

## 1. Einleitung

### 1.1. Hypertonie ist weltweit eine bedeutende Krankheit

Große epidemiologische Studien der letzten 50 Jahre haben zweifelsfrei bewiesen, dass die unbehandelte arterielle Hypertonie einen Risikofaktor erster Ordnung für das Auftreten verschiedener kardiovaskulärer und verwandter Erkrankungen darstellt (Kjeldsen et al. 2001, Lewington et al. 2002). Hierzu gehören die koronare Herzkrankheit, zerebrovaskuläre und periphere Gefäßerkrankungen sowie entsprechende Endorganschäden mit Herz- und Nierenversagen durch kardiale Hypertrophien beziehungsweise Nephrosklerose, aber auch Retinopathien.

Nach Einschätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist ein erhöhter Blutdruck verantwortlich für jährlich 7,1 Millionen Tote oder 13 % der Mortalität weltweit; die steigende Tendenz bei der Prävalenz betrifft bei weitem nicht mehr nur die Industrienationen (World Health Report, 2003). Die WHO misst die Bedeutung verschiedener Krankheiten für die Gesellschaft mit der Einheit DALY (*disability-adjusted life years*), die nicht nur die Mortalität, sondern auch die Beeinträchtigung des normalen beschwerdefreien Lebens durch eine Krankheit mit einbezieht. Obwohl die arterielle Hypertonie häufig erst im fortgeschrittenen Alter auftritt, hat sie einen substantziellen Anteil von über 64 Millionen DALYs oder immerhin 4 % der weltweiten Belastung durch Krankheiten (World Health Report, 2003).

Höhere arterielle Blutdruckwerte sind mit einem größeren kardiovaskulären Risiko assoziiert (Chobanian et al. 2003). Daher ist bereits eine allgemeine Definition der arteriellen Hypertonie (im weiteren nur noch als Hypertonie bezeichnet) und ihre Klassifikation durchaus problematisch. Schon eine über 30 Jahre alte Definition deutet an, dass hierbei der individuelle (soziale und genetische) Hintergrund des Patienten zu berücksichtigen ist: *Hypertension should be defined in terms of a blood pressure level above which investigation and treatment do more good than harm.* („Hypertonus sollte definiert werden als ein Grenzblutdruckwert, ab dessen Übersteigen seine Untersuchung und Behandlung mehr Nutzen als Schaden bringt.“) (Evans und Rose 1971).

Die Festlegung des Wertes, ab wann Blutdruck als erhöht einzustufen ist, gestaltet sich außerordentlich schwierig. In den aktuellen internationalen Leitlinien Europas (Guidelines Committee European Society of Hypertension 2003) und des JNC VII in den USA (Chobanian et al. 2003)

wird bei erwachsenen Menschen ein systolischer Blutdruck von unter 120 mmHg und ein diastolischer von unter 90 bzw. 80 mmHg als optimal angesehen. Als arterielle Hypertonie wird je nach individuellem Risikoprofil ein Blutdruck definiert, der systolisch 140 mmHg oder diastolisch 90 mmHg übersteigt. Hierzwischen liegende Werte sind individuell abhängig vom kardiovaskulären Risikoprofil als normal oder als Prähypertonie erhöht einzustufen und gegebenenfalls zu behandeln.

Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen primärer (essentieller) und sekundärer Hypertonie. Als sekundäre Hypertonie bezeichnet man alle Hypertonieformen, denen eine bekannte anatomische Abnormität oder endokrine Störung zugrunde liegen und bei denen daher der Blutdruck durch ein kausales, gezieltes und rechtzeitiges therapeutisches Eingreifen normalisiert werden kann. Eine sekundäre Hypertonie liegt jedoch nur in 5 - 10 % aller Fälle vor (Ganten und Ritz 1985, Kaplan 1998). Klinisch ist ihr Ausschluss ein wichtiges Konzept bei der Diagnostik von Patienten mit erhöhtem Blutdruck.

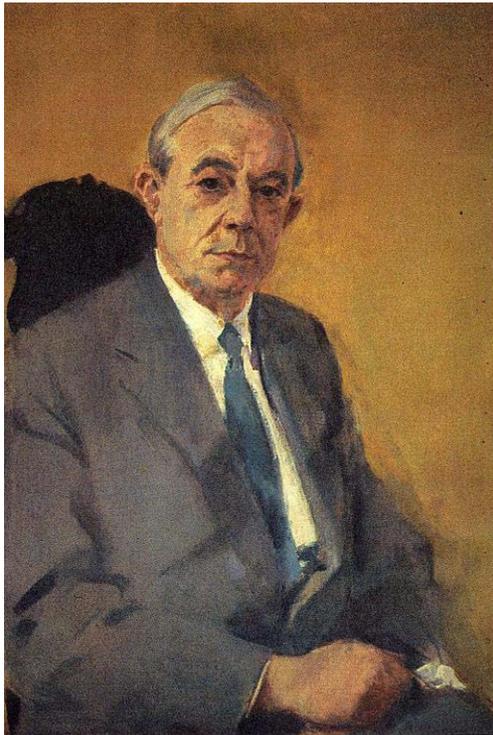
Als primär versteht man demgegenüber diejenigen Formen der Hypertonie, deren zugrunde liegender Pathomechanismus (noch) nicht diagnostiziert werden kann und die daher einer nur symptomatischen Behandlung zugänglich sind. Diese unter primärer arterieller Hypertonie zusammengefassten Formen machen 90 - 95 % aller Fälle aus (Ganten und Ritz 1985, Kaplan 1998).

