

Aus dem CharitéCentrum für Innere Medizin mit Kardiologie, Gastroenterologie
und Nephrologie, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie Charité,
Universitätsmedizin
Direktor: Prof. Dr. Rainer Dietz

Habilitationsschrift

Analyse komplexer kardiovaskulärer Erkrankungen im Tiermodell

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

Dr. med. Jan Monti

eingereicht: November 2008

Dekanin: Prof. Dr. A. Grütters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Schunkert, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Stoll, Leibnitz-Institut für Arterioskleroseforschung, Münster

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am 09. November 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Arterielle Hypertonie und hypertensive Herzerkrankung - Epidemiologie	4
1.2. Hypertonie und hypertensive Herzerkrankung als komplexe genetische Erkrankungen	5
1.3. Analyse komplexer genetischer Erkrankungen im Tiermodell	7
2. Fragestellungen	9
3. Tiermodelle und experimentelle Strategien	10
3.1. Kopplungsanalysen in ingezüchteten Tiermodellen	10
3.2. Rattenmodelle in der Analyse komplexer genetischer Erkrankungen	12
3.3. Identifizierung von Kandidatengenomen komplexer Erkrankungen	15
3.4. Genexpression als intermediärer Phänotyp bei der Analyse von Kandidatengenomen	17
4. Ergebnisse und Diskussion	21
Eigene Arbeiten zur Genetik von Hypertonie und hypertensiven Herzerkrankung	
4.1. Hypertoniemechanismen im Bradykinin-Rezeptor Typ 2 <i>Knockout</i> Modell	21
4.2. Identifizierung interagierender genetischer Loci im SHR-Modell	23
4.3. Rolle von <i>Wnk4</i> bei der Entstehung der Hypertonie	25
4.4. Identifizierung von <i>Ephx2</i> als Herzinsuffizienz-Kandidatengen	27
5. Ausblick und klinische Bedeutung	29
6. Zusammenfassung	30
7. Literatur	32

1. Einleitung

1.1. Arterielle Hypertonie und hypertensive Herzerkrankung – Epidemiologie

Die arterielle Hypertonie sowie deren Folgeerkrankungen stellen unverändert eine der wichtigsten Morbiditäts- und Mortalitätsursachen in den entwickelten Industrieländern dar ⁽¹⁾. Neben den zerebralen, vaskulären und renalen Endorganschäden zählt die Hypertonie-assoziierte Herzinsuffizienz aufgrund der hohen Prävalenz und Mortalität der Erkrankung zu den schwerwiegendsten Hypertoniefolgen. Allein in den USA werden pro Jahr mehr als eine halbe Million Herzinsuffizienzpatienten neu diagnostiziert und etwa 287000 Patienten versterben jährlich in Folge der Erkrankung ⁽²⁾. Dabei konnten verschiedene Studien belegen, dass die Inzidenz der Herzinsuffizienz insgesamt allein durch eine effiziente Hypertonie-Therapie um etwa 50% gesenkt werden kann ^(3,4). Der Risikofaktor Hypertonie ist nach Daten der Framingham-Studie sowie auch der Cardiovascular Health Study für ca 40% aller Herzinsuffizienzfälle ursächlich ^(2, 5). Trotz einer Reihe insbesondere medikamentöser Behandlungsstrategien, die zu einer verbesserten Prognose der Herzinsuffizienz beigetragen haben, ist die Mortalität der Herzinsuffizienz unverändert hoch und beträgt 5 Jahre nach Erstdiagnose der Erkrankung ca. 50% bei Männern bzw. 45% bei Frauen ⁽²⁾.

Eine differenzierte Betrachtung der vorliegenden epidemiologischen Daten zeigt ausserdem, dass die in den letzten Jahrzehnten entwickelten Behandlungsstrategien nicht für alle Gruppen von herzinsuffizienten Patienten gleichermassen gewinnbringend waren. In den letzten Jahren zeigte sich immer deutlicher, dass nur bei etwa der Hälfte der Patienten, bei denen erstmals eine Herzinsuffizienz diagnostiziert wird, eine Einschränkung der systolischen Funktion des Herzens und damit eine verminderte Ejektionsfraktion vorliegt. Bei der anderen Hälfte der Patienten – nahezu regelmässig Patienten mit bestehender arterieller Hypertonie und in der

Folge linksventrikulärer Hypertrophie ⁽⁶⁾ – scheint eine zunächst ausschliesslich diastolische Funktionsstörung ohne Beeinträchtigung der systolischen Herzfunktion ursächlich für die Herzinsuffizienz zu sein ⁽⁷⁾. Während für Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz ein leichter Rückgang der Mortalität innerhalb der letzten 20 Jahre beobachtet werden konnten, blieb die Mortalität der diastolischen Herzinsuffizienz seither unverändert ⁽⁷⁾.

1.2. Hypertonie und hypertensive Herzerkrankung als komplexe genetische Erkrankungen

Aufgrund der geschilderten epidemiologischen Daten bleibt die Identifizierung der kausalen Krankheitsdeterminanten der Hypertonie wie auch der Herzinsuffizienz als Hypertoniefolgeerkrankung eine wichtige Aufgabe. Dabei wurden genetische Einflüsse auf die Höhe des Blutdrucks bereits 1923 von Weitz und später von Platt beobachtet ^(8, 9). Weitz ging der Frage nach, ob bei Familienangehörigen von Hypertoniepatienten ebenfalls eine arterielle Hypertonie vorlag, und stellte fest, dass der prozentuale Anteil der an Hypertonie erkrankten Geschwister „sehr viel grösser war, als bei zahlreichen beliebigen Personen, deren Blutdruck bestimmt wurde“ ⁽⁸⁾. Sir George Pickering definierte den arteriellen Blutdruck erstmals als quantitatives Merkmal, dessen genetisch determinierter Anteil nicht allein auf die Wirkung eines einzelnen mutierten Genortes zurückgeführt werden konnte. Mit Ausnahme äusserst seltener monogenetisch vererbter Formen folgt die Hypertonie keinem einfachen Mendelschen Vererbungsmuster ⁽¹⁰⁻¹²⁾. So wurde die genetisch determinierte Blutdruckvariabilität in Familienstudien auf etwa 20% ⁽¹³⁻¹⁵⁾, in Zwillingsstudien sogar auf 60% geschätzt ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Obwohl die Rolle der Hypertonie als Risikofaktor für die Entstehung einer Herzinsuffizienz gut etabliert ist, tragen unabhängig davon genetische Faktoren zur Entstehung der Erkrankung bei. Jüngere Daten aus Teilnehmern der *Framingham offspring*

study konnten belegen, dass Kinder von Herzinsuffizienzpatienten ein ca. 2-fach erhöhtes Risiko haben, selbst an einer Herzinsuffizienz zu erkranken. Selbst nach Adjustierung der Daten auf das Vorhandensein etablierter Risikofaktoren einschliesslich Hypertonie und LV-Hypertrophie war das Herzinsuffizienzrisiko um ca. 70% erhöht ⁽¹⁹⁾.

Trotz dieser guten Belege für eine genetische Komponente in der Entstehung von Hypertonie und Herzinsuffizienz, sind die genauen genetischen und molekularen Ursachen nach wie vor weitgehend unbekannt. Ein Grund dafür liegt in der komplexen multifaktoriellen Genese beider Erkrankungen. Im Gegensatz zu den monogenen Erkrankungen, bei denen Mutationen einzelner Genorte zu schwerwiegenden Funktionsstörungen der entsprechenden Genprodukte führen, sind komplexe Erkrankungen durch vielschichtige Interaktionen zwischen verschiedenen Genorten (epistatische Interaktionen) sowie Interaktionen zwischen genetischen Faktoren und Umweltvariablen (ökogenetische Interaktionen) gekennzeichnet (Abbildung 1) ⁽²⁰⁾. Diese komplexen Interaktionen werden beispielhaft durch Beobachtungen an Patienten deutlich, deren Blutdruck unterschiedlich stark von verschiedenen Umweltfaktoren, wie dietätischer Kochsalzbelastung, beeinflusst wird ⁽²¹⁾.

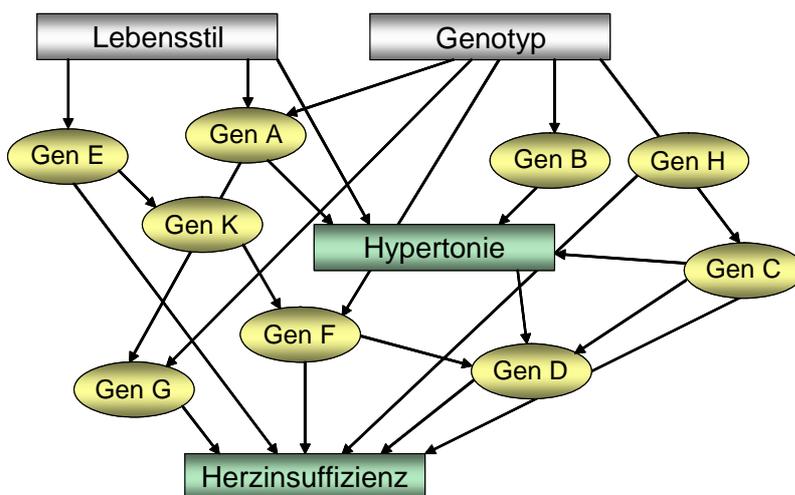


Abbildung 1: Die Hypertonie assoziierte Herzinsuffizienz als komplexe Erkrankung. Schematisch dargestellt ist der multifaktorielle Einfluss auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz durch die Beteiligung mehrerer Gene, des Risikofaktors Hypertonie und des Lebensstils.

