

1. Einleitung

1.1. Hypertonie und Mikroalbuminurie – zwei Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen

Die arterielle Hypertonie zählt zu den Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, welche die häufigste Ursache für die Morbidität und Mortalität in den Industrieländern darstellen (Murray & Lopez, 1997). Trotz eines verbesserten Verständnisses der Pathophysiologie und der Möglichkeit, den Blutdruck medikamentös effektiv zu senken, lassen sich steigende Inzidenzen von hypertensiven Endorganschäden und Folgeerkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit, Herzinsuffizienz, Schlaganfall und Niereninsuffizienz nachweisen (Carretero & Oparil, 2000). In Deutschland beträgt die Prävalenz der arteriellen Hypertonie, ähnlich wie in anderen westlichen Industrieländern, 25 % der Bevölkerung, wobei mit zunehmendem Alter die Zahl der Hypertoniker deutlich ansteigt und in der Gruppe der über 65-jährigen jeder Zweite einen Hypertonus aufweist (Kreutz, Paul, Ganten, 2000).

Die Ursachen der arteriellen Hypertonie sind in 90 - 95 % aller Hypertoniefälle bislang unbekannt. Bei diesen Formen der Hypertonie, die als essentielle, idiopathische oder auch primäre Hypertonie bezeichnet werden, lassen sich keine ursächlichen renovaskulären oder endokrinen Erkrankungen oder seltene nach den Mendelschen Gesetzen vererbten monogenetischen Hypertonieformen finden. Die essentielle Hypertonie zählt zu den komplexen multifaktoriellen und polygenetischen Erkrankungen, bei denen sich eine Fülle an genetischen und Umweltfaktoren einander bedingen und zu einem heterogenen Erscheinungsbild der Erkrankung in der Bevölkerung führen (Carretero & Oparil, 2000; Kreutz & Hübner, 2002).

Bei der Suche nach den pathogenetischen Mechanismen, die der essentiellen Hypertonie zugrunde liegen, haben mehrere Untersuchungen eine ursächliche Beteiligung der Niere gezeigt. Sowohl in Nierentransplantations-Experimenten zwischen normotensiven und hypertensiven Rattenstämmen (Bianchi et al., 1974; Dahl et al., 1974; Patschan et al., 1997; Rettig et al., 1990), als auch bei Langzeitbeobachtungen von nierentransplantierten Patienten (Curtis et al., 1983; Guidi et al., 1996; Strandgaard & Hansen, 1986) ließ sich nachweisen, dass zum einen mit der Transplantation einer Niere eines hypertensiven Spenders der erhöhte Blutdruck übertragen werden kann und zum anderen, dass sich die Blutdruckwerte eines hypertensiven Empfängers nach der Transplantation einer Niere eines normotensiven Spenders verbessern oder normalisieren können.

Eine Schlüsselrolle der Niere bei der Entstehung des Hypertonus lässt sich auch aufgrund der Aufklärung einiger seltener monogenetisch determinierten Hypertonieformen postulieren. Die bisher identifizierten Mutationen in mindestens 10 Genen beeinflussen den Blutdruck über den gemeinsamen pathophysiologischen Weg der gesteigerten oder verminderten Salz- und Wasser-Reabsorption im Nephron. Dazu zählen u.a. der autosomal dominant vererbte Glukokortikoid-supprimierbare Aldosteronismus, der autosomal rezessive scheinbare Mineralokortikoidexzess und das autosomal dominante Liddle-Syndrom (Lifton et al., 2001).

Die Identifizierung der genetischen Faktoren der polygen determinierten essentiellen Hypertonie gestaltet sich nicht zuletzt wegen der im Vergleich zu den monogenetischen Formen kleineren Effekte einzelner Gene auf den Blutdruck als weitaus schwierigeres Unterfangen (Luft, 1998). Jeunemaitre et al. (1992) berichteten über einen Polymorphismus im Angiotensinogen-Gen, welcher mit der essentiellen Hypertonie von hypertensiven Geschwistern aus Utah und Frankreich assoziiert ist. Diese M235T-Variante und die von Inoue et al. (1997) beschriebene Veränderung im Promotorbereich des Angiotensinogen-Gens (G-6A) führen über eine verstärkte Transkription zu erhöhten Plasmaspiegeln von Angiotensinogen bei Trägern dieser Allele verbunden mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Hypertonus (Jeunemaitre et al., 1997; Kunz et al., 1997).

Die Aufklärung dieser Variation und anderer Genmutationen wie z.B. im Angiotensin-converting-Enzym, alpha-Adduzin, β_2 -adrenergen Rezeptor, der β_3 -Untereinheit des G-Proteins und die T594M Mutation in der β -Untereinheit des epithelialen Natrium-Kanals stellen erste Erfolge in der Erforschung der essentiellen Hypertonie dar. Ihre klinische Bedeutung wird sich jedoch erst in näheren Untersuchungen zeigen, es lässt sich aber festhalten, dass derzeit nur ein kleiner Teil der Blutdruckvariation in der Bevölkerung erklärt werden kann (Lifton et al., 2001; Luft, 1998).

Die Definition des Bluthochdruckes ab einer Höhe von 140/90 mmHg und die Unterteilung der prähypertensiven Stadien in einen optimalen, normalen und hochnormalen Blutdruck (JNC VI, 1997) spiegeln die Erkenntnisse wider, dass kardiovaskuläre und renale Komplikationen nicht erst ab einem spezifischen pathologischen Blutdruckwert auftreten. In Abhängigkeit von bereits bestehenden Begleit- oder Folgeerkrankungen von Patienten gelten niedrigere Grenzwerte, da eine starke positive und kontinuierliche Korrelation zwischen dem Blutdruck und dem Risiko von Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen sowie der Sterblichkeit schon im als normotensiv definierten Bereich nachgewiesen wurde (Cutler, 1996).