## **1.2. Bluthochdruck wird als quantitative Eigenschaft vererbt**

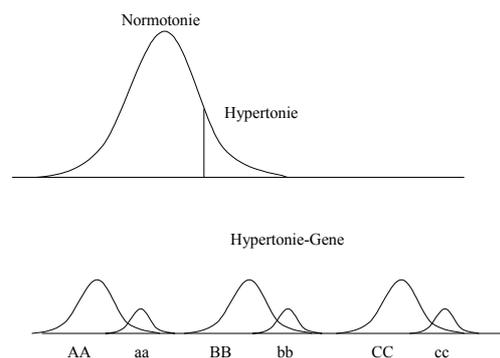
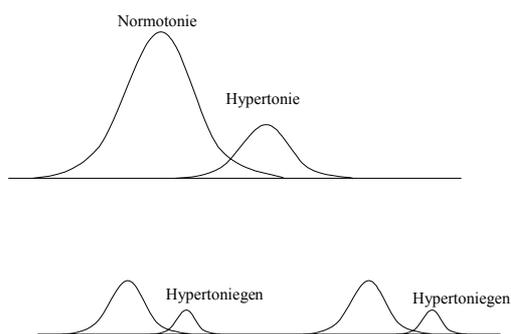
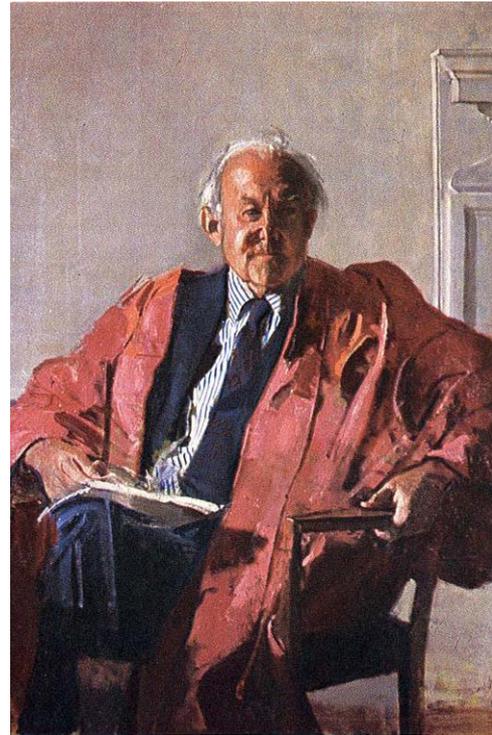
Der Begriff des komplexen oder quantitativen Merkmals (*quantitative trait*) bezieht sich auf alle Phänotypen, die nicht den klassischen Mendelschen Vererbungsgang aufweisen. *Quantitative Traits* sind Phänotypeneigenschaften, deren Werte eine kontinuierliche Verteilung zeigen. Diese natürliche Variation, welche bei allen Eukaryoten vorkommt, wird durch ein Zusammenspiel von sowohl genetischen Faktoren als auch Umwelteinflüssen verursacht. Die chromosomalen Regionen oder Orte (*Loci*), die einen *Quantitative Trait* regulieren, bezeichnet man folglich als *Quantitative Trait Loci*, kurz QTL. Sie werden wie Mendelsche Eigenschaften vererbt.

Die Bedeutung des Blutdrucks als quantitatives Merkmal ist schon länger bekannt, wenn auch nicht unumstritten. So hatte schon Weitz beobachtet, dass Geschwister von Hypertoniepatienten vermehrt an Hochdruck litten (Weitz 1923). Ihren Höhepunkt fand die Frage um die Vererbung

**Lord Robert Platt (1900 – 1978)**



**Sir George Pickering (1904 – 1982)**



**Abbildung 2: Die historische Debatte zwischen Lord Robert Platt und Sir George Pickering.** In der Auseinandersetzung um die genetischen Grundlagen der Hypertonie vertrat Platt die Auffassung, dem Blutdruck läge eine diskontinuierliche Verteilung zugrunde; größere Hypertoniegene würden als Mendelsche Eigenschaften vererbt. Pickering hingegen argumentierte, die Hypertonie befände sich am oberen Ende einer Normalverteilung des Blutdrucks; eine ganze Reihe an Genen übe einen kleinen Effekt auf einen intermediären Phänotypen aus, der – wenn er eine willkürlich festgelegte Grenze überschreite – schließlich zur Hypertonie führe. (Kurven mod. nach Weder, 1997.) Die Portraits stammen von der Manchester Health Authority bzw. aus dem Pembroke College Oxford, GB.

der humanen essentiellen Hypertonie und dessen Modus in einer Auseinandersetzung zweier prominenter englischer Internisten: Sir George Pickering vertrat seit Ende der 1940-er Jahre die Ansicht, der genetische Anteil der kontinuierlichen Normalverteilung des Blutdrucks innerhalb einer Population, die tageszeitlichen Varianzen und die mit erhöhtem Blutdruck vermehrt auftretenden, eingangs erwähnten kardiovaskulären Erkrankungen seien nicht auf die Wirkung eines einzelnen Gens zurückzuführen; Hypertoniepatienten nähmen das obere Ende einer normalverteilten Kurve von Blutdruckwerten ein (Pickering 1972). Lord Robert Platt of Grindleford hingegen vertrat einige Jahre später die Auffassung, dass Hypertonie eine spezifische Entität sei, die autosomal rezessiv und somit nach Mendelschen Regeln vererbt werde; Blutdruckwerte in hypertonen Familien stellten somit eine von normotensiven Individuen diskontinuierliche Verteilung dar (Platt 1947 zit in: Swales 1985).

Unzählige Studien haben seit der Platt-Pickering-Debatte die Heritabilität der Hypertonie belegt. Neuere Untersuchungen stützten die Theorie Pickerings, nach denen in der Regel für den erblichen Anteil an Bluthochdruck von keinem einfachen Mendelschen Erbgang auszugehen ist (Havlik et al. 1979, Higgins et al. 1980, Levine et al. 1982). Zudem sprechen die Befunde verschiedener Geschwisterstudien für eine Pathogenese, bei der mehr als ein Gen beteiligt ist. Schon früh wurde bei natürlichen Geschwistern eine höhere Konkordanz im Auftreten der Krankheit festgestellt als bei adoptierten (Biron et al. 1976). In großen Familienstudien wie der Framingham Heart Study (Brown et al. 2003), der San Antonio Family Heart Study (Mitchell et al. 1996) oder der Québec Family Study (Rice et al. 2000) konnte die Heritabilität der Hypertonie belegt werden.

In klassischen Zwillingsstudien wurde gezeigt, dass Hypertonie bei monozygoten Zwillingen eher konkordant auftritt als bei dizygoten (Levine et al. 1982). Nachfolgende große nordamerikanische Studien an Zwillingen berechneten, dass die Heritabilität der Hypertonie je nach Alter und Geschlecht ca. 15 bis 70 % der Blutdruckvariationen beträgt (Slattery et al. 1988, Hunt et al. 1989, Ditto 1993). Dies konnte in verschiedenen Zwillingsstudien-Designs für Europa (Fagard et al. 1995, Hong et al. 1994, Vinck et al. 2001, Zeegers et al. 2004), Südamerika (Colletto et al. 1993), Asien (Wang et al. 1990) und Afrika (Adeyemo et al. 2002) bestätigt werden.

In der Tat gibt es hingegen einige seltene Formen familiärer Hypertonie, bei denen lediglich ein Genort mutiert ist (Lifton et al. 1992, Shimkets et al. 1994, Hansson et al. 1995, Mune et al. 1995, Schuster et al. 1996) und die somit Platts Postulat unterstützen.

