

Aus dem Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Untersuchungen zur Genetik hypertensiver Endorganschäden
bei konsomen Rattenmodellen“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Norbert Wendt

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Kreuz

2. Prof. Dr. med. U. Kintscher

3. Prof. Dr. med. K. F. Hilgers

Datum der Promotion: 20.11.09

Meinen Eltern und meiner Frau

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
Einleitung und Zielstellung.....	2
Methodik.....	3
Rattenstämme.....	3
Stammdefinition	3
Phänotypisierung	3
Histologie.....	4
Triglyceride und Cholesterin.....	4
Statistik	4
Ergebnisse.....	5
Diskussion	7
Fibrose	9
Fazit	10
Referenzen	A
Anteilerklärung.....	E
Lebenslauf.....	G
Komplette Publikationsliste.....	H
Erklärung	I
Danksagung	J

Abstract

Die klinische Bedeutung der Hypertonie ergibt sich aus ihrer hohen Prävalenz und den resultierenden Endorganschäden. Dabei zeigt sich, dass besonders salz-sensitive Hypertoniker ausgeprägte hypertensive Endorganschäden (HES) entwickeln.

Ziel dieser Arbeit war es, genetische Grundlagen der HES bei salz-sensitiver Hypertonie zu untersuchen. Als Tiermodell wurde die salz-sensitive Dahl-Ratte (SS) verwendet, welche neben schweren HES, wie linksventrikulärer Hypertrophie mit Fibrosebildung, auch eine Hypercholesterinämie entwickelt. Mittels experimenteller Kreuzpaarungen zwischen der SS-Ratte und der salz-resistenten Spontaneously Hypertensive Rat (SHR), welche moderate HES entwickelt, konnte ein Quantitative Trait Locus (QTL) mit Kopplung zur Herzhypertrophie auf Chromosom 19 (RNO19) entdeckt werden. Durch selektive Rückkreuzung wurde anschliessend das protektive RNO19 vom SHR-Stamm in den isogenetischen Hintergrund des SS-Stammes transferiert.

Männliche konsome SS-19^{SHR}-Ratten zeigten sowohl unter Normal- (NSD) als auch unter Hochsalzdiät (HSD) signifikant niedrigere systolische Blutdruckwerte (SBD) als der SS-Parentaltierstamm (NSD: 149 ± 4 vs. 162 ± 3 mmHg; HSD: 186 ± 8 vs. 213 ± 3 mmHg; $p < 0,05$). Der konsome SS-19^{SHR}-Stamm war jedoch weiterhin salzsensitiv mit einem Blutdruckanstieg von 37 mmHg unter HSD im Vergleich mit NSD. Analog zum SBD war das relative linksventrikuläre Gewicht (LVW) des konsomen Stammes unter beiden Diäten signifikant niedriger im Vergleich zum SS-Parentaltierstamm (NSD: $2,1 \pm 0,03$ vs. $2,3 \pm 0,03$ mg/g; HSD: $2,5 \pm 0,07$ vs. $3,1 \pm 0,10$ mg/g; $p < 0,05$). Auch war bei SS-19^{SHR}-Männchen im Vergleich zu SS-Männchen die perivaskuläre Fibrose unter HSD signifikant erniedrigt ($10,4 \pm 0,6$ vs. $15,7 \pm 1,4$ %, $p < 0,001$). Zusätzlich waren die Plasma-Cholesterin-Konzentrationen männlicher SS-19^{SHR}-Ratten unter HSD signifikant niedriger im Vergleich zum SS-Stamm (100 ± 7 vs. 141 ± 6 mg/dL; $p < 0,001$). Weitere Korrelationsanalysen und immunhistologische Untersuchungen konnten einen signifikanten Einfluss des Cholesterinspiegels auf den Grad der Fibrosierung des linken Ventrikels nachweisen.

Die Untersuchung des konsomen Stammes SS-19^{SHR} ergab zusammenfassend, dass RNO19 einen signifikanten Einfluss auf den SBD, die Entwicklung der Herzhypertrophie und die Plasmacholesterinkonzentration ausübt. Darüberhinaus wurde ein vorher unbekannter Zusammenhang in der Entwicklung der Herzfibrose bei Dahl-Ratten mit dem Cholesterinspiegel gezeigt, welcher durch RNO19 genetisch moduliert wird.

Einleitung und Zielstellung

Die arterielle Hypertonie zeichnet sich durch ihre hohe Prävalenz und die aus ihr resultierenden hypertensiven Endorganschäden und Folgeerkrankungen aus ¹⁻³. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass bei einem Teil der betroffenen Patienten die Progression der Endorganschäden deutlich beschleunigt ist. Die genetischen Ursachen des Phänomens sind bisher weitgehend ungeklärt ⁴. Bei Hypertonikern ist häufig nur eine geringe Korrelation zwischen Blutdruck und dem Schweregrad der hypertensiven Endorganschäden zu beobachten. Dies gilt insbesondere für die Entstehung der hypertensiven Nephropathie ⁵. Generell ist wahrscheinlich der Einfluss von genetischen Faktoren die zusätzlich zum Blutdruckniveau die Entstehung von Endorganschäden beeinflussen von entscheidender Bedeutung ⁶.

Neben anderen Rattenstämmen wie der Munich-Wistar-Frömter Ratte (MWF), im Detail beschrieben von Schulz et al. ⁷⁻¹¹, soll hier ein besonderes Augenmerk auf die Kopplungsanalysen unter einer Hochsalzdiät (HSD) (4 % w/w NaCl) zwischen der Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) und der salz-sensitiven Dahl-Ratte (SS) gelegt werden. Durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten mehrere Quantitative Trait Loci (QTL) auf Chromosom 19 (RNO19) der Ratte mit signifikanter Kopplung zur Herzhypertrophie (LVH), Albumin- (UAE) sowie Proteinurie (UPE) entdeckt werden ¹⁻³. Um QTL zu verifizieren und eingehender zu untersuchen, ist die Zucht und Charakterisierung konsomer Stämme nötig ¹². Durch selektive Rückkreuzung wurde dazu das protektive Chromosom 19 vom SHR-Stamm in den isogenetischen Hintergrund des SS-Stammes transferiert (SS-19^{SHR}).