1.3. Analyse komplexer genetischer Erkrankungen im Tiermodell

Die genetische Analyse komplexer Erkrankungen im Menschen wird dadurch erschwert, dass sowohl Hypertonie als auch Herzinsuffizienz keine homogenen Krankheitsbilder, sondern heterogene Gruppen von Erkrankungen darstellen. Komplizierend wirken Phänomene wie unterschiedliche Penetranz und Phänokopie. In dieser Situation ermöglichen ingezüchtete Tiermodelle eine reduktionistische Betrachtungsweise von komplexen Phänotypen. Einerseits fehlt ingezüchteten Tierstämmen die genetische Heterogenität, andererseits lassen sich durch die Kontrolle der Umweltbedingungen exogene Determinanten und deren vielschichtige Interaktionen untereinander minimieren. Experimentelle Kreuzungen ingezüchteter Tierstämme sind daher besonders gut für die Aufschlüsselung quantitativer Merkmale wie z.B. dem Blutdruck geeignet. Ingezüchtete Tierstämme, die einen bestimmten Phänotyp wie zum Beispiel Bluthochdruck oder auch Herzinsuffizienz aufweisen, können durch selektive Züchtung etabliert werden. Aus einer Kolonie von nicht oder nur teilweise ingezüchteten Tieren werden solche ausgewählt, die den Phänotyp von Interesse zeigen und miteinander verpaart. In nachfolgenden Generationen werden diejenigen Nachfahren zur Weiterzucht verwendet, die das Merkmal von Interesse ausprägen. Ist das entsprechende Merkmal fixiert, werden die Nachkommen unter kontinuierlicher Kontrolle des Phänotyps über etwa 20 Generationen ingezüchtet, um genetische Homogenität zu erreichen. Werden in einer analogen Paarungsstrategie Nachkommen gezüchtet, denen das pathologische Merkmal fehlt, entsteht ein kontrastierender Tierstamm, der das zu untersuchende Merkmal nicht ausprägt. Während sich die beiden Stämme in ihren Genen unterscheiden, die für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich sind, unterscheiden sie sich auch in einer Reihe von Genen, die zufällig im Prozess der Trennung der Stämme fixiert wurden und mit dem eigentlich selektierten Phänotyp nichts zu tun haben. Durch den Vergleich zweier Inzuchtstämme allein

lassen sich für die Erkrankung relevante Genorte nicht identifizieren, da keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob Unterschiede kausal an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt sind oder sekundäre Phänomene darstellen. Somit können Ergebnisse vergleichender Studien zwischen „kranken“ und „normalen“ Stämmen nur Hinweise auf Kandidatengene geben, die dann in Kopplungs- oder Kosegregationsanalysen auf eine kausale Beteiligung am Krankheits-Phänotyp überprüft werden müssen.

2. Fragestellungen

Schwerpunkt der hier vorgestellten Forschungsarbeiten ist die Identifizierung der genetischen Grundlagen für komplexe kardiovaskuläre Erkrankungen wie Hypertonie und Herzinsuffizienz. Ausgangspunkt der durchgeführten Experimente waren dabei genetisch veränderte Tiermodelle wie z.B. die Bradykinin-Rezeptor Typ 2 *Knockout* Maus bzw. die in der Einleitung beschriebenen Inzucht-Rattenstämme mit fixierter kardiovaskulärer Erkrankung und ebenfalls fixiertem Genotyp. Dabei war neben der Identifizierung genetischer Krankheitsdeterminanten immer auch die Mitwirkung bei der Generierung entsprechender Ressourcen wichtiger Bestandteil der eigenen Forschungstätigkeit. Dazu zählt die Mitwirkung an der Sequenzierung des Rattengenoms ⁽²⁴⁾; die Erstellung einer SNP-Karte der Ratte ⁽⁶⁷⁾, sowie die Identifizierung genomweiter Expressions-QTL der Ratte ⁽⁵⁰⁾.

In eigenen Arbeiten wurden Bradykinin-Rezeptor Typ 2 Knockout Mäuse genomweit bezüglich ihrer renalen Genexpression analysiert um potentiell neue, durch den Bradykinin-Rezeptor vermittelte *pathways* zu identifizieren, die in die Blutdruckregulation involviert sind (siehe 3.1. ⁽⁵⁸⁾). Im Weiteren wurden insbesondere die Modelle der spontan hypertensiven sowie der spontan herzinsuffizienten Ratte analysiert, um genetische Ursachen der durch Zucht fixierten Krankheitsphänotypen zu identifizieren. Dabei wurden das Zusammenwirken verschiedener QTL bei der Blutdruckregulation untersucht (siehe 3.2. ⁽³²⁾) sowie identifizierte Kandidatengene genetisch und funktionell auf ihre tatsächliche Relevanz bei der Hypertoniegenese getestet (siehe 3.3. ⁽⁶¹⁾). Darüber hinaus wurden in einem aufwendigen Forschungsprojekt genetische Determinanten der Herzinsuffizienz im o.g. Rattenmodell untersucht. Dabei konnte für die Erkrankung erstmals ein krankheitsverursachendes Gen identifiziert und in einem *knockout*-Mausmodell bestätigt, sowie dessen Relevanz im Menschen gezeigt werden (siehe 3.4. ⁽⁶⁴⁾).

3. Tiermodelle und experimentelle Strategien

3.1. Kopplungsanalysen in experimentellen Kreuzungen ingezüchteter Tiermodelle

Mit einer molekulargenetischen Kopplungsanalyse untersucht man die Zuordnung eines genetischen Merkmals zu einer chromosomalen Region in einer segregierenden Population, wobei die Zuordnung indirekt über genetische Marker, deren chromosomale Position bekannt ist, erfolgt. Es wird die Häufigkeit von Rekombinationsereignissen (*crossing over*) zwischen dem genetischen Merkmal (beispielsweise der Genexpression oder der Erkrankung) und einem genetischen Marker untersucht. Eine chromosomale Region, die genetische Variation und/oder Variationen enthält, die für die Ausprägung eines quantitativen Merkmals verantwortlich ist/sind, wird als *Quantitative Trait Locus* (QTL) bezeichnet. Komplexe Erkrankungen werden meist durch mehrere QTLs mit unterschiedlich starkem Einfluss auf den Phänotyp bedingt. Als genetische Marker werden hauptsächlich zwei verschiedene Arten von DNA Polymorphismen verwendet: Mikrosatelliten und *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs). Mikrosatelliten (*Short Tandem Repeats*) sind repetitive Sequenzen aus Di-, Tri- oder Tetra-Nukleotiden unterschiedlicher Länge, während SNPs Variationen einzelner Basenpaaren in der DNA Sequenz darstellen. Für verschiedene Spezies wie Mensch, Ratte oder Maus steht eine Vielzahl von genetischen Markern zur Verfügung (www.ensembl.org).

Für die Durchführung einer Kopplungsanalyse in der Ratte werden segregierende Populationen aus zwei kontrastierenden Inzuchtstämmen generiert. Durch die Kreuzung zwischen zwei sich in Bezug auf den zu untersuchenden Phänotyp unterscheidenden Inzuchtrattenstämmen bleiben in der F₂-Filialgeneration nur diejenigen Genorte mit dem Phänotyp assoziiert, die für deren Ausprägung verantwortlich sind. Dazu werden homozygote Parentalstämme gekreuzt und man erhält eine Tochtergeneration F₁, die von jedem Elternteil

einen Chromosomenstrang erbt und durchgehend heterozygot ist. Verpaart man die F1-Tiere miteinander, weist die resultierende F2-Filialgeneration eine zufällige Verteilung beider Genome auf. Die jeweiligen Phänotypen kosegregieren hierbei mit ihren assoziierten Genotypen (Abbildung 2).

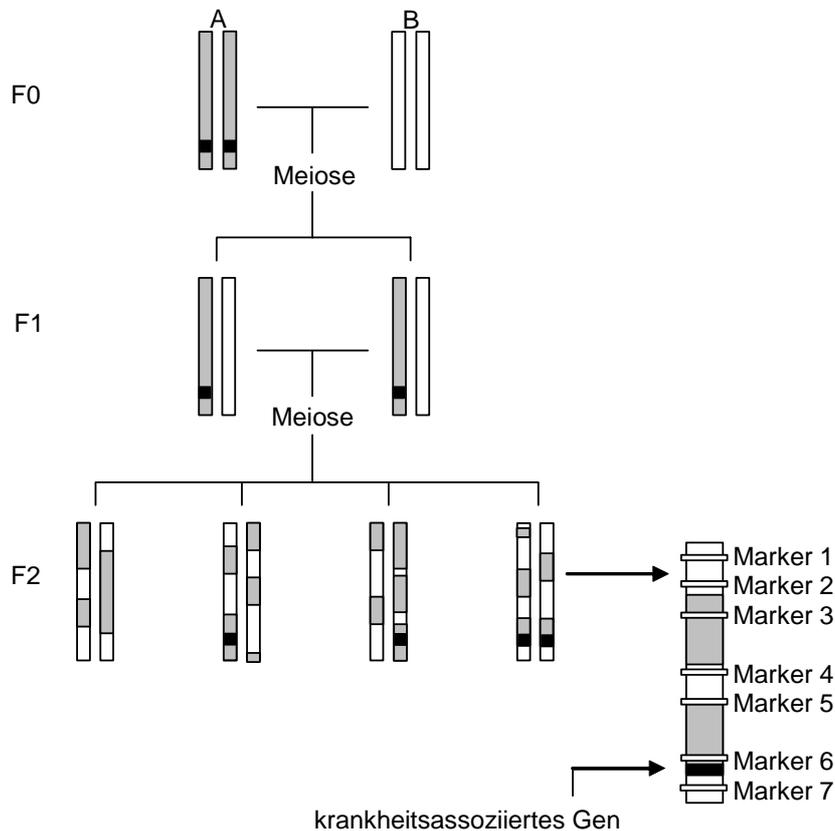


Abbildung 2: Erzeugung einer Intercross Population durch Kreuzung von homozygoten Inzuchtstämmen A und B ⁽²²⁾. Der zum Krankheitsgen nächstgelegene Marker (Marker 6) zeigt die stärkste Assoziation mit dem für diese Erkrankung relevanten Phänotyp.

