

4. Diskussion

4.1. Unsere Kopplungsanalyse zeigt durch die Erweiterung der ursprünglichen Kohorte einen blutdruckregulierenden QTL

Mit dieser Untersuchung einer Region auf Chromosom 6 im Rattenmodell der zum Schlaganfall neigenden spontan hypertensiven Ratte konnte erstmalig ein blutdruckregulierender QTL auf diesem Chromosom am anonymen Marker *D6MGH10* gezeigt werden. Weiterhin konnte ein postulierter blutdruckregulierender Einfluss zweier in dieser Region lokalisierter Kandidatengene, für Kallistatin und für den Bradykininrezeptor B2, in diesem Modell nicht nachgewiesen und durch die statistische Power der Studie ein solcher in einer dem nachgewiesenen QTL ähnlichen Größenordnung mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

In unserer statistischen Analyse untersuchten wir, ob ein kosegregierendes Allel mit dem jeweiligen Phänotypen gekoppelt ist. Dabei verglichen wir die Wahrscheinlichkeit der spezifischen Konstellation von Allel und Eigenschaft. Die zu untersuchende Hypothese (der Marker ist gekoppelt mit der Eigenschaft in einer bestimmten Entfernung, die die Rekombinationsrate θ unter Annahme eines bestimmten genetischen Übertragungsmodus – z. B. rezessiv – reflektiert) wurde verglichen mit der Nullhypothese, dass es keine Kopplung zwischen dem Marker und der Eigenschaft gebe. Teilt man diese beiden Wahrscheinlichkeiten miteinander, ergibt sich ein Quotient, die *likelihood ratio*. Der dekadische Logarithmus dieser Ratio ist der erwähnte LOD (*logarithm of odds*)-Wert. Der LOD-Wert kann errechnet werden, indem man in die zu untersuchende Hypothese die möglichen Entfernungen θ des Markers zum Locus modelliert. Bei einer signifikanten Kopplung gibt der höchste LOD-Wert die wahrscheinlichste Distanz zwischen dem Marker und dem Locus an.

Bei der Angabe unserer QTL folgen wir international akzeptierten Kriterien (Lander und Kruglyak 1995). Der Schwellenwert, ab dem ein QTL angenommen werden kann, ohne dass zu viele falsch positive Befunde berichtet werden, ist in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits kann die Veröffentlichung nicht reproduzierbarer Ergebnisse die Glaubwürdigkeit der genetischen Epidemiologie in Frage stellen. Auf der anderen Seite ist zu vermeiden, dass Hinweise auf wichtige Regionen durch unangemessen strenge Kriterien verloren gehen.

Üblicherweise wurde ein LOD-Wert von über 3 als signifikant angesehen (Lander und Botstein 1989). Später argumentierte man, dass selbst bei einem LOD-Wert von 3,6 in einer genomweiten Intervallkartierung von 5 % falsch positiven Kopplungen ausgegangen werden muss (Lander und Kruglyak 1995). Die Autoren wollen je nach Höhe des LOD-Wertes und des p-Wertes die Kopplung sukzessiv als suggestiv oder signifikant einstufen. Für die QTL-Kartierung von F₂-Rattenstämmen geben sie einen LOD-Wert von über 4,3 und einen p-Wert von unter 0,000052 als signifikant an. Diese statistische Evidenz tritt bei einer Intervallkartierung nur 0,05 mal auf, das heißt mit einer Wahrscheinlichkeit von 5 %. Einen LOD-Wert ab 2,8 und p-Wert ab 0,0016 bezeichnen sie als Schwellenwert für suggestive Kopplung. Dieser Wert ist bei einer Intervallkartierung nur einmal durch Zufall bedingt zu erwarten. Die Autoren schlagen vor, bei einer suggestiven Kopplung den Rohdatensatz zu erweitern und die gesamten Daten erneut zu analysieren (Lander und Kruglyak 1995).

Diese Schwellenwerte wurden in folgenden Arbeiten als geeignet akzeptiert (Rubattu et al. 1996, Stoll et al. 2001). Andere Autoren lehnen diese Einteilung als zu oberflächlich ab und überlassen die Interpretation der errechneten Werte dem einzelnen. Sie bevorzugen vielmehr, die Verteilung sämtlicher p-Werte einer Intervallkartierung aufzutragen (Witte et al. 1996).