Die historische Debatte zwischen Pickering und Platt führte schließlich zu der allgemein akzeptierten Auffassung, der Blutdruck sei unimodal verteilt (Ward 1995). Konsensus für die essentielle Hypertonie ist inzwischen das von Pickering begründete Konzept, dass jedes für die Regulation des Blutdrucks verantwortliche Gen einen kleinen Effekt auf einen intermediären Phänotypen hat; die Summe dieser Gene, die zur Ausprägung der Hypertonie *per definitionem* beiträgt, also ab einem willkürlich festgelegten Schwellenwert, macht die genetische Grundlage des Bluthochdrucks aus (Pickering 1987). Platt sollte jedoch in Bezug auf die monogenetisch vererbten familiären Hypertonieformen Recht behalten. In jedem Fall war diese Debatte ein wichtiger Anstoß für das Interesse an den genetischen Grundlagen der Hypertonie.

### 1.3. Komplexe Eigenschaften der Hypertonie erschweren die Untersuchung ihrer genetischen Ursachen

Krankheiten werden dann als komplex bezeichnet, wenn ein Phänotyp nicht genau und konstant durch einen Geneffekt verursacht ist: Derselbe Genotyp führt zu verschiedenen Phänotypen oder andersherum verschiedene Genotypen ergeben denselben Phänotypen – sei es durch Zufall, Umwelteinflüsse oder Interaktionen mit anderen Genen. Genau genommen tragen bei näherer Betrachtung auch monogenetische Erkrankungen komplexe Züge, besonders im Hinblick auf die unterschiedlichen klinischen Verläufe bei Trägern derselben Allele. Oft genug ist es unmöglich, einen perfekt kosegregierenden genetischen Marker zu finden. Die Ursachen hierfür sind auf eine Reihe grundlegender Probleme zurückzuführen.

Phänomene wie reduzierte Penetranz beziehungsweise Phänokopie erschweren die Dissektion der genetischen Grundlage komplexer Erkrankungen. Hierbei bricht die Krankheit trotz des prädisponierenden Allels nicht oder nicht in voller Ausprägung aus beziehungsweise der pathologische Phänotyp tritt ohne entsprechende genetische Grundlage auf. Auch hier sind Zufall, Umwelteinflüsse oder Interaktionen mit anderen Genen mögliche Gründe.

In einem gemeinsamen biochemischen Kreislauf oder in einer zellulären Struktur kann jedweder Defekt eines beteiligten Gens letztendlich zu derselben Krankheit führen, sodass sich verschiedene Mutationen mit demselben klinischen Bild auf eine genetische Heterogenität (auch *locus heterogeneity*) zurückführen lassen. Komplexe Krankheiten folgen bisweilen einem polygenen (oder multigenen) Vererbungsmodus; sie hängen dann nicht nur von Umweltfaktoren ab, sondern weisen auch in Bezug auf die beteiligten Gene und ihre relative Bedeutung im jeweiligen betroffenen Individuum oder der Familie eine sehr hohe Heterogenität auf. Für die Hypertonie legen die beschriebenen monogenetischen Formen einerseits sowie der Fund mehrerer QTLs in experimentellen Modellen andererseits nahe, dass beide Phänomene bei ihrer Entstehung und Ausprägung eine Rolle spielen.

Weitere Probleme wie das häufige Auftreten des krankheitsverursachenden Allels oder spezielle Vererbungsmodi wie der mitochondriale Vererbungsmechanismus, bei dem nur durch die Mutter an die nachfolgenden Generationen weitergegebene Gene in Mitochondrien für die Krankheit verantwortlich sind, können die Kopplungsanalyse verkomplizieren. Das Vorhandensein oder Fehlen eines Krankheitsmerkmals, zumal es in der Entwicklung von Individuen zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt auftreten kann, erlaubt somit keine automatischen Rückschlüsse auf individuelle Gene.

Ferner ist speziell die Hypertonie nicht dichotom verteilt, sondern quantitativ, sodass in ihrer Definition – wie eingangs erläutert – arbiträr ein Grenzwert festgelegt werden muss, der die individuelle Realität nur unbefriedigend wiedergeben kann.

Diese Charakteristika haben die Erforschung der Pathogenese des Hypertonus bislang erschwert. Zudem sind an der Homöostase kardiovaskulärer Funktionen verschiedene physiologische Systeme in einem äußerst komplexen Zusammenwirken beteiligt. Zelluläre und humorale Blutbestandteile, das Gefäßendothel und dessen Tonusregulation, Stoffwechsel- und Elektrolythaushalte, um nur einige zu nennen, spielen eine wichtige Rolle. Daher liegt es nahe, dass eine Vielzahl von Genen als Kandidaten in Frage käme, möglicherweise einen dieser Faktoren zu stören, der letztendlich zum Phänotyp Bluthochdruck führt.

#### **1.4. Verschiedene Konzepte haben die genetische Analyse komplexer Krankheiten möglich gemacht**

Die Untersuchung der erblichen Grundlagen von Krankheiten hat zum Ziel, die relevanten Gene zu lokalisieren und zu identifizieren. Ferner möchte man den Anteil dieser Gene am pathologischen Phänotypen quantifizieren und mögliche Interaktionen der beteiligten Gene untereinander oder mit der Umwelt aufklären.

Ein Phänotyp ist allgemein definiert als die physikalischen Charakteristika zum Beispiel einer Zelle oder eines Organismus. Der Begriff wird in der medizinisch-genetischen Analyse jedoch oft mit der untersuchten Erkrankung und ihren zu messenden Parametern gleichgesetzt. An einem Genort kann das entsprechende Gen intra- als auch interindividuell verschiedene molekularstrukturelle Zustände aufweisen. Diese verschiedenen Allele sind durch molekularbiologische Methoden nachweisbar und werden als Genotypen bezeichnet.

Ein genetischer Marker ist eine Variante einer spezifischen DNA-Sequenz mit bekannter Lokalisation im Genom. Diese Variante kann in einem Gen direkt liegen und somit eine funktionelle Bedeutung haben. Sie kann aber auch außerhalb in der Nähe einer – womöglich unbekannt – kodierenden Sequenz liegen und diese gewissermaßen markieren.

