

1. Einleitung

1.1 Hypertonie als gesundheitspolitisches Problem

In Ländern der ersten Welt ist eine Erhöhung des arteriellen Blutdruckes eines der großen epidemiologischen Probleme der öffentlichen Gesundheitsversorgung. Die Bedeutung der Hypertonie ergibt sich aus der Tatsache, dass sie zu einer deutlichen Zunahme der Morbidität und Mortalität bei anderen Erkrankungen des Herzkreislaufsystems, wie z.B. Schlaganfall, Herzinfarkt, Herzversagen und terminaler Niereninsuffizienz führt (Lifton et al. 2001).

Trotzdem sind Pathogenese oder gar Ursache nur ansatzweise bekannt, da eine große Zahl von sowohl Umweltfaktoren als auch körpereigenen Systemen an der Entstehung oder Aufrechterhaltung des Blutdruckes beteiligt sind. So gelten Alter, Geschlecht, Rasse oder Diät als bedeutende "extrakorporale" Faktoren mit Einfluss auf den Blutdruck.

Die körpereigene Regulation beeinflussende Hormonsysteme wie das Renin-Angiotensin-System oder das Kinin-Kallikreinsystem gelten als "intrakorporale" Faktoren, indem sie auf den Gefäßtonus und auf den Wasser-, und Elektrolythaushalt, und hier besonders auf die Natriumhomöostase Einfluss haben. Weitere "intrakorporale" Regulationsmechanismen beinhalten die Barorezeptoren des glomus caroticus, die Natriuretischen Peptide aus Vorhof und Gehirn, sowie das sympathiko-adrenerge Hormonsystem, die direkt den Gefäßtonus und die kardiale Herzleistung beeinflussen.

Die Niere nimmt in den oben beschriebenen Regulationsmechanismen eine zentrale Stellung ein. Sie variiert als Sensor-, und Effektororgan zugleich den Wasser-, und Elektrolythaushalt, und hat somit eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und der Behandlung der Hypertonie. Eine Nierenschädigung kann sowohl Ursache, als auch Folge eines Bluthochdruckes sein.

Obwohl die physiologischen Abläufe all dieser Systeme weitgehend bekannt sind, so ist doch ihr komplexes Zusammenspiel nur ansatzweise erforscht, ihre gegenseitige Beeinflussung zu vielgestaltig, um sie als die Summe ihrer Einzelteile betrachten zu können. Die Unterscheidung einer primären Veränderung von einer adaptierenden sekundären Reaktion des Körpers ist durch physiologische Beobachtungen alleine kaum möglich. Daher ist auch die Therapie empirischer Natur, der praktizierende Arzt muss zur Zeit in der Hypertoniebehandlung aufgrund von seiner Erfahrung und mithilfe der sog. evidenzbasierten Medizin aus verschiedenen, unterschiedlich

arbeitenden Medikamentengruppen eine Mono-, oder Kombinationstherapie zusammenstellen, die bei der geringsten Nebenwirkungsrate den Blutdruck am effizientesten senken kann. Da aber die interindividuellen Schwankungen sehr groß sein können, zum einen bezogen auf die Ursache der arteriellen Hypertonie, zum anderen aber auch auf die Reaktion des Körpers auf die angebotene Therapie, wäre eine genaue genetische Hintergrundanalyse der Hypertonie und ihrer Ursachen sehr hilfreich.

Hierbei ist die genaue Positionierung und Entschlüsselung der krankheitsrelevanten Proteine und der sie kodierenden Gene von Bedeutung. Mindestens so wichtig ist aber die Erkenntnis über das Zusammenspiel der verschiedenen Proteine, Hormone, Regulationsmechanismen und extrakorporalen Faktoren. Das Gesamtbild Hypertonie scheint mehr zu sein als die einzelnen beitragenden Faktoren. Trotzdem ist das Verständnis der Details unerlässlich für das Verstehen des Gesamtbildes.

Eines der Hauptziele dieser Arbeit soll im tierexperimentelle Rahmen die Herausarbeitung der zentralen Rolle der Niere, und damit verbunden die Bedeutung der Proteinurie und der Albuminurie, in der Entstehung oder Unterhaltung der Hypertonie sein.