Aufgabe dieses Dissertationsvorhaben war die genetische Charakterisierung und die Phänotypisierung des neuen konsomen Stammes SS-19^{SHR} im Vergleich zu beiden Parentaltierstämmen. Dies schloss Untersuchungen des Blutdrucks, des Herzens sowie der Nieren und Gefäße mit ein. Ausserdem wurden metabolische Untersuchungen in Stoffwechselkäfigen und eine Bestimmung der Blutlipide durchgeführt. Immunhistologische Analysen sollten einen detaillierteren Einblick in die Pathophysiologie der Fibrosierung des linken Ventrikels (LV) bringen. In Ergänzung zur vorhergehenden Kopplungsanalyse sollten auch weibliche Tiere mit eingeschlossen werden, um somit Einflüsse von RNO19 auf den bekannten sexuellen Dimorphismus im Dahl- und SHR-Stamm zu untersuchen ^{13, 14}. Die Einbeziehung von Tieren unter Normaldiät (NSD) in das Studiendesign erlaubte es, Unterschiede im konsomen Stamm im Bezug zum salz-sensitiven Hintergrund des Dahl-Stammes dazustellen.

Methodik

Rattenstämme

Die SS-Ratte ist ein wichtiges Tiermodell der salz-sensitiven Hypertonie¹⁵. In der Literatur wird dieser Inzucht-Stamm zusätzlich als insulin-resistent^{16, 17} und hyperlipidemisch beschrieben¹⁸. Er wurde durch gezielte Selektion von Ratten, die unter HSD (8 % w/w NaCl) einen hohen Blutdruck entwickeln gezüchtet. Während dieser Rattenstamm zwar generell als salz-sensitives Hypertonie-Modell verwendet wird, zeigt er jedoch auch eine spontane Hypertonieentwicklung unter NSD^{19, 20}.

Der SHR-Stamm dagegen ist ein Modell für einen salz-resistenten spontanen Bluthochdruck²¹. Hypertensive Endorganschäden treten in diesem Stamm erst relativ spät auf und sind insgesamt nur gering ausgeprägt. Aus diesem Grund wurde er als kontrastierender Stamm für Kartierungsexperimente mit dem Dahl-Stamm verwendet.

Stammdefinition

Die Genotypisierung und Zucht des konsomen Stammes SS-19^{SHR} erfolgte nach Standardmethoden^{9, 10, 22}. Daran anschliessend wurde der genetische Hintergrund analog zu Siegel et al. aller für die Stammdefinition benötigten Tiere mittels eines Panels aus 210 polymorphen Mikrosatelliten überprüft².

Phänotypisierung

Generell beinhalteten die Parentaltiergruppen mindestens 12 Tiere und die Gruppen mit konsomen Tieren mindestens 18 Tiere. Zur HSD-Gruppe gehörige Tiere wurden im Alter von 6 Wochen für jeweils 8 Wochen mit einer NaCl-reichen Spezialdiät (NaCl-Gehalt 4%, Ssniff, Spezialdiäten, 59480 Soest) gefüttert. In der 14. Woche erfolgte die systolische Blutdruckmessung mittels der nicht-invasiven Tail-cuff-Methode^{3, 23}. Dabei wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt, wobei die Daten computergestützt aufgezeichnet wurden. Die Messungen wurden an drei aufeinander folgenden Tagen unter Berücksichtigung zirkadianer Rhythmen nach gleichem Schema zur gleichen Tageszeit durchgeführt. Der Blutdruckwert wurde aus allen 9 Messungen gemittelt.

Anschliessend wurden die Tiere für einen Tag einzeln in Stoffwechselkäfige gesetzt. Aus dem 24-h-Urin wurden die Albuminkonzentration mittels eines direkten, kompetitiven ELISA und die Gesamtproteinkonzentration mittels der Bradford-Methode ermittelt^{8, 9}.

Zur Präparation wurden die Tiere mit intraperitonealer Injektion von Ketamin/Xylazin (87 mg/kg und 13 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Abdomen und Thorax wurden geöffnet und Blut aus der vena cava zur Gewinnung von Plasma gewonnen. Danach

wurden Herz, Nieren und ein Teil der Aorta entnommen. Linker und rechter Ventrikel des Herzens wurden präpariert und jeweils einzeln gewogen. Von der Aorta wurde vorsichtig das umgebende Gewebe und die Adventitia entfernt und anschließend Länge und Gewicht bestimmt. Vom linken Ventrikel wurde zentral ein 5 mm dicker Ring ausgeschnitten, 24h lang in Methacarn (60 % Methanol, 30 % Chloroform, 10 % Essigsäure) fixiert und anschließend in 80 % Ethanol gelagert. Die entnommenen Organe wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und danach bei -80 °C gelagert ²².

Histologie

Die Evaluierung der linksventrikulären (LV) interstitiellen (LVIF) und perivaskulären (LVPF) Fibrose wurde standardisiert mittels eines Färbeautomaten (Robot-Stainer HM 760) und computerunterstützter Bildauswertung durchgeführt ^{22, 24}. Die immunhistologische Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Quadri (MDC Berlin) durchgeführt. Sie erfolgte an Cryoschnitten von männlichen SS und SS-19^{SHR}-Tieren unter HSD mittels FITC-markierter Antikörper gegen Kollagen-I, Fibronectin und ED-1.

Triglyceride und Cholesterin

Alle Stoffwechselfparameter wurden nach Standardmethoden (Labor 28, Mecklenburgische Straße 28, 14197 Berlin) bestimmt. Zur Validierung der enzymatischen Methode der Cholesterin-Bestimmung wurde in Kooperation mit Herrn Professor Dr. Winkler der Universitätsklinik Freiburg eine Lipidgelelektrophorese einzelner Proben als Referenzmethode durchgeführt. Es zeigte sich, dass die mittels enzymatischer Reaktion gewonnenen Werte nur für das Gesamtcholesterin und HDL-Cholesterin übereinstimmten, während für LDL-Cholesterin mit dieser Methode keine korrekten Werte bestimmt werden konnten.

Statistik

Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Bei normalverteilten Daten wurde als statistischer Test die 3-faktorielle-Varianzanalyse für Stamm, Geschlecht und Diät mit post-hoc Bonferroni-Korrektur, bei fehlender Normalverteilung der Mann-Whitney-U Test durchgeführt (SPSS 13.0, SPSS Inc., USA). Eine multivariate Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Frau Professor Dr. Monika Stoll (Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung) durchgeführt.