Veränderungen in der Sequenz der DNA können auf unterschiedliche Weise eine Krankheit zur Folge haben. Liegen sie in einer kodierenden Sequenz, können Mutationen zu einer veränderten RNA-Prozessierung (z.B. Splicing) oder einer veränderten Aminosäuresequenz des Genproduktes führen und seine funktionellen Eigenschaften beeinträchtigen, wenn zum Beispiel die Bindungsstelle eines Rezeptors, Enzyms oder Messengers modifiziert wird; seine immunologischen Merkmale, wenn ein Epitop verändert wird; oder seine physikalischen Charakteristika, wenn Stabilität, Löslichkeit o. ä. betroffen sind. Liegen sie in einer genregulatorischen Region, so kann entweder die eigene oder, bei Transkriptionsfaktoren bzw. anderen modulatorischen Molekülen, die Expression anderer Gene quantitativ beeinflusst werden. Mitunter werden Gene auch qualitativ, das heißt in ihrem räumlichen oder zeitlichen Expressions-Muster, verändert. Liegen DNA-Sequenzvarianten außerhalb einer kodierenden Region, so sind sie unter Umständen nicht funktionell.

Im Gegensatz zu den eher seltenen Mutationen spricht man von genetischen Polymorphismen, wenn zwei oder mehr verschiedene Allele innerhalb einer Population relativ häufig auftreten. Polymorphismen als Allelvarianten entstehen z. B. durch Insertion bzw. Deletion von Basensequenzen oder durch Basensubstitution bzw. Punktmutation.

Eine Sonderform der Insertions-Deletions-Polymorphismen stellen die *Simple Sequence Length Polymorphisms* (SSLPs) dar, die auch als Mikrosatellitenmarker, *Short Tandem Repeats* (STR) oder *Simple Sequence Repeats* (SSR) bezeichnet werden. Diese Marker wurden zunächst durch das Screening bekannter Sequenzen, später durch das Screening genomischer Bibliotheken entwickelt. Sie beruhen auf einer unterschiedlichen Anzahl an Dinucleotidwiederholungen, meist von CA-Sequenzen. Für ein Primerpaar resultieren daraus je nach Allelgröße PCR-Produkte unterschiedlicher Länge, die durch Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden können.

Durch DNA-Sequenzierung könnte man alle Arten von Polymorphismen gleichzeitig detektieren, auch die in letzter Zeit vermehrt entwickelten *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), deren Polymorphismus auf der Veränderung einer einzelnen Base beruht.

Bei einem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP), einer Untergruppe der SNPs, kommen zwei Allele vor. In dem einen taucht eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease auf. An dieser Stelle kann die Restriktionsendonuklease den DNA-Strang nach stattgefunderer PCR trennen. Es resultieren nach PCR-Amplifikation des entsprechenden Allels, Inkubation mit dem Restriktionsenzym und Auftrennung auf dem Agarosegel im Falle des homozygoten Allels statt eines höhermolekularen PCR-Produktes mit einer Bande nunmehr zwei niedrigermolekulare Banden. Das Erkennungsmotiv ist je nach spezifischer Restriktionsendonuklease verschieden. In dem anderen Allel kommt dieses Motiv durch einen Basenaustausch nicht vor. Somit kann die Endonuklease den Strang auch nicht durchtrennen, und es bleibt im Falle des homozygoten Allels bei dem einzelnen PCR-Produkt mit einer höhermolekularen Bande. Im heterozygoten Allel wird nur ein Allel geschnitten, sodass drei Banden sichtbar werden: zwei Banden des geschnittenen Allels und eine des ungeschnittenen.

Die diallelischen RFLPs haben einen geringeren polymorphen Informationsgehalt (*polymorphic information content* oder Heterozygotitätsindex) als die Mikrosatelliten mit bis zu 15 Allelen.

Die systematische Genotypisierung gesamter größerer Kohorten mit der DNA-Sequenzierung ist derzeit technisch und finanziell noch immer sehr aufwendig ist. Daher nutzt man bislang hauptsächlich die oben beschriebenen Verfahren.

### **1.5. Tiermodelle sind ein repräsentatives Werkzeug zur genetischen Dissektion der Hypertonie**

Für die Aufklärung von Ätiologie, Pathophysiologie und möglicherweise therapeutischen Möglichkeiten bei komplexen humanen Erkrankungen wird die Entwicklung von Tiermodellen als fundamental angesehen. Sie spiegeln die genetischen oder pathophysiologischen Teilaspekte dieser Erkrankungen wider. Bluthochdruck in Tiermodellen unterscheidet sich in vielen Bereichen nicht vom klinischen Bild der Hypertonie bei Patienten, ob der Modellhochdruck nun spontan, chirurgisch oder hormonell induziert, umwelt- oder ernährungsbedingt ist.

Gegenüber der Untersuchung humaner Populationen weisen Tiermodelle eine Reihe von Vorteilen auf. In Tiermodellen, die einen Hypertonus aufweisen und diesen auch weitervererben, vermag man das Problem der genetischen Heterogenität durch Inzucht zu umgehen. In humanen Studien kann die statistische Aussagekraft durch die genetische Heterogenität der beteiligten Individuen bisweilen in einem Ausmaß beeinträchtigt werden, dass Rückschlüsse auf zu ermittelnde genetische Faktoren unmöglich sind. Tiermodelle sind auch deshalb ein geeigneter reduktionistischer Ansatz, weil bei ihnen die Umweltbedingungen leichter zu kontrollieren sind als in humanen Studien. Vor allem die Möglichkeit, bestimmte Hybride verschiedener phänotypischer Merkmale mit von vornherein festgelegter, über Generationen ingezüchteter und konstant gehaltener genetischer Konstellation zu kreuzen, ist ein unschätzbare Werkzeug zur Identifizierung der genetischen Grundlagen dieser phänotypischen Merkmale.

In der Entwicklung dieses experimentellen Ansatzes hat es eine Reihe von Hypertoniemodellen gegeben, so Hunde (Katz et al. 1957), Kaninchen (Alexander et al. 1954), Truthähne (el Halawani et al. 1973) und Mäuse (Weibust und Schlager 1968). Heute durchgesetzt hat sich als Tiermodell der arteriellen Hypertonie vornehmlich die Ratte – und dies aus mehreren Gründen. Hämö-

dynamische Bestimmungen sind an ihr relativ gut durchzuführen, die Zucht ist unproblematisch, die Generationszeiten sind kurz und die Haltungskosten niedrig. Dazu haben die meisten etablierten Rattenmodelle Prävalenz an Allelen gezeigt, die auch beim Menschen zu Hochdruck führen (Lovenberg 1987). Außerdem kann die Vielzahl an Rattenmodellen als repräsentativ für die Heterogenität der primären Hypertonie des Menschen angesehen werden (Rubattu et al. 1995).