1.2 Proteinurie als Zeichen der Nierenschädigung

Die Niere erfüllt bei den Säugetieren eine lebenswichtige Funktion. Im menschlichen Körper dient sie vor allem als Ausscheidungsorgan von wasserlöslichen Stoffen.

Hier wird das Blut "ultrafiltriert", d.h. die zur Exkretion bestimmten Stoffe werden abfiltriert, die zur Homöostase notwendigen Elektrolyte, Proteine und Verbindungen (z.B. Wasser) werden in der notwendigen Menge zurückgehalten oder im tubulären System resorbiert.

Insgesamt ist das "System Niere" anfällig für viele unterschiedliche Arten der Schädigung.

Man unterscheidet dabei zwischen primärer Schädigung der Niere, also Krankheiten, die ihren Ursprung in der Niere nehmen, und sekundären Schädigungen, deren Pathomechanismus nicht von der Niere ausgeht, diese aber mitschädigt.

Zur erstgenannten Gruppe zählen z.B. Autoimmunerkrankungen wie die Wegnersche Granulomatose oder entzündliche Veränderungen, also Nephritiden unterschiedlicher Genese.

Zur letztgenannten Gruppe zählt z.B. der Diabetes mellitus oder die Amyloidniere bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Die Hypertonie nimmt eine Zwischenstellung ein und kann sowohl Ursache als auch Folge einer Nierenschädigung sein.

So entwickelt sich eine renale Form der Hypertonie durch eine Stenose der Nierenarterie und damit verbunden einer Aktivitätssteigerung des RAAS. In diesem Fall ist die Schädigung direkt an der Niere lokalisiert.

Bei der weitaus häufigeren sekundären Form der Hypertonie kommt es durch Endothelläsionen im arteriellen Schenkel zu Endorganschäden, die auch die Niere betreffen können und so zu einer sekundären Form der Proteinurie führen.

Schon seit längerer Zeit ist durch tierexperimentellen Studien bekannt, dass Albuminurie ein Risikofaktor für die Entwicklung chronischer Nephropathien und die Zunahme der kardiovaskulären Mortalität ist (Schulz et al. 2002).

Eine gewisse Proteinausscheidung im Urin wird beim Menschen als physiologisch angenommen, allerdings ist diese Grenze bei 30µg/ml willkürlich festgelegt.

Normalerweise erscheinen im Ultrafiltrat der Niere nur niedermolekulare Proteine, die zu 90% im Tubulus wieder resorbiert werden.

Als Proteinurie bezeichnet man eine Ausscheidung von mehr als 150mg Eiweiß /24h oder eine Abweichung vom physiologischen Proteinmuster.

Gesondert wird die sog. Mikroalbuminurie bewertet, dabei werden am Tag zwischen 30 mg und 300 mg Albumin /24h im Urin ausgeschieden.

Sie gilt als wichtiges Frühsymptom einer diabetischen oder hypertensiven Nephropathie (Mann et al. 2001; Ruilope et al. 2001).

Außerdem ist die Mikroalbuminurie selbst ein Risikofaktor für die Entwicklung einer hypertensiven Nephropathie (Nephrosklerose) sowie hypertensiver Endorganschädigungen durch Gefäßläsionen und endotheliale Dysfunktion.

Durch die fortschreitende Fibrosierung der Niere durch Proteinablagerung kommt es zu zunehmender Volumenretention und damit zu Verstärkung eines präexistenten Hochdruckes mit Endorganschäden, es entwickelt sich ein selbstunterhaltender circulus vitiosus.

Es wird vermutet, dass Schädigung des Endothels einerseits in den Gefäßen zu Artherosklerose, andererseits an der Niere zu einer Veränderung der Basalmembran

führt. Es kommt zur vermehrten Durchlässigkeit von großmolekularen Proteinen, die eigentlich in den Kapillarschlingen des Glomerulums zurückgehalten werden sollten. Anfänglich führt dies noch nicht zu einer Proteinurie, da die meisten Proteine im tubulorenalen System wieder aufgenommen werden.

Mit weiterer Progression der Basalmembranschädigung kommt es jedoch zu einer Überschreitung der Absorptionskapazität und zu einer Ausscheidung von Proteinen und Albumin im Urin.