Ergebnisse

Der SS-Stamm zeigte bei beiderlei Geschlecht einen signifikanten Blutdruckanstieg unter Salzbelastung ($p < 0,001$, Abbildung 1A). Die weiblichen Tiere hatten dabei unter beiden Diäten insgesamt niedrigere Blutdrücke als männliche Tiere ($p < 0,001$). Kontrastierend dazu konnten beim SHR-Stamm weder ein Blutdruckanstieg unter Salzbelastung noch signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern festgestellt werden. Der Transfer von RNO19 führte zu signifikant niedrigeren Blutdrücken auf SHR-Niveau in männlichen und weiblichen SS-19^{SHR}-Tieren unter HSD im Vergleich zum hypertensiven SS-Stamm ($p < 0,001$). Darüber hinaus zeigten männliche ($p = 0,010$) und weibliche ($p = 0,057$) SS-19^{SHR}-Tiere auch unter NSD niedrigere Blutdrücke als SS- und SHR-Parentaltiere. RNO19 hatte keinen Einfluss auf den sexuellen Dimorphismus und die Salz-Sensitivität des Dahl-Stammes, da der konsome Stamm dem SS-Stamm vergleichbare Muster zeigte.

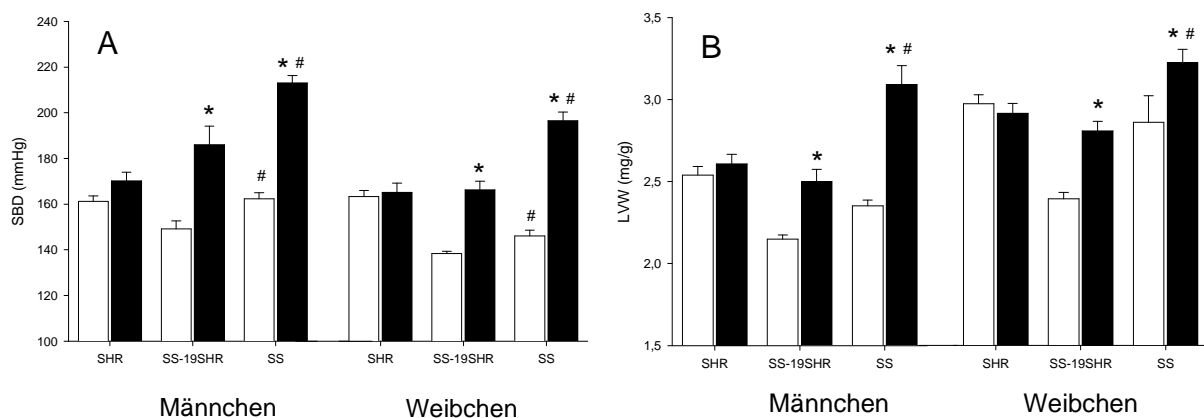


Abbildung 1; Systolischer Blutdruck (A) und relatives linksventrikuläres Gewicht (B)

Niedrig-Salz-Diät in weiss; Hoch-Salz-Diät in schwarz

*, $p < 0,05$ Hoch-Salz-Diät vs. Niedrig-Salz-Diät verglichen mit gleichem Stamm

#, $p < 0,05$ vs SS-19^{SHR}, verglichen mit gleicher Diätgruppe

Beim LVW (Abbildung 1B) ergaben sich dem SBD vergleichbare Ergebnisse. Der SHR-Stamm war analog zum SBD auch bezüglich der LVW-Zunahme resistent gegen die HSD. Ein sexueller Dimorphismus war in allen drei Stämmen vorhanden, wobei Weibchen generell höhere LVW zeigten. RNO19 aus dem SHR-Stamm führte zu signifikant niedrigerem LVW in konsomen Männchen und Weibchen unter HSD im Vergleich zum SS-Stamm ($p = 0,001$). SS-19^{SHR} unter Normaldiät zeigten die gleiche Tendenz. Vergleichbar zu den SBD-Ergebnissen hatte RNO19 keinen Einfluss auf die Salzsensitivität oder den sexuellen Dimorphismus des SS-Hintergrunds.

Der SS-19^{SHR}-Stamm wies eine signifikant niedrigere Albuminexkretion unter NSD im Vergleich zum SS-Stamm auf (Daten nicht gezeigt, siehe ²²). Unter HSD war kein signifikanter Unterschied mehr in der UAE zwischen dem konsomen und dem SS-

Stamm festzustellen. Weibliche SS- als auch SS-19^{SHR}-Tiere schieden insgesamt signifikant weniger Albumin im Vergleich zu männlichen Tiere aus. Alle SHR-Tiere zeigten nur physiologische Mengen an Albumin im Urin.

LVIF als auch LVPF stieg bei SS-Tieren unter HSD signifikant an ($p < 0,01$). Generell zeigte sich kein Unterschied der drei Stämme unter NSD. RNO19 führte zu signifikant niedrigerer Ausprägung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose in männlichen SS-19^{SHR} unter HSD im Vergleich zum SS-Stamm (jeweils $p < 0,05$). Ein sexueller Dimorphismus war bei keiner Gruppe zu beobachten.

Die Cholesterinkonzentrationen im Plasma von SS-Tieren waren im Vergleich zu SHR und SS-19^{SHR} bei beiden Geschlechtern jeweils signifikant erhöht ($p < 0,01$, Abbildung 2A). Auch zeigte sich ein deutlicher sexueller Dimorphismus sowohl beim SS- als auch