Das erste Rattenmodell wurde als Neuseeländische genetisch hypertensive Ratte (GH) vor über 40 Jahren aus Tieren mit spontanem Bluthochdruck gezüchtet (Smirk und Hall 1958). Seitdem wurden eine ganze Reihe weiterer Stämme selektiv gezüchtet. Sie entwickeln ihren Bluthochdruck entweder spontan, wie der Milaner hypertensive Stamm (MHS) und der Lyon hypertensive Stamm (LH), oder als Reaktion auf Salzaufnahme mit der Nahrung, wie der Sabra hypertensive Stamm (SBH). Ein weiterer, intensiv beforschter Stamm ist die Dahl salzsensitive hypertensive Ratte, die sich in Hinblick auf die Entwicklung einer Hypertonie in einen salzsensitiven (DSS) sowie einen salzresistenten (DSR) Stamm unterteilen läßt und die später als SS/Jr bzw. SR/Jr weitergezüchtet wurden.

Als Paradigma der genetischen Modelle für Hypertonie gilt die spontan hypertensive Ratte (*spontaneously hypertensive rat*, SHR). Sie wurden vor über 35 Jahren an der Universität von Kyoto (Japan) durch selektive Züchtung aus einem Stamm von Wistar-Ratten entwickelt, in dem bei einzelnen Tieren ein erhöhter Blutdruck festgestellt wurde (Okamoto und Aoki 1963). Dabei verpaarte man diejenigen Tiere miteinander, die das Merkmal von Interesse aufwiesen, in diesem Fall den Bluthochdruck, und verwandte von ihren Nachfahren ebenso nur diejenigen mit dem Merkmal zur Weiterzucht. Mit dem fixierten Bluthochdruck als Merkmal wurden die Tiere über Generationen hinweg – 20 und mehr – ingezüchtet, um genetische Homogenität, d. h. Homozygotie an allen Loci, zu erreichen. SHR-Ratten zeigen schon früh in ihrer postnatalen Entwicklung einen steilen Anstieg des Blutdrucks, der sich dann nach 16 Wochen auf dem hohen Niveau stabilisiert. Männliche Tiere weisen höhere Werte auf als weibliche. Dieser sexuelle Dimorphismus zeigt sich auch beim humanen Hypertonus.

Die zum Schlaganfall neigende spontan hypertensive Ratte (SHRSP) wurde als Unterstamm aus Tieren der SHR-Kolonie weitergezüchtet, deren Vorgänger an zerebrovaskulären Infarkten oder Hämorrhagien gestorben waren (Okamoto et al. 1963).

Um die Ursachen des spontanen Hochdrucks aufzuklären, wurden üblicherweise verschiedene physiologische, biochemische und andere Parameter dieses Stammes mit dem eines normotensiven, so genannten Kontrollstammes verglichen. Bei dem normotensiven Referenzstamm handelte es sich meist um Wistar-Kyoto-Ratten (WKY), die parallel zu den SHR aus Wistar-Ratten mit normalem Blutdruck ingezüchtet worden waren. Durch Inzüchtung waren jedoch nicht nur der Bluthochdruck, sondern eine ganze Reihe anderer genetischer und phänotypischer Unterschiede zufallsbedingt über Generationen hinweg fixiert worden, sodass die meisten festgestellten Unterschiede nicht ursächlich, sondern – wenn überhaupt – nur sekundär mit der Hypertonie zusammenhängen. Durch Vergleich zweier ingezüchteter Stämme allein kann also noch keine Kausalität nachgewiesen werden.

Wenn jedoch zwei ingezüchtete Stämme, die sich in einem relevanten Merkmal unterscheiden, zu nachfolgenden Hybridtochtergenerationen weitergezüchtet werden, lassen sich die krankheitsbedingenden Gene unter Umständen durch eine Segregationsanalyse herausfinden. Man kreuzt ein ingezüchtetes hypertensives mit einem ingezüchteten normotensiven Tier, die beide homozygot für ihr Merkmal sind. Man erhält dann eine Tochtergeneration  $F_1$ , die von jedem Elternteil einen Chromosomenstrang erbt und durchgehend heterozygot ist. In der Meiose dieser Tiere wird nun das väterliche und das mütterliche, entweder hypertensinogene oder normotensinogene Erbmaterial zufallsbedingt rekombiniert. Verpaart man die  $F_1$ -Tiere weiter miteinander, weist die resultierende  $F_2$ -Filiälgeneration eine zufällige Verteilung beider Genome auf: Sie sind homozygot für hypertensinogene bzw. normotensinogene Allele und somit hyperten bzw. normoten – oder heterozygot an den entsprechenden Genorten und weisen somit einen intermediären Phänotypen auf.

Rekombinante ingezüchtete Ratten wiederum entstehen, indem man aus zufällig ausgewählten  $F_2$ -Ratten über 20 Generationen hinweg Bruder- und Schwestertiere miteinander verpaart. In dem resultierenden genetischen Mosaik kann man dann individuelle komplexe Eigenschaften als Mendelsche Eigenschaften analysieren.

Bei einem konsomischen bzw. kongenen Stamm werden durch Züchtung Chromosomen bzw. ein Teil dieser Chromosomen von einem hypertensiven Tier in ein normotensives (oder um-

gekehrt) transferiert. Hierzu wird jeweils das Tier des Donorstammes mit dem Tier des Empfängerstammes rückgekreuzt und der Nachwuchs, der die entsprechende chromosomale Region genotypisch nachweislich enthält und phänotypisch weiterhin dem charakterisierten Phänotypen entspricht, zur weiteren Rückkreuzung verwendet. Dieses Vorgehen kann man beschleunigen, indem man jeweils dasjenige Männchen zur weiteren Rückkreuzung verwendet, welches bei einem genomweiten Screening am wenigsten Donorallele aufgewiesen hat.

Hat man die chromosomale Region bei erhaltenem Phänotypen auf ein Minimum reduziert, können alle hierin enthaltenen Gene als Kandidaten für den beobachteten Phänotyp gelten. Die Sequenzierung dieser Gene kann dann zur Entdeckung von Sequenzunterschieden in Tieren mit Hypertonie im Vergleich zu den Kontrolltieren führen und so möglicherweise die für den Phänotyp verantwortlichen Gene identifizieren. Die Priorität bei der Sequenzierung der Gene könnte man durch eine vorherige Expressionsanalyse in hypertensiven Tieren im Vergleich mit Kontrolltieren festlegen. Die Gene mit einem Expressionsunterschied zwischen hypertensiven und normotensiven Tieren würde man zuerst untersuchen.