Die Tubuli werden durch die Proteinablagerungen gestört, es kommt zunehmend zu Funktionsverlust, bindegewebigem Umbau und schließlich Vernarbung des Gewebes, der so genannten Fibrosierung.

Nun ist auch beim Menschen ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Albuminurie und dem Risiko eines kardiovaskulären Todes belegt.

Während man früher annahm, dass sich erhöhte Albuminuriewerte nur bedingt auf die Mortalität auswirken, ist in einer großen Studie (Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) Study Group) gezeigt worden, dass auch in einer großen, vorher nicht selektierten Kohorte die Albuminurie assoziiert ist mit einer Zunahme der Mortalität im Allgemeinen und der kardiovaskulären Mortalität im Besonderen, also der Sterberate aufgrund eines kardiovaskulären Vorfalls (Hillege et al. 2002).

1.3 Die Rolle der Niere in der Entstehung der Hypertonie

Daten desUSRDS, des United States Renal Data System, belegen, dass die hypertensive Nephrosklerose die zweithäufigste Ursache nach der diabetischen Nephropathie für eine Niereninsuffizienz ist. Durch Kohortenstudien aus den 70er Jahren konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem systolischen Blutdruck > 140 mm Hg und einem diastolischen Blutdruck > 90 mm Hg nach 16 Jahren Nachbeobachtung ein vierfach erhöhtes Risiko aufweisen, an einer terminalen Niereninsuffizienz zu erkranken (Klag et al. 1997).

Im Gegenzug konnte durch die MDRD-Studie (Modification of Diet in Renal Disease Study Group) gezeigt werden, dass strikte Blutdruckeinstellung mittels Antihypertensiva die Proteinurie als Zeichen der Nierenschädigung senkt und ein Fortschreiten der renalen Funktionseinschränkung verlangsamt (Klahr et al. 1994).

Arterielle Hypertonie kann Nierenschäden auf verschiedene Weise verursachen. Zum einen kann die Hypertonie preglomeruläre Arterien und Arteriolen schädigen mit der

Entwicklung einer Mediasklerose und luminaler Einengung bis hin zur Okklusion des Gefäßes, was wiederum zur Ischämie und Schädigung der Glomerula führt. Dieser Effekt wurde schon 1919 durch Fahr et al. entdeckt. Zum anderen kann ein systemischer Hypertonus direkt zum Hochdruck in den glomerulären Kapillaren führen und so über die Erhöhung der Wandspannung direkt zur Glomerulosklerose beitragen. Letzterer Mechanismus konnte im Tiermodell anhand der 5/6 Nephrektomie gezeigt werden (Anderson et al. 1985).

Einer der ersten, der die zentrale Rolle der Niere in der Blutdruckhomöostase erkannte, war der Physiologe Guyton. Er postulierte eine gestörte Beziehung zwischen dem Perfusionsdruck der Niere und der Natriumausscheidung als Ursache eines Blutdruckanstieges. Beweise hierfür waren Nierentransplantationsexperimente an Ratten und die Beobachtungen an nierentransplantierten Patienten. In beiden Fällen konnte gezeigt werden, dass entweder eine hypertensive Niere in einem normotensiven Empfänger (Tiermodell) oder eine normotensive Niere in einem hypertensiven Empfänger (niereninsuffizienter Patient) eine dem Spenderorgan entsprechende Veränderung des Blutdruckes ergab.

Schließlich liegt bei 90 % der Patienten im terminalen Stadium der Niereninsuffizienz bei einer primären Nierenerkrankung, egal welcher Ursache, eine ausgeprägte Hypertonie vor. Und einer der ersten Ansätze der medikamentösen Therapie der Hypertonie ist die Regulation des Natriumangebotes an die Niere, entweder über diätetische Maßnahmen und/ oder über den Nierenblutfluß verändernde Medikamente.

All dies zeigt die Schlüsselrolle der Niere im Hinblick auf die "Volkskrankheit" Hypertonus.

Eine sorgfältige Beachtung der vergleichsweise einfach zu messenden Faktoren Proteinurie und Albuminurie könnte zum einen eine leichte Schädigung der Niere bei latentem Hypertonus aufzeigen, zum anderen aber auch eine höhere Anfälligkeit für eine Hypertonie bei vorbestehender, klinisch noch nicht relevanter Nierenschädigung markieren.