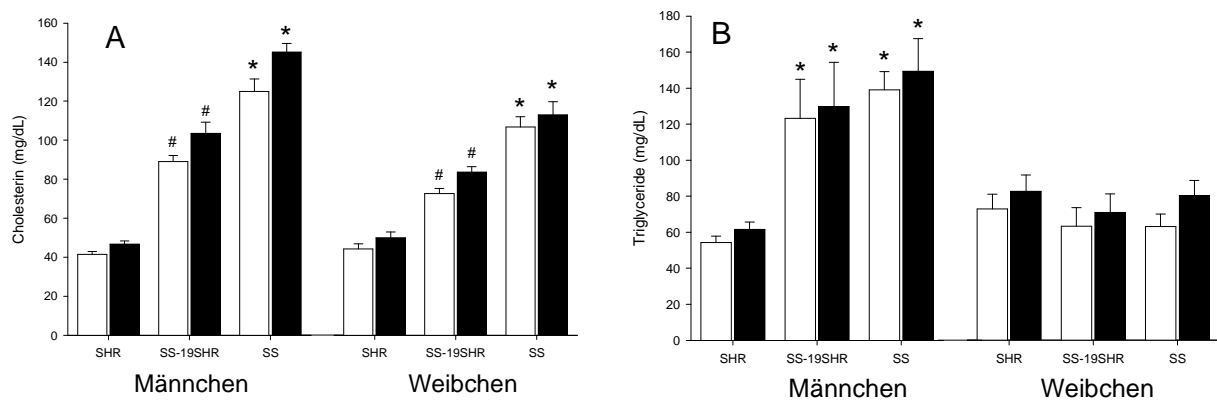


Abbildung 2, Cholesterin- (A) und Triglyceridspiegel (B) im Plasma

*, $p < 0,05$ vs. SHR

#, $p < 0,05$ vs. SHR und SS

beim SS-19^{SHR}-Stamm. HSD führte bei keinem Stamm zu einer Veränderung des Plasma-Cholesterin-Spiegels. Der Transfer von RNO19 bewirkte eine signifikante Absenkung der Cholesterinkonzentration bei männlichen und weiblichen SS-19^{SHR} ($p < 0,05$), diese blieb jedoch signifikant über SHR-Niveau ($p < 0,05$). Die Triglyceridspiegel waren bei männlichen Tieren analog zur Cholesterinkonzentration im SS-Stamm im Vergleich zu SHR-Ratten signifikant erhöht ($p < 0,05$) (Abbildung 2B). Dabei zeigte sich ein ausgeprägter sexueller Dimorphismus, da alle weiblichen Ratten vergleichbar niedrige Triglyceridspiegel aufwiesen. Darüber hinaus zeigte sich kein Einfluss der Hochsalzdiät auf die Triglyceride. Der Transfer von RNO19 bewirkte jedoch keine Absenkung der Triglyceride im Vergleich zum SS-Stamm.

Die Färbung mittels FITC-markierter Antikörper (Abbildung 3) gegen Kollagen-I zeigte sowohl bei hochsalz-gefütterten SS- als auch bei SS-19^{SHR}-Männchen große Mengen an Kollagen im LV. Die größten Anlagerungen befanden sich dabei um die Gefäße, wobei aber SS-19^{SHR} deutlich weniger Kollagen aufwies als der SS-Stamm. Die

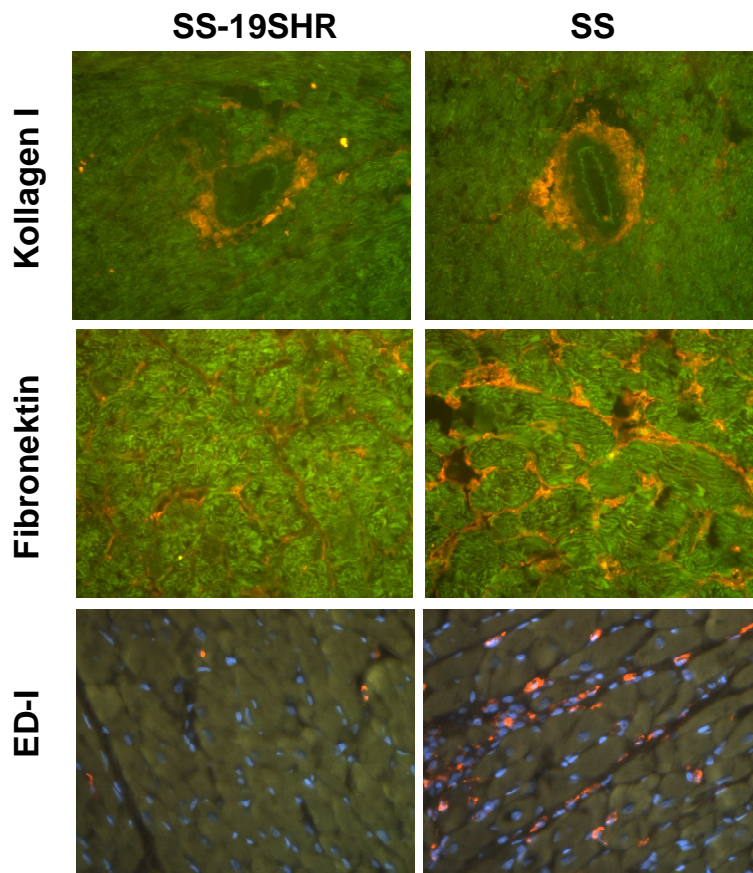


Abbildung 3; Färbung des linken Ventrikel hochsalz-gefütterter Männchen mittels FITC-markierter Antikörper gegen Kollagen-I, Fibronektin und ED-1

Fibronektinfärbung zeigte analog zum Kollagen-I eindeutig weniger Fibronektin beim konsomen SS-19^{SHR}-Stamm, wobei aber im Gegensatz zum Kollagen-I der gesamte LV gleichmässig durchzogen war. Die Makrophageninfiltration konnte mittels ED-1 positiver Zellen abgeschätzt werden. Der LV von HSD-gefütterten SS-Männchen wurde im Vergleich zu SS-19^{SHR} von signifikant mehr Makrophagen infiltriert (99 ± 21 vs. 22 ± 4 Zellen/Sichtfeld; $p < 0,05$).

Diskussion

Diese Studie wurde initiiert aufgrund der früheren Kartierungsstudien in zwei experimentellen Kreuzungen zwischen den hypertensiven SHR- und SS-Ratten, welche darauf hindeuteten, dass ein QTL auf Chromosom 19 im Zusammenhang mit der Entwicklung kardiovaskulärer Hypertrophie, sowie Albuminurie und Proteinurie in Verbindung steht¹⁻³.

Der wichtigste Befund dieser Studie ist der signifikant niedrigere Blutdruck im konsomen Stamm im Vergleich zum SS-Stamm sowohl unter Niedrig- als auch Hochsalzdiät. Dies zeigt zum ersten Mal einen Blutdruck-QTL auf RNO19, der den spontanen Bluthochdruck des SS-Stammes unter NSD erklären kann^{1, 19}.