Untersucht man Kopplung zwischen physiologischen bzw. klinischen Phänotypen und Genotypen, so bezeichnet man die identifizierten *Quantitative Trait Loci* als physiologische QTL (pQTL).

3.2. Rattenmodelle in der Analyse komplexer genetischer Erkrankungen

Die Ratte bietet gegenüber anderen Tiermodellen für kardiovaskuläre Erkrankungen wesentliche Vorteile. Aufgrund der kurzen Generationszeit und einfachen Haltung sind die Tiere schnell und in grosser Anzahl verfügbar. Darüber hinaus lässt die ausreichende Körpergrösse der Tiere eine Vielzahl physiologischer, biochemischer und aufwendiger hemodynamischer Untersuchungen zu. Zur Aufklärung genetischer Faktoren komplexer Erkrankungen stehen derzeit über 500 Inzuchtstämme als Modellorganismen mit einer Fülle an physiologischen Daten zur Verfügung (*Rat Genome Database; Rat Phenome Project, Physgen*).

Eines der wichtigsten Werkzeuge zur Identifizierung genetischer Grundlagen komplexer Merkmale stellt die Möglichkeit zur Erzeugung großer Kohorten genetisch informativer Nachkommen dar. Abhängig von der Fragestellung können dabei unterschiedliche Züchtungsstrategien, wie beispielsweise die Erzeugung von *Intercross*- oder *Backcross*-Populationen, von rekombinant ingezüchteten Ratten oder von kongenen Tieren angewendet werden ⁽²³⁾. Die Generierung einer heterogenen Rattenpopulation (*heterogeneous stock*), die aus acht genetisch und phänotypisch unterschiedlichen Inzuchtrattenstämmen erzeugt wird, ermöglicht beispielsweise die Detektion eines pQTLs mit einer Größe in einem Bereich von weniger als 1 cM. So konnten bis heute in genetischen Studien der Ratte mehr als 1000 pQTLs identifiziert werden (*Rat Genome Database*).

Im Jahr 2004 wurde die Sequenzierung des Rattengenoms mit einer Abdeckung von über 90% des Genoms fertig gestellt und damit die Grundlage für die Identifizierung von Kandidatengenen und für vergleichende Analysen mit dem Genom der Maus und des Menschen geschaffen ⁽²⁴⁾. Die Tatsache, dass Gene des Menschen und Gene der Ratte syntenisch angeordnet sind, macht es möglich, Rückschlüsse von der Ratte auf den Menschen

zu ziehen. Darüber hinaus bietet die Generierung von Expressionsdaten in dem für die Erkrankung relevanten Gewebe und deren Integration mit physiologischen Daten eine herausragende Möglichkeit zur Identifizierung genetischer Determinanten komplexer Erkrankungen.

Spontan hypertensive Ratte (SHR) und normotensive WKY-Ratte

In der experimentellen Erforschung der Hypertonie und der Hypertonie-bedingten Endorganschäden zählt die spontan hypertensive Ratte zu den meistuntersuchten Tiermodellen. Dieser Rattenstamm entstand durch eine selektive Verpaarung ingezüchteter Wistar-Ratten, bei denen ein erhöhter Blutdruck beobachtet wurde ⁽²⁵⁾. Der von denselben Wistar-Ratten stammende normotensive, ingezüchtete WKY-Stamm, ist der am häufigsten verwendete Kontrollstamm ⁽²⁶⁾. Wie bei der essentiellen Hypertonie im Menschen zeigen sich auch im SHR-Modell typische Hypertonie-assoziierte Endorganschäden. Zudem wurde in Segregationsstudien gezeigt, dass die genetisch determinierte Varianz der Blutdruckwerte in SHR ebenso wie im Menschen unter polygener Kontrolle steht. Im SHR Modell wurden blutdruckregulierende QTL u.a. auf den Chromosomen 1 ⁽²⁷⁾ und 10 ^(28, 29) identifiziert. Die experimentelle Bestätigung der Krankheitsrelevanz beider Loci gelang durch die Etablierung kongener Linien ⁽³⁰⁻³²⁾. Dabei wurde durch Rückkreuzung von SHR-Tieren auf einen normotensiven Kontrollstamm für beide QTL ein Transfer von SHR-Allelen auf den homogenen genetischen Kontroll-Hintergrund erreicht. Sowohl die Chr1-kongeneten als auch die Chr10-kongeneten Tiere zeigten einen signifikant erhöhten Blutdruck nach dietätischer Kochsalzbelastung ^(32, 30). Darüber hinaus konnte eine epistatische Interaktion zwischen beiden blutdruckregulierenden Loci experimentell nachgewiesen werden ⁽³²⁾.

Ähnlich wie in ingezüchteten SHR-Ratten konnte auch in Chr1-kongeneten Ratten die entscheidende Bedeutung der Niere für die Hypertonieentwicklung nachgewiesen werden: der

blutdruckregulierende Effekt des Chromosom 1 QTL konnte durch Transplantation einer Niere auf ein nicht kongenes Tier übertragen werden ⁽³³⁾.

Spontan hypertensive und herzinsuffiziente Ratte (SHHF)

Die spontan herzinsuffiziente SHHF Ratte (*spontaneously hypertensive heart failure rat*) ist ein genetisch definiertes Modell für eine Hypertonie-assoziierte Herzinsuffizienz. SHHF Ratten sind durch Kreuzung von SHR Ratten aus der Kolonie am *National Institute of Health* mit *Koletzky obese* Ratten hervorgegangen ⁽³⁴⁾.

Abhängig vom Allel-Status des Leptinrezeptors existieren sowohl übergewichtige als auch normalgewichtige Kolonien. Alle SHHF Tiere entwickeln eine *early-onset* Hypertonie, verbunden mit einer linksventrikulären Hypertrophie und einer manifesten Herzinsuffizienz ⁽³⁵⁾. Diese wird von einer Reihe pathophysiologischer Merkmale begleitet, die auch für Patienten mit Hypertonie-assoziiierter Herzinsuffizienz typisch sind. Dazu zählen z.B. eine erhöhte Plasma-Renin-Aktivität (PRA) und erhöhte ANP- und Aldosteron-Plasmaspiegel ⁽³⁶⁾. Eine weitere Parallele besteht auf der Ebene Herzinsuffizienz-typischer metabolischer Veränderungen. So besteht sowohl in SHHF Ratten als auch in herzinsuffizienten Patienten eine deutlich verminderte Expression von Genen, die in die mitochondriale beta-Oxidation von Fettsäuren involviert sind ⁽³⁵⁾. Funktionelle und strukturelle kardiale Veränderungen im SHHF Modell gehen – ähnlich wie bei herzinsuffizienten Patienten - mit einem Anstieg inflammatorischer Marker wie z.B. Tumor Nekrose Faktor- α oder Interleukin 6 einher ^(37, 38).

Im Gegensatz zu ebenfalls hypertensiven SHR Ratten kommt es in SHHF Ratten bei vergleichbarem Blutdruck und linksventrikulärer Masse zu einem verstärkten Remodelling und einem frühzeitigen Übergang in die Herzinsuffizienz ⁽³⁹⁾.

Aufgrund der genetischen Homogenität und der genannten pathophysiologischen Charakteristika eignen sich SHHF Ratten besonders zum Studium der genetischen Faktoren, die zur Progression einer linksventrikulären Hypertrophie mit erhaltener linksventrikulärer Funktion in eine manifeste Herzinsuffizienz führen.

3.3. Identifizierung von Kandidatengenomen komplexer Erkrankungen

Durch Kopplungsanalysen im Modellsystem ingezüchteter Rattenstämme konnten in den letzten 2 Jahrzehnten eine Vielzahl genomischer Loci identifiziert werden, die kausal an der Entstehung komplexer Erkrankungen beteiligt sind. Die weitere Identifizierung und Analyse von Krankheitsgenen innerhalb der identifizierten QTL wurde jedoch in grösserem Umfang erst in den letzten 10 Jahren durch eine enorme Entwicklung neuer genomischer Ressourcen in der Ratte, aber auch Maus und Mensch ermöglicht. Allein seit 1999 konnten durch positionelle Klonierungsstrategien 21 Krankheitsgene u.a. für inflammatorische Erkrankungen, Brustkrebs, Glomerulonephritis, Herzinsuffizienz und Herzhypertrophie beschrieben werden (Tabelle 1) ⁽⁴⁰⁾. Ein Meilenstein bei der Entwicklung genomischer Ressourcen für die Ratte war dabei die Publikation des Rattengenoms, zu der auch eigene Arbeiten beitragen konnten ⁽²⁴⁾. Dadurch wurden erstmals vergleichende genomische Analysen zwischen Mensch, Maus und Ratte ermöglicht, die entscheidende Erkenntnisse für die Evolution des menschlichen Genoms sowie funktionelle Voraussagen über die Funktion bislang unbekannter menschlicher Gene ermöglichten. Seit 2004 wurde die Sequenz des initial sequenzierten Brown-Norway Stammes weiter vervollständigt und die vollständige Sequenzierung eines der wichtigsten Krankheitsmodelle – der spontan hypertensiven Ratte – in Angriff genommen ⁽⁴⁰⁾.