1.4 Bauweise und Funktion der Niere

Um die Zusammenhänge zwischen Hypertonie, Proteinurie und Albuminurie bei Nierenschädigung zu verdeutlichen, möchte ich kurz auf die Funktionsweise und den Aufbau der Niere eingehen.

Die menschliche Niere enthält ca. 1-1,25 Mio. Nephrone je Organ (Lippert, Anatomielehre). Folgend ist der Aufbau eines Nephrons mit Glomerulus und tubulärem System als kleinste funktionale Einheit der Niere beschrieben:

Makroskopisch lassen sich an der Niere zwei verschiedene Zonen unterscheiden, die Rinde und das Mark.

Das Mark besteht aus den Sammelrohren, die für das Gegenstromprinzip von Bedeutung sind, und den Nierenkelchen, die sich ins Nierenbecken entleeren.

In der Rinde befinden sich die Glomerula, aus Kapillarschlingen gebildete "Gefäßknoten", die von der sog. Bowmanschen Kapsel umgeben sind. Auf der einen Seite befindet sich der Gefäßpol, auf der anderen Seite der Harnpol.

Am Gefäßpol erhält das Glomerulum das zu filtrierende Blut über ein zuführendes vas afferens, nachdem der Knoten durchströmt wurde, fließt das Blut über ein vas efferens der Nierenvene zu.

Die Wand der Glomerulumkapillaren besteht aus einem dünnen, fenestrierten Endothel, und einer geschlossenen Basalmembran. Hier werden bei der gesunden Niere großmolekulare Proteine mit mehr als 40.000 Dalton Proteingewicht zurückgehalten (Albumin 66.000 Dalton).

Am Harnpol, also zum Kapselraum hin, ist die Basalmembran von stark verzweigten, fortsatzreichen Zellen, den Podozyten umgeben. Diese Fortsätze bilden Schlitz, deren 30-40 nm breite Zwischenräume von einer Membran überzogen sind, dem Schlitzdiaphragma (Rodewald et al. 1974).

Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass sich hier der entscheidende Ort der Ultrafiltration befindet, also die Fähigkeit der Niere, harnpflichtige Substanzen zu filtrieren und Proteine zumindest teilweise zurückzuhalten.

Als eine der Hauptkomponenten des Schlitzdiaphragmas ist kürzlich das Protein "Nephrin" entdeckt worden (Holzman et al. 1999). Bei Punktmutationen des Nephringens *NPHS1* kann es zu einem angeborenen nephrotischen Syndrom kommen (Kestila et al. 1998).

Bei dieser seltenen Form der monogenetischen Nephropathie werden in einem rezessiven Erbgang zwei defekte Nephrinallele vererbt, und es kommt bei den betroffenen Kindern schon früh zu einer massiven Proteinurie.

Auch in weiteren Versuchen konnte bewiesen werden, dass Nephrin eine große Rolle in der Filterbarriere der Niere für Eiweiße spielt (Reiser et al. 2002).

Allerdings ist die genaue Funktion des Proteins immer noch unbekannt.

Insgesamt hat sich also gezeigt, dass der Aufbau der Schlitzmembran von entscheidender Bedeutung für die Ultrafiltration des Blutes ist, diese wiederum bestimmt die Proteinurie und hat damit Einfluss auf die Entwicklung einer Hypertonie und Endorganschädigung.

Daher ist es von besonderem Interesse, weitere Kandidatengene zu identifizieren, die an der Pathophysiologie der Proteinurie beteiligt sein können.

Hierfür sind Kreuzungsexperimente von großem Nutzen, wie sich schon bei anderen polygenetischen Erkrankungen, z.B. der familiären Adipositas oder dem Diabetes gezeigt hat.

1.5 Tiermodelle

Kreuzungsexperimente mit unterschiedlichen Stämmen, die in sich eine große genetische Homogenität aufweisen, sind schon lange ein probates Mittel, um die genetischen Grundlagen von physiologischen Regelkreisen und Krankheiten als deren Störfaktoren genauer zu untersuchen.

