

1 Einleitung

1.1 Die primäre Hypertonie und ihre Bedeutung

Bluthochdruck zählt neben Übergewicht, Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus und Rauchen zu den bedeutendsten Risikofaktoren für Herz-Kreislaufkrankungen. Kardiovaskuläre Erkrankungen wiederum stellen die Hauptursache für Morbidität und Mortalität in den industrialisierten Ländern dar (Murray et al., 1997). Gemäß der durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) festgelegten Definition liegt eine arterielle Hypertonie dann vor, wenn mit der Methode nach Riva-Rocci und Korotkoff Blutdruckwerte von systolisch größer/gleich 140 mmHg und diastolisch größer/gleich 90 mmHg gemessen werden. Die Einteilung in primäre und sekundäre Hypertonie erfolgt dabei in Abhängigkeit von der Kenntnis der Entstehungsursache. Ist der Hypertonus infolge pathologischer Organveränderungen entstanden, erfolgt die Zuordnung zu den sekundären Hypertonieformen, konnten keine ursächlichen Pathomechanismen identifiziert werden, spricht man von primärer oder essentieller Hypertonie (Kreutz, Paul, Ganten, 2000).

Die enorme medizinische und sozioökonomische Bedeutung der arteriellen Hypertonie ergibt sich aus ihrer hohen Prävalenz und den aus ihr resultierenden hypertensiven Endorganschäden und Folgeerkrankungen. 25 % der erwachsenen deutschen Bevölkerung sind Hypertoniker, wobei die Prävalenz mit zunehmendem Alter kontinuierlich ansteigt, so dass unter den über 65-jährigen bereits jeder Zweite zu hohe Blutdruckwerte aufweist (Kreutz, Paul, Ganten, 2000). Betrachtet man die demographische Entwicklung in den westlichen Industrieländern, so wird sich mit der zunehmenden Lebenserwartung auch der Anteil der Hypertoniker zukünftig weiter erhöhen (van Rossum et al., 2000).

Die primäre Hypertonie stellt von beiden genannten Hypertonieformen mit einem Anteil von ca. 90 – 95 % unter den Hypertonikern die zahlenmäßig bedeutsamere Form der Hypertonie dar. Als auslösende Faktoren für die Entstehung einer Hypertonie wurden bereits Ende der vierziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts genetische Ursachen vermutet. Uneinigkeit herrschte allerdings darüber, ob der Blutdruckregulation ein oder mehrere Gene zugrunde liegen. Während Platt die Ein-Gen-Hypothese vertrat, argumentierte Pickering für die Beteiligung mehrerer Gene (Platt, 1947; Pickering, 1959). Die von Camussi im Rahmen von epidemiologischen Studien beobachtete familiäre

Häufung sowie die erhöhte Konkordanz der Hypertonie bei eineiigen Zwillingen unterstützten die Annahme, dass die primäre Hypertonie eine genetisch regulierte Erkrankung darstellt (Camussi et al., 1988). Entscheidende Hinweise zur genetischen Beeinflussung der Blutdruckregulation und Hypertonie-Entstehung ergab die Aufklärung von seltenen, monogenetischen und damit „klassisch Mendelschen“ Hypertonieformen (Lifton, 1996). In diesem Zusammenhang konnten für das autosomal dominant vererbte Liddle-Syndrom, den glukokortikoidreagiblen Aldosteronismus (GRA) und den augenscheinlichen Mineralokortikoidexzeß (AME) Mutationen in dem jeweiligen, für die Blutdruckregulation verantwortlichen Gen identifiziert werden. Bei den meisten bisher gefundenen Mutationen in mindestens 10 Genen erfolgt die Beeinflussung des Blutdruckes über eine gesteigerte oder verminderte Salz- und Wasserresorption in der Niere (Lifton et al., 2001). Als wichtigster mit der primären Hypertonie assoziierter Genpolymorphismus wurde eine Veränderung im Promotor des Angiotensinogen-Gens beschrieben (Corvol et al., 1999). Die erwähnten Beispiele bestätigen sowohl Platts Hypothese einer monogenetischen, als auch Pickerings Hypothese einer polygenetischen, d. h. einer durch mehrere, verschiedene Gene determinierten, Blutdruckregulation. In den weitaus meisten Fällen handelt es sich bei der arteriellen Hypertonie jedoch um eine polygenetisch und multifaktoriell regulierte Erkrankung, der mehrere, unabhängig voneinander vererbte Genveränderungen zugrunde liegen können und deren Ausmaß zusätzlich von verschiedenen Umweltfaktoren wie den individuellen Lebensbedingungen, z. B. der Ernährung, beeinflusst wird (Abb. 1).

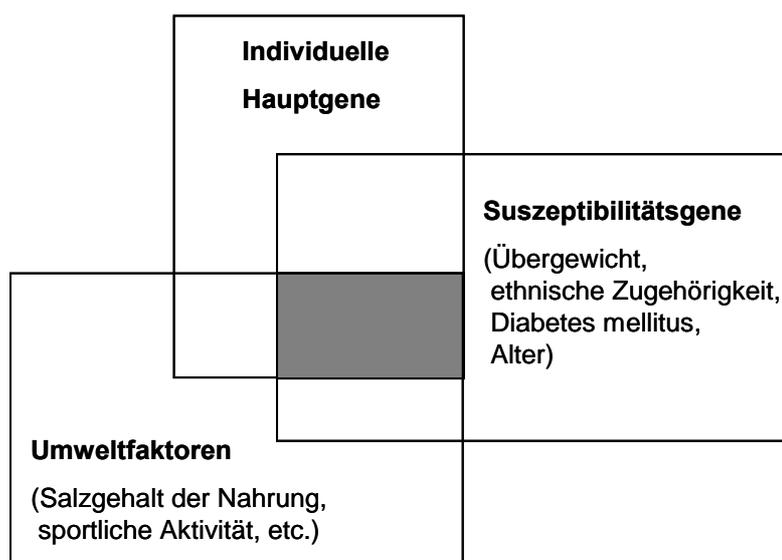


Abb. 1: Die essentielle Hypertonie (graues Feld) als Resultante verschiedener Interaktionen zwischen genetischen Faktoren und Umweltvariablen.
(modifiziert nach Rutherford, 2003)