In unserer Kopplungsanalyse in der Kohorte A von 112 Tieren der zweiten Tochtergeneration einer Kreuzung aus hypertensiven und normotensiven Tieren konnten wir zeigen, dass der basale systolische Blutdruck mit einem LOD-Wert von 2,4 an den anonymen Marker *D6MGH10* gekoppelt war. Der basale Pulsdruck zeigte Kopplung mit zwei Spitzenwerten: eine erste Spitze mit einem LOD-Wert von 2,9 für den anonymen Marker *D6MGH10* und eine zweite Spitze mit einem LOD-Wert von 2,2 für den anonymen Marker *D6Rat79* sowie 1,5 für den benachbarten Marker des Bradykininrezeptors B2 und 1,4 für den benachbart kartierten RFLP des Kallistatin-Gens.

Einen kosegregationsbedingten, allelspezifischen signifikanten Anstieg des absoluten systolischen und diastolischen Blutdrucks bei erneuter Messung nach zwölf tägiger Salzbelastung konnten wir nicht zeigen. Lediglich der Anstieg des diastolischen Blutdrucks nach Salzbelastung war mit einem LOD-Wert von 2,2 an den RFLP des Kallistatin-Gens gekoppelt. Weiter konnten wir eine

Kopplung der Herzfrequenz nach Salzaufnahme mit einem LOD-Wert von 2,5 an den anonymen Marker *D6MGH10* zeigen.

In einer kleinen Kohorte mit einer begrenzten Anzahl an Tieren hatten wir somit einen ersten Anhalt für einen möglichen QTL an den Markern des Kallistatin-Gens, des Bradykininrezeptor B2-Gens oder des anonymen Markers *D6MGH10*. Ein oder mehrere QTL kamen an diesen Markern in Frage, Phänotypen wie den systolischen Blutdruck oder den Pulsdruck zu regulieren. Im einzelnen konnten wir eine suggestive Kopplung des anonymen Markers *D6MGH10* mit dem basalen arteriellen Pulsdruck nachweisen. Keiner der weiteren analysierten Phänotypen erreichte indes für die untersuchten genetischen Marker die zum Nachweis einer suggestiven Kopplung notwendige Schwelle eines LOD-Wertes von 2,8.

Die Ergebnisse zeigten somit, dass die statistische Power dieser Kohorte nicht ausreicht, um die gestellten Fragen an diese Region mit einiger Sicherheit zu beantworten. Ferner zeigte die mit der Kohorte A erzeugte genetische Kartierung der Marker auf Chromosom 6 in einer möglichen QTL-Region, nämlich um den Marker *D6MGH10*, sehr große Markerabstände. Diese Abstände sollten zur besseren Beurteilung der Region mit weiteren informativen Markern verkleinert werden.

Daher verfolgten wir in der Folge nun die Strategie, die Anzahl der Tiere zu erhöhen, um durch den erweiterten Datensatz die statistische Power der Kopplungsanalyse zu vergrößern. Weiter wollten wir zusätzliche Marker in der Region identifizieren, um die Auflösung unserer genetischen Karte zu verfeinern. Beide Maßnahmen, sowohl die Erhöhung der Tierzahl als auch die Genotypisierung weiterer Marker, dienten einem gemeinsamen Ziel: die initial nicht mit definitiver Sicherheit nachweisbaren Kopplungen entweder als unzutreffend zu verwerfen oder aber LOD-Werte zu erzielen, die nach anerkannten statistischen Kriterien signifikant die Existenz eines oder mehrerer QTL in Region auf Chromosom 6 nachweisen. Dazu sollte die in Frage kommende Region so hochauflösend wie möglich kartiert werden.

Um dieses erste Ergebnis zu überprüfen, wurde die ursprüngliche Kohorte in der Anzahl der Tiere ungefähr verdoppelt. Weitere 102 F₂-Tiere wurden nach dem gleichen genetischen Schema wie zuvor gezüchtet. Zur Phänotypisierung wurden die Tiere nicht durch wiederholte Messungen

über einen Femoralkatheter, sondern über ein in der abdominalen Aorta liegendes telemetrisches System erfasst. Die unterschiedlichen Messmethoden für die zusätzlichen Tiere wurden im Rahmen einer Untersuchung an SHR- und SHRSP-Tieren validiert (Rubattu et al. 1996).