Vorteile dieser über viele Generationen ingezüchteten Stämme sind einerseits die schon erwähnte genetische Homogenität der Tiere, d.h. interindividuelle Unterschiede des Genoms sind kaum vorhanden und dadurch kann es nicht zu einer Verstärkung oder Abschwächung eines Merkmals kommen.

Andererseits sind bei diesen Tieren durch Züchtung und Selektion bestimmte Phänotypen besonders stark ausgebildet, so dass sich Blutdruck, Fettstoffwechsel oder Nierenfunktion und deren Störungen gut messen lassen. Durch die genetische Homogenität sind die Ergebnisse reproduzierbar und durch Nahrungszusätze oder Pharmakotherapie standardisiert beeinflussbar.

In dieser Arbeit wurden zwei hypertensive Rattenmodelle verwendet.

Zum einen SHR/Rks-Tiere, eine in der Hypertonieforschung häufig verwendete Züchtung mit einem essentiellen Hypertonus (Spontaneous Hypertensive Rat).

Der andere Stamm MWF/Rks ist ein Tiermodell, welches auch eine milde Hypertonie aufweist, zusätzlich aber eine Albuminurie und Proteinurie durch ein angeborenes Nephrondefizit hat. Es wurde dann nach einem festgelegten Schema ein Backcross generiert.

Hierbei werden Parentaltiere aufgrund besonderer phänotypischer Eigenschaften ausgewählt. Diese werden miteinander gekreuzt und die weiblichen Tiere der F1-Generation wiederum mit dem Vatertier zurückgekreuzt.

Der Vorteil dieses Züchtungsschemas liegt darin, dass bei sehr ähnlichem genetischem Hintergrund der beiden Stämme genotypische Unterschiede, die zum Phänotyp Albuminurie führen, leichter herausgearbeitet werden können.

Der Einfluss der sekundären, sich aus den Endorganschäden der Hypertonie ergebenden Proteinurie wird so gemindert.

Näheres zu den verwendeten Tiermodellen findet sich im Abschnitt "Material und Methoden".

1.6 Vorteil der genomweiten Kopplungsanalyse

Durch genomweite Kopplungsanalysen lässt sich eine Verbindung zwischen einem Merkmal wie Blutdruck und dem Genom herstellen, indem statistische Häufungen im Auftreten eines Phänotyps und einem oder mehreren Allelen im Genom aufgezeigt werden können.

Ergebnis solcher Genomweiten Kopplungsstudien sind sog. *Quantitative Trait Loci* (QTL), Genorte oder Allele, die vereinfacht gesagt statistisch betrachtet eine hohe Wahrscheinlichkeit haben, im Genom von den Tieren vorzukommen, die den gesuchten Phänotyp stark ausprägen (Rapp 2000).

Als Beispiel sei hier die in diesem Labor vorausgegangene Untersuchung genannt, bei der ein nierengesunder, normotensiver Referenzstamm (Lew) mit dem nierengeschädigten, hypertensiven Stamm MWF verpaart und so ein Backcross generiert wurde. Es wurden drei mögliche QTL für Albuminurie nachgewiesen, die allerdings genetisch nicht mit dem Blutdruck in Verbindung stehen (Schulz et al. 2002).

Es wird angenommen, dass die Proteinurie eine multifaktorielle Genese besitzt, d.h. es gibt verschiedene Faktoren, die ursächlich dazu beitragen.

Es kann einen oder mehrere QTL geben, die unterschiedliche Interaktionsmöglichkeiten miteinander aufweisen können. Zum einen können sie unabhängig voneinander auf den Phänotypen einwirken.

In diesem Fall sollte es zu einem additiven Effekt der QTL in unterschiedlichen Kreuzungen kommen, d.h. abhängig von der Anzahl und Signifikanz der einzelnen QTL wäre das Merkmal unterschiedlich stark ausgeprägt.

Sie können sich aber auch gegenseitig beeinflussen und in einem komplexen Zusammenhang stehen: so bezeichnet man den interaktiven Effekt von nicht-allelen Genen auf eine Phänotyp als "Epistasie", den simultanen Effekt von einem Gen auf mehrere Phänotypen hingegen als "Pleiotropie" (Schork et al. 1996).

Des Weiteren haben Umwelteinflüsse oft großen Effekt auf einen Phänotyp.