Blutdruck-Loci auf Chromosom 19 konnten bereits in früheren Kopplungsanalysen zwischen SHR und den normotensiven Wistar-Kyoto (WKY)²⁵ oder Brown Norway (BN)^{26, 27} Referenzstämmen identifiziert werden, jedoch zeigte sich hier das SHR-Allel als blutdrucksteigernd. Dagegen erwies sich das SHR-Allel in dieser Studie in einem vergleichbaren hypertensiven Hintergrund des SS-Stammes¹ als blutdrucksenkend.

Dies betont die Nützlichkeit konsome Stämme zu züchten um QTL zu identifizieren, die in Kopplungsanalysen nicht detektiert werden können²⁸⁻³⁰. Auch Kopplungsanalysen, die annähernd gleiche Stämme und einen vergleichbaren Versuchsansatz verwendeten, konnten keinen Blutdruck-QTL auf Chromosom 19 entdecken^{31, 32}. Eine mögliche Erklärung der fehlenden Kopplung ist eine Interaktion mit anderen QTL im heterogenen Hintergrund der F2- oder Rückkreuzungs-Tiere.

Der starke Einfluss des Blutdrucks zeigt sich aber auch in Korrelationsanalysen aller Phänotypen. So fanden sich hochsignifikante Korrelationen des SBP mit dem LVW ($r = 0,4$; $p < 0,001$), der ANP-mRNA-Gewebsexpression ($r = 0,60$; $p = 0,0039$) und der relativen Nierengewichte ($r = 0,86$; $p = 0,0004$) (Ergebnisse nicht dargestellt).

Analog zum Blutdruck wies auch das LVW gravierende Unterschiede zwischen SS-Parentaltierstamm und SS-19^{SHR} auf. Es zeigten sich die gleichen Verhältnisse wie beim SBD, nur muss als einziger Unterschied aufgeführt werden, dass alle Stämme inklusive des SHR-Stammes geschlechtsspezifische Unterschiede zeigten ($p < 0,01$).

Die Cholesterinwerte im Plasma des SS-Stammes waren etwa doppelt so hoch wie die des gleichbehandelten SHR-Stammes. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren in der Literatur beschriebenen Studien³³. Darüber hinaus zeigte sich ein signifikanter sexueller Dimorphismus im SS-Stamm, wobei Weibchen generell niedrigere Werte aufwiesen. Dieser Dimorphismus blieb im konsomen Stamm weiterhin erhalten. Analog konnten Mosher et al. in der Framingham Heart Population zeigen, dass Cholesterin-QTL generell durch das Geschlecht in der Ausprägung modifiziert werden³⁴. Dementsprechend manifestierte sich auch beim Triglyceridspiegel ein starker sexueller Dimorphismus beim SS-Stamm, der durch das Einkreuzen von Chromosom 19 nicht verändert wurde.

Garret et al., die analog zu dieser Arbeit Chromosom 2 aus dem SHR in den SS-Stamm transferierten konnten bei dem neuen konsomen Stamm SS-2^{SHR} zwar Einfluss auf den SBD und den daraus resultierenden Endorganschäden, jedoch nicht auf den Cholesterin- oder Triglyceridspiegel feststellen³⁵. Die Senkung des Cholesterinspiegels in SS-19^{SHR} ist daher keine unspezifische Reaktion auf die Senkung des SBD per se. Die in dieser Arbeit präsentierten Befunde weisen vielmehr auf die Existenz eines oder mehrerer Gene auf RNO19 hin, welche an der Regulation dieses Phänotyps beteiligt sind.

Bei der histologischen Auswertung des LV aller Gruppen konnten wir keine Anzeichen einer beginnenden Arteriosklerose, wie sie beim Menschen entstehen kann, entdecken³⁶. Mäuse und Ratten benötigen jedoch extreme Modifikationen ihrer Diät,

damit sie überhaupt eine dem Menschen ähnliche Pathophysiologie entwickeln³⁷. So zeigten erst transgene Rattenlinien, die eine Cholesterinkonzentration von über 600 mg/dL im Plasma entwickeln, eine beginnende Arteriosklerose³⁸.

Fibrose

Analog zum SBD wurden auch bei der LVIF und PVF die höchsten Werte bei HSD-gefütterten Dahl-Männchen beobachtet. Die Einkreuzung von RNO19 führte zu signifikant niedrigeren Fibrose-Werten im konsomen SS-19^{SHR}-Stamm.

Eine statistische Analyse aller Tiere konnte jedoch keine signifikante Korrelation der Fibrose mit dem SBD oder der LVW finden. Allerdings zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation der Fibrosewerte zum Cholesterinspiegel (LVIF zu Cholesterin, $r = 0,464$; $p < 0,001$; LVPF zu Cholesterin, $r = 0,401$, $p < 0,0001$). In einer multivariaten Regressionsanalyse, welche den SBD und das LVW als wichtige Kovariablen mit einschloss, konnte der Cholesterinspiegel 25% ($p = 0,0001$) und 20% ($p = 0,0006$) der Variabilität der perivaskulären und interstitiellen Fibrose erklären³⁹. Der systolische Blutdruck dagegen zeigte nur einen unbedeutenden Effekt auf die perivaskuläre ($p = 0,037$) sowie die LVW auf die interstitielle Fibrose ($p = 0,044$).

Yaoita et al. konnten in einem Myokardinfarkt-Modell zeigen, dass eine mit Cholesterin angereicherte Diät (HCD) zu einer verstärkten Fibrosierung des LV führt⁴⁰. Dabei konnte im LV der HCD-gefütterten Tiere eine erhöhte Makrophageninfiltration nachgewiesen werden. Analog konnte eine signifikant erhöhte Anzahl ED-1 positiver Zellen im LV der SS-Männchen im Vergleich zum konsomen SS-19^{SHR} beobachtet werden. Frühere Studien an Dahl-Ratten zeigten, dass endotheliale Dysfunktion⁴¹ und oxidativer Stress⁴² wichtige Pathomechanismen in der Makrophageninfiltration und nachfolgenden Entwicklung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose sind. Die Anzahl ED-1 positiver Makrophagen korrelierte mit beiden Fibroseparametern sowie der Cholesterinkonzentration, jedoch weder mit dem SBD noch mit dem LVW. Dies betont die Relevanz der Cholesterinkonzentration für die Entstehung einer Herzfibrose in diesem Tiermodell und den Einfluss der Makrophagen auf den Phänotyp. Während der SBD generell eine wichtige Einflussgröße für die Entwicklung einer Herzfibrose ist⁴³, tritt er wahrscheinlich in dieser Studie in den Hintergrund, da alle Tiere einen SBD von über 160 mmHg aufwiesen. Dadurch können andere, synergistisch wirkende Faktoren an Bedeutung gewinnen und den Phänotyp entscheidend beeinflussen.