Neben der Sequenz des Rattengenoms wurden in den letzten Jahren zwei weitere wichtige Voraussetzung für genetische Analysen in der Ratte erarbeitet: die Entwicklung einer dichten Karte genetischer Marker sowie die Entwicklung verschiedener Microarray-Plattformen, die eine hochparallele Analyse der Genexpression in der Ratte ermöglichen. Nach der Publikation der ersten Microsatelliten – Karten der Ratte durch Serikawa 1992 und Jacob 1995 ^(41, 42), wurde die Kollektion genetischer Rattenmarker entscheidend verbessert. Im Rahmen des STAR-Konsortiums, dessen Daten im April 2008 publiziert wurden, wurden mehr als 20000 SNP-Marker in mehr als 300 Inzuchtstämmen sowie rekombinanten Inzuchtstämmen analysiert. Unter Nutzung von mehr als 80% dieser Marker wurde eine hochauflösende genetische Karte der Ratte konstruiert sowie deren Nutzbarkeit zur QTL-Analyse demonstriert ⁽⁴³⁾.

Unter Nutzung all dieser beschriebenen Ressourcen – Sequenz, hochauflösende Karten genetischer Marker sowie hochparallele Microarray-basierte Expressionsanalytik – wurden neue Strategien zur genetischen Analyse von Krankheitsgenen in komplexen Erkrankungen entwickelt. Dazu zählt die Integration von Kopplungsanalysen mit genomweiten Genexpressionsanalysen, die vergleichende Analyse von QTLs zwischen verschiedenen Spezies sowie die Übertragung von Kandidatengenanalysen in genmanipulierte Tiermodelle (Transgene bzw. *Knockout*-Modelle).

Gene	Phenotype	Susceptible strain	Date	Complementation	Human trait
<i>Cd36</i>	Insulin resistance, hyperlipidemia	SHR/NCrI	1999, 2001	<i>In vivo</i>	Dyslipidemia, insulin resistance, hypertension
<i>Aspa</i>	Spongy leukodystrophy	TRM/Kyo	2000	ND	Canavan disease
<i>Mertk</i>	Retinal dystrophy	RCS/Kyo	2000, 2001	<i>In vivo</i>	
<i>Atrn</i>	Hypomyelination, mahogany coat color	ZI/Kyo	2001	<i>In vivo</i>	
<i>Cyp11b1</i>	Blood pressure	SS/Jr	2001	ND	Hypertension
<i>Ncf1</i>	Arthritis	DA/Rhd	2002	<i>In vivo</i>	Rheumatoid arthritis
<i>Cblb</i>	Type 1 diabetes	KDP/Tky	2002	<i>In vivo</i>	
<i>Gimap5</i>	Type 1 diabetes	BB/OK	2002	ND	
<i>Pkhd1</i>	Polycystic kidney disease	PKD	2002	ND	Polycystic kidney disease
<i>Rab38</i>	Platelet storage pool disease, renal failure	FH, LE/BluGill, FHH/EurMcwi	2004, 2005	ND	
<i>Ciita</i>	MHC expression	DA/Sic	2005	ND	Rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, myocardial infarction
<i>Gstm1</i>	Hypertension, oxidant stress	SHRSP/Gla	2005	ND	
<i>Anks6</i>	Polycystic kidney disease	PKD/Mhn(cy/+)	2005	ND	
<i>Fcgr3</i>	Crescentic glomerulonephritis	WKY/NCrI	2006	ND	Systemic erythematosus, systemic autoimmunity
<i>Tmem67</i>	Polycystic kidneys, brain malformations	WPK	2006	ND	Meckel-Gruber syndrome
<i>Fbxo10, Frmpd1</i>	Mammary cancer	WF/NHsd	2007	ND	Breast cancer
<i>Ephx2</i>	Heart failure	SHHF/Bbb	2007	<i>In vivo</i>	Heart failure
<i>Ogn</i>	Left ventricular mass	SHR/NCrI	2007	<i>In vivo</i>	Left ventricular mass
<i>Jund</i>	Crescentic glomerulonephritis, macrophage activation	WKY/NCrI	2007	ND	Macrophage activation
<i>Vav1</i>	Neuroinflammation	DA/BII	2007	ND	Multiple sclerosis
<i>Srebf1</i>	Hepatic steatosis	SHR/Olalpcv	2008	<i>In vivo</i>	

Tabelle 1: Durch positionelle Klonierungsstrategien seit 1999 identifizierte Krankheitsgene in der Ratte (aus ⁽⁴⁰⁾)

Complementation: Zusätzliche *in vivo* Bestätigung der Befunde in Ratte oder Maus; ND: nicht durchgeführt

3.4. Genexpression als intermediärer Phänotyp bei der Analyse von Kandidatengen

Im Jahr 2001 stellten Jansen und Nap erstmals theoretisch die Möglichkeit der Kombination von genomweiten Genexpressionsanalysen mit genotypischen Daten in einer segregierenden Population im Zusammenhang mit einer Kopplungsanalyse vor und bezeichneten diese Kombination als *genetical genomics* ⁽⁴⁴⁾. Ein Jahr später publizierten Brem und Yvert die erste Anwendung zur Kartierung von genomweiten Expressionsniveaus in einer segregierenden Hefepopulation ^(45, 46). Eine ähnliche Strategie wurde kurz darauf in einer segregierenden Maus-Population und schliesslich in transformierten humanen Zelllinien gesunder Probanden angewendet ⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾. Transkriptionsniveaus werden dabei als quantitative Merkmale betrachtet,

deren genetische Grundlagen durch klassische Kopplungsanalysen kartiert werden können, da die transkriptionelle Kontrolle der Genexpression zu einem großen Teil erblich bedingt ist ^(47, 50). Das Besondere an der Integration von Transkriptionsniveaus als quantitatives Merkmal zur Identifizierung von Kandidatengen stellt ihren Charakter als intermediärer Phänotyp zwischen genomischen Sequenzvariationen und komplexen physiologischen Phänotypen dar. Ein QTL, welcher die Transkriptmenge eines Transkripts beeinflusst, wird als Expressions-QTL (eQTL) bezeichnet ⁽⁴⁷⁾. Die Identifizierung eines eQTLs für ein Transkript setzt also voraus, dass in diesem eQTL eine genetische Sequenzvariation liegt, die die Expression des Gens beeinflusst ⁽⁵¹⁾.

Durch die Bestimmung der exakten chromosomalen Lokalisation von Kopplungsmarker und Transkript kann man eQTLs in zwei Kategorien einteilen: kartiert ein eQTL innerhalb von 20 Mb um die genetische Lokalisation des Transkripts, so wird er als *cis* eQTL bezeichnet, kartiert er außerhalb dieser 20 Mb, so handelt es sich um einen *trans* eQTL (Abbildung 3).

Die besondere Eigenschaft unterschiedlicher Transkriptionsniveaus als intermediärer Phänotyp besteht darin, dass sie engstens mit Variationen in der DNA Sequenz verknüpft sind: Der Weg vom Genotyp zum Phänotyp führt vielfach über die Genexpression ⁽⁵³⁾. Die Korrelation klinischer Daten und genomweiter Genexpressionen ermöglicht somit die Identifizierung von allelspezifischen Varianten innerhalb hoch signifikant *cis*-regulierter Transkripte, die als Kandidatengene von besonderem Interesse sind ⁽⁵²⁾.

Der Identifizierung von *cis*-regulierten Transkripten als Kandidatengene in einem pQTL schließen sich zahlreiche funktionelle Analysen an, um ein Gen als Suszeptibilitätsgen für eine komplexe Erkrankung zu bestätigen ⁽⁵¹⁾.