Untersuchungen haben aber auch ergeben, dass nicht nur die Höhe des Blutdruckes die Entwicklung der hypertensiven Endorganschäden bedingt, sondern dass zusätzliche vom Blutdruck unabhängige genetische Prädispositionen deren Manifestation beeinflussen (Fliser & Ritz, 1998; Freedman, 2003; Rubattu et al., 1996). Die pathogenetischen Mechanismen, die im

Einzelnen dafür verantwortlich sind, dass bestimmte Hypertoniker Folgeerkrankungen wie die hypertensive Nephropathie erleiden, sind Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

Ein charakteristisches Frühsymptom und Prädiktor für die Entwicklung chronischer Nierenerkrankungen, wie die hypertensive Nephropathie, ist die erhöhte Albuminausscheidung im Urin. Die Bedeutung einer als Mikroalbuminurie bezeichneten pathologischen Albuminausscheidung von 30 - 300 mg/24h bezieht sich jedoch nicht nur auf die strukturellen renalen Veränderungen, sondern besteht für einen hypertensiven Patienten mit Mikroalbuminurie in einem nochmals deutlich erhöhten Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse zusätzlich zu dem größerem Risiko der Entwicklung einer Niereninsuffizienz (Bianchi et al., 1999; Toto, 2005) (Abb. 1).

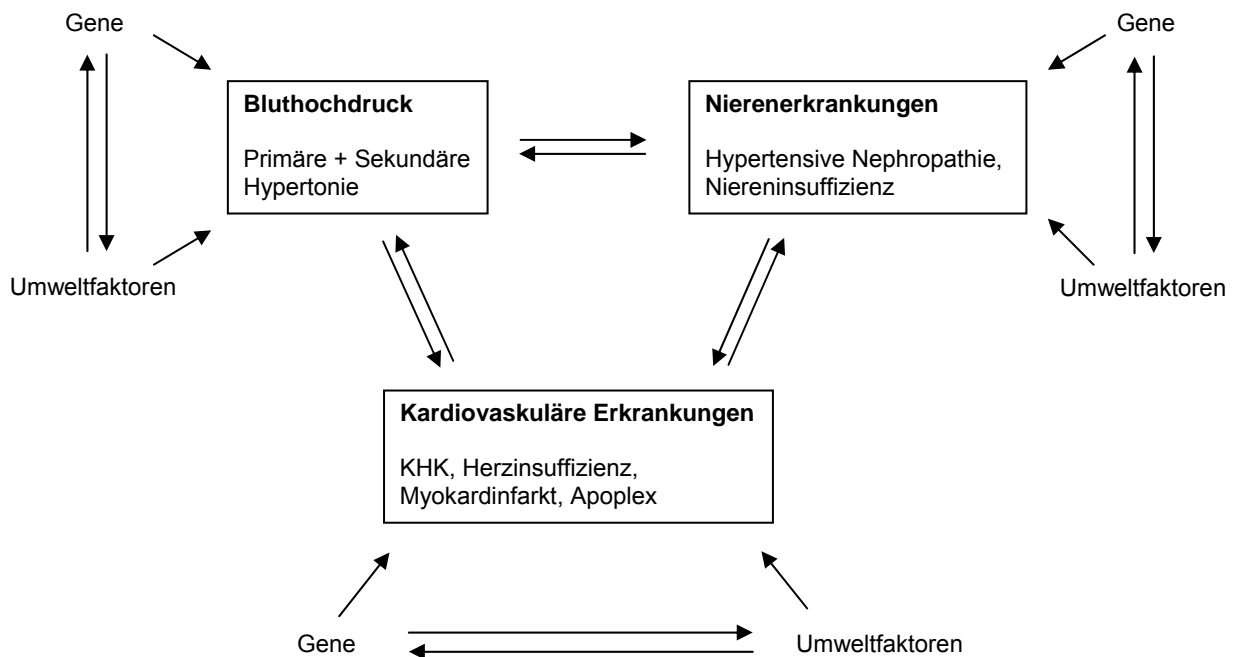


Abb. 1: Die Interaktionen von Bluthochdruck, kardiovaskulären- und Nierenerkrankungen unter der Beeinflussung von Umwelt- und genetischen Faktoren.

Einen unabhängigen Risikofaktor für das Entstehen von kardiovaskulären Ereignissen, ebenso wie für die Gesamtsterblichkeit, stellt die Mikroalbuminurie auch für die allgemeine Bevölkerung dar, und im Besonderen für Patienten mit Diabetes oder bereits bestehenden kardiovaskulären Erkrankungen (Hillege et al., 2002; Mann et al., 2001; Ritz, 2005).

Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Mikroalbuminurie und eine eingeschränkte Nierenfunktion in der allgemeinen Bevölkerung verbreiteter sind, als bisher angenommen wurde. Im Rahmen der PREVEND-Studie, bei der ca. 40000 Einwohner der niederländischen Stadt Groningen hinsichtlich der Nierenfunktion und Albuminausscheidung im Urin untersucht wurden, ergab sich für chronische Nierenerkrankungen mit einer eingeschränkten Filtrationsrate (GFR<60 ml/min) eine Prävalenz von 8 % und bei insgesamt 12 % der Erwachsenen war eine Mikroalbuminurie, Proteinurie oder verminderte Nierenfunktion nachzuweisen (de Zeeuw et al., 2005). Diese Zahlen stimmen mit der geschätzten Prävalenz von 10,8 % für chronische Nierenerkrankungen in der US-amerikanischen Bevölkerung überein. Hochgerechnet auf die Weltbevölkerung beträgt die Anzahl der Menschen mit chronischen Nierenerkrankungen ungefähr 500 Millionen (Coresh et al., 2003). Geschätzte 1,8 Millionen Menschen werden derzeit mit einer Nierenersatztherapie, d.h. in erster Linie mit einer Nierentransplantation, Hämo- oder Peritonealdialyse behandelt, wobei 90 % dieser Patienten in den Industrieländern leben, da aus Kostengründen in den Schwellenländern eine Nierenersatztherapie kaum und in den Dritte-Welt-Ländern gar nicht verfügbar ist (Moeller et al., 2002; Remuzzi et al., 2006; Xue et al., 2001).