Die somit erweiterte Kohorte von 214 F₂-Tieren wurde von uns Kohorte B benannt. Die Kohorte B wurde von uns genotypisiert, die verwendeten Marker kartiert und einer Kopplungsanalyse unterzogen. Wie aus Tabelle F (Vergleich LOD-Werte Kohorte A / Kohorte B) ersichtlich, stiegen die LOD-Werte in unserer folgenden Analyse des gesamten Datensatzes der Kohorte B für alle untersuchten Phänotypen im Vergleich zu Kohorte A.

Für die Kohorte B konnten wir eine Kopplung des Markers *D6MGH10* mit dem basalen systolischen Blutdruck mit einem signifikanten LOD-Wert von 4,8 sowie dem basalen diastolischen Blutdruck mit einem grenzwertigen LOD-Wert von 3,0 nachweisen. Weiter konnten wir bei diesem Marker eine Kopplung mit einem signifikanten LOD-Wert von 4,4 an den basalen Pulsdruck und mit einem grenzwertigen LOD-Wert von 3,8 an die Herzfrequenz nach Salzaufnahme zeigen. Schließlich zeigte derselbe Marker Kopplung an den systolischen Blutdruck nach Salzaufnahme mit einem LOD-Wert von 2,7 sowie an den Herzfrequenzanstieg nach Salzaufnahme mit einem LOD-Wert von 2,6. Für die Marker des Bradykininrezeptor B2-Gens und des Kallistatin-Gens sanken die LOD-Werte und blieben auch in der erweiterten Kohorte unter der Signifikanzschwelle.

Wendet man als Schwellenwert den anerkannten LOD-Wert von 4,3 für eine signifikante Kopplung an, konnten wir durch die Erhöhung der Anzahl an Tieren somit zwei signifikante Kopplungen zeigen: den basalen systolischen Blutdruck mit einem LOD-Wert von 4,8 sowie den basalen Pulsdruck mit einem LOD-Wert von 4,4 an den Marker *D6MGH10*. Damit konnte erstmals ein blutdruckregulierender QTL auf Rattenchromosom 6 dieses Hypertoniemodells nachgewiesen werden.

Bisher wurde lediglich in einem Abstract über einen nicht näher bezeichneten QTL für systolischen Blutdruck auf Chromosom 6 in einer Kreuzung von GH und BN mit einem LOD-Wert von 4,5 berichtet (Jacob Lab et al. 1996).

In unserer Arbeit konnte die Erhöhung der Anzahl an Tieren in Kohorte B außerdem einen blutdruckregulierenden genetischen Einfluss des Kallistatin-Gens und des Bradykininrezeptor B2-Gens weitgehend unwahrscheinlich machen: In der erweiterten Kohorte sank der LOD-Wert für Kopplung mit dem arteriellen Pulsdruck von jeweils 1,4 bzw. 1,5 für beide auf 0,7 ab.

Die Poweranalyse zeigte, dass unser Experiment in den 214 F₂-Tieren der Kohorte B bei dem gegebenen $\alpha = 0.05$ mit einer statistischen Power von 80% einen Unterschied im basalen systolischen Blutdruck von 6,63 mmHg oder höher und im Pulsdruck von 2,06 mmHg oder höher zwischen den Genotypgruppen in Bezug auf den Allelstatus am Marker BKRB2 zu detektieren vermochte. In Bezug auf den Allelstatus am Kallistatinmarker konnte mit einer Power von 80% ein Unterschied im basalen systolischen Blutdruck von 6.64 mmHg oder höher und im Pulsdruck von 2,10 mmHg oder höher detektiert werden. Ein größerer Einfluss der beiden Kandidatengene auf den Blutdruck konnte somit weitgehend ausgeschlossen werden.

Wir untersuchten mit einer Varianzanalyse (ANOVA), ob Variationen der Daten auf Unterschieden zwischen den Mittelwerten der Gruppen oder auf Variationen innerhalb der Gruppen zurückzuführen sind. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen wird durch den F-Wert ausgedrückt, der die Ratio beobachteter und erwarteter Variation der Mittelwerte darstellt. Dabei ist bei einem F-Wert über 1 von einem realen Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen auszugehen.