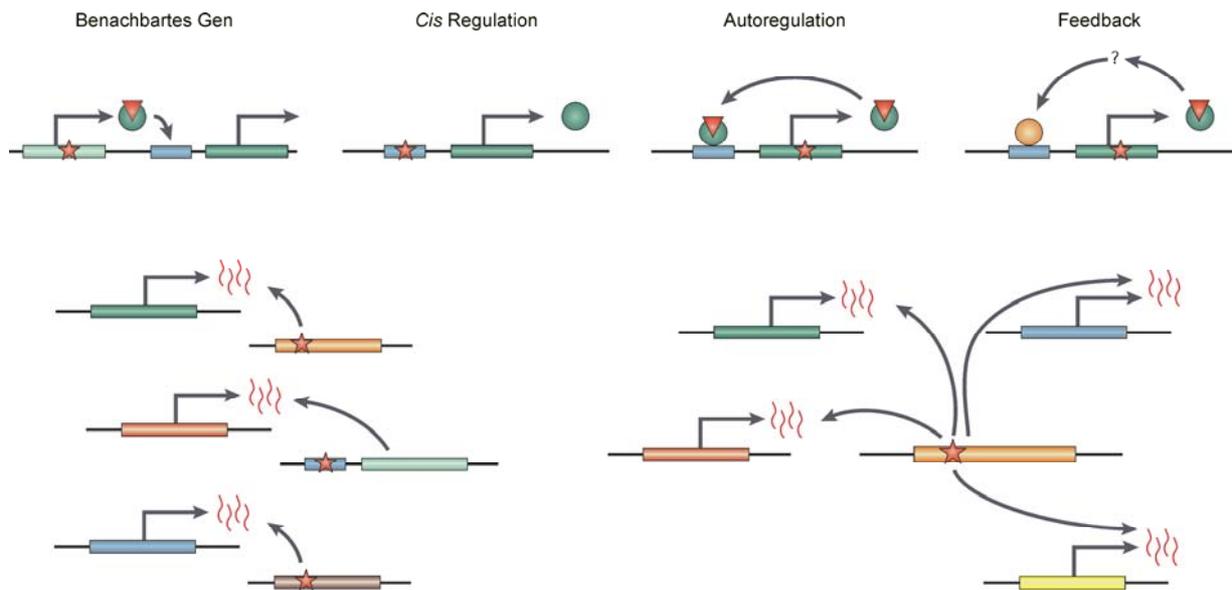


Abbildung 3: Kartierung eines Transkripts in *cis* oder *trans*. A) Verschiedene Variationen könne für die *cis* Kartierung eines Gens verantwortlich sein: Beeinflussung eines Transkripts durch Variationen in einem benachbarten Gen; Variation in der regulatorischen Sequenz eines Gens; autoregulatorische Variationen oder Feedback Variationen. Der rote Stern markiert die regulatorische Variante. Die grünen Kästen stellen die kodierende Region des Gens dar. Der grüne Kreis markiert das Protein und die hellblauen Kästen repräsentieren stromaufwärts lokalisierte regulatorische Elemente. B) *Trans* regulatorischer Einfluss eines Gens. Die Pfeile zeigen von dem Gen mit der regulatorischen Variante hin zu dem Gen oder den Genen, die durch diese Variante reguliert werden und für die somit ein *trans* eQTL kartiert wird ⁽⁵²⁾.

Durch eine vergleichende Sequenzierungsanalyse zwischen dem erkrankten Rattenstamm und den Kontrolltieren können zunächst Variationen in der DNA Sequenz detektiert werden, die je nach Lokalisation einen regulatorischen Einfluss auf die Genexpression haben können oder beispielsweise die RNA Stabilität beeinflussen. Da man in einer Sequenzanalyse sowohl die regulatorischen als auch die kodierenden Regionen eines Gens untersucht, werden auch Polymorphismen detektiert, die zu einem Aminosäureaustausch im Protein, zu verändertem Spleißverhalten, zu *Nonsense*-Mutationen oder zu einem Leseraster-Wechsel führen können, ohne dass diese die Transkriptmenge beeinflussen müssen.

Funktionelle Analysen, wie die Untersuchung des Einflusses identifizierter Polymorphismen auf die Expression eines Gens in Zellkultur (Promoteranalysen) und die Untersuchung der Auswirkung der Gendeletion auf den Phänotyp durch die *knockout* Technologie werden unter anderem angewendet, um ein Kandidatengen als Suzeptibilitätsgen für eine komplexe Erkrankung zu bestätigen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Eigene Arbeiten zur Genetik von Hypertonie und hypertensiven Herzerkrankung

4.1. Hypertoniemechanismen im Bradykinin-Rezeptor Typ 2 *Knockout* Modell ⁽⁵⁸⁾

Bradykinin, das wichtigste Effektor-Peptid des Kallikrein-Kinin-Systems, ist an wichtigen Prozessen der Blutdruck-Homöostase beteiligt. So wurden bereits vasodilatatorische als auch natriuretische Wirkungen von Bradykinin publiziert ⁽⁵⁴⁾. Zudem zeigten *Knockout* Mäuse, in denen der Bradykinin B2-Rezeptor genetisch ausgeschaltet wurde, einen sowohl basal erhöhten Blutdruck als auch eine deutliche salzsensitive Hypertonie-Komponente ^(55, 56). Spätere Arbeiten konnten die initial gezeigten Blutdruckeffekte nicht mehr nachweisen ⁽⁵⁷⁾, so dass angenommen wurde, Unterschiede im genetischen Hintergrund der verschiedenen untersuchten Mauskolonien könnten für die Unterschiede im Blutdruckeffekt verantwortlich sein.

In eigenen Arbeiten wurde die Hypothese untersucht, dass genetisch bedingte, bisher nicht beschriebene kompensatorische Mechanismen für den fehlenden Blutdruckeffekt in Bradykinin-B2-Rezeptor *Knockout* Mäusen verantwortlich sein könnten. Dazu wurde zunächst durch strikte Inzucht der am MDC gehaltenen *Knockout*-Mauskolonie ein homogener genetischer Hintergrund erreicht. Im folgenden experimentellen Ansatz wurde die renale Expression von ca. 12000 bekannten Mausgenen vergleichend in *Knockout*- und Wildtyp-Mäusen gemessen. Im Ergebnis konnte die differentielle Expression einer Gruppe von Genen identifiziert werden, die alle auf das Mauschromosom 7 kartieren. Dabei erschien insbesondere die im *Knockout*-Modell verminderte renale Expression von Aquaporin 1 und 4 von Interesse, die aufgrund ihrer bekannten Funktion im proximalen Tubulus für eine Kompensation des Blutdruckeffektes verantwortlich sein könnten, der durch die genetische Ablation des Bradykinin B2 Rezeptors hervorgerufen wurde ⁽⁵⁸⁾. Zusammenfassend konnten

in dieser Studie durch die Anwendung hochparalleler, Genchip-basierter Expressionsuntersuchungen potentiell neue Mechanismen identifiziert werden, die an der Blutdruckregulation durch das Kallikrein-Kinin-System beteiligt sind.

4.2. Identifizierung interagierender Hypertonie-QTL ⁽³²⁾

Die komplexe Pathogenese der essentiellen Hypertonie wird u.a. durch die Interaktion einer Reihe von Genen mit verschiedenen Umweltfaktoren bestimmt. Darüber hinaus jedoch muss eine epistatische Interaktion zwischen verschiedenen Loci als sehr wahrscheinlich angenommen werden ^(59, 60). Die Untersuchung dieser Interaktion ist essentiell für das Verständnis pathophysiologischer *pathways*, die zur Entwicklung und Aufrechterhaltung der Hypertonie führen. In eigenen Arbeiten wurde die epistatische Interaktion zwischen zwei QTL untersucht, die substantiell zur Blutdruckvariabilität in der Ratte beitragen, untersucht.

Durch Kopplungs-Analysen in experimentellen SHR Kreuzungen mit normotensiven WKY-Ratten konnte zunächst ein wichtiger QTL für die durch Salz-induzierte arterielle Hypertonie auf dem Rattenchromosom 10 beschrieben werden ^(28, 29). Durch die Generierung kongener Linien wurde die Relevanz des Chromosom 10-QTL experimentell bestätigt ⁽³⁰⁾. Darüber hinaus wurden die Chromosom 10-kongenene Tiere, d.h. WKY-Tiere mit SHR-Allelen in der QTL-Region auf Chromosom 10, zur Generierung einer weiteren F2-Kreuzung mit SHR-Tieren verwendet. Dies führte zur Identifizierung eines weiteren Blutdruck QTL auf dem Rattenchromosom 1 ⁽²⁷⁾. Die experimentell ermittelten Blutdruckdaten in Chromosom10-Kongenene sowie in Chromosom 1+10 Doppel-Kongenene liessen eine Interaktion zwischen den beiden QTL auf Chromosom 1 und 10 vermuten. In eigenen Arbeiten wurden kongene Tiere für den Chromosom 1-Locus generiert und eine mögliche Interaktion systematisch in Einzel- und Doppel-Kongenene Stämmen untersucht. Dabei konnte eine epistatische Interaktion zwischen beiden Blutdruck-QTL experimentell nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass der Blutdruckeffekt von SHR-Allelen auf Chromosom 1 abhängig ist vom Vorhandensein von SHR-Allelen auf Chromosom 10 ⁽³²⁾.

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse sind in verschiedener Hinsicht paradigmatisch für die Komplexität multifaktorieller polygener Erkrankungen: 2 verschiedene Loci

modulieren den Phänotyp Blutdruck durch Beeinflussung des Sub-Phänotyps „Salz-induzierter Blutdruckanstieg“. Die epistatische Interaktion beider Loci beinhaltet eine ecogenetische Komponente, nämlich die Blutdruckantwort auf diätetische Salzaufnahme - ein Phänomen, welches auch für die Hypertonieentwicklung im Menschen charakteristisch ist. Die Ergebnisse der Studie unterstreichen, dass die Analyse epistatischer Interaktionen zwischen verschiedenen QTL für das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen, die zur Hypertonieentwicklung beitragen, essentiell ist.