Es existiert bisher keine Therapie, die die Entwicklung von chronischen Nierenerkrankungen zur terminalen Niereninsuffizienz wirkungsvoll verhindern kann, trotz der postulierten gemeinsamen pathophysiologischen Mechanismen der Progression von unterschiedlichen chronischen Nephropathien bis zur Dialysepflichtigkeit (Hostetter et al., 1982; Klahr et al., 1988; Remuzzi & Bertani, 1998). Über die Ausnutzung der zurzeit verfügbaren Therapieoptionen, wie eine optimale Behandlung des Bluthochdruckes (Ruilope et al., 2001) und der Einsatz von ACE-Hemmern und Angiotensin-Typ1-Rezeptorantagonisten kann die Progression der chronischen Nierenerkrankungen verlangsamt und der Zeitpunkt der Dialysepflichtigkeit verzögert werden (Ruggenenti et al., 1999; Ruggenenti et al., 2001; Wilmer et al., 1999). Auch Medikamente wie die HMG-CoA-Reduktasehemmer können über eine Besserung der häufig im Zusammenhang mit chronischen Nierenerkrankungen stehenden Dyslipoproteinämie die Proteinurie vermindern und zum Erhalt der glomerulären Filtrationsleistung beitragen (Fried et al., 2001).

Effektivere Präventions- und Therapieoptionen werden durch die Aufklärung der Ursachen der Nierenerkrankungen gesehen, die es ermöglichen mit Hilfe neu zu entwickelnder Therapiekonzepte früh und gezielt ins Krankheitsgeschehen einzugreifen. Der starke genetische Einfluss in der Entwicklung von chronischen Nierenerkrankungen zeigt sich darin, dass neben klinischen Parametern einer der wichtigsten Risikofaktoren eine positive Familienanamnese ist (Satko et al., 2005), welche mit einem drei- bis neunfach erhöhten Risiko assoziiert ist (Ferguson et al., 1988; Freedman et al., 1993; Spray et al., 1995). Die Vorhersagekraft der Familienanamnese ist für die Entwicklung der Nephropathie bei

hypertensiven oder diabetischen Patienten damit größer als die der Höhe des Blutdruckes oder des Blutzuckers (Freedman et al., 1997; Seaquist et al., 1989).

Die Erforschung der Gene, die den polygenetisch determinierten Nierenerkrankungen wie der hypertensiven oder diabetischen Nephropathie zugrunde liegen, gestaltet sich aufgrund der Komplexität der multifaktoriellen Krankheitsbilder als ähnlich schwierig wie bereits oben für den Hypertonus dargestellt. Nach bisherigen Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass die Albuminurie bei Patienten mit und ohne Diabetes nicht nur von völlig verschiedenen Genen bestimmt wird, sondern, dass zum Teil die gleichen Gene für den mit einer Proteinurie einhergehenden Funktionsverlust der Niere verantwortlich sind (Fogarty et al., 2000; Krolewski et al., 2006). Mit Hilfe von genomweiten Segregations- und Kopplungsanalysen konnten mehrere Genloci für die Albuminurie von Patienten mit Diabetes oder Hypertonie sowie für die allgemeine Bevölkerung identifiziert werden, die in weiteren Untersuchungen näher charakterisiert werden müssen, um die ursächlich verantwortlichen Gene zu detektieren (Freedman et al., 2003; Fox et al., 2005; Krolewski et al., 2006).

1.2. Tiermodelle zur Untersuchung von multifaktoriellen Erkrankungen

Der Einsatz von Tiermodellen hat sich als ein probates Mittel erwiesen, die Schwierigkeiten zu umgehen, die bei der Erforschung der genetischen Ursachen von multifaktoriellen Erkrankungen wie der Albuminurie und der essentiellen Hypertonie beim Menschen entstehen. Durch ingezüchtete Tiermodelle, die die zu untersuchende genetisch determinierte Erkrankung aufweisen, lässt sich das Problem der genetischen Heterogenität vermeiden, welches bei Untersuchungen am Menschen die statistische Aussagekraft so weit reduziert, dass die Detektion von individuellen genetischen krankheitsfördernden Faktoren dadurch deutlich erschwert oder verhindert werden kann. Zusätzlich kann im Vergleich zu klinischen Studien der Einfluss der Umweltbedingungen in Tierexperimenten weitaus besser standardisiert und kontrolliert werden (Kreutz & Hübner, 2002).

In der Hypertonieforschung wurden unterschiedliche genetische Modelle der verschiedensten Spezies etabliert, allen voran von der Ratte, aber auch von Hund, Kaninchen, Truthahn und Maus (Rapp, 2000; Rubattu et al., 1995). Die Wanderratte (*Rattus norvegicus*), welche als erstes Tier primär für wissenschaftliche Untersuchungen gezüchtet wurde, und dessen erste Züchtungen von Crampe sich auf das Jahr 1877 zurückdatieren lassen, ist das derzeit experimentell am meisten genutzte Tiermodell (Hedrich, 2000). Aufgrund ihrer anatomischen und physiologischen Eigenschaften eignet sich die Ratte im Besonderen für eine Vielzahl von invasiven und nicht-invasiven in vivo Untersuchungen unter anderem zur Beurteilung der

Nierenfunktion oder klinisch relevanter hämodynamischer Parameter. Die Ratte ist funktionell das am besten charakterisierte Säugetier-Modell, das sich darüber hinaus für die Planung und Durchführung von Studien durch einfache, gut kontrollierbare Zucht- und Haltungsbedingungen und eine relativ kurze Generationsdauer auszeichnet (Hedrich, 2000; Kreutz & Hübner, 2002).