1.2 Bedeutung von Salzsensitivität und Kochsalz

1904 wurden erstmals von Ambard und Beaujard Auswirkungen einer verminderten Salzaufnahme auf den Bluthochdruck beschrieben (Ambard & Beaujard, 1956). Hundert Jahre später wird die Rolle eines erhöhten Salzkonsums in der Pathogenese der Hypertonie, bei der Blutdruckerhöhung mit zunehmendem Alter sowie als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen noch immer kontrovers diskutiert (Alderman, 2002; Elliott et al., 2002; Freeman et al., 2002; He et al., 2002; MacGregor et al., 2002). Ebenso vehement umstritten sind Empfehlungen, die vor allem für die entwickelten Industrieländer eine mäßige Reduktion des Salzkonsums von derzeit ca. 10 g/Tag auf 5 g/Tag anraten. Die Intensität der Debatte wird durch mindestens fünf randomisierte, kontrollierte Meta-Analysen zum Effekt einer Natriumrestriktion auf den Blutdruck verdeutlicht (Law et al., 1991; Cutler et al., 1991, 1997; Midgley et al., 1996; Graudal et al., 1998). Das nicht bei allen Menschen auftretende Phänomen eines bei erhöhter Kochsalzzufuhr verstärkter ansteigenden bzw. bei kochsalzarmer Diät signifikant abfallenden Blutdruckes, wird als Salzsensitivität in der Literatur beschrieben (Luft, 1999). Im Vergleich dazu wird ein von der Salzaufnahme unabhängiger Blutdruck als salzresistent bezeichnet. Die Salzsensitivität weist, ebenso wie die Hypertonie, eine

mit zunehmendem Alter stark ansteigende Prävalenz auf und ist vor allem in jüngeren Jahren unter Hypertonikern deutlich stärker ausgeprägt als unter der normotensiven Bevölkerung. Je nach Alter, Bevölkerungsgruppenzugehörigkeit (häufigeres Auftreten bei Angehörigen der schwarzen Bevölkerung) und genetischer Prädisposition (höhere Prävalenz bei Hypertoniker-Verwandten ersten Grades) kann der Anteil dieser salzsensitiven Menschen bis zu 85 % der Patienten mit primärer Hypertonie betragen (Weinberger et al., 1986, 1991; Weir et al. 1998; Abb. 2). Weitere prädisponierende Faktoren sind neben dem Alter die Adipositas und der Typ 2-Diabetes mellitus (Bianchi et al., 1999).

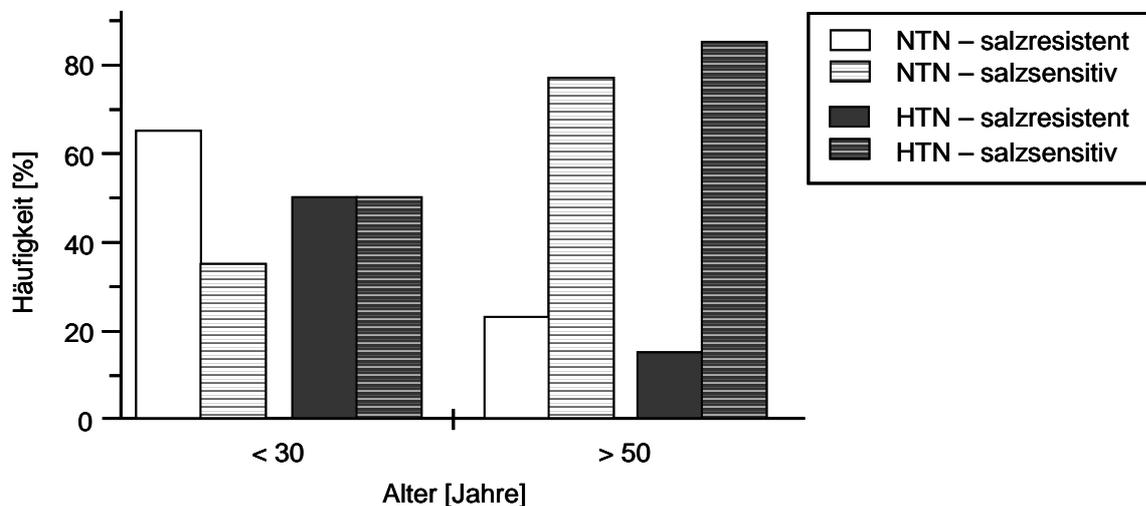


Abb. 2: Prävalenz von Salzsensitivität und Salzresistenz in Abhängigkeit von Alter und Blutdruck. NTN = Normotoniker; HTN = Hypertoniker (modifiziert nach Weinberger et al., 1991).

Die Bedeutung der Salzsensitivität ergibt sich aus der Tatsache, dass bei salzsensitiven, hypertensiven Patienten durch das Zusammentreffen verschiedener kardiovaskulärer und renaler Risikofaktoren ein deutlich erhöhtes Risiko für die Manifestation von Folgeerkrankungen durch häufiger und schwerer auftretende Organschäden an Herz, Gefäßen und Nieren besteht (Bigazzi et al., 1996, Morimoto et al. 1997). Dass Kochsalz eine wesentliche Rolle bei der Determinierung des Blutdrucks und seines Schweregrades spielt sowie darüber hinaus zum großen Teil für den altersbedingten Blutdruckanstieg verantwortlich ist, wurde in zahlreichen tierexperimentellen und kontrollierten klinischen Studien belegt (Intersalt Cooperative Research Group, 1988;

Adshead, 1992; Elliott et al., 1996; Midgley et al., 1996; Daniel et al., 1997; Cutler et al., 1997; Graudal et al., 1998). Zusätzlich zur Erhöhung des Blutdruckes wird Kochsalz für verschiedene andere, blutdruckunabhängige schädliche Effekte auf das kardiovaskuläre System verantwortlich gemacht. Einige davon scheinen ebenso bedeutsam wie die durch Bluthochdruck hervorgerufenen Schädigungen zu sein. So konnten Lindpaintner und Sen in einem Rattenmodell für renovaskuläre Hypertonie durch Salzrestriktion eine signifikante Reduktion des relativen Herzgewichtes bei unveränderten Blutdruckwerten nachweisen (Lindpaintner & Sen, 1985). Salz-Studien an normotensiven Ratten bestätigten den blutdruckunabhängigen hypertrophen Effekt von Kochsalz am Herzen (Kihara et al., 1985; Fields et al., 1991). In zahlreichen weiteren Studien konnte die direkte Assoziation zwischen der über die Nahrung aufgenommenen Salzmenge und dem Ausmaß der linksventrikulären Hypertrophie, die einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität darstellt, belegt werden (Schmieder et al., 1988, 1996, 2000; Daniels et al., 1990; Langenfeld et al., 1995; Messerli et al., 1997; Perry et al., 2000). Diese starke Assoziation war nicht nur auf die erhöhte Nachlast als funktioneller Antwort auf mechanischen Stress zurückzuführen, sondern blieb auch unter Berücksichtigung des durch die erhöhte Salzzufuhr erzeugten Blutdruckanstiegs erhalten. Als salzbedingte Veränderungen in der Niere wurden eine erhöhte glomeruläre Filtrationsrate und eine veränderte Natrium-Reabsorption im proximalen Tubulus beobachtet. Diese Anomalien waren bei salzsensitiven, hypertonen Patienten in stärkerem Maße ausgeprägt (Barba et al., 1996; Mallamaci et al., 1996). In verschiedenen experimentellen Hypertoniemodellen wurden sowohl an renalen als auch zerebralen Gefäßen salzbedingte, blutdruckunabhängige strukturelle Veränderungen beobachtet (Tobian et al., 1990, 1991). An arterialen Gefäßen führte die moderate Reduktion der Salzaufnahme unabhängig vom Blutdruck zu verminderter Gefäßsteifigkeit und verringerter Gefäßwanddicke (Avolio et al., 1986). Ausgehend von der individuell unterschiedlichen Prädisposition für Salzsensitivität und der bei gleichen Blutdruckwerten individuell unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber den organschädigenden Einflüssen hoher Blutdrücke scheinen blutdruckunabhängige, genetische Mechanismen bei der salzbedingten Organschädigung eine Rolle zu spielen.