Beim paarweisen Gruppenvergleich wurde die Bonferroni-Adjustierung angewandt. Üblicherweise wird der α -Level – die Wahrscheinlichkeit, ungerechtfertigter Weise einen Unterschied zu finden, der tatsächlich auf Zufall beruht – bei 0,05 angesetzt. Bei mehreren gleichzeitigen Tests wie der ANOVA steigt diese Wahrscheinlichkeit. Die Bonferroni-Methode adjustiert das Signifikanzniveau auf eine Weise, dass auch bei mehreren Tests die Chance, fälschlicherweise einen Unterschied zu finden, unter 0,05 bleibt. Für die Ergebnisse der ANOVA legten wir ein konservatives Signifikanzniveau von $p < 0,05$ und $F > 1$ an.

Die Ergebnisse in Kohorte A waren zunächst uneindeutig. Für den systolischen Blutdruck und den basalen Pulsdruck unterschieden sich die Mittelwerte der Gruppe mit homozygoten WKY-Allelen signifikant von denen der Gruppe mit homozygoten SHRSP-Allelen. Nur für den basalen

Pulsdruck unterschied sich die heterozygote Gruppe von der Gruppe mit homozygoten SHRSP-Allelen, nicht jedoch für den systolischen Blutdruck.

Eine Diskrepanz in der biologischen Erklärung des Herzfrequenzanstieges nach NaCl-Belastung trat in Kohorte A auf: Im paarweisen Gruppenvergleich waren die Mittelwerte in der Kohorte A nach NaCl-Belastung der Gruppe, die für den Marker *D6MGH10* ein homozygotes WKY-Allel trugen, signifikant niedriger als die der Gruppe mit heterozygoten SHRSP/WKY-Allelen. Die homozygoten WKY-Tiere unterschieden sich jedoch nicht von homozygoten SHRSP-Tieren.

In der erweiterten Kohorte B hingegen zeigten alle Phänotypen mit grenzwertigem oder signifikantem LOD-Wert signifikante p- und F-Werte für den Marker *D6MGH10*. Im paarweisen Gruppenvergleich waren die Mittelwerte der Gruppe mit homozygoten WKY-Allelen signifikant niedriger als die der Gruppe mit homozygoten SHRSP-Allelen. Auch die heterozygote Gruppe hatte niedrigere Mittelwerte als die Gruppe mit homozygoten SHRSP-Allelen.

Die Mittelwerte der Gruppe der mit homozygoten WKY-Allelen für den Marker *D6MGH10* unterschied sich nicht von denen der heterozygoten WKY/SHRSP-Allele. Wir fassten diese beiden Gruppen zusammen und erhielten signifikant niedrigere Mittelwerte im Vergleich zur Gruppe der Tiere mit homozygoten SHRSP-Allelen.

Durch die Erhöhung der statistischen Power in Kohorte B konnten wir die Uneindeutigkeiten in den ANOVA-Ergebnissen der Kohorte A aufklären. In der Schlussfolgerung können wir hier einen rezessiven blutdruckregulierenden Effekt nahe legen: Nur diejenigen Tiere, die für den Marker *D6MGH10* homozygot das hypertensive SHRSP-Allel tragen, weisen signifikant höhere Werte auf als die heterozygoten oder homozygoten für das WKY-Allel. Ein einzelnes SHRSP-Allel reicht für einen blutdruckbeeinflussenden Effekt nicht aus.

Neben der einleitend aufgeführten statistischen Ungenauigkeit, mit der QTL detektiert und lokalisiert werden können, spielen eine Reihe weiterer Einflüsse eine Rolle.

4.2. Die Verfügbarkeit, genomische Dichte und vorhandene Polymorphismen von genetischen Markern bestimmt die Genauigkeit unserer Kopplungsanalyse

Im Vergleich der genetischen Kartierungen der ursprünglichen Kohorte A und der erweiterten Kohorte B mit Hilfe von MapmakerEXP zeigt sich mit beiden Datensätzen eine identische relative Positionierung der Marker. Mit der Vergrößerung des Datensatzes vergrößert sich gleichzeitig die Anzahl an Rekombinationsereignissen. Die Gesamtkartierungsdistanz in Kohorte A beträgt für 11 Marker ca. 91,8 Centimorgan und in Kohorte B für 17 Marker ca. 73,1 Centimorgan. Die Abstände der den *D6MGH10* flankierenden Marker verringern sich im Falle des centromerisch gelegenen *D6Wox5* von 28,2 auf 16,2 Centimorgan und für den telomerisch gelegenen *D6MIT2* von 35,6 auf 24,9 Centimorgan.