## **1.6. In der Rattengenetik werden verschiedene Strategien angewandt**

### *1.6.1. Intervallkartierung*

Mit der Entwicklung moderner molekularbiologischer Methoden wurde 1989 der erste DNA-Polymorphismus veröffentlicht, bei dem in Dahl-Ratten die Kopplung eines RFLP im Renin-Gen mit dem Blutdruck gezeigt wurde (Rapp et al. 1989). Diese wurde später bestätigt (Kurtz et al. 1990).

Durch die Entwicklung erster Mikrosatelliten wurden 1991 die ersten beiden genomweiten Intervallkartierungen (*genome wide screens*) zweier Arbeitsgruppen mit jeweils 100 Markern in der auch im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Rattenpopulation möglich (Hilbert et al. 1991, Jacob et al. 1991). Sie wiesen einen blutdruckregulierenden QTL auf Chromosom 10 nach. Durch die Verwendung unterschiedlicher Marker konnte zudem eine Studie einen blutdruckregulierenden Locus auf Chromosom 18 nachweisen (Jacob et al. 1991), während die andere Studie einen Locus auf dem X-Chromosom zeigen konnte (Hilbert et al. 1991).

Spätere, zusätzliche Intervallkartierungsstudien haben QTLs auf fast allen Rattenchromosomen identifizieren können. Loci auf den Chromosomen 1, 2, 3, 5, 10 und 13 konnten in unabhängigen Studien bestätigt werden (Rapp 2000).

#### *1.6.2. Untersuchung von Kandidatengen in Kopplungsanalysen*

Kopplungs- oder Segregationsanalysen von Kandidatengen des Bluthochdrucks in Ratten wurden schon seit 1972 durchgeführt. Zunächst dienten biochemische oder andere Parameter, die nach den Mendelschen Gesetzen vererbt wurden, als genetische Marker. In ersten Studien wurden für Polymorphismen der renalen Esterase (Yamori et al. 1972) und der 11 $\beta$ -Hydroxylase (Rapp und Dahl 1972) Blutdruckunterschiede nachgewiesen. Auch für die Muskelreaktion von glatter Gefäßmuskulatur auf Kobaltstimulation konnte eine Kosegregation mit dem Blutdruck nachgewiesen werden (Rapp 1982).

Kosegregationsstudien von polymorphen Varianten des Renin- und des SA-Gens als Kandidatengene für die Hypertonie in F<sub>2</sub>-Kreuzungen von SHRSP- und WKY-Tieren konnten die ursprünglichen Ergebnisse in anderen Stämmen nicht bestätigen (Lindpaintner et al. 1990).

In den letzten Jahren wurden eine ganze Reihe von Intervallkartierungs- und Kopplungsstudien durchgeführt, die in neueren einschlägigen Übersichtsarbeiten erschöpfend dargestellt werden (Rapp 2000).

### **1.7. Durch die QTL-Kartierung soll der genetische Anteil der Blutdruckvariabilität analysiert werden**

Die Diskrepanz zwischen der Mendelschen Theorie und der Beobachtung, dass die meisten biologischen Merkmale kontinuierlich variieren, konnte durch das eingangs erwähnte Konzept der quantitativen Vererbung in Einklang gebracht werden. Erst mit der Verbreitung der RFLPs und später der Mini- bzw. Mikrosatelliten wurde jedoch eine systematische und genaue QTL-Kartierung möglich.

Die Kalkulation der QTL-Algorithmen in Rückkreuzungen folgt im Wesentlichen den in einem Meilensteinartikel (Lander und Botstein 1989) dargelegten mathematischen Grundlagen. Die Wahrscheinlichkeit, einen neuen QTL aufzuspüren, ist direkt proportional abhängig

1. vom Anteil der QTL an der Varianz des Gesamtphänotypen,
2. von der Differenz des Phänotypen zwischen den untersuchten parenteralen Stämmen,
3. von der Anzahl der untersuchten Tiere der Kohorte sowie
4. von der genomischen Dichte der verwendeten Marker.

Indirekt proportionalen Einfluss haben darüber hinaus die Zahl der Gene, die am beobachteten Phänotypen beteiligt sind, und die umweltbedingte Varianz.

Ziel einer Kopplungs- oder Segregationsanalyse (*linkage analysis*) ist es folglich, in ingezüchteten Stämmen die Kopplung verschiedener genetischer Marker mit dem Phänotypen Hypertonie über nachkommende Generationen hinweg zu verfolgen und dann womöglich diejenigen Markerallele zu bestimmen, die zur Entstehung des Phänotypen beitragen. Grundlage hierfür ist das Prinzip der freien Segregation der Gene durch Rekombination, bei der in der väterlichen und mütterlichen Meiose Chromosomenmaterial per Zufall rekombiniert wird, um dann in Form von Samen- und Eizelle neu zusammenzufinden und zur Entwicklung eines neuen Individuums zu führen. Je näher zwei Gene oder die erwähnten für sie stehenden genetischen Marker auf demselben Chromosom liegen, desto niedriger ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie durch eine Rekombination in der Meiose getrennt werden. Der Höchstwert zu beobachtender Rekombinationen beträgt 50 %. Mit dieser Wahrscheinlichkeit werden zwei Genloci in einer von zwei möglichen Kombinationen gemeinsam vererbt oder getrennt: Sie liegen im Kopplungsgleichgewicht. Liegen zwei Loci auf demselben Chromosom näher beieinander, werden sie mit größerer Häufigkeit gemeinsam vererbt, weil sie mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit durch eine Rekombination getrennt werden können. Diese gemeinsame Vererbung bezeichnet man als Kopplung (*linkage*). Tritt ein bestimmtes Allel eines Gens oder Markers also häufiger als durch das Hardy-Weinberg-Äquilibrium erwartet mit einem phänotypischen Merkmal zusammen auf, so spricht man von einem Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*).

In erster Annäherung ist der Grad der genetischen Kopplung direkt proportional zur physikalischen Distanz zweier Loci. Daher kann man diese Informationen nutzen, um auf die ungefähre Lage des Phänotypen zu den Genen der chromosomalen Region zu schließen. Wenn beispielsweise 99 von 100 (von einem Phänotypen) Betroffenen ein Allel A aufweisen und nur einer das Allel a, dann ist A zum Phänotypen mit einer Rekombinationsfrequenz von 1 % gekoppelt und liegt in einer Rekombinationsdistanz von 1 Centimorgan (cM) zum Gen. Das entspricht beim Homo sapiens in etwa einer physikalischen Distanz von einer Million Basenpaaren, bei der Ratte ungefähr zwei Millionen Basenpaaren.