Am Beispiel der Proteinurie führt eine pathologische Veränderung des Nierengewebes, ausgelöst durch eine Entzündung, eine Autoimmunkrankheit, oder eine Stoffwechselstörung wie der Diabetes mellitus, zu einer ausgeprägten Proteinurie und schließlich zum Nierenversagen.

Alle diese Krankheiten entfalten ihre Wirkung unter anderem an der Basalmembran des Glomerulum, sind jedoch primär keine Erkrankung von Nierengewebe.

Als dritte Einflussfaktoren spielen die so genannten "intermediären Phänotypen" eine Rolle, also Enzym-, und Hormonspiegel, die den Phänotyp Albuminurie beeinflussen. Als ein Beispiel gilt die Rolle des Renin-Angiotensin-Systems und der Wirkung von ACE-Hemmern auf die renale Durchflussrate.

Die Proteinurie unterliegt somit einer multifaktoriellen Pathogenese, die sich aus vielschichtigen Interaktionen zusammensetzt.

Zum einen die Proteinurie beeinflussenden genetisch determinierten Faktoren, zum anderen Umweltvariablen, und drittens und körpereigene Regulationsvorgängen, die primär nichts mit der Proteinausscheidung zu tun haben, diese aber mittelbar beeinflussen.

Um diese vielfältigen, auch auf unterschiedlichen Ebenen vorhandenen Interaktionen aufzudecken und "entwirren" zu können, ist es hilfreich, sie in Einzelkomponenten zu zerlegen und diese gesondert und unabhängig vom Rest zu untersuchen.

In dem vorliegenden Experiment haben wir versucht, die genetischen Unterschiede der Proteinurie herauszuarbeiten, indem wir den genetischen Hintergrund durch Inzucht von Tieren mit primärer Hypertonie gleichgesetzt, und die Umweltfaktoren standardisiert haben. Dadurch sollte es gelingen, zwei der drei Einflussfaktoren zu minimieren. Theoretisch müssten die nun resultierenden Unterschiede im Phänotyp allein den genotypischen Unterschieden zuzuschreiben sein und damit eine Identifikation von Proteinurie bestimmender Loci erleichtern.

1.7 Experimenteller Ansatz

Am Anfang stand die Generierung und Phänotypisierung eines MWF x SHR-Backcross sowie die Gewinnung von DNA und Organschnitten zur histologischen Aufarbeitung aller 215 Tiere.

Anschließend wurde eine Kopplungsanalyse des gesamten Genoms aller Extremtiere durchgeführt, also der je 23 Tiere mit den höchsten und niedrigsten Albuminuriewerten und Blutdruckwerten.

Die so herausgearbeiteten QTL wurden für alle Tiere untersucht.

Teilaspekte des Projektes sind Inhalt anderer Dissertationen.

Die Ziele dieser Arbeit werden im Folgenden dargestellt.

1.8 Ziel der Arbeit

Das Ziel des Projektes ist die Charakterisierung der genetischen Grundlagen der Proteinurie und Albuminurie bei der MWF-Ratte; dieses ist ein wichtiger Schritt hin zum besseren Verständnis der Hypertonie.

Diese Arbeit geht insbesondere auf Chromosom RNO8 ein.

Es gilt zu untersuchen, inwiefern der genetische Hintergrund für die Nierenschädigung von Bedeutung ist, also ob auch die Backcross-Tiere eine Albuminurie aufweisen, oder ob protektive Gene oder Gen-Gen-Interaktionen des SHR-Stammes die Suszeptibilität (Anfälligkeit) für eine Nierenschädigung des MWF-Stammes herabgesetzt haben.

Eine wichtige Frage, die diese Untersuchung klären soll, ist das Vorhandensein sog. age-of-onset-Effekte. Indem wir Albuminuntersuchungen bei allen Tieren in drei unterschiedlichen Altersgruppen durchgeführt haben, lassen sich altersabhängige Unterschiede der Ultrafiltrationsfunktion der Niere detektieren. Verändert sich die Stärke der Proteinurie im Laufe des Lebens, oder bleibt sie, bezogen auf die 24h-Urinmenge, unverändert?

Weiterhin werden Interaktionen mit Loci auf anderen Chromosomen des gleichen Backcross sowie in anderen Kreuzungsexperimenten mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund diskutiert.