Diese Ergebnisse sind somit auch klinisch interessant, da gezeigt werden konnte, dass die Inflammation ein wichtiger Schritt in der Transition von einer kompensierten

Herzhypertrophie zu einem dekompensierten Herzversagen ist ^{44, 45}. In anderen Zusammenhängen konnte Cholesterin als "Verstärker" proinflammatorischer Stimuli identifiziert werden ⁴⁶. Auch in Studien an Menschen mit koronarer Herzkrankheit bewirkte ein pharmakologisches Senken des Cholesterinspiegels mit Statinen eine signifikant gesenkte Gesamtmortalität ^{47, 48}.

Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Chromosom 19 entgegen der vorher durchgeführten Kopplungsanalyse einen signifikanten Einfluss auf den Blutdruck besitzt. Ebenso führte die Einkreuzung von Chromosom 19 zu verringerter Herzhypertrophie und stark verminderter Fibrosebildung in den konsomen Tieren. Zusätzlich verringerte das SHR-Chromosom den Cholesterinspiegel der SS-Ratten auf ein Mittelmaß zwischen beiden Parentaltierstämmen. Durch eine Korrelationsanalyse konnte eine signifikante Beziehung zwischen den Cholesterinwerten und der Fibrosierung des linken Ventrikel entdeckt werden. Weitergehende histologische Untersuchungen des linken Ventrikels wiesen eine erhöhte Anzahl von ED-1 positiven Zellen im linken Ventrikel von SS-Ratten im Vergleich zum konsomen Stamm nach. Wir interpretieren die Ergebnisse so, dass im Zusammenspiel mit Bluthochdruck ein erhöhter Cholesterinspiegel wahrscheinlich pro-inflammatorisch wirkt und über eine Makrophageninfiltration konsekutiv zu gesteigerter Fibrosebildung führt.

Somit konnte gezeigt werden, dass Chromosom 19 Faktoren beinhaltet, welche sowohl blutdrucksenkend als auch kardioprotektiv wirken. Darüber hinaus konnte über die Senkung des Cholesterinspiegels durch Transfer von RNO19 eine Verbindung zu inflammatorischen Prozessen und Fibrosierung des linken Ventrikels nachgewiesen werden. Weitergehende pharmakologische Interventionsstudien könnten tiefere Einblicke in diesen Zusammenhang geben.

Referenzen

- (1) Poyan Mehr A, Siegel AK, Kossmehl P, Schulz A, Plehm R, de Zeeuw D *et al.* Early onset albuminuria in Dahl rats is a polygenetic trait that is independent from salt loading. *Physiol Genomics* 2003;**143**:209-216.
- (2) Siegel AK, Kossmehl P, Planert M, Schulz A, Wehland M, Stoll M *et al.* 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;**182**:218-225.
- (3) Siegel AK, Planert M, Rademacher S, Mehr AP, Kossmehl P, Wehland M *et al.* Genetic Loci Contribute to the Progression of Vascular and Cardiac Hypertrophy in Salt-Sensitive Spontaneous Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;**237**:1211-1217.
- (4) Sega R, Corrao G, Bombelli M, Beltrame L, Facchetti R, Grassi G *et al.* Blood Pressure Variability and Organ Damage in a General Population: Results from the PAMELA Study. *Hypertension* 2002;**392**:710-714.
- (5) Orth SR, Ritz E. The Nephrotic Syndrome. *N Engl J Med* 1998;**33817**:1202-1211.
- (6) Rubattu S, Volpe M, Kreutz R, Ganten U, Ganten D, Lindpaintner K. Chromosomal mapping of quantitative trait loci contributing to stroke in a rat model of complex human disease. *Nat Genet* 1996;**134**:429-434.
- (7) Schulz A, Schlesener M, Weiss J, Hansch J, Wendt N, Kossmehl P *et al.* Protective effect of female gender on the development of albuminuria in a polygenetic rat model is enhanced further by replacement of a major autosomal QTL. *Clin Sci (Lond)* 2008;**1144**:305-311.
- (8) Schulz A, Standke D, Kovacevic L, Mostler M, Kossmehl P, Stoll M *et al.* A Major Gene Locus Links Early Onset Albuminuria with Renal Interstitial Fibrosis in the MWF Rat with Polygenetic Albuminuria. *J Am Soc Nephrol* 2003;**1412**:3081-3089.
- (9) Schulz A, Litfin A, Kossmehl P, Kreutz R. Genetic Dissection of Increased Urinary Albumin Excretion in the Munich Wistar Fromter Rat. *J Am Soc Nephrol* 2002;**1311**:2706-2714.
- (10) Schulz A, Weiss J, Schlesener M, Hansch J, Wehland M, Wendt N *et al.* Development of Overt Proteinuria in the Munich Wistar Fromter Rat Is Suppressed by Replacement of Chromosome 6 in a Consomic Rat Strain. *J Am Soc Nephrol* 2007;**181**:113-121.
- (11) Schulz A, Hansch J, Kuhn K, Schlesener M, Kossmehl P, Nyengaard JR *et al.* Nephron deficit is not required for progressive proteinuria development in the Munich Wistar Fromter rat. *Physiol Genomics* 2008;**351**:30-35.
- (12) Rapp JP. Genetic Analysis of Inherited Hypertension in the Rat. *Physiol Rev* 2000;**801**:135-172.