Mit Hilfe der Züchtungen von spezifischen Inzuchtrattenstämmen, die bestimmte phänotypische Merkmale aufweisen, lassen sich Kreuzungsexperimente und genetische Kopplungsanalysen durchführen, die den Möglichkeiten von klinischen Studien weit überlegen sind. Selektive Verpaarungen von Tieren mit dem gewünschten Phänotyp führen nach mehreren Generationen zur genetischen Fixierung des Merkmals. Wenn alle Nachkommen durch diese natürliche Selektion der Allelverteilung den gleichen Phänotyp zeigen, lässt sich über mindestens 20 Bruder-Schwester-Verpaarungen ein Inzuchtrattenstamm etablieren, bei dem alle Tiere gleichen Geschlechts an sämtlichen Genorten denselben homozygoten Genotyp aufweisen und damit zu über 99 % genetisch identisch sind (Ganten et al., 1994).

Der Vorteil der Inzuchtrattenstämmen besteht darin, dass jeder Stamm als ein Subtyp der jeweiligen polygenetisch determinierten Erkrankung gesehen werden kann, und dass die Untersuchung von mehreren verschiedenen Inzuchtstämmen die Identifizierung der genetischen Basis multifaktorieller Erkrankungen somit erleichtern kann (Kreutz & Hübner, 2002; Kwitek-Black & Jacob, 2001).

Mittlerweile sind mehr als 220 ingezüchtete Rattenstämme beschrieben, die als Tiermodelle der Erforschung einer Vielzahl von Erkrankungen, wie beispielsweise Herzkreislauferkrankungen (z.B. essentielle Hypertonie), Nierenerkrankungen (z.B. Albuminurie), Stoffwechselstörungen (z.B. Dyslipoproteinämien, Diabetes mellitus), neurologischen Erkrankungen (z.B. Epilepsie, M. Parkinson), Autoimmunerkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis) und verschiedenen Krebserkrankungen dienen (Hedrich, 2000).

1.3. Strategien für die Identifizierung krankheitsrelevanter Gene

Die Identifizierung der genetischen Ursachen von Erkrankungen stellt einen wichtigen Schritt zum Verständnis der genauen pathogenetischen Mechanismen dar und eröffnet die Möglichkeit, neue Therapiestrategien zu entwickeln, die nicht nur symptomatisch orientiert sind, sondern mit deren Hilfe sich die Krankheiten in der frühen Entstehung behandeln oder verhindern lassen.

Die Vergangenheit hat gezeigt, dass sich monogenetisch determinierte Erkrankungen aufgrund des relativ starken Effektes einer einzelnen Genvariante durch Untersuchungen in Familien mit

einem gehäuftem Auftreten der jeweiligen Krankheit leichter aufklären lassen, als die in der Bevölkerung häufiger vorkommenden komplex regulierten polygenetischen Erkrankungen. Kennzeichen der multifaktoriellen Erkrankungen sind die vergleichsweise schwächeren Effekte einzelner Gene, die sich gegenseitig stark beeinflussen können (epistatische Interaktionen) und mit verschiedenen Umweltfaktoren wechselseitig interagieren (ökogenetische Interaktionen).

Eine Strategie für die Identifizierung der molekulargenetischen Grundlagen der multifaktoriellen Erkrankungen ist die Kandidatengen-Analyse. Sie stützt sich auf die Annahme, dass bestimmte Gene aufgrund ihrer pathophysiologischen Funktion in das Krankheitsgeschehen involviert sein könnten. Dabei sind Erkenntnisse über die monogenetisch determinierten Krankheitsformen hilfreich, da andere, in der Ausprägung mildere Mutationen desselben Krankheitsgens bei polygenetischen Erkrankungen eine Rolle spielen können (Lifton et al., 2001). In Kandidatengen-Studien wird gezielt nach einer Assoziation des infrage kommenden Genes mit dem Krankheitsphänotyp und möglicher Mutationen gesucht. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass neue, bislang unbekannte pathophysiologische Mechanismen auf diese Weise nicht entdeckt werden können. Hinzu kommt, dass mit der abgeschlossenen Sequenzierung des humanen Genoms (Pennisi, 2003) längst noch nicht alle Gene und ihre Funktionen bekannt sind. Die Anzahl der zuvor geschätzten Gene des humanen Genoms von 30.000 - 40.000 (Lander et al., 2001, Pruitt & Maglott, 2001) wurde nach der Sequenzierung reduziert auf 20.000 - 25.000 proteinkodierende Gene (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004), da sich derzeit jedoch fast 29.000 Gene im NCBI (National Library of Medicine; [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) finden lassen, bleibt deren definitive Anzahl und somit auch die der bislang unbekanntem Gene unklar.

Genomweite Kosegregations- und Kopplungsanalysen stellen eine effektive Methode für die Identifizierung auch von bislang unbekanntem Genen dar, die an der Pathogenese multifaktorieller Erkrankungen beteiligt sind. Mit Hilfe dieser Untersuchungen werden chromosomale Regionen erfasst, die ein oder mehrere Gene enthalten können, die einen Einfluss auf den zu untersuchenden Phänotyp haben. Diese Genloci, die für ein quantitatives Merkmal kodieren, werden als Quantitative Trait Loci (QTL) bezeichnet (Rapp, 2000).