1.3 Bluthochdruckassoziierte Organschäden

Langfristig führt die arterielle Hypertonie durch funktionelle und strukturelle Veränderungen zu erheblichen Endorganschäden und zur Manifestation von Folgeerkrankungen, insbesondere am Herzen, den Gefäßen und den Nieren. Dabei hängen das Aus-

maß der Schädigung, Morbidität und Mortalität in erster Linie von der Dauer und dem Schweregrad der Hypertonie ab, wobei schon in normotensiven Bereichen eine direkte Proportionalität mit der Höhe des Blutdruckes besteht (Carretero & Oparil, 2000).

1.3.1 Niere

Guyton und Mitarbeiter zählten zu den ersten, die der Niere eine bedeutende Schlüsselrolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Hypertonie zusprachen. Sie vermuteten in der verminderten Fähigkeit der Niere, eine der aufgenommenen Salzmenge entsprechende Menge auszuscheiden und in der dadurch bedingten gestörten Natrium-Balance die Ursache des Bluthochdruckes (Guyton et al., 1964). Durch in der Niere stattfindende Retentions- und Ausscheidungsmechanismen entspricht unter physiologischen Bedingungen die ausgeschiedene der mit der Nahrung aufgenommenen Salzmenge. Dabei ist für die Salz-Exkretion ein bestimmter mittlerer arterieller Druck im Glomerulum erforderlich, daher bezeichnet man diesen Prozess als Druck-Natriurese. Im Falle eines erhöhten Blutdruckes verfügt die Niere über einen Autoregulationsmechanismus, der sie vor zu hohen, potentiell schädigenden Drücken schützt. Die Übertragung des erhöhten arteriellen Blutdruckes auf das Glomerulum wird dabei durch Vasokonstriktion der afferenten Glomerulusarteriole verhindert und infolgedessen der glomeruläre hydrostatische Druck konstant gehalten. Störungen dieses adaptiven Mechanismus werden mit einer erhöhten Suszeptibilität für die Entwicklung einer progressiven Nierenschädigung in Verbindung gebracht (Bianchi et al., 1999). In Studien an experimentellen Modellen für salzsensitive Hypertonie konnte im Vergleich zu salzresistenten, hypertensiven Individuen eine raschere Verschlechterung der Nierenfunktion, die ausnahmslos mit vermindertem Gefäßwiderstand der afferenten Arteriole und erhöhtem intraglomerulärem Druck einherging, beobachtet werden (Bianchi et al., 1983; Dworkin et al., 1984). Darüber hinaus wiesen salzsensitive – verglichen mit salzresistenten Patienten eine zu höheren Drücken verschobene Druck-Natriurese-Kurve auf, d.h. zur Ausscheidung einer bestimmten Salzmenge wird im Vergleich zu salzresistenten Patienten ein höherer Druck benötigt (Campese et al., 1988; Kimura et al., 1990). Guytons Hypothese, das ursächliche Eingreifen der Niere in die Blutdruckregulation, konnte sowohl in tierexperimentellen als auch humanen Transplantationsstudien bestätigt werden: Erhielt ein zuvor normotensiver Empfänger die Niere eines hypertensiven Spenders, entwickelte auch der Empfänger einen Hypertonus und umgekehrt (Curtis et al., 1983; Rettig & Schmitt, 1994). Frühzeichen einer hochdruckbedingten Nierenfunktionsstörung, die in erster Linie auf arteriosklerotischen

Veränderungen intrarenaler Gefäße beruht, ist das Auftreten einer vermehrten Protein-ausscheidung. In Abhängigkeit von ihrer Genese erfolgt die Einteilung in glomeruläre und tubuläre Proteinurien. Da der Nachweis von relativ niedermolekularen Proteinen wie beispielsweise Albumin im Urin auf eine Schädigung des glomerulären Filters hinweist, ist eine Mikroalbuminurie charakteristisch für glomeruläre Erkrankungen. Die Obergrenze der physiologisch vorhandenen Albuminurie liegt beim Menschen bei 30 mg/24h. Bei Albuminuriewerten zwischen 30 und 300 mg/24h spricht man von einer Mikroalbuminurie. Mit dem Schweregrad der Hypertonie und der Eiweißausscheidung verschlechtert sich die Nierenfunktion und kann bis zur terminalen Niereninsuffizienz führen. Bei ca. 20 % aller Patienten mit chronischem Nierenversagen kann die Erkrankung ursächlich auf Bluthochdruck zurückgeführt werden (Zucchelli et al., 1992).

1.3.2 Herz und Gefäße

Am Herzen manifestiert sich die chronische Druckbelastung bei arterieller Hypertonie als Linksherzhypertrophie. Parallel dazu kommt es zur vermehrten Bildung von Bindegewebe zwischen den Muskelfasern. Die Folgen dieser strukturellen Veränderungen sind Minderdurchblutung des Herzens sowie erhöhte Herzsteifigkeit und dadurch bedingt eine vorwiegend diastolische linksventrikuläre Funktionsstörung. Die linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) selbst stellt einen wesentlichen prognostischen Faktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität dar (Morimoto et al., 1997; Bihorac et al., 2000; Weinberger et al., 2001). Bei der Manifestation und Progression einer LVH und einer linksventrikulären Dysfunktion kommt der salzsensitiven Hypertonie eine entscheidende Bedeutung zu. Darüber hinaus ist die salzsensitive Hypertonie auch mit endothelialer Dysfunktion und Gefäßhypertrophie der Aorta assoziiert (Hayakawa et al., 1997; Barton et al., 1998). An den Herzkranzgefäßen führen erhöhte Blutdrücke zur endothelialen Dysfunktion, Mediahypertrophie und Arteriosklerose (koronare Herzkrankheit). Nach demselben Prinzip werden auch alle weiteren Gefäße geschädigt und bewirken je nach Schwere des Bluthochdrucks u. a. eine Erhöhung des Schlaganfallrisikos um das zwei- bis vierfache im Vergleich zur Normalbevölkerung (MacMahon et al., 1990).

1.4 Tiermodelle zur Untersuchung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Bedingt durch die genetische Heterogenität im Zusammenspiel mit vielfältigen Umweltfaktoren u. a. durch individuell verschiedene Lebenssituationen ist die Aussagekraft