4.3. Rolle von *Wnk4* bei der Entstehung der Hypertonie ⁽⁶¹⁾

Die Analyse der genetischen Variation, die einem identifizierten Blutdruck-QTL zugrunde liegt, stellt nach wie vor eine Herausforderung dar. Dabei ermöglicht die Konstruktion kongener Stämme sowohl die experimentelle Bestätigung für die Blutdruckrelevanz eines QTL als auch die Einengung der in der Kopplungsanalyse identifizierten Region auf ein genau definiertes genomisches Intervall. Innerhalb dieses Intervalls kommen prinzipiell alle Gene als positionelle Krankheitsgene in Frage. Hohe Priorität in der weiteren Analyse erhalten Gene, die aufgrund bekannter funktioneller Daten eine mögliche kausale Rolle in der Krankheitsentstehung vermuten lassen.

Eigene Arbeiten haben die Rolle der Serin/Threonin-Kinase *Wnk4* als mögliches Krankheitsgen innerhalb eines wichtigen Hypertonie-QTL auf dem Rattenchromosom 10 untersucht ⁽⁶¹⁾. Die Hypothese einer kausalen Rolle von *Wnk4* innerhalb dieses QTL wurde dabei durch Arbeiten unterstützt, die Mutationen im humanen *Wnk4* und *Wnk1*-Gen als ursächlich identifizierten für eine seltene, autosomal dominant vererbte Hypertonieform, den Pseudohypoaldosteronismus Typ II ⁽⁶²⁾. Diese Arbeiten postulierten einen durch die Mutation verursachten *gain of function*-Mechanismus in beiden Genen, entweder über eine erhöhte RNA-Expression oder einer erhöhten Protein-Aktivität durch veränderte Proteinsequenz. Während es sich beim Pseudohypoaldosteronismus Typ II um eine seltene monogene Erkrankung handelt, könnten möglicherweise häufiger vorkommende Sequenzvarianten mit deutlich geringeren Effekten zur Entstehung der epidemiologisch weitaus relevanteren Form, der polygen verursachten, essentiellen Hypertonie beitragen ^(62, 63).

Zunächst wurde die Blutdruck-Relevanz des QTL auf Chromosom 10 durch die Generierung einer kongenen Rattenlinie experimentell bestätigt. Zudem wurde die genomische Lokalisation von *Wnk4* innerhalb des kongenen Intervalls experimentell gezeigt. In einer Reihe von Experimenten konnten sowohl Sequenzunterschiede zwischen den verwendeten

Parentalstämmen WKY und SHR als auch Unterschiede in der renalen RNA-Expression von *Wnk4* ausgeschlossen werden. Zudem wurde ein sekundärer Effekt des unterschiedlichen Blutdruckes zwischen WKY und SHR auf die *Wnk4* -Expression ausgeschlossen. Insgesamt konnte damit gezeigt werden, dass *Wnk4* im essentiellen Hypertoniemodell der SHR-Ratte nicht zum Blutdruckanstieg beiträgt, der durch allelische Variationen auf Chromosom 10 verursacht wird.

4.4. Identifizierung von *Ephx2* als Herzinsuffizienz-Kandidatengen im SHHF-Modell ⁽⁶⁴⁾

Hypertonie sowie die damit verbundene links-ventrikuläre Myokardhypertrophie (LVH) stellen im Menschen eine der häufigsten Ursachen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz dar. Dabei ist die Hypertrophie von Kardiomyozyten initial eine durchaus kompensatorische Reaktion, durch die einer erhöhten Wandspannung entgegengewirkt werden kann. Letztlich ist die resultierende LVH jedoch klinisch mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert. Bisher sind die molekularen „Schalter“, die den Übergang von Druckbelastung in ein maladaptives kardiales Remodelling regeln, weitgehend unverstanden. Neuere epidemiologische Daten der Framingham-Studie legen jedoch einen substantiellen Beitrag genetischer Faktoren für den Krankheitsprozess nahe ⁽¹⁹⁾.

Um diese genetischen Faktoren zu untersuchen, haben eigene Arbeiten das Modell der spontan hypertensiven und herzinsuffizienten SHHF-Ratten untersucht ⁽⁶⁴⁾. Dieses Modell wurde durch eine Kreuzung von SHR-Ratten mit *Koletzky-obese rats* generiert. Genau wie SHR entwickeln SHHF Ratten bereits nach wenigen Wochen eine ausgeprägte arterielle Hypertonie, die von einer LVH gefolgt wird. Im Gegensatz zu SHR entwickeln SHHF Ratten jedoch im Alter von ca 16 Monaten eine Einschränkung der systolischen Pumpfunktion, die mit einer ausgeprägten klinischen Herzinsuffizienz verbunden ist. Die genetischen Determinanten sowohl der Hypertonie als auch der Herzinsuffizienz im SHHF Modell sind unbekannt.

In eigenen Experimenten wurde F2-Kreuzungen von SHHF-Tieren mit zwei unterschiedlichen Kontrollstämmen generiert: mit WKY als normotensivem Kontrollstamm sowie mit SHR-Ratten als hypertensivem Kontrollstamm. In allen drei Parentalstämmen wurden invasive hemodynamische Messungen mit Druck-Volumen-Kathetern durchgeführt, die sowohl in SHR als auch in SHHF Tieren einen erhöhten Blutdruck, eine LVH sowie Zeichen einer diastolischen Dysfunktion nachweisen konnten. Allein SHHF-Tiere zeigten

jedoch eine linksventrikuläre Dilatation verbunden mit einer reduzierten Ejektionfraktion sowie vermindertem Herzminutenvolumen. Im zweiten Schritt wurden alle individuellen Tiere beider F2-Kreuzungen ebenfalls hemodynamisch charakterisiert. Als intermediärer Phänotyp wurde in allen F2-Tieren die kardiale Genexpression, und zwar Chip-basiert für alle bekannten Rattengene gemessen. Daneben wurden alle F2-Tiere über das gesamte Genom mit Hilfe polymorpher genetischer Marker genotypisiert (*whole genome scan*). Letztlich wurden sowohl für die hemodynamischen als auch für die Expressions-Phänotypen Kopplungsanalysen durchgeführt. Durch Integration der Linkage-Ergebnisse für hemodynamische Herzinsuffizienz-Phänotypen als auch kardiale Expressionsdaten wurde das Gen *Ephx2* innerhalb eines signifikanten QTL auf dem Rattenchromosom 15 als Kandidatengen der Herzinsuffizienz im SHHF-Modell identifiziert.

Ephx2 kodiert das Protein der löslichen Epoxidhydrolase, welches für die Konversion von Epoxyeicosatetraensäuren (EETs) zu den entsprechenden Diolen (DHETs) mit deutlich geringerer biologischer Aktivität verantwortlich ist. Pharmakologische Experimente mit *Ephx2*-Inhibitoren konnten für EETs eine Reihe kardioprotektiver Effekte wie z.B. Vasodilatation, anti-Inflammation, anti-Thrombozyten-aggregatorische Effekte sowie inhibitorische Effekte auf die Migration glatter Gefässmuskelzellen nachweisen ⁽⁶⁵⁾. Ausserdem konnten Studien an *Ephx2-Knockout*-Mäusen eine verminderte Infarktgrösse nach Induktion einer Myokardischämie im Vergleich zu Kontrollmäusen demonstrieren ⁽⁶⁶⁾.

Eigene Arbeiten konnten demonstrieren, dass *cis*-Variation am *Ephx2*-Locus kosegregiert mit Herzinsuffizienz, vermehrter RNA-Expression, Protein-Expression und Enzymaktivität und damit auch mit einer verminderten Gewebekonzentration von kardioprotektiven EETs. Zusätzlich konnte in einem *Ephx2-Knockout*-Modell gezeigt werden, dass die Ablation des *Ephx2*-Gens zu einem Schutz vor Druck-induzierter Herzinsuffizienz sowie einer verminderten Anfälligkeit für Herzrhythmusstörungen führt.

5. Ausblick und klinische Bedeutung

Ziel der zuvor geschilderten Projekte ist ein besseres Verständnis der genetischen Determinanten, die komplexen kardiovaskulären Erkrankungen wie Hypertonie und Herzinsuffizienz zugrunde liegen. Dazu wurden experimentelle Strategien wie Linkage-Analysen in segregierenden Populationen, genomweite Expressionsanalysen und die Generation and Analyse kongener Rattenlinien im Zusammenspiel mit aufwendigen Phänotypisierungsmethoden in verschiedenen Modellorganismen – Maus und Ratte – angewendet. Im Ergebnis dieser Arbeiten konnten verschiedene krankheitsrelevante QTL identifiziert werden und innerhalb dieser QTL eine Reihe von Kandidatengenen funktionell analysiert werden. Insbesondere konnte die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) als Krankheitsgen einer Hypertonie-assoziierten Herzinsuffizienz sowohl in der Ratte als auch in der Maus experimentell herausgearbeitet werden. In eigenen Arbeiten wurden zudem humane Daten generiert, die eine Bedeutung der sEH auch in der Pathogenese der Herzinsuffizienz im Menschen nahelegen ⁽⁶⁴⁾. Im Anschluss an experimentelle Strategien, die zunächst auf die Identifizierung krankheitsrelevanter Gene in Modellorganismen gerichtet sind, bleibt die Validierung dieser Gene für komplexe kardiovaskuläre Erkrankungen im Menschen der nächste wichtige Schritt. Eigene Anträge planen insbesondere die Validierung der sEH für die Entstehung der Herzinsuffizienz im Menschen im Rahmen assoziativer genetischer Ansätze. Ziel ist dabei sowohl ein besseres Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankungen, mögliche diagnostische Fortschritte im Sinne einer frühen genetischen Risikostratifizierung sowie auch die Identifizierung möglicher therapeutischer Ansatzpunkte im Menschen.