Zur Identifizierung der QTL wird eine ausreichend große Studienpopulation hinsichtlich der Ausprägung des Phänotyps klinisch untersucht und das gesamte Genom mit gleichmäßig verteilten polymorphen genetischen Markern, deren chromosomale Lokalisation aus Kartierungsuntersuchungen bekannt ist, charakterisiert. Nur die Marker, die sehr nah am Krankheitsgen liegen, kosegregieren mit dem Phänotyp, während vom Krankheitsgen weiter entfernt liegende Marker keine Assoziation zur Erkrankung aufweisen und unabhängig vom Phänotyp segregieren. Mit Hilfe von statistischen Kopplungsanalysen lässt sich feststellen, ob

die Assoziation von genetischem Marker und Krankheitsgen tatsächlich durch eine echte Kopplung (Linkage) erklärt werden kann, oder durch genetische Rekombinationen (Crossing-Over) vorgetäuscht ist. Die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung wird über den LOD-Score (logarithm of the odds) ausgedrückt.

Für die weitere Analyse der QTL stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die in dem QTL-Bereich gelegenen Gene können mit Hilfe von Positionsklonierungen, Untersuchungen zur differentiellen Genexpression sowie Mutations- und Funktionsanalysen näher charakterisiert werden (Charron et al., 2005).

Bisher wurden durch Kosegregations- und Kopplungsanalysen beim Menschen mehrere QTL für die essentielle Hypertonie und die Albuminurie identifiziert, wobei aufgrund der genetischen Heterogenität der Humanpopulationen vermutete Kopplungen teilweise nicht den statistischen Grenzwert für die Signifikanz erreichten (Lifton et al., 2001; Satko et al., 2005). Die statistische Aussagekraft der Untersuchungen lässt sich durch tierexperimentelle Kosegregationsanalysen bei Inzuchtrattenstämmen erhöhen, wobei sich über anschließende vergleichende Kartierungen der QTL mit dem humanen Genom und systematische klinische Analysen die Relevanz der QTL für den Menschen überprüfen lässt (Abb. 2).

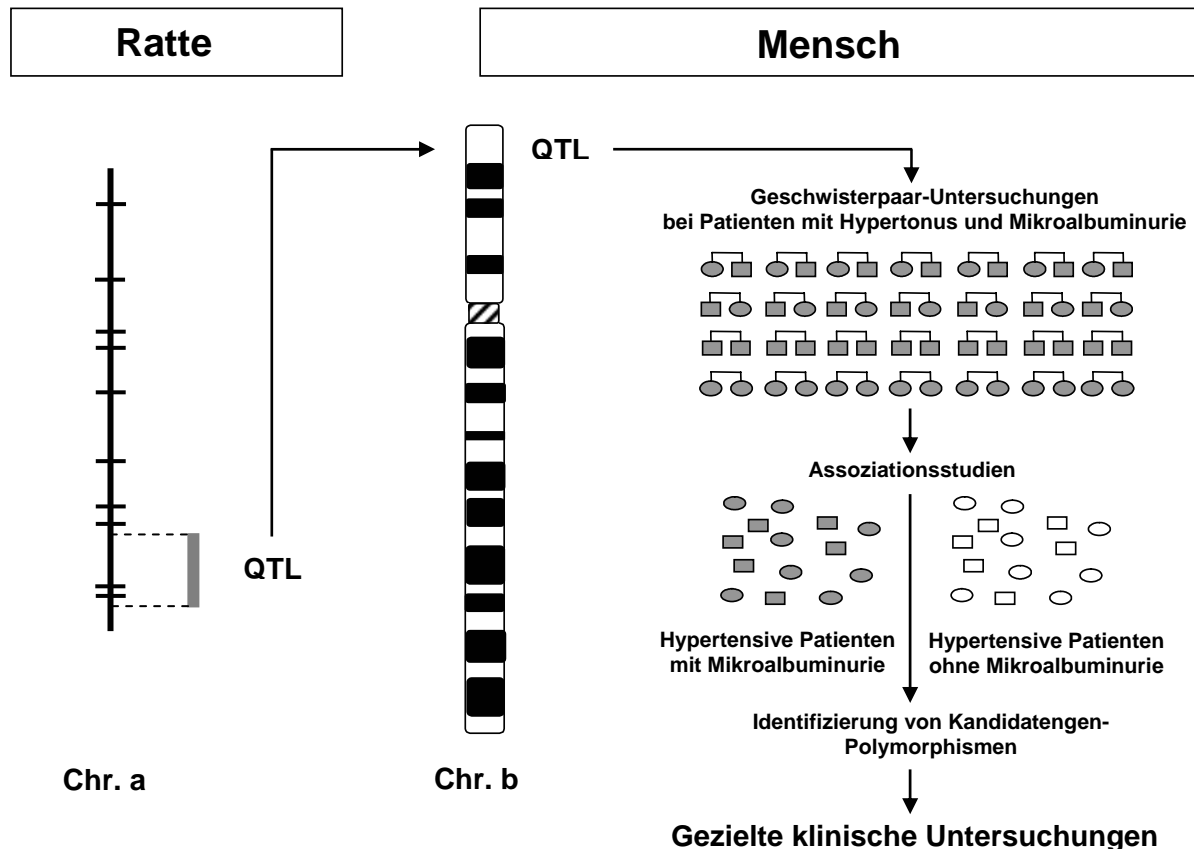


Abb. 2: Strategien zur Identifizierung krankheitsrelevanter Gene am Beispiel eines blutdruckregulierenden QTL mit Einfluss auf die Albuminausscheidung.
 Im Tiermodell ermittelte Quantitative Trait Loci (QTL) können über Homologievergleiche chromosomalen Regionen des humanen Genoms zugeordnet werden. Kandidatengene des QTL-Bereiches lassen sich durch Geschwisterpaaruntersuchungen und Assoziationsstudien analysieren. Identifizierte Kandidatengen-Polymorphismen erlauben gezielte klinische Untersuchungen am Patienten.