humaner Studien für die Untersuchung der genetischen Ursachen polygenetisch regulierter Erkrankungen eingeschränkt. Zur Vereinfachung der Analyse genetisch determinierter Krankheitsbilder werden daher phänotypisch und genotypisch eindeutig charakterisierte Tiermodelle genutzt. In der Hypertonieforschung wurden in den vergangenen Jahren verschiedene genetische Modelle aus unterschiedlichen Spezies, u. a. Ratte, Hund, Kaninchen, Truthahn und Maus, etabliert (Alexander et al., 1954; Katz et al., 1957; Schlager et al., 1968; El Halawani et al., 1973; Lovenberg & Horan, 1987). Die Ratte bietet sich aufgrund gut kontrollierbarer und standardisierbarer Haltungsbedingungen und der dadurch bedingten Ausschaltung vielfältiger exogener Faktoren und deren Interaktionen untereinander als Tiermodell für genetische Untersuchungen an. Darüber hinaus erleichtern einfache Zuchtbedingungen, ein relativ kurzer Generationszyklus und nicht zuletzt die aufgrund ihrer Größe gute experimentelle Zugänglichkeit für physiologische Untersuchungen die Studiendurchführung und –planung (Hedrich, 2000). Mit im Hinblick auf ein bestimmtes phänotypisches Merkmal durchgeführten selektiven Verpaarungen über mehrere Generationen hinweg wurden Inzuchtrattenstämme für diverse Krankheitsbilder etabliert. Innerhalb eines Inzuchtrattenstammes weisen alle Tiere an sämtlichen Genorten denselben homozygoten Genotyp auf und sind damit genetisch zu über 99 % identisch. Das Merkmal für das entsprechende Krankheitsbild (z. B. Bluthochdruck) liegt in dem jeweiligen Inzuchtstamm in genetisch fixierter Form vor und wird von Generation zu Generation unverändert weiter vererbt (Kreutz et al., 1994). Die Vorteile von Inzuchtrattenstämmen sind ihre genetische Uniformität und die Stabilität der charakteristischen Merkmale über lange Zeit. Aufgrund der angeführten Vorteile zählt die Ratte zu den meistgenutzten Tiermodellen und dient als Modellorganismus für eine Vielzahl von Erkrankungen, beispielsweise kardiovaskuläre Erkrankungen (z. B. Bluthochdruck), Stoffwechselstörungen (z. B. Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen), neurologische Erkrankungen (z. B. Epilepsie, Parkinson), Autoimmunerkrankungen und verschiedene Krebsformen (Hedrich, 2000).

1.5 Häufig verwendete Rattenmodelle für das Krankheitsbild Hypertonie

Der Blutdruck bei der Ratte stellt ebenso wie beim Menschen ein quantitatives, durch verschiedene Gene sowie durch Umweltfaktoren beeinflusstes Merkmal dar. Infolgedessen ist die Ratte als Modellorganismus für die experimentelle Analyse der primären Hypertonie gut geeignet. Durch über mehrere Generationen (zumeist > 20) reichende gezielte Bruder-Schwester-Verpaarungen von Tieren mit den gewünschten Blutdruck-

eigenschaften wurden verschiedene Inzuchtrattenstämme mit spontan auftretender oder induzierbarer Hypertonie etabliert.

Der Inzuchtrattenstamm der spontan hypertensiven Ratte (SHR) wurde ausgehend von Wistar-Ratten 1963 von Okamoto und Aoki etabliert (Okamoto & Aoki, 1963). Gezielte Verpaarungen der Tiere mit den höchsten Blutdrücken führten über mehrere Generationen zu einem Stamm mit spontan auftretender Hypertonie. Der Blutdruckanstieg setzt dabei im Alter von 5 bis 6 Wochen ein und manifestiert sich mit Werten zwischen 160 und 180 mmHg im Alter von 10 Wochen (Volpe & Rubattu, 1994). Heute stellt die SHR-Ratte das am häufigsten bei der Erforschung kardiovaskulärer Erkrankungen, insbesondere in der Bluthochdruckforschung, verwendete Tiermodell dar (> 13.000 Veröffentlichungen / Referenzen, NCBI National Library of Medicine; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>).

Ebenfalls von Okamoto wurde die zu Schlaganfällen neigende, spontan hypertensive Ratte (SHRSP) durch selektives Verpaaren von SHR-Ratten mit hoher Schlaganfall-Inzidenz etabliert (Okamoto et al., 1974). Die SHRSP-Ratte entwickelt bereits als Jungtier eine schwere spontane Hypertonie, die sich bei adulten Tieren mit Werten bis zu 240 mmHg und ausgeprägten Endorganschäden manifestiert. Die Manifestation von Schlaganfällen und kardiovaskulären Endorganschäden sowie die Mortalität werden durch Salzbelastung zusätzlich signifikant erhöht.

Anfang der sechziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts waren es Dahl und Mitarbeiter in Brookhaven (USA), die Sprague-Dawley-Ratten hinsichtlich ihrer Sensitivität (S) oder Resistenz (R) gegenüber dem blutdruckerhöhenden Effekt von Natriumchlorid durch gezielte Verpaarungen selektierten (Dahl et al., 1962a; Dahl et al., 1962b). Bereits nach drei Generationen systematischer Zucht konnten sie verschiedene Linien salzsensitiver S-Ratten und salzresistenter R-Ratten isolieren. Die Tiere der S-Linie reagierten auf erhöhte Salzkonzentrationen im Futter mit einem merklichen Blutdruckanstieg, während bei den Tieren der R-Linie lediglich ein schwacher Effekt zu verzeichnen war. Durch inkonsequentes Züchten in den nachfolgenden Generationen, stellten sich die 1973 durch Rapp erworbenen Tiere sowohl des S- als auch des R-Stammes als nicht vollständig ingezüchtet heraus. Mit Hilfe präziser Blutdruckanalysen und systematischer Verpaarungen über mehr als 20 Generationen etablierte er Inzuchtstämme der salzsensitiven Dahl/SS/Jr- und der salzresistenten Dahl/SR/Jr-Ratte. Während die salzresistente Dahl/SR/Jr-Ratte normotone Blutdrücke zwischen 120 und 130 mmHg aufweist, die sich auch unter Salzbelastung nicht weiter erhöhen, stellt die salzsensitive

Dahl/SS/Jr-Ratte wie die SHR-Ratte ein Tiermodell für angeborene, spontane Hypertonie dar. Der sich bereits deutlich unter Niedrigsalz- (0,2 - 0,4 %) oder Normalfutter (1 %) entwickelnde Bluthochdruck erreicht dabei Werte zwischen 170 und 180 mmHg und steigt als Ausdruck der Salzsensitivität unter Salzbelastung mit 8 % NaCl auf Werte über 200 mmHg an. Darüber hinaus bilden sich schwere vaskuläre Schäden, vor allem in der Niere und im Herzen aus (Rapp & Dene, 1985; Rapp, 1994; Volpe & Rubattu, 1994; Walder et al., 1996). Aufgrund dieser Eigenschaften stellt die salzsensitive Dahl/SS/Jr-Ratte ein Tiermodell für spontane, salzsensitive Hypertonie mit ausgeprägten Endorganschäden dar.

1.6 Strategien zur Identifizierung von Genen

Das Spektrum vererbbarer Krankheiten reicht von monogenetischen bis zu äußerst komplex regulierten polygenetischen Erkrankungen. Zu den letztgenannten zählen einige der in den entwickelten Industrieländern am häufigsten vorkommenden Krankheiten wie Typ 2-Diabetes mellitus und Bluthochdruck. Die Aufklärung der beteiligten Gene stellt einen wichtigen Schritt bei der Erforschung der zugrunde liegenden Pathogenese dar und kann zur Entwicklung neuer Therapiestrategien beitragen.

Der Anteil der genetisch bedingten Blutdruckvariabilität in der Bevölkerung beträgt nach heutigen Schätzungen zwischen 30 und 50 % (Ward, 1995). Durch multiple Interaktionen der unterschiedlichen genetischen Faktoren mit verschiedenen Umweltvariablen ergeben sich äußerst komplexe Beziehungen. So können durch einen einzigen Umweltfaktor mehrere Krankheitsgene beeinflusst werden und zur verstärkten oder verminderten Ausprägung des Phänotyps führen, umgekehrt sind aber auch die, unter Umständen entgegengesetzten, Interaktionen verschiedener Umweltfaktoren mit nur einem Gen möglich. Durch diese komplexe, multifaktorielle und polygenetische Natur der primären Hypertonie wird die Analyse der zugrunde liegenden Ursachen und pathophysiologischen Mechanismen erschwert (Kreutz et al., 1994; Hübner, Kreutz, Lindpaintner, 1994).