In der physikalischen Karte betrug die Gesamtdistanz der sequenzierten Sequenzen ungefähr 63,1 Millionen Basenpaare. Wenn man davon ausgeht, dass die genetische Distanz von 1 Centimorgan in der Ratte ungefähr 2 Millionen Basenpaaren entsprechen, so sind unsere errechneten Distanzen wesentlich höher als die sequenzierten. Dies kann an der begrenzten Anzahl an Rekombinationen liegen, die in unseren Kohorten von maximal 214 Tieren vorkommen.

In einer Rückkreuzung oder einer F₂-Generation von 200 Tieren, wie in der hier vorliegenden Arbeit, können QTLs wahrscheinlich nur auf 20 bis 35 Centimorgan genau lokalisiert werden (Rapp 2000). Wir konnten unsere Marker mit einer Auflösung zwischen weniger als einem und maximal 16 Centimorgan kartieren. Ein solches Intervall ist viel zu groß, um ein Gen positionell zu klonieren. Um das positionelle Klonieren eines Gens möglich machen zu können, geht man von der Feinkartierung einer Region mit einer Auflösung von mindestens einem Centimorgan aus. Dies entspricht in der Ratte ungefähr 2×10^6 Basenpaaren - einer Länge, auf der man immerhin noch ca. 40 Gene erwarten würde (Rapp 2000).

Eine höhere Auflösung unserer Karte wird kaum möglich sein, da es zunehmend schwerer werden wird, polymorphe Marker in einem kürzeren Abstand zu finden. Trotz Hinzuziehung weiterer SSLPs in der unmittelbaren Nachbarschaft konnten wir die Auflösung um den relevanten Marker *D6MGH10* nicht verbessern. Abhilfe könnte hier der Einsatz der erwähnten SNPs schaffen. Darüber hinaus wird die Untersuchung dieser Marker eine noch höhere Anzahl an Tieren er-

forderlich machen, da in einem 1 cM-Intervall nur eine Rekombination pro 100 Tiere zu erwarten ist (Rapp 2000). Jenseits der 5-10 cM-Auflösung ist eine genauere Lokalisation der QTL nicht signifikant zu verbessern; hier hängt die Lokalisation vielmehr von der Höhe der phänotypischen Ausprägung ab (Davarsi et al. 1993). Somit sind eine nur geringe Auswirkung des QTL auf den Phänotypen und die beschränkte Anzahl an Rekombinationen in den untersuchten Markern wahrscheinlich die limitierenden Faktoren unserer Kopplungsanalyse.

Die Schaffung kongener Stämme und Substämme hilft hier weiter. Die Kartierung unserer Region mithilfe kongener Stämme wird ab einer Auflösung von unter 1 cM problematisch werden, da sie weniger durch eine Steigerung der Anzahl der Tiere als vielmehr durch die Dichte der Marker und die Anzahl der Crossover-Ereignisse verbessert werden wird: Selbst wenn man zusätzliche Marker entwickeln kann, so sind jedoch Rekombinationen unterhalb eines Bereiches von 0,2 cM tendenziell gebündelt (Rapp 2000). Das heißt, dass in bestimmten Regionen Rekombinationen innerhalb eines Bereiches von 0,2 cM schlichtweg nicht vorkommen.

4.3. Die Wahl des Stammes erlaubt die Analyse der Salzabhängigkeit in der Ätiologie der Hypertonie

Im Zusammenhang mit der Aufklärung des Effekts von Salz auf den Blutdruck sind weithin die Dahl salzsensitive hypertensive Ratte, die sich in Hinblick auf die Entwicklung einer Hypertonie in einen salzsensitiven (DSS) sowie einen salzresistenten (DSR) Stamm unterteilt, und die verwandten SS/Jr- bzw. SR/Jr-Stämme verwendet worden. Die in dieser Arbeit verwendeten SHRSP-Tiere wurden ausgewählt, da sie als experimentelles Modell in ihrer Entwicklung einer salzsensitiven Hypertonie eher der Situation ähneln, wie man sie auch in humanen Populationen antrifft: Durch die Salzaufnahme wird der Bluthochdruck verstärkt (Dietz et al. 1982); sein Auftreten ist jedoch davon nicht abhängig wie bei der Dahl-Ratte, bei der die Aufnahme hoher Dosen an NaCl obligate Voraussetzung zur Ausprägung der Hypertonie ist (Dahl et al. 1962).