Für die Durchführung dieser tierexperimentellen Kosegregationsanalysen werden zwei sich in Bezug auf den zu untersuchenden Phänotyp unterscheidende Inzuchtrattenrattenstämme miteinander verpaart. Die daraus hervorgegangenen Tiere der heterozygoten F1-Generation sind aufgrund der Mendelschen Gesetze genetisch und phänotypisch nahezu identisch. Durch die Bildung einer F2-Generation oder alternativ einer Backcross-Population durch Rückkreuzung der F1-Tiere mit dem den Phänotyp tragenden Parentalstamm erfolgt eine Genotypenaufspaltung auf der Grundlage der unabhängigen Allelverteilung und der genetischen Rekombination während der Meiose I (Abb. 3).

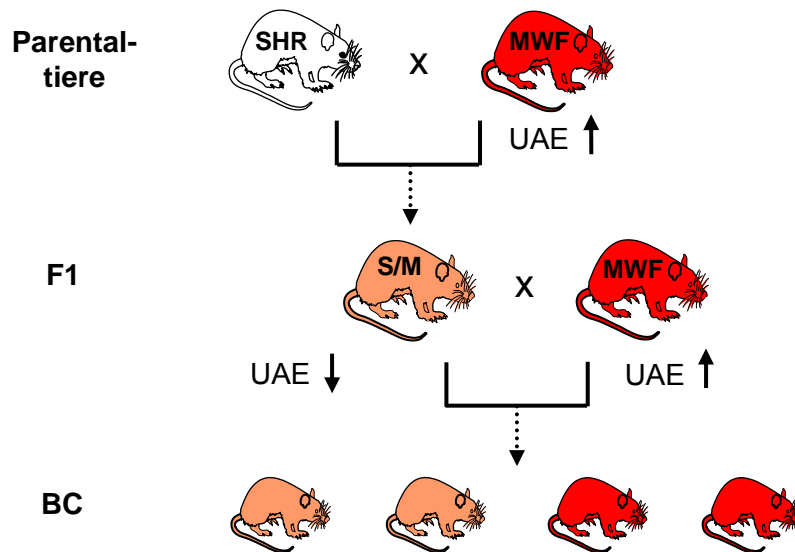


Abb. 3: Kosegregationsanalyse am Beispiel einer Backcross-Population.

Verpaarung eines nierengesunden (SHR) mit einem nierenkranken (MWF) Ratteninzuchtstamm mit erhöhter Albuminausscheidung.

S = SHR-Allel; M = MWF-Allel; UAE = Albuminurie; F1 = 1. Filialgeneration; BC = Backcross-Generation.

Die genetische Homogenität der Inzuchtrattenstämme und die daraus resultierende Minimierung der Allelzustände in der zu untersuchenden F2- oder Backcross-Population führt dazu, dass die mit den jeweiligen Phänotypen assoziierten Genotypen leichter detektiert werden können.

Ein weiterer Vorteil der tierexperimentellen Analysen besteht darin, dass durch die Züchtung von konsomen oder kongenen Stämmen die identifizierten QTL in ihrer Relevanz für den Phänotyp bestätigt werden können. Dafür wird das Chromosom oder der Chromosomenabschnitt, welcher den QTL beinhaltet in den jeweiligen kontrastierenden Parentaltierstamm überführt. Durch die anschließende Züchtung kongener Sublinien ist eine Eingrenzung des identifizierten chromosomalen Intervalls auf 0,3-0,5 cM möglich. Da sich bei der Ratte auf einer Länge von 0,5 cM ungefähr 20 Gene befinden, ist auf diese Weise eine weitaus effizientere Suche nach den ursächlichen Krankheitsgenen möglich (Kreutz & Hübner, 2002; Rapp, 2000).

1.4. Die Inzuchtrattenstämme MWF und SHR

Die Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratte stellt ein aussagekräftiges Tiermodell dar für die Erforschung der Pathogenese von Herz-Kreislaufkrankungen (Kreutz et al., 2000; Gschwend et al., 2002) und der genetischen Ursachen von proteinurischen Nierenerkrankungen (Schulz et al., 2002; Schulz et al., 2003), des weiteren für funktionelle Analysen von glomerulären Schädigungen und deren Reparaturmechanismen (Macconi et al., 2000; Macconi et al., 2006; Remuzzi et al., 2006) sowie für Interventionsstudien (Iordache et al., 1994; Remuzzi et al., 1995; Remuzzi et al., 2002; Remuzzi et al., 2006).

Der Inzuchtrattenstamm MWF wurde ausgehend von Munich-Wistar-Ratten wegen einer phänotypischen Besonderheit, den so genannten subkapsulären Glomeruli, die die Durchführung von Mikropunktionsstudien ermöglichten, etabliert. Um die Anzahl dieser oberflächlich gelegenen Glomeruli der Munich-Wistar-Ratten zu erhöhen, begann Prof. Frömter (Frankfurt/Main) mit der Zucht einer Sublinie, die von Hackbarth et al. mittels operativer mikroskopischer Untersuchungen der Nierenoberfläche weitergeführt wurde (Hackbarth et al., 1980). In der F5-Generation wiesen die Tiere mehr als 50 Glomeruli im normalerweise glomerulifreien Cortex corticis der Niere auf, ohne dass sich Nierenfunktionparameter wie die glomeruläre Filtrationsrate und der renale Plasmafluß im Vergleich zu anderen Wistar-Mutanten wie W/Ztm cryptorchic verändert hatten (Hackbarth et al., 1981). Der neue Stamm wurde MWF/Ztm genannt, und konnte ab der 20. Generation als Inzuchtrattenstamm verwendet werden.