Für die Identifizierung der molekulargenetischen Grundlagen genetisch regulierter Krankheiten wurden verschiedene Strategien entwickelt:

1. Kandidatengen-Analyse
2. Linkage-Analyse (Kopplungsanalyse)
3. Analyse des gesamten Genoms / Kosegregationsstudien (Abb. 3).

Die Voraussetzung für die Anwendung der Kandidatengen-Analyse ist die Kenntnis der pathophysiologischen Hintergründe der Erkrankung. Mit diesem Wissen können Gene, von denen man annimmt, dass ihre Produkte bei der Entstehung der Krankheit beteiligt sind, gezielt charakterisiert und hinsichtlich Mutationen und deren möglicher Assoziation mit dem Krankheitsphänotyp untersucht werden. Zu den im Rahmen der Hypertonieforschung in Frage kommenden Genen zählen hier vor allem die des Renin-Angiotensin-Systems, des sympathischen Nervensystems, des Kallikrein-Kinin-Systems, Ionenkanäle oder Gene, die für vasoaktive Substanzen, wie z. B. die Endotheline, kodieren. Der hauptsächlich limitierende Faktor der Kandidatengen-Methode ergibt sich aus der relativ kleinen Anzahl heute bekannter Gene: Den heute ca. 10.000 bekannten Genen stehen ca. 30.000 unbekannte Gene gegenüber (Pruit et al., 2001). Damit ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich die krankheitsrelevanten Gene unter den 75 % unbekanntem Genen befinden und dadurch mit der Kandidatengen-Methode nicht identifizierbar sind, außerordentlich hoch.

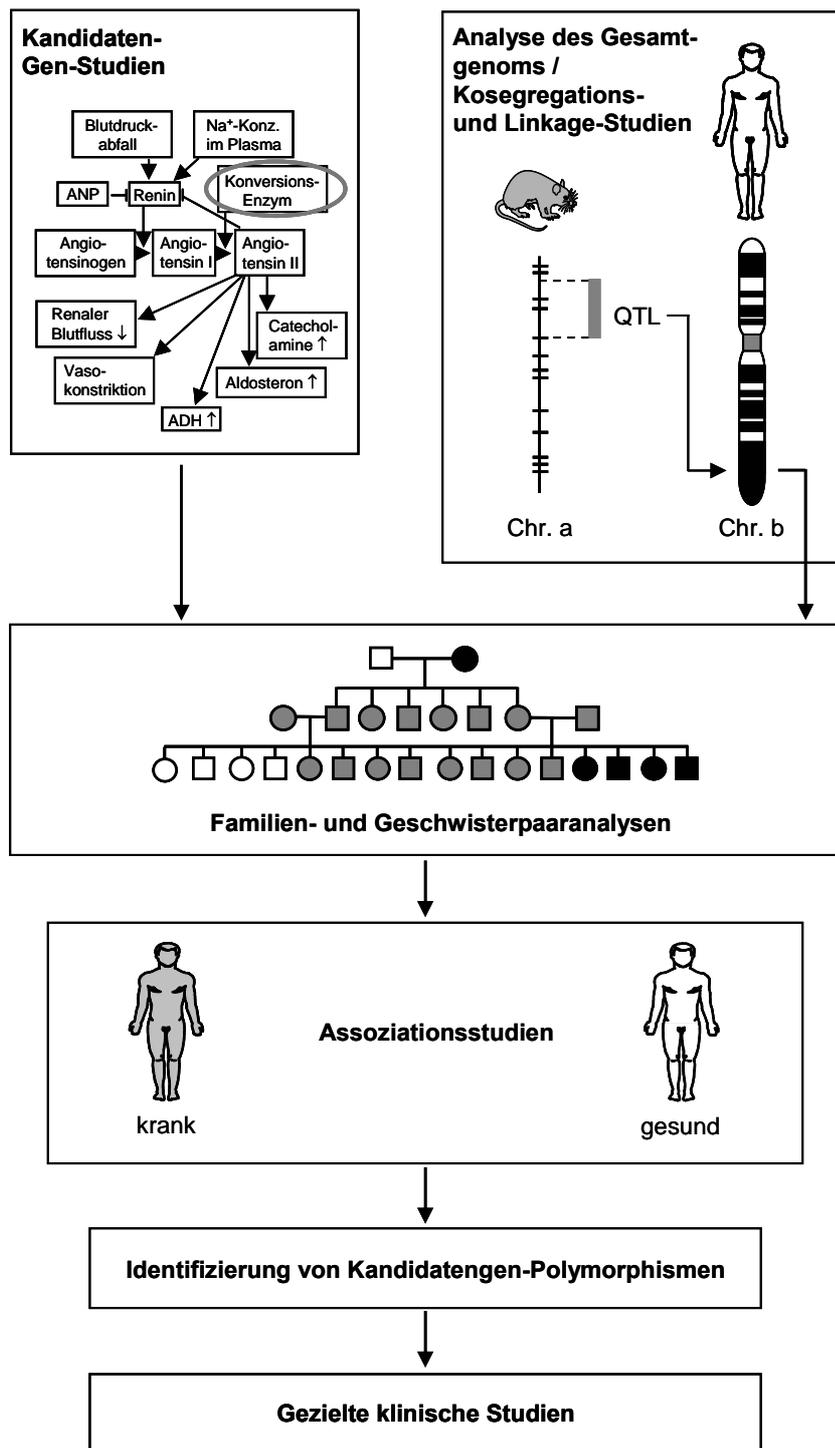


Abb. 3: Strategien zur Identifizierung krankheitsrelevanter Gene. Über den Homologievergleich mit dem menschlichen Genom können im Tiermodell ermittelte Quantitative Trait Loci (QTL) chromosomalen Regionen des Menschen zugeordnet werden. Die entsprechenden DNA-Abschnitte oder Gene, deren Produkte pathogenetische Bedeutung zu haben scheinen (Kandidatengene), können nachfolgend gezielt im Rahmen von Familien- und Geschwisterpaaranalysen sowie Assoziationsstudien untersucht und identifizierte Kandidatengenpolymorphismen in klinischen Studien überprüft werden.

Die Methode der Linkage-Analyse findet vor allem bei den seltenen monogenetischen Hypertonieformen Anwendung.