4.4. Der gezeigte QTL beeinflusst den systolischen Blutdruck, den diastolischen Blutdruck und den Pulsdruck

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Kopplungsanalyse zeigen einen Einfluss eines Gens am Locus *D6MGH10* sowohl auf den basalen systolischen Blutdruck und den basalen diastolischen

Blutdruck, als auch auf den Pulsdruck. Dies erscheint im Lichte neuerer klinischer Erkenntnisse von potentiell besonderer Bedeutung.

Während bis in die 90-er Jahre in humanen Therapiestudien der diastolische Blutdruck als ausschlaggebender Risikofaktor angesehen wurde, weisen jüngere Daten darauf hin, dass sowohl der diastolische als auch der systolische Blutdruck die Anfälligkeit für zerebrovaskuläre Ereignisse und koronare Herzerkrankung erhöhen (Lewington et al. 2002). Für Europa wurde gezeigt, dass die Inzidenz an Schlaganfällen stärker ansteigt als an Myokardinfarkten (Kjeldsen et al. 2001). Ebenfalls für Europa konnte nachgewiesen werden, dass der systolische Blutdruck im Verlauf des Erwachsenenalters kontinuierlich steigt, während der diastolische bis ins sechste Lebensjahrzehnt steigt und dann abfällt (Primatesta et al. 2001).

Daraus ergibt sich zumindest für die ältere Bevölkerung, dass ein hoher Pulsdruck ein besserer Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse ist als der diastolische oder systolische Blutdruck allein und auf ein besonderes Risiko bei hypertensiven Patienten hinweist (Franklin et al. 2001). In der erwähnten Metaanalyse stellten jedoch sowohl der diastolische als auch der systolische Blutdruck Risikofaktoren für zerebrovaskuläre und koronare Mortalität dar, mehr noch als der Pulsdruck bei den über 55-jährigen (Lewington et al. 2002).

Neuere Daten zeigen, dass bei den über 50-jährigen der systolische Blutdruck ein bedeutenderer kardiovaskulärer Risikofaktor ist als der diastolische (Chobanian et al. 2004). Da jedoch Patienten sowohl mit isoliertem systolischem Hochdruck (Staessen et al. 1997) als auch mit isoliertem diastolischem Hochdruck (Collins et al. 1990) von einer antihypertensiven Therapie profitieren, empfehlen internationale europäische Leitlinien (Guidelines Committee European Society of Hypertension, 2003), beide Parameter zur Klassifikation und Risikostratifizierung mit einzubeziehen.

Obwohl wir mit einem anonymen Marker noch kein verantwortliches Gen benennen können, ist davon auszugehen, dass der Locus *D6MGH10* im untersuchten Rattenmodell durch eine veränderte Genstruktur oder -expression kausal an der Regulation sowohl des diastolischen als auch des systolischen Blutdrucks und des Pulsdrucks beteiligt ist. Theoretisch scheint es sich hier um

ein Gen zu handeln, das grundlegend in die Pathogenese dieser verschiedenen Phänotypen gleichzeitig eingreift.

4.5. Kandidatengene spielen durch die Physiologie ihrer Genprodukte eine mögliche Rolle bei der Entstehung der Hypertonie

Seit ihrer frühen Erstbeschreibung (Elliot und Nuzum 1934; zit in: Margolius 1995) sind Kallikreine und ihre Produkte, die Kinine, als Regulatoren kardiovaskulärer Funktion bekannt. Ihre Rolle bei der Regulierung lokaler und systemischer Hämodynamik, Gefäßpermeabilität, Entzündungs- und Schmerzreaktion, der Aktivierung neuronaler Kreisläufe sowie des Elektrolyt- und Wassertransportes ist Gegenstand intensiver Forschung. Die beobachtete verminderte Kallikreinausscheidung mit dem Urin bei hypertensiven Patienten wird als Ausdruck eines defizienten endogenen vasodilatatorischen Systems gesehen (Margolius 1995). Allerdings zeigen viele Hypertoniepatienten eine normale Kallikreinexkretion (Margolius 1989). Schwarze scheiden allgemein weniger Kallikrein aus als Kaukasier (Levy et al. 1977). Epidemiologische Untersuchungen bei Kindern zum Zusammenhang von Kallikreinausscheidung und Blutdruck konnten zeigen, dass Familien mit der niedrigsten Kallikreinausscheidung einen signifikant höheren Blutdruck aufwiesen als Familien mit höherer (Zinner et al. 1976, Zinner et al. 1978).