Phänotypische Charakterisierungen des Inzuchtrattenstammes MWF haben gezeigt, dass dieses Tiermodell eine spontane arterielle Hypertonie und eine frühzeitig beginnende Proteinurie entwickelt (Hackbarth et al., 1991), die sich zum überwiegenden Anteil aus Albumin zusammensetzt, weswegen glomeruläre Defekte als Ursprungsort des Proteinverlustes postuliert wurden (Remuzzi et al., 1992). Des Weiteren weisen MWF-Ratten im Vergleich zu gesunden Lewis-Ratten eine bis zu 12%ige Vergrößerung des Bowman'schen Kapseldurchmessers auf (Hackbarth et al., 1983) und altersabhängig lassen sich die Nierenfunktion zusätzlich einschränkende glomerulosklerotische und fibrotische Veränderungen beobachten (Remuzzi et al., 1992; Schulz et al., 2003). Darüber hinaus konnten Gschwend et al. (2002) eine selektive endotheliale Dysfunktion in den Koronararterien von MWF-Ratten nachweisen, der eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Arteriosklerose zugesprochen wird (Rubanyi, 1993). Einen interessanten morphologischen Aspekt, neben dem Auftreten subkapsulärer Glomeruli, stellt die 27 - 50 % reduzierte Nephronanzahl bei MWF-Ratten im Vergleich zu gesunden Lewis- und Wistar-Ratten dar (Kaufmann & Hackbarth, 1990; Fassi et

al., 1998). Brenner et al. formulierten 1988 die Hypothese, dass reduzierte Nephronanzahlen mit einer damit einhergehenden verminderten Filtrationsoberfläche als prädisponierende pathogene Faktoren die essentielle Hypertonie maßgeblich beeinflussen (Brenner et al., 1988). In einer Fall-Kontroll-Studie konnte gezeigt werden, dass hypertensive Patienten eine signifikant geringere Anzahl von Nephronen und ein größeres glomeruläres Volumen aufwiesen, als die normotensive Kontrollgruppe (Keller et al., 2003). Die Bedeutung der Nephronanzahl für die essentielle Hypertonie in der allgemeinen Bevölkerung bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Weitgehend unbekannt sind die Mechanismen, die den sexuellen Dimorphismen zugrunde liegen, welche bei der MWF-Ratte (Kreutz et al., 2000; Remuzzi et al., 1988) und auch bei anderen Tiermodellen wie beispielsweise der spontan hypertensiven Ratte (Ganten et al., 1989) oder der salzsensitiven Dahl-Ratte (Crofton et al., 1993) ausgeprägt sind. Dieses beim Menschen als „gender-Effekt“ bezeichnete Phänomen beschreibt die Geschlechtsabhängigkeit von bestimmten Krankheitsausprägungen.

Bei dem MWF-Rattenstamm äußert sich der sexuelle Dimorphismus in einem mildereren Krankheitsverlauf der Weibchen, welcher durch hypertensive, aber im Vergleich zu den Männchen niedrigere Blutdruckwerte und eine sich später entwickelnde und weniger ausgeprägte Albuminurie gekennzeichnet ist (Kreutz et al., 2000; Remuzzi et al., 1992).

Die stärkere Ausprägung der Erkrankungen der MWF-Männchen, die mit einer erhöhten Sterblichkeit im Vergleich zu gesunden Ratten, wie beispielsweise dem Lewis-Stamm, verbunden ist (Schulz, Dissertation 2002), spiegelt die Problematik eines sich im Vergleich zu Frauen bei Männern schneller entwickelnden Nierenfunktionsverlustes bei chronischen Nierenerkrankungen wider (Hanes et al., 1996; Silbiger & Neugarten, 1995).

Für die Erforschung der Entstehung und Progression von hypertensiven und renalen Erkrankungen stellt die MWF-Ratte aufgrund der sie kennzeichnenden Charakteristika ein aus klinischer Sicht hochinteressantes Tiermodell dar.

Um zu untersuchen, welche genetischen Faktoren ursächlich an der Entwicklung der arteriellen Hypertonie, und vor allem der renalen Veränderungen wie der Albuminurie, der Glomerulosklerose und interstitiellen Fibrose, sowie der subkapsulären Glomeruli bei der MWF-Ratte beteiligt sind, wurde eine Kosegregations- und Kopplungsanalyse durchgeführt. Als kontrastierender Stamm wurde die spontan hypertensive (SHR)-Ratte gewählt (Schulz et al., 2003).

Die SHR-Ratte wurde ausgehend von Wistar-Kyoto (WKY)-Ratten 1963 von Okamoto und Aoki etabliert (Okamoto & Aoki, 1963). Gezielte Verpaarungen von Tieren mit den höchsten Blutdrücken führten zu einem Rattenstamm mit spontan auftretender Hypertonie. Nach der 20. Generation von Bruder-Schwester-Verpaarungen konnte der Stamm 1969 als SHR-Inzuchtrattenstamm verwendet werden (Okamoto et al., 1972). Seitdem zählt die SHR-Ratte zu

den am häufigsten genutzten Tiermodellen, insbesondere in der Bluthochdruckforschung (> 13.000 Publikationen, National Library of Medicine; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>). Bei vergleichbaren normalen Blutdruckwerten zwischen Mensch und Ratte (systolischer Blutdruck 116-145 mmHg, diastolischer Blutdruck 76-97 mmHg; d'Uscio et al., 2000), ist die SHR-Ratte durch deutlich erhöhte systolische Blutdruckwerte von 160-180 mmHg und Maximalwerten von 200 mmHg gekennzeichnet (Volpe & Rubattu, 1994; Yamori, 1994). Im Unterschied zur MWF-Ratte weist die SHR-Ratte normale Albuminwerte im Urin (Poyan Mehr et al., 2003) verbunden mit einer im Wesentlichen histologisch gesunden Nierenstruktur auf (Karlsen et al., 1997) und zeigt nur eine geringe und langsame Progression von vergleichsweise milden hypertensiven Nierenschädigungen im hohen Lebensalter (Bakoush et al., 2004; Feld et al., 1977).

Aufgrund dieser kontrastierenden renalen Eigenschaften zwischen der MWF- und SHR-Ratte wurde eine (MWF x SHR) F1 x MWF-Backcross-Population für eine genomweite QTL-Analyse gezüchtet, um die genetische Basis der Albuminurie, Glomerulosklerose und der renalen interstitiellen Fibrose vor dem Hintergrund ähnlich hypertensiver Blutdruckwerte bei den zwei Rattenstämmen zu untersuchen (Schulz et al., 2003).

Im Rahmen der Kosegregations- und Kopplungsanalyse dieser Backcross-Population wurden acht QTL für die Albuminurie und mit schwächerer Signifikanz für die Proteinurie auf den Rattenchromosomen 1, 4, 6, 7, 8, 9, 15 und X identifiziert. Von besonderer Bedeutung schien der QTL auf dem Rattenchromosom 6 (RNO6), weil er eine signifikante Kopplung schon bei jungen Tieren in der 8. Woche aufweist, zudem mit starken phänotypischen Effekten bei Homozygotie für das MWF-Allel verbunden ist, und ein kolokalisierter QTL-Bereich mit etwas schwächeren statistischen und phänotypischen Effekten auf die frühzeitige Albuminurie bereits in der Backcross-Population aus MWF- und normotensiven Lewis-Ratten (Schulz et al., 2002) nachgewiesen wurde. Zusätzlich kartieren ein QTL für subkapsuläre Glomeruli mit und ohne Kapselkontakt und ein QTL für die renale interstitielle Fibrose in die Region von RNO6 (Schulz et al., 2003).

Um die Relevanz von RNO6 näher zu untersuchen und die den Phänotypen zugrunde liegenden Gene zu identifizieren, wurde in der Arbeitsgruppe mit der Züchtung eines konsomen Stammes begonnen, bei dem die mit den Phänotypen assoziierten MWF-Allele des Chromosoms 6 vollständig durch SHR-Allele ausgetauscht werden, aber der gesamte genetische Hintergrund homozygot für das MWF-Allel ist. Vor diesem isogenetischen MWF-Hintergrund lässt sich durch die Eliminierung des QTL tragenden Chromosoms 6 der Einfluss der QTL auf die Entwicklung der Phänotypen mit Hilfe des konsomen Stammes MWF-6^{SHR} analysieren.

1.5. Ziel der Arbeit

Die arterielle Hypertonie und die Mikroalbuminurie sind entscheidende unabhängige Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, die zu den Haupttodesursachen in den Industrieländern zählen, und für chronische Nierenerkrankungen, die das kardiovaskuläre Risiko zusätzlich erhöhen, und deren Endstadium, die terminale Niereninsuffizienz, einer kostenaufwendigen Nierenersatzbehandlung bedarf (Baigent et al., 2000; Mann et al., 2003; Ruilope et al., 2001; Segura et al., 2004). Durch die Aufklärung der den Krankheitsbildern zugrunde liegenden genetischen Ursachen eröffneten sich neue Möglichkeiten für die Entwicklung von individuellen und kausalen Therapiestrategien (Pharmakogenetik). Durch gezielte, ursachen-orientierte Präventivmaßnahmen ließen sich auf diesem Wege Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen frühzeitig behandeln oder sogar verhindern. Für die Grundlagenforschung ist die Verwendung geeigneter Tiermodelle, welche die genotypischen und phänotypischen Gegebenheiten des Menschen widerspiegeln, aber einen vereinfachten genetischen Hintergrund aufweisen, eine aussichtsreiche Methode (Kreutz et al., 2000; Kwitek-Black & Jacob, 2001).

Die vorliegende Arbeit, die im Rahmen der Gesamthematik „Molekulargenetik der Hypertonie und hypertensiver Endorganschäden“ entstanden ist, hatte das Ziel, den konsomen Rattenstamm MWF-6^{SHR} genotypisch und phänotypisch zu charakterisieren, um die Bedeutung verschiedener QTL für die Entwicklung und Progression von hypertensiven, chronischen Nierenschädigungen zu untersuchen.

In einem ersten Schritt sollte die genetische Reinheit des konsomen Stammes MWF-6^{SHR} mit einer systematischen Genom-Analyse überprüft werden. Auf dieser Grundlage sollten die entsprechenden getesteten Tiere zur Koloniedefinition des MWF-6^{SHR}-Stammes ausgewählt werden.

In einem zweiten Schritt sollte die phänotypische Charakterisierung des konsomen Stammes MWF-6^{SHR} im Vergleich mit den Parentaltieren MWF und SHR nach einem festgelegten Versuchsprotokoll erfolgen. Um altersabhängige Effekte erfassen zu können, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die Albuminurie und der systolische Blutdruck erfasst. Zum Versuchsende wurden zusätzliche klinisch-chemische und organspezifische Parameter analysiert, sowie eine histologische Untersuchung der Nieren vor allem hinsichtlich der renalen interstitiellen Fibrose, der Glomerulosklerose und dem Auftreten von subkapsulären Glomeruli durchgeführt.

Der vor dem Hintergrund der bekannten sexuellen Dimorphismen bei MWF- und SHR-Ratten mögliche geschlechtsabhängige Einfluss der QTL auf dem Rattenchromosom 6 wurde bei der

Planung des Versuchsaufbaus durch die Analyse von Männchen und Weibchen aller drei Stämme berücksichtigt.

Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit soll die Etablierung von teilkongen Stämmen erfolgen, die eine weitere Eingrenzung des QTL-Bereiches und damit eine effiziente Suche und Charakterisierung von Kandidatengen erlauben. Die vergleichende Kartierung des QTL-Bereiches mit dem Humangenom ermöglicht gezielte klinische Untersuchungen, die zur Identifizierung der kausal verantwortlichen Gene führen können.