Eine effektive Methode zur Identifizierung bislang unbekannter Gene ist die tierexperimentelle bei Inzuchtstämmen angewendete Kosegregations- und Linkage-Analyse, bei der das gesamte Genom analysiert wird. Die Grundlage bilden die Gesetzmäßigkeiten der Rekombination während der Meiose sowie freie Segregation und unabhängige Verteilung der Allele. Bei der Verpaarung zweier sich in Bezug auf den zu untersuchenden Phänotyp unterscheidenden Inzuchtrattenstämme, bleiben die Nachkommen der F₂-Generation, die während der meiotischen Rekombination die mit dem Phänotyp assoziierte(n) chromosomale(n) Region(en) geerbt haben, mit dem Phänotyp assoziiert (Hübner, Kreuzt, Lindpaintner, 1994; Abb. 4). Diese relativ großen chromosomalen Regionen, die mehrere Gene mit Einfluss auf den untersuchten Phänotyp enthalten können, werden als „Quantitative Trait Loci“ (QTL) bezeichnet (Rapp, 2000). Ihre Identifizierung erfolgt durch Analyse des gesamten Genoms unter Verwendung polymorpher Mikrosatellitenmarker, deren chromosomale Lokalisation aus Kartierungsuntersuchungen bekannt ist. Lediglich Marker, die sehr nah am Krankheitsgen lokalisiert sind, bleiben mit dem pathologischen Phänotyp assoziiert, während entfernt gelegene oder Marker anderer Chromosomen keine Assoziation zur Krankheit aufweisen (Abb. 4). Eine dichte, gleichmäßige Verteilung der Marker und die Testung ausreichend großer Studienpopulationen ermöglicht auch bei polygenen Erkrankungen die Detektion von QTL. Die entsprechenden DNA-Abschnitte können anschließend gezielt durch Züchtung eines kongenen (Ratten-) Stammes (Abb. 5) verifiziert werden. Hierdurch kann einerseits in Verbindung mit der Kandidatengen-Analyse die Relevanz in Frage kommender Kandidatengene untersucht werden, zum anderen können neu identifizierte Gene funktionell charakterisiert werden. Da der Blutdruck ein quantitatives Merkmal darstellt und eine kontinuierliche Variation (Normalverteilung) von hohen zu niedrigen Werten zeigt, kann zur Ermittlung der zugrunde liegenden genetischen Faktoren die Methode des QTL-Mappings angewendet werden. Über die vielen im letzten Jahrzehnt durchgeführten Kosegregationsstudien zwischen hypertensiven und normotensiven Rattenstämmen konnten zahlreiche QTL mit Einfluss auf die Blutdruckregulation auf nahezu jedem Rattenchromosom identifiziert werden (Rapp, 2000).

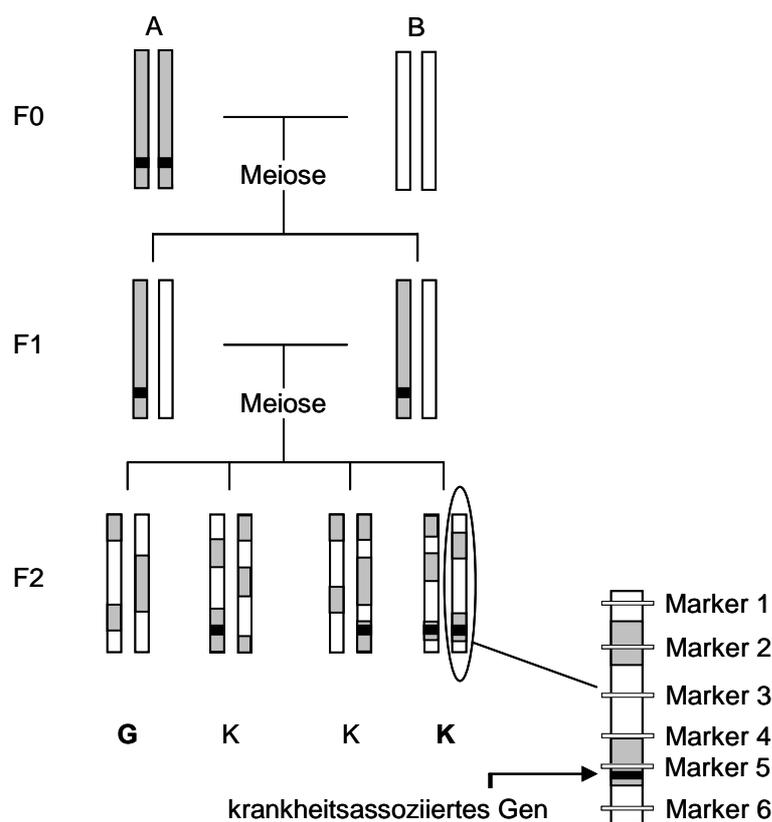


Abb. 4: Meiotische Rekombination am Beispiel der Kreuzung zweier Inzuchtstämme A und B, die sich in Bezug auf den zu untersuchenden Phänotyp unterscheiden: Jeder vertikale Balken entspricht einem Chromosom. Während die Neu- und Umverteilung der Erbanlagen (Rekombination) bei der Verpaarung der jeweils genetisch homogenen Elterntiere (F0) in der F1-Generation zu genetisch identischen Nachkommen führt, bewirkt sie bei der Verpaarung der F1-Tiere durch „Crossing-over“ die Aufspaltung in genetisch unterschiedliche Nachkommen. Je größer die genetische Distanz zweier Genorte, desto wahrscheinlicher ist ihre Trennung während der meiotischen Rekombination. Die F2-Tiere, die beide Allele (Homozygotie) des krankheitsassoziierten Genes (schwarzer Balken) geerbt haben, bleiben mit dem Krankheitsphänotyp assoziiert (K, fettgedruckt). Geht man von einem kodominanten oder dominanten Erbgang aus, zeigen auch die Tiere, die das entsprechende Allel in einfacher (heterozygoter) Form geerbt haben, Ausprägungen des kranken Phänotyps (K). Tiere, die keines der entsprechenden Allele tragen, weisen den gesunden Phänotyp auf (G, fettgedruckt).

Die Identifizierung von chromosomalen Regionen mit Einfluss auf den untersuchten Phänotyp erfolgt mit Hilfe polymorpher Mikrosatellitenmarker (Marker 1-6). Dabei zeigt der am nächsten am Krankheitsgen lokalisierte Marker (Marker 5) die stärkste Phänotyp-Assoziation, während entfernt oder auf anderen Chromosomen gelegene Marker geringe oder keine Assoziation aufweisen.