6. Zusammenfassung

Die arterielle Hypertonie sowie deren Folgeerkrankungen stellen unverändert eine der wichtigsten Morbiditäts- und Mortalitätsursachen in den entwickelten Industrieländern dar. Eine Reihe von Studien konnte einen erheblichen Einfluss genetischer Faktoren auf Entstehung und Verlauf dieser Erkrankungen belegen – dennoch sind die genauen genetischen und molekularen Determinanten von Hypertonie und Herzinsuffizienz nach wie vor weitgehend unbekannt. Eine Analyse dieser Determinanten im Menschen ist jedoch aufgrund der Komplexität der Erkrankungen und der vielfältigen genetischen- und Umwelt-Interaktionen schwierig. Daher wurden in den vorliegenden Arbeiten zu einem grossen Teil ingezüchtete Tiermodelle genutzt, die eine reduktionistische Betrachtungsweise solcher komplexer Phänotypen ermöglichen. Einerseits fehlt diesen Tierstämmen die genetische Heterogenität, andererseits lassen sich durch die Kontrolle der Umweltbedingungen exogene Determinanten und deren vielschichtige Interaktionen untereinander minimieren.

In den hier vorgestellten Studien wurden experimentelle genetische Strategien in Ratte und Maus mit genomweiten Expressionsuntersuchungen kombiniert, um zunächst genomische Regionen und in weiteren Experimenten einzelne Kandidatengene zu identifizieren, die kausal an der Entstehung der o.g. Erkrankungen mitwirken. Paradigmatisch gelang dies bei der Identifizierung der löslichen Epoxidhydrolase als wichtiges Krankheitsgen bei der Entstehung der Hypertonie-assoziierten Herzinsuffizienz. Dabei wurde unter Nutzung von Sequenz- und Kartierungsressourcen zunächst im Rattenmodell eine krankheitsrelevante genomische Region identifiziert, aus der im zweiten Schritt ein Kandidatengen extrahiert und im entsprechenden Mausmodell validiert wurde. Die hier vorgestellten humanen Daten legen zudem eine Bedeutung dieses Gens auch für die Entstehung der Herzinsuffizienz im Menschen nahe.

Die Validierung der im Ratten- und Mausmodell identifizierten Krankheitsgene für die Krankheitsentstehung im Menschen bleibt jedoch auch weiterhin wichtige Zielstellung für zukünftig geplante Studien. Dabei sind sowohl Fortschritte für die individuelle genetische Risikostratifizierung als auch neue Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen zu erwarten.

7. Literatur

- 1 Dannenberg AL, Drizd T, Horan MJ, Haynes SG, Leaverton PE. Progress in the battle against hypertension. Changes in blood pressure levels in the United States from 1960 to 1980. *Hypertension*. 1987 Aug;10(2):226-33
- 2 Levy D, Kanchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med*. 2002 Oct 31;347(18):1397-402
- 3 SHEP Cooperative Research Group. Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). *JAMA*. 1991 Jun 26;265(24):3255-64.
- 4 Dahlöf B, Lindholm LH, Hansson L, Scherstén B, Ekblom T, Wester PO. Morbidity and mortality in the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension (STOP-Hypertension). *Lancet*. 1991 Nov 23;338(8778):1281-5
- 5 Fried LP, Kronmal RA, Newman AB, Bild DE, Mittelmark MB, Polak JF, Robbins JA, Gardin JM. Risk factors for 5-year mortality in older adults: the Cardiovascular Health Study. *JAMA*. 1998 Feb 25;279(8):585-92.
- 6 Yancy CW, Lopatin M, Stevenson LW, De Marco T, Fonarow GC; ADHERE Scientific Advisory Committee and Investigators. Clinical presentation, management, and in-hospital outcomes of patients admitted with acute decompensated heart failure with preserved systolic function: a report from the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE) Database. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Jan 3;47(1):76-84.
- 7 Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2006 Jul 20;355(3):251-9.
- 8 Weitz W. Zur Ätiologie der genuinen oder vaskulären Hypertension. *Z. Klein. Med*. 1923 96:151-83.
- 9 Platt R. Heredity in hypertension. *Lancet*. 1963 Apr 27;1(7287):899-904.
- 10 Havlik RJ, Garrison RJ, Feinleib M, Kannel WB, Castelli WP, McNamara PM. Blood pressure aggregation in families. *Am J Epidemiol*. 1979 Sep;110(3):304-12.
- 11 Higgins M, Keller J, Moore F, Ostrander L, Metzner H, Stock L. Studies of blood pressure in Tecumseh, Michigan. I. Blood pressure in young people and its relationship to personal and familial characteristics and complications of pregnancy in mothers. *Am J Epidemiol*. 1980 Feb;111(2):142-55.
- 12 Levine C, Skimming J, Levine E. Familial pheochromocytomas with unusual associations. *J Pediatr Surg*. 1992 Apr;27(4):447-51.
- 13 Hunt SC, Hasstedt SJ, Kuida H, Stults BM, Hopkins PN, Williams RR. Genetic heritability and common environmental components of resting and stressed blood pressures, lipids, and body mass index in Utah pedigrees and twins. *Am J Epidemiol*. 1989 Mar;129(3):625-38.

- 14 Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In *Hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management*. JH Laragh and BM Brenner, eds. New York: Raven Press 1990
- 15 Tambs K, Moum T, Holmen J, Eaves LJ, Neale MC, Lund-Larsen G, Naess S. Genetic and environmental effects on blood pressure in a Norwegian sample. *Genet Epidemiol*. 1992;9(1):11-26.
- 16 McIlhany ML, Shaffer JW, Hines EA Jr. The heritability of blood pressure: an investigation of 200 pairs of twins using the cold pressor test. *Johns Hopkins Med J*. 1975 Feb;136(2):57-64.
- 17 Feinleib M, Garrison RJ, Fabsitz R, Christian JC, Hrubec Z, Borhani NO, Kannel WB, Rosenman R, Schwartz JT, Wagner JO. The NHLBI twin study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary of results. *Am J Epidemiol*. 1977 Oct;106(4):284-5.
- 18 Austin MA, King MC, Bawol RD, Hulley SB, Friedman GD. Risk factors for coronary heart disease in adult female twins. Genetic heritability and shared environmental influences. *Am J Epidemiol*. 1987 Feb;125(2):308-18.
- 19 Lee DS, Pencina MJ, Benjamin EJ, Wang TJ, Levy D, O'Donnell CJ, Nam BH, Larson MG, D'Agostino RB, Vasan RS. Association of parental heart failure with risk of heart failure in offspring. *N Engl J Med*. 2006 Jul 13;355(2):138-47.
- 20 Liew CC, Dzau VJ. Molecular genetics and genomics of heart failure. *Nat Rev Genet*. 2004 Nov;5(11):811-25.
- 21 Luft FC, Miller JZ, Cohen SJ, Fineberg NS, Weinberger MH. Heritable aspects of salt sensitivity. *Am J Cardiol*. 1988 Jun 15;61(16):1H-6H.
- 22 Siegel AK, Kossmehl P, Planert M, Schulz A, Wehland M, Stoll M, Bruijn JA, de Heer E, Kreutz R. Genetic linkage of albuminuria and renal injury in Dahl salt-sensitive rats on a high-salt diet: comparison with spontaneously hypertensive rats. *Physiol Genomics*. 2004 Jul 8;18(2):218-25.
- 23 Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, Churchill GA, Paigen BJ, Svenson KL. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat Rev Genet*. 2007 Jan;8(1):58-69.
- 24 Rat Genome Sequencing Project Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. 2004 Apr 1;428(6982):493-521.
- 25 Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963 Mar;27:282-93.
- 26 Louis WJ, Howes LG. Genealogy of the spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat strains: implications for studies of inherited hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990;16 Suppl 7:S1-5.
- 27 Kreutz R, Struk B, Rubattu S, Hübner N, Szpirer J, Szpirer C, Ganten D, Lindpaintner K. Role of the alpha-, beta-, and gamma-subunits of epithelial sodium channel in a model of polygenic hypertension. *Hypertension*. 1997 Jan;29(1 Pt 1):131-6.