Betrachtet man einen einzelnen Marker, dann stellt die Frage, ob dieser als QTL einen Phänotypen beeinflusst, eine Sonderform des *Maximum Likelihood Estimate* (MLE) dar: Man vergleicht die Nullhypothese „keine Kopplung“ mit der Wahrscheinlichkeit „vorliegende Kopplung“. Der erwähnte LOD-Wert vergleicht im dekadischen Logarithmus also *zwei* Wahrscheinlichkeiten: diejenige, mit der die Daten eher auf einem QTL beruhen, mit derjenigen, dass sie auf der Nullhypothese, nämlich der Abwesenheit eines QTL (*independent assortment*) beruhen. Ein LOD-Wert von 3 bedeutet demzufolge eine tatsächlich vorliegende Kopplung mit einer Wahrscheinlichkeit von  $10^3 : 1$  gegenüber derjenigen, dass die Daten zufällig zustande gekommen sind.

Die Varianzanalyse (ANOVA) prüft die Signifikanz der Unterschiedlichkeit von Mittelwerten. Mit der Ein-Weg-Varianzanalyse wird der Einfluss des Locus auf den Phänotypen getestet. Die Unterteilung in der Drei-Weg-ANOVA berücksichtigt hierbei zusätzlich die Herkunft von WKY- oder SHRSP-Männchen, neben dem Genotypen nämlich noch das Geschlecht und die großväterliche Herkunft.

Anders als der LOD-Wert, der eine Ratio aus zwei Wahrscheinlichkeiten ist, gibt der p-Wert hingegen nur *eine* Wahrscheinlichkeit an: Die Wahrscheinlichkeit, einen LOD-Wert bestimmter Größe zu finden, liegt um den p-Wert unter der Nullhypothese. Ein  $p = 10^{-3}$  bedeutet folgerichtig, die Wahrscheinlichkeit, einen so hohen LOD-Wert wie beobachtet zu finden, liegt  $1 : 10^3$  unter der Nullhypothese.

Von allen Loci, in denen sich die Stämme unterscheiden und die in nachfolgenden Tochtergenerationen frei segregieren, werden nur die für die Hypertension kausal verantwortlichen Allele mit diesem Phänotypen gekoppelt auftreten. (Genau genommen kann man damit auch immer nur diejenigen Gene identifizieren, die im betreffenden Modell die Hypertonie verursachen.) Genetische Kopplung vermag jedoch nur im Ausnahmefall bei sehr dicht liegenden Markern und zahlreichen informativen Rekombinationen das Gen direkt zu identifizieren. In der Regel kann durch Segregationsanalysen ein Genort (*locus*), d. h. eine Region mit einer variablen Zahl in Frage kommender Kandidatengene eingegrenzt werden.

Anders als die Kopplungsuntersuchungen, bei denen die Segregation von Marker und Phänotyp über mehrere Generationen verfolgt wird und in einer parametrischen Analyse ein bestimmter Vererbungsgang angenommen werden muss, können nonparametrische Studien miteinander verwandte Individuen vergleichen, ohne ein Vererbungsmodell zu postulieren (*sib pair analysis, allele sharing method*): Bei konkordanten Geschwistern, die beide den fraglichen Phänotypen aufweisen, und bei diskordanten Geschwistern, die sich im fraglichen Phänotypen voneinander unterscheiden, wird verglichen, ob sich die Genotypallele des Markers am untersuchten Locus ebenfalls gleichen bzw. voneinander unterscheiden. Verglichen werden die Häufigkeiten der bei beiden Geschwistern gemeinsam geerbten Allele mit den nach den Mendelschen Regeln zu erwartenden, je nachdem ob die elterlichen Genotypen bekannt sind (*identity by descent*) oder nicht (*identity by state*).

In möglichst großen Kohorten nicht verwandter Individuen werden in Assoziationsstudien (*case control studies*) bei Kandidatengenomen mit putativer Relevanz die Allelverteilungen zwischen den Individuen mit ausgeprägtem und nicht bzw. weniger ausgeprägtem Phänotypen verglichen. Hierbei ist darauf zu achten, dass die beobachteten Allelhäufigkeiten im Hardy-Weinberg-Equilibrium stehen.

## 1.8. Zielsetzung dieser Arbeit

Der arterielle Blutdruck ist das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels einer bisher unbekannt Anzahl regulatorischer Systeme, welche Gefäßtonus, Herzfunktion, Wasser- und Elektrolythaushalt sowie Entwicklungs-, Wachstums- und Strukturmerkmale von Herz und Gefäßen beeinflussen. Jedes dieser Systeme wird seinerseits durch die Interaktion von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen bestimmt. Unter den Umwelteinflüssen, die in der Beeinflussung des Blutdrucks mit den genetischen Faktoren interagieren, hat über Jahre hin die NaCl-Aufnahme mit der Nahrung sicherlich die meiste Aufmerksamkeit auf sich gezogen. So sind bei hypertonen Patienten Untergruppen beschrieben worden, in denen der Blutdruck entweder vermehrt oder vermindert auf NaCl-Aufnahme mit der Nahrung reagiert hat (Kawasaki et al. 1978, Weinberger et al. 1986, Osihma et al. 1987). Große Querschnittstudien und interkulturelle Vergleiche weisen außerdem darauf hin, dass Blutdruck allgemein von der NaCl-Aufnahme mit der Nahrung abhängig sein kann. Es wird angenommen, dass es sich bei der NaCl-abhängigen Blutdruckvarianz um ein ökogenetisches Phänomen handelt: Hypothetisch führt eine bei den meisten Individuen schwach ausgeprägte Reaktion auf einen Umwelteinfluss, hier der Blutdruckanstieg durch die NaCl-Aufnahme mit der Nahrung, infolge bestimmter Veränderungen der verantwortlichen Gene zu einem pathogenetisch wichtigen Mechanismus, an dessen Ende die arterielle Hypertonie resultiert.

Sowohl das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System als auch das Kallikrein-Kinin-System sind für eine regulatorische Funktion des Elektrolyt- und Volumenhaushaltes sowie der Blutdruckregulation in Betracht gezogen worden. Während Funktion und biologische Mechanismen der Signaltransduktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in einigen Einzelheiten aufgeklärt worden sind, bleibt die Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems größtenteils eher unklar. Es gibt Hinweise auf mögliche direkte Einflüsse dieses Systems auf die Regulation des renalen Blutflusses und NaCl-Haushaltes sowie indirekte Effekte über die Kallikreinausscheidung mit dem Urin. Die beobachtete verminderte Urinausscheidung des Kallikreins bei hypertensiven Patienten (Margolius 1995) hat zu Spekulationen bezüglich der möglichen kausalen Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems bei der Entstehung der Hypertonie geführt. Die Frage, ob diese Beobachtungen Ursache oder Folge der hypertensiven Erkrankung sind, lässt sich möglicherweise nur molekularbiologisch klären.