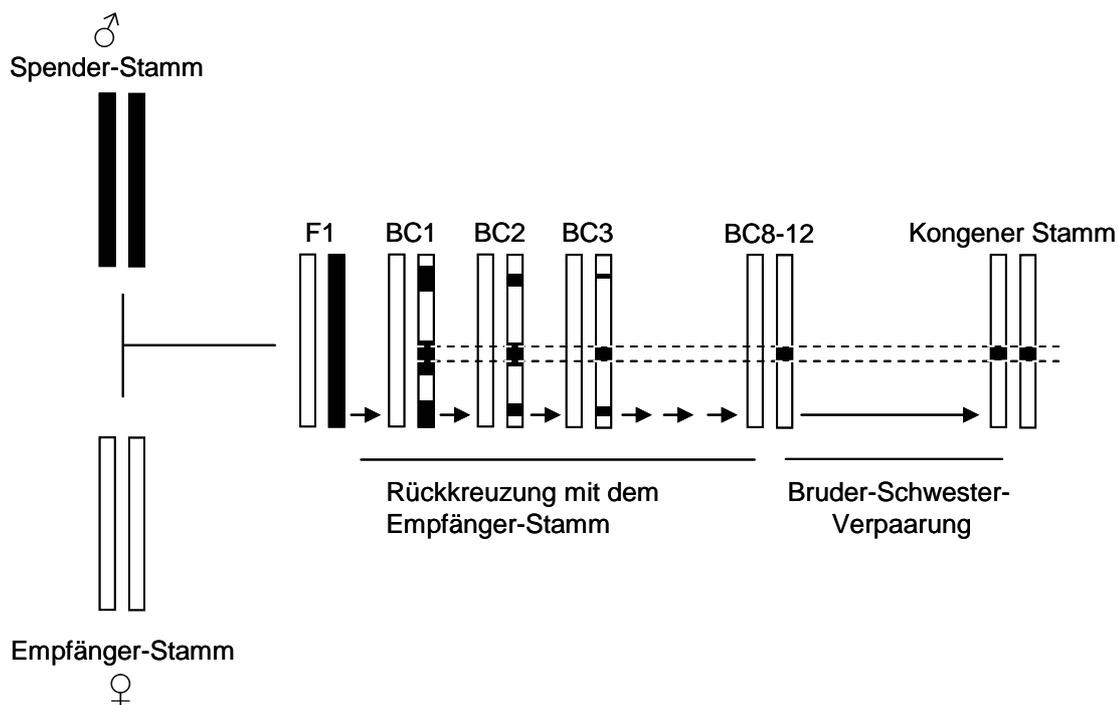


Abb. 5: Strategie zur Etablierung eines kongenen Stammes: Die Übertragung der gewünschten chromosomalen Region (Bereich zwischen den gestrichelten Linien) erfolgt durch serielles Rückkreuzen des Spender-Stammes mit dem Empfänger-Stamm über 8-12 Backcross-Generationen und anschließender Fixierung des übertragenen, bis dahin heterozygoten, Bereiches durch Bruder-Schwester-Verpaarung (Kreutz & Hübner, 2002).

Vor allem monogene Erkrankungen konnten bisher erfolgreich mit Hilfe von Linkage-Analysen charakterisiert und aufgeklärt werden. Die erfolgreiche Anwendung der experimentellen Linkage-Analyse konnte bei Kreuzpaarungsstudien an Ratten, in denen ein Stamm mit spontaner, polygener Hypertonie mit einem normotonen Stamm gekreuzt wurde, gezeigt werden. Die phäno- und genotypische Analyse der F2-Population erbrachte die signifikante Assoziation des Blutdruckes mit einer Region auf dem Rattenchromosom (RNO) 10. Der Vergleich mit der homologen humanen chromosomalen Region (comparative mapping) ergab einen Bereich auf Chromosom 17 des Menschen, in dem auch das für das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) kodierende Gen lokalisiert ist. In der sich anschließenden, gezielten Untersuchung mit einem speziell für das ACE-Gen entwickelten, polymorphen Marker konnte tatsächlich die Assoziation des ACE-Allels des kranken Stammes mit dem Blutdruck nachgewiesen werden (Lindpaintner et al., 1990; Hilbert et al., 1991; Jacob et al., 1991). Das Adducin-Gen als

mögliches blutdruckregulierendes Kandidatengen ergab sich aus Kosegregationsstudien an Milan-hypertensiven und Milan-normotensiven Ratten (Bianchi et al., 1994). Gezielte klinische Untersuchungen bewiesen die Assoziation des α -Adducin-Genes mit der primären Hypertonie (Casari et al., 1995). Darüber hinaus wurde bei Patienten mit primärer Hypertonie der Einfluss des α -Adducin-Genotyps auf das Ausmaß der Blutdrucksenkung nach Behandlung mit einem Thiaziddiuretikum nachgewiesen (Cusi et al., 1997). Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte demnach nicht nur die Bedeutung eines im genetischen Rattenmodell identifizierten, blutdruckregulierenden Genortes für die menschliche Hypertonie bestätigt werden, sondern erstmalig auch die Möglichkeiten einer medikamentösen Behandlung der Hypertonie in Abhängigkeit vom Genotyp des Patienten (Pharmakogenetik) aufgezeigt werden.

1.7 Ziel der Arbeit

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen zu den Haupttodesursachen in den entwickelten Industrienationen. Als besonders gefährdet gelten salzsensitive Patienten, die als Antwort auf einen erhöhten Salzgehalt der Nahrung einen verstärkten Blutdruckanstieg sowie gravierende Endorganschäden entwickeln. Die der salzsensitiven Hypertonie zugrunde liegenden Pathomechanismen sind weitgehend ungeklärt. Das häufigere Auftreten in bestimmten Bevölkerungsgruppen und bei Angehörigen ersten Grades weist auf die wahrscheinliche Bedeutung genetischer Faktoren hin.

Folgende, in Abb. 6 zusammengefasste Vorstellung über die Ätiopathogenese der salzsensitiven Hypertonie liegt dieser Arbeit zugrunde: Zum einen kann die Entwicklung einer salzsensitiven Hypertonie primär durch genetisch bedingte Funktionsstörungen der renalen Natriumexkretion hervorgerufen werden (Abb. 6, Punkt 0), zum anderen können unabhängig von primär genetisch bedingten Salzausscheidungsstörungen andere genetische Faktoren zu Hypertonie und sekundären Nierenfunktionsveränderungen und in Folge zu einer eingeschränkten Natriumexkretion führen (Abb. 6, Punkt 1). Bei einem Teil der Patienten führen diese Veränderungen zur Entwicklung einer salzsensitiven Hypertonie, identisch mit dem bei salzsensitiven Dahl/SS/Jr-Ratten beobachteten Phänotyp (Abb. 6, Punkt 2a), während ein anderer Teil der Patienten die renalen Funktionsveränderungen kompensiert und eine mit geringerem Progressionsrisiko verbundene salzresistente Hypertonie, identisch mit dem SHR/Mol-Phänotyp, ausbildet (Abb. 6, Punkt 2b).