- (13) Thompson C, Lucier GW. Hepatic estrogen responsiveness. Possible mechanisms for sexual dimorphism. *Mol Pharmacol* 1983;**241**:69-76.
- (14) Gong G, Dobin A, Johnson ML, Pettinger WA. Sexual dimorphism of renal alpha2-adrenergic receptor regulation in Dahl rats. *Hypertens Res* 1996;**192**:83-89.
- (15) DAHL LK, HEINE M, TASSINARI L. Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion. *Nature* 1962;**194**:480-482.
- (16) Kotchen TA, Zhang HY, Covelli M, Blehschmidt N. Insulin resistance and blood pressure in Dahl rats and in one-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1991;**2616**:E692-E697.
- (17) Ogihara T, Asano T, Ando K, Sakoda H, Anai M, Shojima N *et al.* High-Salt Diet Enhances Insulin Signaling and Induces Insulin Resistance in Dahl Salt-Sensitive Rats. *Hypertension* 2002;**401**:83-89.
- (18) Herrera VM, Didishvili T, Lopez LV, Zander K, Traverse S, Gantz D *et al.* Hypertension exacerbates coronary artery disease in transgenic hyperlipidemic Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Mol Med* 2001;**712**:831-844.
- (19) Kurtz TW, Morris RC. Hypertension in the recently weaned Dahl salt-sensitive rat despite a diet deficient in sodium chloride. 1985;**230**.
- (20) Sterzel RB, Luft FC, Gao Y, Schnermann J, Briggs JP, Ganten D *et al.* Renal disease and the development of hypertension in salt-sensitive Dahl rats. *Kidney Int* 1988;**336**:1119-1129.
- (21) Okamoto K, AOKI K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963;**27**:282-293.
- (22) Wendt N, Schulz A, Siegel AK, Weiss J, Wehland M, Sietmann A *et al.* Rat chromosome 19 transfer from SHR ameliorates hypertension, salt-sensitivity, cardiovascular and renal organ damage in salt-sensitive Dahl rats. *J Hypertens* 2007;**251**:95-102.
- (23) Kreutz R, Kovacevic L, Schulz A, Rothermund L, Ketteler M, Paul M. Effect of high NaCl diet on spontaneous hypertension in a genetic rat model with reduced nephron number. *J Hypertens* 2000;**186**:777-782.
- (24) Rothermund L, Vetter R, Dieterich M, Kossmehl P, Gogebakan O, Yagil C *et al.* Endothelin-A Receptor Blockade Prevents Left Ventricular Hypertrophy and Dysfunction in Salt-Sensitive Experimental Hypertension. *Circulation* 2002;**10618**:2305-2308.
- (25) Lodwick D, Kaiser MA, Harris J, Cumin F, Vincent M, Samani NJ. Analysis of the Role of Angiotensinogen in Spontaneous Hypertension. *Hypertension* 1995;**256**:1245-1251.
- (26) Lezin E, Zhang L, Yang Y, Wang JM, Wang N, Qi N *et al.* Effect of Chromosome 19 Transfer on Blood Pressure in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Hypertension* 1999;**331**:256-260.

- (27) Pravenec M, Gauguier D, Schott JJ, Buard J, Kren V, Bila V *et al.* Mapping of Quantitative Trait Loci for Blood-Pressure and Cardiac Mass in the Rat by Genome Scanning of Recombinant Inbred Strains. *J Clin Invest* 1995;**964**:1973-1978.
- (28) Nadeau JH, Singer JB, Matin A, Lander ES. Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. *Nat Genet* 2000;**243**:221-225.
- (29) Matin A, Collin GB, Asada Y, Varnum D, Nadeau JH. Susceptibility to testicular germ-cell tumours in a 129.MOLF-Chr 19 chromosome substitution strain. *Nat Genet* 1999;**232**:237-240.
- (30) Cowley AW, Jr., Roman RJ, Kaldunski ML, Dumas P, Dickhout JG, Greene AS *et al.* Brown Norway chromosome 13 confers protection from high salt to consomic Dahl S rat. *Hypertension* 2001;**372 Part 2**:456-461.
- (31) Garrett MR, Saad Y, Dene H, Rapp JP. Blood pressure QTL that differentiate Dahl salt-sensitive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol Genomics* 2000;**31**:33-38.
- (32) Garrett MR, Joe B, Yerga-Woolwine S. Genetic linkage of urinary albumin excretion in Dahl salt-sensitive rats: influence of dietary salt and confirmation using congenic strains. *Physiol Genomics* 2006;**251**:39-49.
- (33) Herrera VLM, Didishvili T, Lopez LV, Myers RH, Ruiz-Opazo N. Genome-Wide Scan Identifies Novel QTLs for Cholesterol and LDL Levels in F2[Dahl RxS]-Intercross Rats. *Circ Res* 2004;**944**:446-452.
- (34) Mosher MJ, Martin LJ, Cupples LA, Yang Q, Dyer TD, Williams JT *et al.* Genotype-by-sex interaction in the regulation of high-density lipoprotein: the Framingham Heart Study. *Hum Biol* 2005;**776**:773-793.
- (35) Garrett MR, Gunning WT, Radecki T, Richard A. Dissection of a genetic locus influencing renal function in the rat and its concordance with kidney disease loci on human chromosome 1q21. *Physiol Genomics* 2007;**303**:322-334.
- (36) Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, Haghfelt T, Faergeman O, Faergeman G *et al.* Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). 1994. *Atheroscler Suppl* 2004;**53**:81-87.
- (37) Guyard-Dangremont V, Desrumaux C, Gambert P, Lallemant C, Lagrost L. Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate species. Relation to atherogenesis susceptibility. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1998;**1203**:517-525.
- (38) Herrera VLM, Makrides SC, Xie HX, Adari H, Krauss RM, Ryan US *et al.* Spontaneous combined hyperlipidemia, coronary heart disease and decreased survival in Dahl salt-sensitive hypertensive rats transgenic for human cholesteryl ester transfer protein. *Nat Med* 1999;**512**:1383-1389.
- (39) Wendt N, Schulz A, Qadri F, Bolbrinker J, Kossmehl P, Winkler K *et al.* Genetic analysis of salt-sensitive hypertension in Dahl rats reveals a link between cardiac fibrosis and high cholesterol. *Cardiovasc Res* 2008;cvn263.