Es ist denkbar, dass angeborene Veränderungen der Funktion oder Expression des Kallikrein-Kinin-Systems eine vornehmliche, genetisch determinierte Rolle in der Pathogenese der NaCl-abhängigen Hypertonie oder allgemeiner in den Blutdruckvarianzen aufgrund von NaCl-Aufnahme spielen. Mehrere Befunde deuten auf einen Zusammenhang zwischen dem Kallikrein-Kinin-System und der Hypertonie hin: Der Blutdruck kosegregiert mit bestimmten Allelen des Kallikrein-Gens in genetisch hypertensiven Ratten (Pravenec et al. 1991). Transgene Mäuse mit zusätzlichen Kopien des humanen Kallikrein-Gens weisen abnorm niedrige Blutdruckwerte auf (Wang et al. 1994). Verschiedene wichtige Kosegregationsstudien haben bewiesen, dass Blutdruck mit einer Region gekoppelt ist, welche das Gen für das *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) enthält (Hilbert et al. 1991, Jacob et al. 1991, Deng und Rapp 1992, Nara et al. 1991). Dieses Enzym ist identisch mit Kininase II. Es inaktiviert hydrolytisch Kinine. Interessanterweise wurde die Kopplung nur für den Blutdruck nach NaCl-Aufnahme mit der Nahrung gefunden, nicht jedoch vor NaCl-Aufnahme oder für den Anstieg durch NaCl-Aufnahme. Expressionsanalysen von Kallistatin (oder Kallikrein bindendes Protein, KBP) in SHR-Ratten und in WKY-Ratten haben gezeigt, dass dieses Kallikrein-Bindungs-Protein in den Nieren der hypertensiven Ratten geringer exprimiert ist als in den Nieren der normotensiven Kontrolltiere des WKY-Stammes (Chao und Chao 1988). Diese Beobachtung lässt eine kausale Rolle des Kallikrein-Renin-Systems in der Blutdruckregulation der SHR-Ratten vermuten.

Weitere Evidenz hierfür lieferte eine Untersuchung, in der mit einem ELISA-Assay Plasmakonzentrationen für Kallistatin in F<sub>0</sub>-Tieren des SHRSP- (n=4) und des WKY-Stammes (n=4) gemessen wurde. Die Kallistatin-Plasmakonzentrationen waren in SHRSP-Tieren signifikant niedriger als in WKY-Tieren (Mittelwerte  $311 \pm 32 \mu\text{g/ml}$  versus  $479 \pm 32 \mu\text{g/ml}$ ) (Lindpaintner et al. 1994). Möglicherweise ist die Inhibition von Gewebs-Kallikrein durch Kallistatin (KBP) ein zweiteiliger Vorgang, bei dem der erste Schritt – Bindung von Enzym und Inhibitor – reversibel ist (Chao et al. 1990). Somit könnte Kallistatin sowohl als Trägerprotein dienen und das Kallikrein auf diese Weise vor der Zersetzung durch Hydrolyse schützen als auch einen Inhibitor darstellen. Hypothetisch könnten die erniedrigten Kallistatinkonzentrationen in den SHRSP-Tieren zu einem vermehrten hydrolytischen Abbau der „ungeschützten“ Kallikreine durch andere Serinproteasen führen. Mithilfe einer somatischen Zellhybrid-DNA-Sammlung gelang es, das Kallistatin (KBP) auf Chromosom 6 in der Ratte zu kartieren (Chen et al. 1997). Eine initiale genom-

weite Intervallkartierung mit insgesamt 181 Markern, davon 10 Markern auf Chromosom 6, ergab keinen Anhalt für einen QTL auf Chromosom 6 in der untersuchten  $F_2$ -Population (Hilbert et al. 1991, Jacob et al. 1991). Eine Kosegregationsanalyse mittels einer BglII-RFLP-Genotypisierung durch Southernhybridisierung in den  $F_2$ -Tieren der Kohorte A dieser Arbeit ergab einen signifikanten Effekt des Kallistatin-Lokus auf den diastolischen Blutdruckanstieg nach Salzbelastung: Der diastolische Blutdruck stieg um 19 % in Tieren homozygot für das SHRSP-Allel, um 11,4 % in heterozygoten Tieren und um 7,4 % in Tieren homozygot für das WKY-Allel ( $p=0,0002$ ) (Lindpaintner et al. 1994). Die Methode der Genotypisierung eines RFLP des Kallistatin-Gens mittels Southernhybridisierung, die eine Genotyp-Phänotyp-Assoziation nahe gelegt hatte, ist schwierig durchzuführen und oft nur ungenau zu interpretieren. Deshalb sollte in dieser Arbeit die mögliche Existenz eines Blutdruck-QTL sowie weiterer QTLs auf dem Chromosom 6 der Ratte basierend auf den gemessenen Phänotypen in der Kohorte eingehend und vollständig untersucht werden.

Wir stellten die Hypothese auf, dass die Gene für Kallistatin (Kallikrein bindendes Protein [KBP]) sowie den chromosomal benachbarten Bradykininrezeptor B2 (BKRB2) Kandidatengene für die Blutdruckregulation und möglicherweise für die Blutdruckreaktion auf NaCl-Aufnahme mit der Nahrung darstellen.

Unter Hinzuziehung der mittlerweile entwickelten und zur Verfügung stehenden flankierenden Marker sollte diese Region auf Chromosom 6 mithilfe der uns zur Verfügung stehenden  $F_2$ -Tochtergeneration aus SHRSP- und WKY-Ratten feinkartiert und auf mögliche QTLs untersucht werden. Diese  $F_2$ -Tochtergeneration ist in der Literatur im Detail beschrieben. Es handelt sich dabei um die gleiche Population, die Gegenstand früherer publizierter Studien war (Hilbert et al. 1991; Jacob et al. 1991; Lindpaintner et al. 1990; Lindpaintner 1993).

Als abhängige Variablen untersuchten wir neben dem basalen systolischen Blutdruck den basalen diastolischen Blutdruck, die basale Herzfrequenz und den Pulsdruck. Um der Frage der Salzsensitivität nachzugehen, untersuchten wir weiter den systolischen und diastolischen Blutdruck nach Salzbelastung, die Herzfrequenz und den Pulsdruck nach Salzbelastung sowie den systolischen und diastolischen Blutdruckanstieg und den Herzfrequenzanstieg nach Salzbelastung.