Kininogene sind Vorläufermoleküle hohen Molekulargewichts (*high molecular weight precursors, HMW*) oder niedrigen Molekulargewichts (*low molecular weight precursors, LMW*). Sie sind durch alternatives Splicing unterschiedliche Produkte desselben Genes. Das aktivierte humane Gewebekallikrein spaltet *LMW*-Kininogene zu Lys-Bradykinin (Kallidin), während das plasmatische Kallikrein Bradykinin freisetzt. Beide Peptide sind equipotent, und ein funktioneller Unterschied zwischen ihnen ist bisher nicht bekannt (Margolius 1995). Einer ihrer Inhibitoren ist das Kallistatin (Kallikrein bindendes Protein [KBP]). Es gehört zur Familie der Serin-Proteinase-Inhibitoren (*serpins*) und ist auf Protein- wie auf DNA-Ebene sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte charakterisiert worden (Chao et al. 1990, Chai et al. 1991, Zhou et al. 1992).

In der Ratte ist das Kallistatin ein Protein von 60 kD Größe. Es wird von einem 1500 bp langen primären Transkript kodiert, welches eine hohe Sequenzhomologie mit anderen *serpins* aufweist. Kallistatin ist in der Lage, Kallikrein kovalent zu binden und es durch Spaltung an der Aminosäure Lysin zu inaktivieren. Daher wurde seine Rolle in der Modulation des Kallikrein-Kinin-

Systems postuliert. Studien haben unterschiedliche Kallistatin-Plasmakonzentrationen bei SHR- und WKY-Ratten gezeigt, die darauf hinweisen, dass Veränderungen in der Expression oder Stabilität des Proteins zumindest in den untersuchten Modellen zur Blutdruckregulation beitragen (Chao et al. 1990). Neuere Studien, die Kallistatin spezifisch in glatten Muskelzellen und Endothelzellen von Gefäßen lokalisieren konnten, deuten auf eine Rolle bei vaskulären Funktionen und der Angiogenese hin (Miao et al. 2002). In Ratten konnte eine Vasorelaxation isolierter Aortenringe und eine verminderte Nierenperfusion nachgewiesen werden (Chao et al. 2001). Transgene Mäuse, die Ratten-Kallistatin überexprimieren, sind hypotensiv, und in SHR-Ratten führt der Gentransfer humanen Kallistatins zu einer Abschwächung des Blutdruckanstiegs (Chao et al. 2001).

Der überwiegende Teil der Wirkung der Kinine wird durch den Bradykininrezeptor B2 (*BKRB2*) vermittelt (Margolius 1995, Tschöpe et al. 2000). Sein Ligand ist das Bradykinin. Sowohl der Ratten- als auch der humane *BKRB2* sind kloniert worden (McEachern et al. 1991, Hess et al. 1992). In der Ratte umfasst das *BKRB2*-Gen eine Länge von 7,3 kb und enthält drei Exons, getrennt durch zwei Introns; es kodiert ein Peptid von 366 Aminosäuren (Wang et al. 1994).

Die höchste *BKRB2*-Dichte findet sich in der Niere, wobei der Rezeptor auch in Herz, Lunge, Hirn, Uterus und Hoden nachweisbar ist (Pesquero et al. 1994). Für den *BKRB2* ist der Nachweis einer Strukturvariation oder eines Genpolymorphismus mit einer direkten funktionellen Konsequenz bisher nicht erbracht worden (Margolius 1995) und steht weiter aus.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir in unserem Hypertoniemodell keinen statistisch signifikanten Einfluss der beiden Kandidatengene auf die Blutdruckregulation nachweisen. Durch die hohe Power unseres Experiments, selbst kleinere Unterschiede in systolischem Blutdruck und Pulsdruck zwischen den Genotypgruppen zu detektieren, konnten wir einen größeren Einfluss der Gene für Kallistatin und für den Bradykininrezeptor B2 auf die Blutdruckregulation sogar weitgehend ausschließen. Dies bestätigt frühere Daten (Chen et al. 1997), die in einer Kreuzung von GH und BN das Kallistatin-Gen (*KBP*) auf Rattenchromosom 6 kartieren, jedoch keine Kosegregation mit Blutdruck zeigen konnten.

