	60°	1,5 + Tw
371	K649	D10Rat14	10	97,201	60°	1 + Tw
372	K650	D10Rat144	10	86,290	55°	1,5 + Tw
373	K651	D10Rat207	10	89,896	60°	1,5 + Tw
374	K653	D10Rat151	10	78,406	55°	1,5 + Tw
375	R126	Aep	10		55°	1,5
376	K2143	D11Mit186	11	35,049	60°	1,5 + Tw.
377	K459	D11Wox4	11	16,000	55°	1,5 + Tw
378	K462	D11Wox3/Cspmo2	11	56,910	55°	1,5 + Tw
379	K463	D11Wox10	11	42,748	55°	1,5 + Tw
380	K465	D11Mgh6	11	19,445	55°	1,5 + Tw
381	K516	D11Rat22	11	9,053	55°	1,5 + Tw
382	K181	MDH2	12	22,022	55°	1,5 + Tw
383	K468	D12Wox15/Sdhe1	12	37,144	60°	1
384	K469	D12Wox16	12	28,081	55°	1,5 + Tw
385	K471	D12Wox5	12	nur celera	55°	1,5 + Tw
386	K472	D12Wox3	12	13,682	55°	1,5 + Tw
387	K473	D12Wox2	12	9,768	55°	1,5 + Tw
388	K667	BcL2	13	6,609	55°	1,5 + Tw
389	K2154	D14Mit129	14	47,003	65°	1,5 + Tw.
390	K2204	M-Chr. 14	14		60°	1,5 + Tw.
391	K2205	M-Chr. 14	14		60°	1,5 + Tw.
392	K2206	M-Chr. 14	14		60°	1,5 + Tw.
393	K2337	D14Got6	14	3,388	60°	1,5 + Tw.
394	K2339	D14Got11	14	7,086	60°	1,5 + Tw.
395	K2340	D14Got17	14	8,787	60°	1,5 + Tw.
396	K2344	D14Rat80	14	13,778	60°	1,5 + Tw.
397	K2346	D14Rat6	14	16,433	60°	1,5 + Tw.
398	K2347	D14Got19	14	17,113	65°	1,5 + Tw.
399	K2348	D14Rat78	14	17,575	60°	1,5 + Tw.
400	K2349	D14Got12	14	14,070	65°	1,5 + Tw.
401	K337	D14Mgh4/Igh	14	138,229	55°	1,5 + Tw
402	K584	D14Rat65	14	36,974	55°	1,5 + Tw
403	K588	D14Rat37	14	81,448	55°	2 + Tw
404	K589	D14Rat94	14	89,192	55°	1,5 + Tw
405	R130	Gck	14	86,587	55°	2
406	K482	D15Wox5/T3rec	15	9,369	55°	1,5 + Tw
407	K483	D15Wox3	15	45,582	65°	1,5 + Tw
408	K103	D16Mit4	16	28,260	55°	1,5
409	K1357	D16Rat88	16	0,819	60°	1,5 + Tw
410	K1360	D16Got7	16	7,841	60°	1,5 + Tw
411	K1362	D16Got10	16	13,231	60°	1,5 + Tw
412	K1365	D16Got17	16	18,626	60°	1,5 + Tw
413	K1366	D16Got55	16	55,119	60°	1,5 + Tw
414	K1367	D16Rat58	16	69,218	60°	1,5 + Tw
415	K1368	D16Got77	16	74,556	60°	1,5 + Tw
416	K1369	D16Rat15	16	80,046	60°	1,5 + Tw
417	K1406	D16Got4	16	6,097	60°	1,5