- (40) Yaoita H, Yoshinari K, Maehara K, Sando M, Watanabe K, Maruyama Y. Different Effects of a High-Cholesterol Diet on Ischemic Cardiac Dysfunction and Remodeling Induced by Coronary Stenosis and Coronary Occlusion. *J Am Coll Cardiol* 2005;**45**:2078-2087.
- (41) Barton M, d'Uscio LV, Shaw S, Meyer P, Moreau P, Luscher TF. ET(A) receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 1998;**31**:499-504.
- (42) Tian N, Moore RS, Braddy S, Rose RA, Gu JW, Hughson MD *et al.* Interactions between oxidative stress and inflammation in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**293**:H3388-H3395.
- (43) Seccia TM, Belloni AS, Kreutz R, Paul M, Nussdorfer GG, Pessina AC *et al.* Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II. *J Am Coll Cardiol* 2003;**41**:666-673.
- (44) Kong SW, Bodyak N, Yue P, Liu Z, Brown J, Izumo S *et al.* Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Physiol Genomics* 2005;**21**:34-42.
- (45) Ueno S, Ohki R, Hashimoto T, Takizawa T, Takeuchi K, Yamashita Y *et al.* DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003;**307**:771-777.
- (46) Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T *et al.* Local Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 at Vessel Wall Induces Infiltration of Macrophages and Formation of Atherosclerotic Lesion: Synergism With Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**:115-120.
- (47) Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, Macfarlane PW *et al.* Prevention of Coronary Heart Disease with Pravastatin in Men with Hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1995;**333**:1301-1308.
- (48) The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of Cardiovascular Events and Death with Pravastatin in Patients with Coronary Heart Disease and a Broad Range of Initial Cholesterol Levels. *N Engl J Med* 1998;**339**:1349-1357.

Anteilserklärung

Publikation 1: Rat chromosome 19 transfer from SHR ameliorates hypertension, salt-sensitivity, cardiovascular and renal organ damage in salt-sensitive Dahl rats, Wendt N, Schulz A, Siegel AK, Weiss J, Wehland M, Sietmann A, Kossmehl P, Grimm D, Stoll M, Kreutz R.

60 Prozent; Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen (Phänotypisierung) siehe Methodenteil, Datenauswertung, Literaturstudium und Erstellung des Manuskripts

Publikation 2: Genetic analysis of salt-sensitive hypertension in Dahl rats reveals a link between cardiac fibrosis and high cholesterol, Wendt N, Schulz A, Qadri F, Bolbrinker J, Kossmehl P, Winkler K, Stoll M, Vetter R, Kreutz R.

70 Prozent; Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen (Phänotypisierung) siehe Methodenteil, Datenauswertung, Literaturstudium und Erstellung des Manuskripts

Publikation 3: Development of overt proteinuria in the Munich Wistar Fromter Rat is suppressed by replacement of chromosome 6 in a consomic rat strain. Schulz A, Weiss J, Schlesener M, Hansch J, Wehland M, Wendt N, Kossmehl P, Sietmann A, Grimm D, Stoll M, Nyengaard JR, Kreutz R.

20 Prozent; Teil der Phänotypisierung (Blutdruckmessung, Stoffwechselläufiguntersuchungen u.a.); Vorbereitung der histologischen Untersuchungen

Publikation 4: Nephron deficit is not required for progressive proteinuria development in the Munich Wistar Fromter rat. Schulz A, Hansch J, Kuhn K, Schlesener M, Kossmehl P, Nyengaard JR, Wendt N, Huber M, Kreutz R.

15 Prozent; Teil der Phänotypisierung (Blutdruckmessung, Stoffwechselläufiguntersuchungen u.a.); Vorbereitung der histologischen Untersuchungen

Publikation 5: Protective effect of female gender on the development of albuminuria in a polygenetic rat model is enhanced further by replacement of a major autosomal QTL, Schulz A, Schlesener M, Weiss J, Hansch J, Wendt N, Kossmehl P, Grimm D, Vetter R, Kreutz R.

20 Prozent, Teil der Phänotypisierung (Blutdruckmessung, Stoffwechselläufiguntersuchungen u.a.); Vorbereitung der histologischen Untersuchungen

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Klose J, Wendt N, Kubald S, Krause E, Fechner K, Beyermann M et al. Hexa-histidin tag position influences disulfide structure but not binding behavior of in vitro folded N-terminal domain of rat corticotropin-releasing factor receptor type 2a. *Protein Sci* 2004;139:2470-2475.

Klose J, Fechner K, Beyermann M, Krause E, Wendt N, Bienert M et al. Impact of N-terminal domains for corticotropin-releasing factor (CRF) receptor-ligand interactions. *Biochemistry* 2005;445:1614-1623.

Schulz A, Weiss J, Schlesener M, Hansch J, Wehland M, Wendt N et al. Development of Overt Proteinuria in the Munich Wistar Fromter Rat Is Suppressed by Replacement of Chromosome 6 in a Consomic Rat Strain. *J Am Soc Nephrol* 2007;181:113-121.

Wendt N, Schulz A, Siegel AK, Weiss J, Wehland M, Sietmann A et al. Rat chromosome 19 transfer from SHR ameliorates hypertension, salt-sensitivity, cardiovascular and renal organ damage in salt-sensitive Dahl rats. *J Hypertens* 2007;251:95-102.

Wendt N, Schulz A, Qadri F, Bolbrinker J, Kossmehl P, Winkler K et al. Genetic analysis of salt-sensitive hypertension in Dahl rats reveals a link between cardiac fibrosis and high cholesterol. *Cardiovasc Res* 2008;cvn263.

Schulz A, Hansch J, Kuhn K, Schlesener M, Kossmehl P, Nyengaard JR et al. Nephron deficit is not required for progressive proteinuria development in the Munich Wistar Fromter rat. *Physiol Genomics* 2008;351:30-35.

Schulz A, Schlesener M, Weiss J, Hansch J, Wendt N, Kossmehl P et al. Protective effect of female gender on the development of albuminuria in a polygenetic rat model is enhanced further by replacement of a major autosomal QTL. *Clin Sci (Lond)* 2008;1144:305-311.

Erklärung

„Ich, Norbert Wendt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Genetik hypertensiver Endorganschäden bei konsomen Rattenmodellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem wissenschaftlichen Betreuer und Doktorvater Professor Dr. Reinhold Kreutz für die freundliche Überlassung des Themas, seine intensive Betreuung, Hilfsbereitschaft und Geduld bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Angela Schulz und Herrn Dr. Wehland von Trebra für die wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.