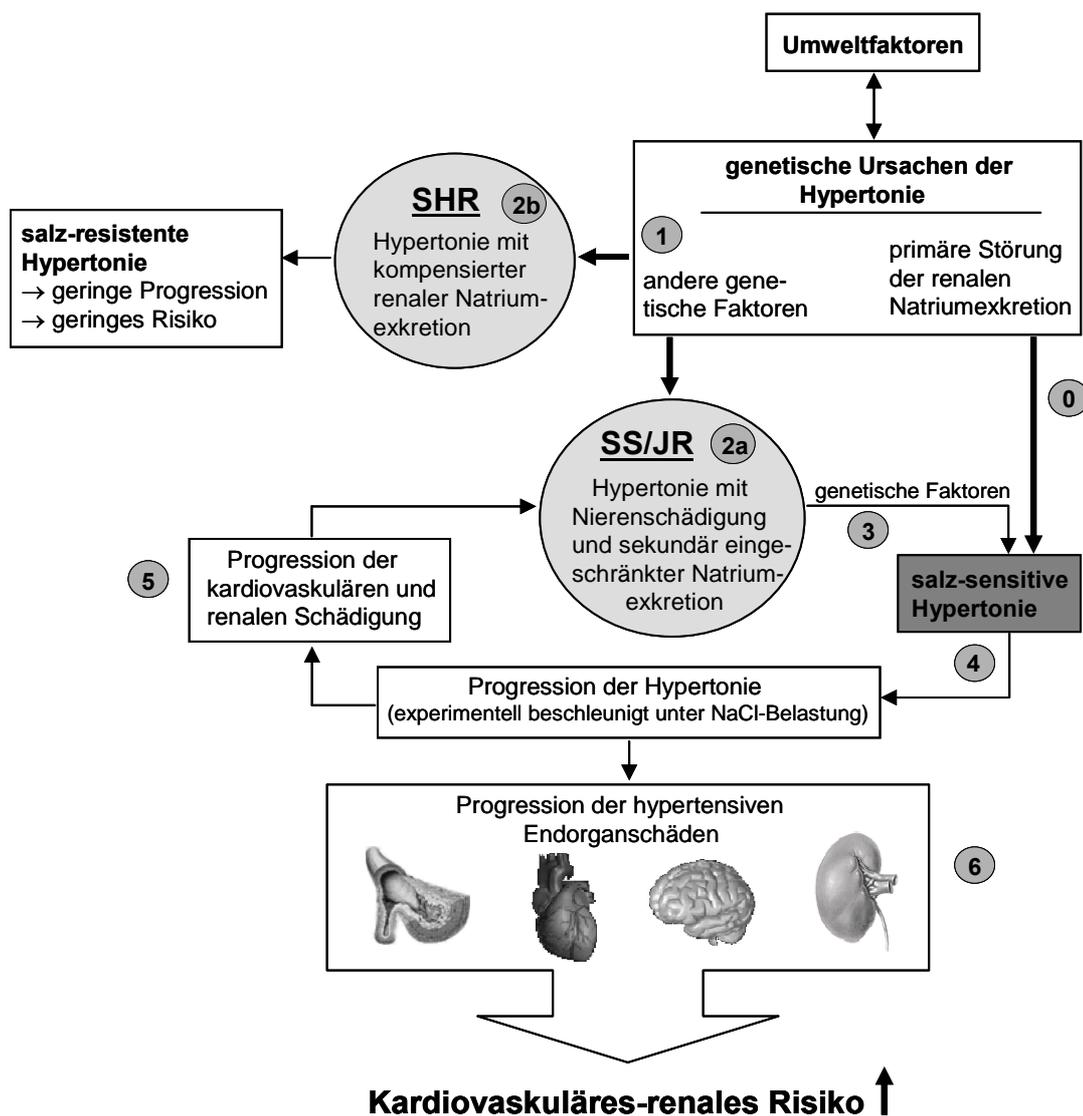


Abb. 6: Ätiopathogenese der salzsensitiven Hypertonie. Im Wechselspiel mit Umweltfaktoren können einerseits primär genetisch bedingte Faktoren zur Nierenschädigung mit gestörter Salzausscheidung und infolgedessen zu salzsensitiver Hypertonie führen (0), andererseits kann ein durch andere genetische Faktoren bedingter Bluthochdruck zur Schädigung der Niere führen (2a,b). Kann eine dadurch hervorgerufene Störung der Natriumexkretion nicht kompensiert werden, ist der sich entwickelnde Hypertonus salzsensitiv (3). Unter Salzsensitivität kommt es zu gesteigerter Hypertonie-Progression (4), die verstärkte Schädigungen kardiovaskulärer und renaler Art zur Folge hat (5) und auf diese Weise den Blutdruckanstieg zusätzlich fördert. Der so entstandene Circulus vitiosus führt zu einem beträchtlich erhöhten kardiovaskulär-renalen Risiko dieser Patienten (6).

Die Entwicklung sekundärer Nierenfunktionsveränderungen mit Einschränkung der Salzexkretion bei der salzsensitiven Hypertonie kann wiederum genetischen Einflüssen unterliegen (Abb. 6, Punkt 3) und zur weiteren Progression der Hypertonie (Abb. 6, Punkt 4) sowie der renalen und kardiovaskulären Schädigung im Sinne eines circulus vitiosus führen, wobei der progredienten Nierenschädigung bei der Aufrechterhaltung und dem Voranschreiten der Erkrankung eine entscheidende Bedeutung zukommt (Abb. 6, Punkt 5). Die Progression der unter Salzsensitivität entstandenen hypertensiven Endorganschäden erhöht das Risiko kardiovaskulärer sowie renaler Ereignisse wie Herzinfarkt, Schlaganfall und Nierenversagen in erheblichem Maße (Abb. 6, Punkt 6).

Vor diesem Hintergrund bestand das Ziel der Arbeit in der Identifizierung chromosomaler Regionen (QTL) bei der Dahl/SS/Jr-Ratte, die für die Entwicklung der salzsensitiven, spontanen Hypertonie verantwortlich sind. Eine weitere Fragestellung war die Klärung der Bedeutung der blutdruckregulierenden QTL für die Manifestation der hypertensiven Endorganschäden, insbesondere der kardiovaskulären Hypertrophie und der Nierenschädigung, sowie die Identifizierung möglicher blutdruckunabhängiger QTL mit Einfluss auf die kardiovaskuläre und/oder renale Schädigung.

Der erste, dem Arbeitsprogramm zugrunde liegende Schritt beinhaltete die phänotypische Charakterisierung sowohl der salzsensitiven spontanen Hypertonie der Dahl/SS/Jr-Ratte als auch der salzresistenten spontanen Hypertonie des SHR/Mol-Stammes unter Normal- und Salzdiät. Dabei sollten neben der Messung des systolischen Blutdruckes auch Parameter der hypertensiven Endorganschädigung wie Albuminurie, Proteinurie und kardiovaskuläre Hypertrophie sowie histologische Bewertungen einbezogen werden. Die Überprüfung der genetischen Homogenität der Inzuchttrattenstämme sollte durch gezielte Analyse des gesamten Genoms mit Hilfe von polymorphen Mikrosatellitenmarkern erfolgen.

In einem zweiten Schritt sollte eine männliche F2-Kreuzpaarungspopulation aus salzsensitiver Dahl/SS/Jr-Ratte und dem kontrastierenden, salzresistenten Referenzstamm SHR/Mol etabliert und phänotypisch charakterisiert werden. Zur Beschleunigung der Hypertonie-Progression war die Gabe eines salzreichen Futters (4 % NaCl) vorgesehen. Die dadurch hervorgerufene verstärkte Phänotyp-Ausprägung sollte zur Vereinfachung der sich anschließenden Identifizierung genetischer Determinanten genutzt werden.

Im Anschluss an die phänotypische Charakterisierung der F2-Tiere sollten im dritten Schritt mithilfe einer genomweiten Mikrosatellitenmarker-basierten Kopplungsuntersuchung QTL mit Einfluss auf die salzsensitive spontane Hypertonie identifiziert und kartiert werden.

Die Verifizierung der detektierten krankheitsrelevanten genetischen Regionen sollte in nachfolgenden Arbeiten durch Etablierung von kongenen Stämmen erfolgen. Parallel dazu sollten durch Homologievergleich mit dem menschlichen Genom die in der Ratte detektierten QTL den entsprechenden chromosomalen Regionen des Menschen zugeordnet werden und diese danach gezielt auf mögliche Kandidatengene untersucht werden.

Die Erforschung und eindeutige funktionelle Charakterisierung von Genen, die kausal mit der Hypertonie und/oder den hypertensiven Endorganschäden in Verbindung stehen, ermöglicht einerseits die frühzeitige Identifizierung von Risikopatienten, andererseits erlaubt sie die gezielte Entwicklung einer individuellen, verbesserten Pharmakotherapie dieser Patienten. Die in Tiermodellen identifizierten genetischen Suszeptibilitätsfaktoren stellen einen bedeutsamen Faktor dieser Entwicklung dar.