Ifd. Nr	Nr.	Marker	Chr.	Position in Mb	AT	Mg(mM)
418	K1408	D16Rat31	16	8,340	60°	1,5
419	K1410	D16Rat61	16	64,203	60°	1,5
420	K1413	D16Got60	16	69,505	60°	1,5
421	K1416	D16Got75	16	74,990	60°	1,5
422	K1417	D16Got78	16	76,738	60°	1,5
423	K1418	D16Rat130	16	78,646	60°	1,5
424	K1421	D16Rat19	16	35,339	60°	1,5
425	K1422	D16Got198	16		60°	1,5
426	K1485	Lpa-16M	16		60°	1,5
427	K1529	D16Got22	16	19,242	60°	1,5
428	K1530	D16Rat77	16	22,270	60°	1,5
429	K1532	D16Rat26	16	23,614	60°	1,5
430	K1533	D16Rat75	16	24,132	60°	1,5
431	K194	D16Mgh3/Glud	16	9,965	55°	1,5 + Tw
432	K486	D16Wox7	16	63,306	55°	1,5 + Tw
433	K104	D17Mit7	17	14,575	55°	1,5
434	K197	PRLB/PrI	17	44,709	55°	1,5 + Tw
435	K2164	D17Mit35	17		60°	1,5 + Tw.
436	K491	D17Wox8	17	93,490	55°	1,5 + Tw
437	K494	D17Wox3	17	33,639	55°	1,5 + Tw
438	K201	D18Mit2	18	15,584	55°	1,5 + Tw
439	K202	D18Mit4	18	27,415	55°	1,5 + Tw
440	K2166	D18Mit67	18	12,166	65°	1,5 + Tw.
441	K520	D18Wox6	18	64,110	55°	1,5 + Tw
442	K521	D18Mit6	18	82,920	55°	1,5 + Tw
443	K559	D18Rat44	18	86,863	60°	1,5 + Tw
444	K562	D18Rat121	18	74,449	60°	1,5 + Tw
445	K566	D18Rat13	18	66,720	60°	1 + Tw
446	K592	D18Rat99	18	31,655	55°	1,5 + Tw
447	K593	D18Rat71	18	31,170	55°	1,5 + Tw
448	K594	D18Rat96	18	41,105	55°	1,5 + Tw
449	K596	D18Rat53	18	42,005	55°	1,5 + Tw
450	K597	D18Rat57	18	54,606	55°	1,5 + Tw
451	K598	D18Rat50	18	53,848	55°	1,5 + Tw
452	K600	D18Rat41	18	59,279	55°	1,5 + Tw
453	K601	D18Rat60	18	60,199	55°	1,5 + Tw
454	K602	D18Rat91	18	61,205	60°	1,5 + Tw
455	K603	D18Rat12	18	72,700	60°	1,5 + Tw
456	K107	D19Mit5	19	35,000	55°	1
457	K210	Heoxg	19	13,967	60°	1 + Tw
458	K369	D19Mit1	19		55°	1,5 + Tw
459	K501	D19Wox1	19	46,087	55°	1,5 + Tw
460	K513	D19Kyo1	19		55°	1,5
461	K514	D19Kyo3	19		55°	1,5 + Tw
462	K569	D19Rat12	19	27,497	60°	1,5 + Tw
463	K571	D19Rat64	19	46,434	55°	1,5 + Tw
464	K572	D19Rat3	19	54,808	55°	1,5 + Tw
465	K573	D19Rat11	19	31,605	50°	1,5 + Tw
466	K575	D19Rat34	19	2,265	55°	1,5 + Tw
467	K576	D19Rat47	19	12,882	55°	1,5 + Tw
468	K1600	D20Rat2-E	20	9,534	60°	1,5
469	K1601	D20Got4	20	3,844	60°	1,5

lfd. Nr	Nr.	Marker	Chr.	Position in Mb	AT	Mg(mM)
470	K505	D20Wox5/(Q-like)	20	1,503	55°	1 + Tw
471	K515	D20Kyo3	20		55°	1,5 + Tw
472	K709	D20Rat5	20	18,412	55°	1,5 + Tw
473	K710	D20Rat9	20	31,830	55°	1,5 + Tw
474	K712	D20Rat33	20	14,043	55°	1,5 + Tw
475	K716	D20Rat55	20	43,622	55°	1,5 + Tw
476	K717	D20Rat56	20	47,000	55°	1,5 + Tw
477	K718	D20Rat58	20	47,550	55°	1,5 + Tw
478	K719	D20Rat23	20	21,127	55°	1,5 + Tw
479	TNF-TC	Tnf-c	20	3,661	60°	1,5 + Tw
480	K1334	DXRat110	X	53,177	55°	1 + Tw
481	K1336	DXRat111	X	56,477	60°	1,5 + Tw
482	K1337	DXMit5	X	62,247	60°	1,5 + Tw
483	K1338	DXGot45	X	59,605	60°	1 + Tw
484	K1516	M-X	X			
485	K1517	M-X	X		60°	1,5
486	K1518	M-X	X		60°	1,5
487	K1583	DXRat56	X	81,378	60°	1,5
488	K1585	DXRat93	X	106,006	60°	1,5
489	K1586	DXRat71	X	109,514	60°	1,5
490	K1593	AU026118	X	158,967	60°	1,5
491	K16	DXMgh4	X	42,285	55°	1,5 + Tw
492	K213	DXMgh2	X	59,112	55°	1,5 + Tw
493	K365	DXWox30	X		55°	1,5 + Tw
494	K652	DXRat18	X	123,048	55°	1,5 + Tw
495	K654	DXRat19	X	34,810	55°	1,5 + Tw
496	K656	DXRat16	X	85,081	60°	1,5 + Tw
497	K657	DXRat17	X	112,204	55°	1,5 + Tw
498	K658	DXRat9	X	46,119	55°	1,5 + Tw
499	K660	DXRat12	X	40,074	55°	1,5 + Tw
500	K661	DXRat103	X	134,157	55°	1 + Tw
501	K662	DXRat23	X	143,741	60°	1,5 + Tw
502	K663	DXRat66	X	31,245	55°	1,5 + Tw
503	K665	DXRat81	X	28,947	55°	1 + Tw
504	K666	DXRat82	X	19,620	55°	1,5 + Tw
505	R47	Ar/DXWox9	X	8,594	55°	1,5 + Tw
506	K1062	intergenische Marker		6,169	55°	1,5 + Tw
507	K1071	intergenische Marker			60°	2 + Tw
508	K1072	intergenische Marker		108,285	60°	1,5 + Tw
509	K1073	intergenische Marker		6,256	60°	1,5 + Tw

Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Pathophysiologie, Abteilung Versuchstierkunde, an der Ernst-Moritz Arndt Universität Greifswald erstellt.

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

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. agr. habil. Dr. rer. med. habil. Ingrid Klötting für die Bereitstellung des Themas und die stets gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Für die Unterstützung des praktischen Teils danke ich besonders Silvia Sadewasser und Katrin Stabenow.

Zusammenfassung der Dissertation

Thema „*Phänotypische Selektion auf Bluthochdruck*“ vorgelegt von *Frank Fleischer*

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der genetischen Grundlage der essentiellen Hypertonie. Viele Experimente konnten Genorte finden, die an der Blutdruckregulation beteiligt sind und bei Mutation zu Anstiegen des Blutdruckes führen. Bisher wurden jedoch keine Gene gefunden, die eine essentielle Hypertonie verursachen.

Mittels der phänotypischen Selektion auf Bluthochdruck wurden Rückkreuzungshybriden aus normotensiven BB/OK Ratten und spontanhypertensiven SHR/Mol Ratten gezüchtet und im Anschluss mit Mikrosatellitenmarkern auf Veränderungen im Genom untersucht. Der Tierexperimentelle Teil dieser Arbeit und eine erste Untersuchung des Genoms mit 259 Mikrosatellitenmarkern wurde bereits 1997 durchgeführt [Klötting I. et al. 1997].

Die genaue Beschreibung des Rattengenoms und daraus resultierend die Vervielfachung der Mikrosatellitenmarker zur Analyse des Genoms machten eine Weiterführung der Arbeit sinnvoll.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Genom der Rückkreuzungshybriden mithilfe von weiteren 509 Mikrosatellitenmarkern auf Unterschiede im Vergleich zu normotensiven BB/OK Ratten untersucht. Wie bereits 1998 konnten auf Chromosom 14 Genorte ausgemacht werden, die nicht ausschließlich BB/OK zuzuordnen waren, sondern stattdessen Eigenschaften der spontanhypertensiven SHR-Mol Rattenlinie zeigten. Mithilfe der DNA-Sequenzierung konnten auf Chromosom 3 Mutationen entdeckt werden, die im kodierenden Bereich für das Gen *Rnd3* liegen. Dieses Gen spielt eine Rolle bei der Hemmung der Ausbildung von Stressfasern. Diese Proteine verankern Zellen über Fokalkontakte an der Plasmamembran und sind unter anderem in den großen Gefäßen und dem Myokard zu finden. Hieraus lässt sich eine Relevanz für die Ausprägung von Hypertonie ableiten.

Weitere Veränderungen im Genom der Rückkreuzungstiere konnten nicht gefunden werden. Hieraus kann man schlussfolgern, dass bei guter Abdeckung des Genoms der Ratten nur wenige bestimmende Gene eine Rolle bei der Ausprägung der Hypertonie spielen. Die Annahme, dass die essentielle Hypertonie über eine Vielzahl von Genen vererbt wird, erscheint anhand der gefundenen Ergebnisse unwahrscheinlich und bestätigt Ergebnisse der Entwicklung einer hypertonen Wistarratte von Okamoto et al. 1966 [Udenfriend S. Et al. 1976].

Ob es sich bei den Veränderungen, die entdeckt wurden, um hauptursächliche Gene der essentiellen Hypertonie handelt, kann mit dieser Arbeit nicht geklärt werden.