- 28 Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann JS, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, Cartwright P, De Gouyon B, Julier C, Takahasi S, et al. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature*. 1991 Oct 10;353(6344):521-9.
- 29 Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker RK, Mao YP, Ganten D, Dzau VJ, Lander ES. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell*. 1991 Oct 4;67(1):213-24.
- 30 Kreutz R, Hübner N, James MR, Bihoreau MT, Gauguier D, Lathrop GM, Ganten D, Lindpaintner K. Dissection of a quantitative trait locus for genetic hypertension on rat chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 12;92(19):8778-82.
- 31 Hübner N, Lee YA, Lindpaintner K, Ganten D, Kreutz R. Congenic substitution mapping excludes Sa as a candidate gene locus for a blood pressure quantitative trait locus on rat chromosome 1. *Hypertension*. 1999 Oct;34(4 Pt 1):643-8.
- 32 Monti J, Plehm R, Schulz H, Ganten D, Kreutz R, Hübner N. Interaction between blood pressure quantitative trait loci in rats in which trait variation at chromosome 1 is conditional upon a specific allele at chromosome 10. *Hum Mol Genet*. 2003 Feb 15;12(4):435-9.
- 33 Clemitson JR, Pratt JR, Frantz S, Sacks S, Samani NJ. Kidney specificity of rat chromosome 1 blood pressure quantitative trait locus region. *Hypertension*. 2002 Sep;40(3):292-7.
- 34 McCune S, Baker PB, Stills FH. SHHF/Mcc-cp rat: model of obesity, non-insulin-dependent diabetes, and congestive heart failure. *Ilar News* 1990 32:23-7
- 35 Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation*. 1996 Dec 1;94(11):2837-42.
- 36 Holycross BJ, Summers BM, Dunn RB, McCune SA. Plasma renin activity in heart failure-prone SHHF/Mcc-facp rats. *Am J Physiol*. 1997 Jul;273(1 Pt 2):H228-33.
- 37 Bergman MR, Kao RH, McCune SA, Holycross BJ. Myocardial tumor necrosis factor-alpha secretion in hypertensive and heart failure-prone rats. *Am J Physiol*. 1999 Aug;277(2 Pt 2):H543-50.
- 38 Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. 1990 Jul 26;323(4):236-41.
- 39 Haas GJ, McCune SA, Brown DM, Cody RJ. Echocardiographic characterization of left ventricular adaptation in a genetically determined heart failure rat model. *Am Heart J*. 1995 Oct;130(4):806-11.
- 40 Aitman TJ, Critser JK, Cuppen E, Dominiczak A, Fernandez-Suarez XM, Flint J, Gauguier D, Geurts AM, Gould M, Harris PC, Holmdahl R, Hubner N, Izsvák Z, Jacob HJ, Kuramoto T, Kwitek AE, Marrone A, Mashimo T, Moreno C, Mullins J, Mullins L, Olsson T, Pravenec M, Riley L, Saar K, Serikawa T, Shull JD, Szpirer C, Twigger SN, Voigt B, Worley K. Progress and prospects in rat genetics: a community view. *Nat Genet*. 2008 May;40(5):516-22.
- 41 Serikawa T, Kuramoto T, Hilbert P, Mori M, Yamada J, Dubay CJ, Lindpaintner K, Ganten D, Guénet JL, Lathrop GM, et al. Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics*. 1992 Jul;131(3):701-21.

- 42 Jacob HJ, Brown DM, Bunker RK, Daly MJ, Dzau VJ, Goodman A, Koike G, Kren V, Kurtz T, Lernmark A, et al. A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Nat Genet*. 1995 Jan;9(1):63-9.
- 43 STAR Consortium, Saar K, Beck A, Bihoreau MT, Birney E, Brocklebank D, Chen Y, Cuppen E, Demonchy S, Dopazo J, Flicek P, Foglio M, Fujiyama A, Gut IG, Gauguier D, Guigo R, Guryev V, Heinig M, Hummel O, Jahn N, Klages S, Kren V, Kube M, Kuhl H, Kuramoto T, Kuroki Y, Lechner D, Lee YA, Lopez-Bigas N, Lathrop GM, Mashimo T, Medina I, Mott R, Patone G, Perrier-Cornet JA, Platzer M, Pravenec M, Reinhardt R, Sakaki Y, Schilhabel M, Schulz H, Serikawa T, Shikhagaie M, Tatsumoto S, Taudien S, Toyoda A, Voigt B, Zelenika D, Zimdahl H, Hubner N. SNP and haplotype mapping for genetic analysis in the rat. *Nat Genet*. 2008 May;40(5):560-6.
- 44 Jansen RC, Nap JP. Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends Genet*. 2001 Jul;17(7):388-91.
- 45 Brem RB, Yvert G, Clinton R, Kruglyak L. Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast. *Science*. 2002 Apr 26;296(5568):752-5
- 46 Yvert G, Brem RB, Whittle J, Akey JM, Foss E, Smith EN, Mackelprang R, Kruglyak L. Trans-acting regulatory variation in *Saccharomyces cerevisiae* and the role of transcription factors. *Nat Genet*. 2003 Sep;35(1):57-64
- 47 Schadt EE, Monks SA, Drake TA, Lusis AJ, Che N, Colinayo V, Ruff TG, Milligan SB, Lamb JR, Cavet G, Linsley PS, Mao M, Stoughton RB, Friend SH. Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature*. 2003 Mar 20;422(6929):297-302.
- 48 Cheung VG, Conlin LK, Weber TM, Arcaro M, Jen KY, Morley M, Spielman RS. Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells. *Nat Genet*. 2003 Mar;33(3):422-5.
- 49 Morley M, Molony CM, Weber TM, Devlin JL, Ewens KG, Spielman RS, Cheung VG. Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. *Nature*. 2004 Aug 12;430(7001):743-7.
- 50 Hubner N, Wallace CA, Zimdahl H, Petretto E, Schulz H, Maciver F, Mueller M, Hummel O, Monti J, Zidek V, Musilova A, Kren V, Causton H, Game L, Born G, Schmidt S, Müller A, Cook SA, Kurtz TW, Whittaker J, Pravenec M, Aitman TJ. Integrated transcriptional profiling and linkage analysis for identification of genes underlying disease. *Nat Genet*. 2005 Mar;37(3):243-53.
- 51 Flint J, Valdar W, Shifman S, Mott R. Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nat Rev Genet*. 2005 Apr;6(4):271-86.
- 52 Rockman MV, Kruglyak L. Genetics of global gene expression. *Nat Rev Genet*. 2006 Nov;7(11):862-72.
- 53 Williams RW. Expression genetics and the phenotype revolution. *Mamm Genome*. 2006 Jun;17(6):496-502.
- 54 Hall JM. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol Ther*. 1992 Nov;56(2):131-90.

- 55 Madeddu P, Varoni MV, Palomba D, Emanuelli C, Demontis MP, Glorioso N, Dessi-Fulgheri P, Sarzani R, Anania V. Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B2-receptor gene. *Circulation*. 1997 Nov;18;96(10):3570-8.
- 56 Alfie ME, Sigmon DH, Pomposiello SI, Carratero OA. Effect of high salt intake in mutant mice lacking bradykinin-B2 receptors. *Hypertension*. 1997 Jan;29(1 Pt 2):483-7.
- 57 Milia AF, Gross V, Plehm R, De Silva JA, Bader M, Luft FC. Normal blood pressure and renal function in mice lacking the bradykinin B2 receptor. *Hypertension* 2001 Jun;37(6):1473-9
- 58 Monti J, Gross V, Luft FC, Milia AF, Schulz H, Dietz R, Sharma AM, Hübner N. Expression analysis using oligonucleotide microarrays in mice lacking bradykinin type 2 receptors. *Hypertension*. 2001 Jul;38(1):E1-3
- 59 Tanksley SD. Mapping polygenes. *Annu Rev Genet*. 1993;27:205-33.
- 60 Frankel WN, Schork NJ. Who's afraid of epistasis? *Nat Genet*. 1996 Dec;14(4):371-3.
- 61 Monti J, Zimdahl H, Schulz H, Plehm R, Ganten D, Hübner N. The role of Wnk4 in polygenic hypertension: a candidate gene analysis on rat chromosome 10. *Hypertension*. 2003 Apr;41(4):938-42.
- 62 Wilson FH, Disse-Nicodème S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1107-12.
- 63 Jacob HJ, Kwitek AE. Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet*. 2002 Jan;3(1):33-42.
- 64 Monti J, Fischer J, Paskas S, Heinig M, Schulz H, Gösele C, Heuser A, Fischer R, Schmidt C, Schirdewan A, Gross V, Hummel O, Maatz H, Patone G, Saar K, Vingron M, Weldon SM, Lindpaintner K, Hammock BD, Rohde K, Dietz R, Cook SA, Schunck WH, Luft FC, Hubner N. Soluble epoxide hydrolase is a susceptibility factor for heart failure in a rat model of human disease. *Nat Genet*. 2008 May;40(5):529-37.
- 65 Imig JD. Cardiovascular therapeutic aspects of soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev*. 2006 Summer;24(2):169-88.
- 66 Seubert JM, Sinal CJ, Graves J, DeGraff LM, Bradbury JA, Lee CR, Goralski K, Carey MA, Luria A, Newman JW, Hammock BD, Falck JR, Roberts H, Rockman HA, Murphy E, Zeldin DC. Role of soluble epoxide hydrolase in postischemic recovery of heart contractile function. *Circ Res*. 2006 Aug 18;99(4):442-50.
- 67 Zimdahl H, Nyakatura G, Brandt P, Schulz H, Hummel O, Fartmann B, Brett D, Droege M, Monti J, Lee YA, Sun Y, Zhao S, Winter EE, Ponting CP, Chen Y, Kasprzyk A, Birney E, Ganten D, Hubner N. A SNP map of the rat genome generated from cDNA sequences. *Science*. 2004 Feb 6;303(5659):807-15

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rainer Dietz und Herrn Prof. Dr. Detlev Ganten danke ich für die wissenschaftliche und persönliche Förderung meiner Arbeit. Sie haben meine Zeit an der Franz-Volhard Klinik stets hilfreich begleitet und ein Nebeneinander von wissenschaftlicher und klinischer Arbeit kontinuierlich ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. Norbert Hübner danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit, die gewinnbringenden wissenschaftlichen Diskussionen und eine bis heute andauernde freundschaftliche und vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Meiner Familie danke ich für das Verständnis und die Hilfe, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift