1 Einleitung

1.1 Arterielle Hypertonie

Die arterielle Hypertonie ist eine häufige, in der Frühphase zumeist asymptomatisch verlaufende chronische Erkrankung, deren große medizinische und volkswirtschaftliche Bedeutung in den durch sie hervorgerufenen Endorganschäden begründet ist. Vor allem am Herz-Kreislaufsystem und an den Nieren bedingt sie schwerwiegende Folgeerkrankungen wie Schlaganfall, koronare und hypertensive Herzkrankheit sowie Niereninsuffizienz (Mancia *et al.*, 2007).

Unterschieden wird eine primäre (essentielle) von einer sekundären Hypertonie. Über 90 % der Hypertonien sind primäre Hypertonien, die in der Regel erst jenseits des 30. Lebensjahres auftreten und deren Entstehung aus einem Wechselspiel zwischen Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren resultiert, wobei die genaue Pathogenese dieser multifaktoriellen, polygenen Erkrankung bis heute nicht geklärt ist. Bei sekundären Hypertonien ist die Blutdruckerhöhung Folge einer anderen Erkrankung. Ein Beispiel hierfür sind renale Hypertonien, die durch eine Glomerulonephritis, eine chronische Pyelonephritis, Zystennieren oder eine Nierenarterienstenose bedingt sein können oder, als weiteres Beispiel, endokrine Hypertonien, die z. B. bei einem Phäochromozytom oder einem Cushing-Syndrom auftreten (Deutsche Hochdruckliga e.V. und Deutsche Hypertonie Gesellschaft, 2005).

Epidemiologische Studien zeigen, dass die Prävalenz der arteriellen Hypertonie in den westlichen Industriegesellschaften heute über 20 % beträgt (Wolf-Maier *et al.*, 2003). In Deutschland stehen Herz-Kreislauferkrankungen, für die die arterielle Hypertonie eine wesentliche behandelbare Ursache darstellt, an erster Stelle der Mortalitätsstatistik (Schelhase & Rübenach, 2006).

1.1.1 Blutdruckklassifikation

Der Blutdruck wird nach internationalen Richtlinien von 1999 in einen normotonen und einen hypertonen Bereich eingeteilt, wie Tab. 1.1 veranschaulicht (Mancia *et al.*, 2007). Es gibt dabei keinen Schwellenwert, der die Hypertonie sicher von einer Normotonie trennen kann. Deshalb wurde ein Grenzwert dort definiert, wo das kardiovaskuläre Risiko signifikant zu steigen beginnt. Definitionsgemäß werden Blutdruckwerte unter 140 mm Hg systolisch und unter 90 mm Hg diastolisch

als normoton gewertet. Werte über 140 mm Hg systolisch und 90 mm Hg diastolisch werden der Hypertonie zugeordnet, wobei nach den Blutdruckwerten drei Stadien unterschieden werden (siehe Tab. 1.1). Klinisch lassen sich 3 Formen ableiten: die Hypertonie ohne Endorganschäden, mit Endorganschäden und mit kardiovaskulären Folge-/ Begleiterkrankungen.

Tabelle 1.1: Klassifikation der arteriellen Hypertonie

Blutdruck (mm Hg)	Systolisch	Diastolisch
Optimal	<120	<80
Normal	<130	<85
Hoch-normal	130–139	85–89
Bluthochdruck Stadium 1	140–159	90–99
Stadium 2	160–179	100–109
Stadium 3	≥180	≥110

1.1.2 Hypertensive Endorganschäden

Zu den Endorganschäden, die in die Graduierung eingehen, zählen eine nachgewiesene linksventrikuläre Hypertrophie, eine Proteinurie oder Serumkreatininerhöhung (hypertensive Nephropathie), eine morphologisch darstellbare Angiosklerose mit atherosklerotischen Plaques in der Aorta, den Aa. carotides, iliacae oder femorales sowie Einengungen von Arterien der Retina (Fundus hypertonicus). Die Manifestation der hypertensiven Endorganschäden (HES) ist offenbar eine Folge der Blutdruckerhöhung. Sicher ist, dass der Schweregrad der arteriellen Hypertonie mit der Ausprägung der HES korreliert. Aus Daten der Framingham-Studie lässt sich ableiten, dass es mit zunehmender Blutdruckhöhe zu einem konstant steigenden kardiovaskulären Risiko kommt (Kannel *et al.*, 1987).

1.2 Proteinurische Nephropathie und ihre Folgen

Ein spezieller hypertensiver Endorganschaden, der in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden soll, ist eine Nephropathie mit Proteinurie. Diese beginnt mit einer Albuminurie und kann durch fortschreitende Zerstörung von Nierenparenchym zu einem terminalen Nierenversagen führen. Es gibt Daten, die zeigen, dass Amerikaner asiatischer und afrikanischer Abstammung eine deutlich erhöhte Inzidenz eines terminalen Nierenversagens haben (Freedman, 2002). Es konnte

gezeigt werden, dass im Südosten der Vereinigten Staaten Amerikaner afrikanischer Abstammung 20 mal häufiger ein Hypertonie-bedingtes terminales Nierenversagen erleiden als der Rest der Bevölkerung (Annual Report, The Southeastern Kidney Council, ESRD Network 6, 1995) und insgesamt sieben mal häufiger als in der Gesamtbevölkerung der Vereinigten Staaten (United States Renal Data System, USRDS 2000 Annual Data Report, The National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, August 2000). Des Weiteren zeigte sich bei Amerikanern afrikanischer Abstammung eine vier mal höhere Inzidenz eines terminalen Nierenversagens infolge eines Diabetes mellitus als bei anderen an Diabetes mellitus erkrankten Amerikanern (Brancati *et al.*, 1992).

Das deutet darauf hin, dass diese Erkrankungen einen genetisch bedingten Hintergrund aufweisen. Weitere Studien belegen auch für eine Vielzahl anderer renaler Erkrankungen (Diabetes mellitus-, Systemischer Lupus erythematodes- und HIV-assoziierte Nephropathie, IgA-Nephropathie, fokale und segmentale Glomerulosklerose) eine familiäre Häufung (Lei *et al.*, 1998; Schelling *et al.*, 1999; Freedman & Satko, 2000). Damit stellt sich die Frage, welche genetischen Faktoren bei ihren Trägern eine Suszeptibilität für diese renalen Erkrankungen bedingen können.

1.2.1 Albuminurie

Im gesunden Organismus passiert das aus den Glomeruluskapillaren austretende Ultrafiltrat drei Komponenten einer Filtrationsbarriere: die Endothelporen der Kapillarwand, die glomeruläre Basalmembran und die Schlitzmembran zwischen den Podozytenfortsätzen. Die glomeruläre Filtrationsbarriere ist durchlässig für Moleküle bis 50 000 Dalton. Für Proteine ab 60 000 Dalton und Zellen ist sie undurchlässig. Albumin mit einem Molekulargewicht von 69 000 Dalton wird bei intakter Filtrationsbarriere nicht filtriert.

Nur geringe Mengen von Oligopeptiden und Proteinen erscheinen im Primärharn. Diese werden durch Peptidasen des epithelialen Bürstensaums gespalten und als Aminosäuren im proximalen Tubulus vollständig resorbiert. Weiterhin werden Proteine durch Endozytose in die Tubuluszellen aufgenommen und lysosomal verdaut.

Bei Schädigungen der glomerulären Filtrationsbarriere gelangt vermehrt Eiweiß in den Primärharn. Die Transportmechanismen werden überlastet, so dass im Endharn Proteine wie z.B. Albumin nachweisbar sind.

Je nach Ausprägung wird beim Menschen eine Mikroalbuminurie mit einer Albuminexkretion mit bis zu 300 mg/24 h von einer Makroalbuminurie mit einer Ausscheidung von über 300 mg/24 h unterschieden. Eine Mikroalbuminurie ist einerseits ein Indikator für eine glomeruläre Schädigung

und kann als früher Indikator für einen hypertoniebedingten Endorganschaden der Niere gewertet werden. Andererseits konnte gezeigt werden, dass eine Albuminurie mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen vergesellschaftet ist (Atkins *et al.*, 2003).

1.2.2 Renale interstitielle Fibrose

Durch die Anwesenheit von Proteinen im proximalen Tubulus kommt es zu einer komplexen tubulointerstitiellen Entzündungsreaktion, die zu einem fibrotischen Umbau des Parenchyms, einer renalen interstitiellen Fibrose, führt.

Studien haben gezeigt, dass es zwischen vermehrter Proteinexkretion und tubulointerstitieller Schädigung einen Zusammenhang gibt (Remuzzi *et al.*, 1997). Glomerulopathien mit Proteinurie führen zu einer terminalen Niereninsuffizienz über einen Prozess, der zu einer fortschreitenden parenchymalen Zerstörung führt. Dieser Prozess scheint dabei unabhängig von der Art der initialen Schädigung zu sein, die zu einer Proteinurie führte (Remuzzi, 2000). Der erste Schritt ist dabei immer eine Erhöhung der glomerulären Permeabilität, worauf eine gesteigerte Filtration und somit Präsenz von Makromolekülen im proximalen Tubulus folgt. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Protein im Primärharn eine intrinsische Toxizität auf den proximalen Tubulus besitzt (Macconi *et al.*, 2000). Im Rahmen der gesteigerten Reabsorption filtrierter Proteine kommt es zu einer Aktivierung der Epithelzellen des proximalen Tubulus. Biochemische Prozesse, die mit einer tubulären Zellaktivierung als Antwort auf den Proteinstress einhergehen, führen zu einer vermehrten Bildung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Remuzzi *et al.*, 1997). Es resultiert eine Entzündungsreaktion, die zu einer tubulointerstitiellen Schädigung mit gesteigerter Fibrogenese führt (Hsu & Couser, 2003).

Die Entwicklung einer renalen interstitiellen Fibrose repräsentiert somit einen wichtigen Schritt in der Entstehung einer proteinurischen Nephropathie, wobei es möglicherweise eine Korrelation zwischen der renalen interstitiellen Fibrose, der Erkrankungsprognose und dem Organüberleben gibt (Hsu & Couser, 2003; de Heer *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2000) .

1.3 Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung

Der Mensch hat im Vergleich zu vielen Tieren eine sehr viel längere Generationszeit. Auch entwickeln sich beim Menschen Erkrankungen wie zum Beispiel der systolische Bluthochdruck und die proteinurische Nephropathie sehr viel langsamer als bei Tieren mit kurzer Generationsdauer, was longitudinale Beobachtungen aufgrund der langen Krankheitsverläufe erschwert. Hinzu kommen die vielfältigen Probleme beispielsweise der Probengewinnung bei menschlichen Patienten oder

Probanden. Deswegen spielen Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung auch heute noch eine unverzichtbare Rolle.

1.3.1 Ziel tierexperimenteller Modelle

Ein wesentlicher Vorteil tierexperimentelle Modelle ergibt sich aus der Tatsache, dass die meisten Erkrankungen multifaktoriell bedingt sind. Neben genetischen Faktoren beeinflussen auch Umweltfaktoren die Entstehung und den Verlauf der Erkrankung. Tierexperimentell lassen sich äußere Einflüsse kontrollieren und steuern. Bestimmte äußere Faktoren wie zum Beispiel die Auswirkung einer hohen Kochsalzzufuhr auf den Phänotyp Bluthochdruck können so anhand von Tiermodellen sehr viel leichter untersucht werden als in diesen vielfältigen äußeren Einflüssen ausgesetzten menschlichen Populationen (Kreutz & Hübner, 2002).

Außerdem erlauben molekulargenetisch definierte Tiermodelle eine Korrelation von genetisch bedingten Veränderungen mit einem Phänotyp. Deswegen haben Tiermodelle einen hohen Stellenwert in der Identifizierung bisher unbekannter genetischer Faktoren, die bei der Pathogenese multifaktoriell bedingter Erkrankungen wie Hypertonie und Albuminurie eine Rolle spielen (Rapp, 2000).

1.3.2 Beispiele für Tiermodelle

Goldblatt *et al.* gelang es 1934, durch Drosselung des renalen Blutflusses in der Nierenarterie beim Hund einen dauerhaften Hochdruck zu erzeugen. Von den Untersuchungen Goldblatts ausgehend wurden eine Reihe tierexperimenteller Studien durchgeführt, die sich mit der Pathogenese der sekundären, also organbedingten Hypertonieformen befassten.

Ratten-Inzuchtstämme werden seit Jahrzehnten in der Forschung eingesetzt. Zwischen den verschiedenen Rattenstämmen bestehen oft große phänotypische Unterschiede. Um die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, war es notwendig, die genetische Heterogenität innerhalb eines Stammes zu reduzieren. Deswegen wurden Inzuchtstämme entwickelt. Ein solcher Stamm wird etabliert, indem ausgehend von einem Zuchtpaar über mehr als 20 Generationen eine Bruder-Schwester-Verpaarung erfolgt. Dies führt zu einer fast vollständigen Homozygotie der Tiere. Diese kann über 99 % betragen und wird unter anderem durch die in jeder Generation auftretenden Spontanmutationen limitiert (Kreutz & Hübner, 2002).

In den 60er Jahren wurde von Dahl *et al.* ein Rattenstamm gezüchtet, der auf eine hohe Kochsalzzufuhr mit einem starken Blutdruckanstieg reagierte. Diese Tiere waren salssenitiv im Vergleich zu anderen Ratten, die auch bei hohem Salzkonsum normotensiv blieben. Mit diesem Tiermodell wur-

de ein Grundstein für die experimentelle Hochdruckforschung, die die primäre Hypertonie betraf, gelegt. 1963 züchteten Okamoto und Aoki einen Rattenstamm, der im Alter von wenigen Wochen eine spontane Hypertonie zeigte (SH-Ratte, *spontaneously hypertensive rat*) (Okamoto & Aoki, 1963). Des Weiteren entstanden Inzuchtlinien, die neben einer spontanen Hypertonie auch renale Endorganschäden mit Nephrosklerose und Proteinurie zeigten, wie zum Beispiel die von Frömter etablierte Munich-Wistar-Frömter-(MWF)-Ratte und die „Fawn-Hooded"(FH)-Ratte (Ganten & de Jong, 1994).

1.3.3 Eine MWF-SHR-Rückkreuzungspopulation als Modell einer Nephropathie mit Albuminurie

Ein wichtiges Ziel tierexperimenteller Forschung ist die oben erwähnte Identifikation bisher unbekannter genetischer Faktoren, die in der Pathogenese von Erkrankungen eine Rolle spielen. Mit der Verbindung aus klassischen Kreuzungsverfahren (Kosegregationsanalysen) und neuen molekulargenetischen Methoden der Intervallkartierung (Kopplungsanalyse bzw. QTL-Kartierung) können genetische Faktoren identifiziert werden, die einen bestimmten Phänotyp beeinflussen. Um ein genetisches Merkmal zu lokalisieren, ist die klassische Kartierung durch Rückkreuzung eine wichtige Methode. Voraussetzung ist, dass sich die ausgewählten Tierstämme in einem bestimmten Phänotyp unterscheiden. Um die genetischen Grundlagen einer Nephropathie zu untersuchen, würde man für eine Rückkreuzung einen nierenkranken und einen nierengesunden Stamm verpaaren.

Die MWF-Ratte ist ein wichtiges experimentelles Modell, um das Fortschreiten einer chronischen Nierenerkrankung mit Albuminurie und Proteinurie zu untersuchen (Macconi *et al.*, 2000; Fassi *et al.*, 1998). Studien haben gezeigt, dass der Grund für die abnormale Durchlässigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere für Proteine bei diesem Stamm vermutlich mit einer Störung der Integrität des glomerulären Epithels einhergeht: es kam bei MWF-Ratten zu einer veränderten Verteilung des tight-junction-Proteins Zonula occludens-1 in den Podozyten (Macconi *et al.*, 2000). Diese Verteilungsstörung findet sich schon bei jungen MWF-Tieren und könnte eine vermehrte Proteinfiltration bedingen. Die Entwicklung einer renalen interstitiellen Fibrose ist letztendlich das Ergebnis einer progressiven tubulointerstitiellen Schädigung als Antwort auf die fortwährende starke Proteinfiltration (Remuzzi *et al.*, 1997). Das MWF-Modell repräsentiert also ein Tiermodell, mit dessen Hilfe einerseits der genetische Hintergrund molekularer Veränderungen der glomerulären Filtrationsbarriere sowie andererseits morphologische und funktionelle Veränderungen der Niere untersucht werden können.

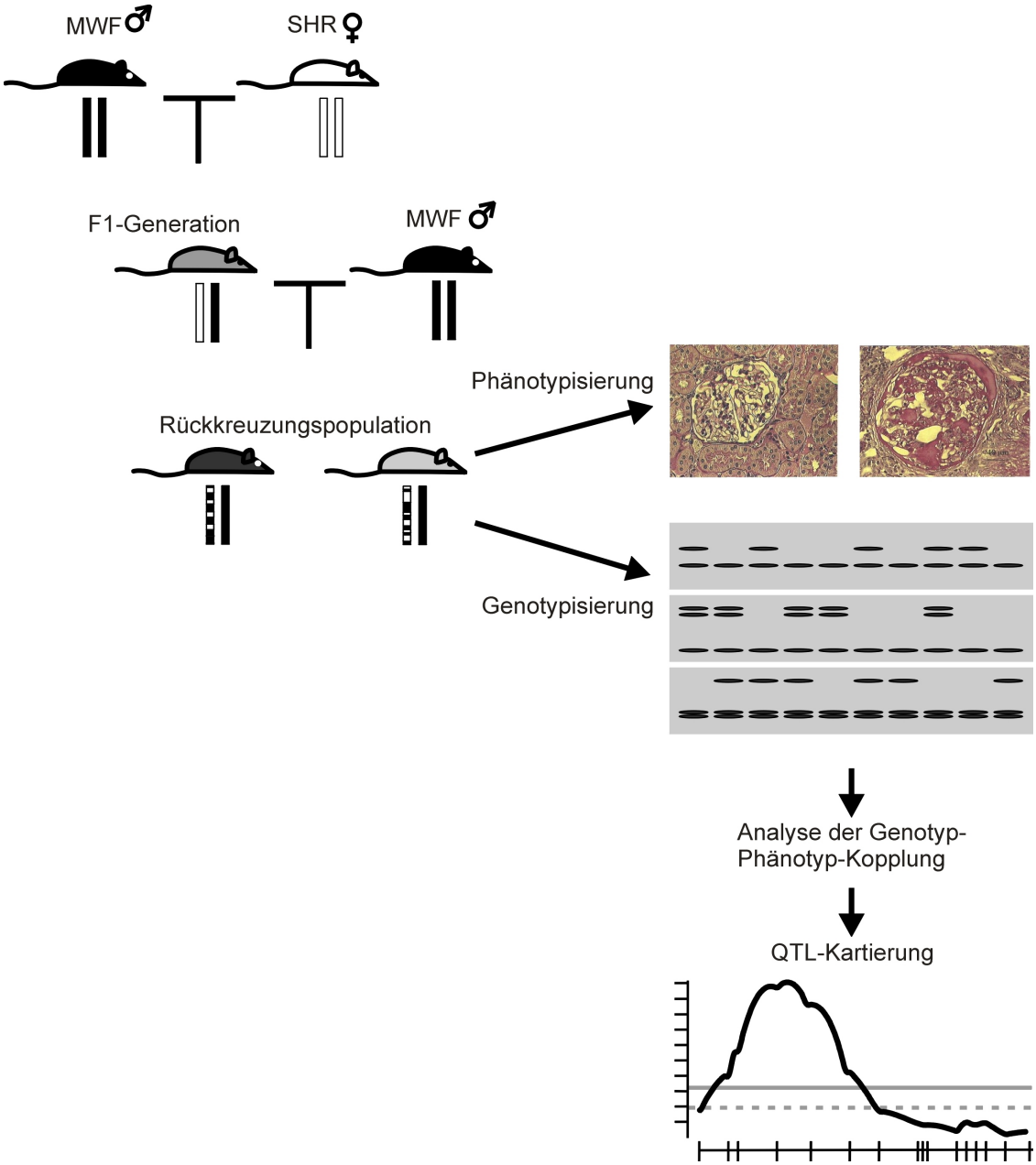

Abbildung 1.1: Design des Rückkreuzungsexperiments: verpaart wurden männliche MWF- mit weiblichen SHR-Tieren. Die heterozygote erste Filial-Generation (F_1) wurde anschließend mit männlichen MWF-Tieren rückgekreuzt. Der Phänotyp der Tiere wird durch die unterschiedliche Farbe der Tiere symbolisiert. Unter jedem Tier ist ein repräsentatives Chromosomenpaar gezeigt, wobei die von den MWF- und SHR-Tieren stammenden Chromosomenabschnitte durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet sind.

In vorhergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte am MWF-Modell gezeigt werden, dass dessen Albuminurie polygenetisch determiniert ist (Schulz *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der MWF-Ratte der genetische Hintergrund der früh einsetzenden Albuminurie sowie die möglicherweise vorhandene Verbindung zwischen der Entstehung einer Albuminurie und einer renalen interstitiellen Fibrose untersucht. Für eine Kopplungsanalyse wurde eine Rückkreuzungspopulation gezüchtet, wobei nierenkranke MWF- mit nierengesunden SHR-Ratten verpaart wurden. Der SHR-Stamm zeigt im Vergleich zur MWF-Ratte eine ähnlich schwere Hypertonie, allerdings fast keine Albuminurie und eine signifikant geringere renale interstitielle Fibrose (Poyan *et al.*, 2003).

In Abb.1.1 ist das Design des MWF-SHR-Rückkreuzungsexperiments schematisch dargestellt. Hierfür wurden jeweils homozygote männliche MWF- und weibliche SHR-Ratten verpaart. Die erste Generation (F_1) ist heterozygot und genetisch homogen. Die weiblichen F_1-Tiere wurden anschließend mit MWF-Männchen zurückgekreuzt. Es resultiert eine genetisch heterogene Rückkreuzungspopulation, deren Tiere an jedem autosomalen Genort homozygot für das MWF-Allel oder heterozygot mit einem MWF- und einem SHR-Allel sein können.

Über eine Phänotypisierung und mit anschließender Genomanalyse kann eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung erstellt werden. Mit Hilfe von statistischen Verfahren können dann genetische Faktoren, die einen bestimmten Phänotyp beeinflussen, als sogenannte *quantitative trait loci* (QTL) identifiziert und chromosomal kartiert werden (Rapp, 2000). Ein QTL bezeichnet dabei die wahrscheinlichste Position eines regulierenden Gens auf einem Chromosomenabschnitt (Rapp, 2000).

1.4 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der genetische Hintergrund einer Nierenschädigung mit Albuminurie, Glomerulosklerose und renaler interstitieller Fibrose bei der MWF-Ratte untersucht werden. Hierfür erfolgte zunächst eine Phänotypisierung hinsichtlich Blutdruck, Albuminurie, Glomerulosklerose und renaler interstitieller Fibrose bei der MWF-Ratte im Vergleich zur spontan hypertensiven Ratte (SHR) ohne Nierenschädigung.

In einer gezüchteten Rückkreuzungspopulation aus MWF- und SHR-Ratten sollte nach phänotypischer Charakterisierung hinsichtlich Blutdruck, Albuminurie, Glomerulosklerose und renaler interstitieller Fibrose eine Korrelationsanalyse zwischen diesen Phänotypen durchgeführt werden.

Anschließend sollten in einer genomweiten Kopplungsanalyse und QTL-Kartierung genetische Faktoren identifiziert werden, die einen Einfluss auf eine früh einsetzende Albuminurie, eine Glomerulosklerose und eine renale interstitielle Fibrose haben.