Eine Studie von 32 rekombinant-ingezüchteten Rattenstämmen aus SHR und BN-Ratten konnte eine Kosegregation eines RFLP im Kallikrein-Gen mit systolischem und diastolischem Blutdruck zeigen (Pravenec et al. 1991). In humanen Populationen hingegen hat eine Fall-Kontroll-Studie für Polymorphismen des Kallikrein-Gens keinen Einfluss auf den Blutdruck oder seine Variabilität nachweisen können (Berge und Berg 1993).

Die Halbwertszeit der Kinine wird bestimmt durch den hydrolytischen Abbau durch Kininasen, deren prominentester Vertreter die Kininase II ist. Sie ist identisch mit dem Angiotensin Converting Enzyme (ACE), dessen intensiv beforschter Genpolymorphismus und sein Beitrag zur Hypertonie kontrovers beurteilt wird (Harrap 1994).

Die Wirkung der in der antihypertensiven Therapie weitverbreiteten ACE-Hemmer ist nicht nur auf die verminderte Angiotensin II-Bildung, sondern auch auf den herabgesetzten Kininabbau zurückzuführen. Dies kann daraus geschlossen werden, dass bei Blockade des *BKRB2* mit dem Antagonisten Icatibant (Hoe 140) die ACE-Hemmer ihre Fähigkeit verlieren, das Myokardinfarktareal oder den postischämischen Reperfusionsschaden zu begrenzen (Linz und Schölkens 1992). Das Ausmaß der protektiven Wirkung lokal produzierte Kinine im Myokard in Bezug auf eine verstärkte Wirkung der ACE-Hemmer wird kontrovers beurteilt (Scioli 1994, Margolius 1995). Sie findet jedoch Unterstützung durch eine klinische Kasuistik, in der durch Infusion von Icatibant eine anaphylaktische Reaktion gegen ACE-Hemmer verhindert werden konnte (Davidson et al. 1994).

4.6. Die genetische Dissektion des QTL und der flankierenden Region erschließt weitere Kandidatengene für die Hypertonie

Wir konnten für den anonymen Marker *D6MGH10* Kopplungen an verschiedene kardiovaskuläre Phänotypen zeigen. Auffällig ist, dass diese Kopplungen auf einen einzelnen Marker beschränkt sind. Auch die zusätzlichen, benachbart kartierten Marker ließen sich nicht so nah am besagten Marker *D6MGH10* kartieren, wie durch die physikalischen Daten zu erwarten war. Physikalisch liegen die benachbarten Marker centromerisch ca. 8551 kb (*D6Wox5*) und telomerisch ca. 374 kb (*D6Rat91*) beziehungsweise ca. 1274 kb (*D6Got131*) vom besagten Marker *D6MGH10* entfernt. Genetisch konnten wir die Marker centromerisch ca. 16,2 Centimorgan

(*D6Wox5*) und telomerisch ca. 8,8 Centimorgan (*D6Rat91*) beziehungsweise ca. 10,5 Centimorgan (*D6Got131*) entfernt kartieren.

Bei der Frage nach Kandidatengenien beschränkten wir uns nicht auf die flankierenden Regionen von ungefähr 4 Centimorgan um den besagten Marker *D6MGH10* herum, in dem die LOD-Werte wieder auf nicht signifikante Werte abfallen. Aufgrund der geringen Markerdichte um den signifikanten Marker herum ist eine Beschränkung auf die Schwelle des signifikanten LOD-Wertes sicher unzureichend, da diese durch eine Gerade interpoliert werden muss. Es wurden daher alle Gene bis zu den benachbarten Markern *D6Wox5* (telomerisch) und *D6Rat91* (centromerisch) mit eingeschlossen.

Unsere Suche in öffentliche Datenbanken nach eventuellen Kandidatengenien in diesem Intervall ergab mehrere beschriebene Gene (Tabelle I), deren Rolle in Bezug auf die Entstehung der Hypertonie zunächst unklar ist. Ausgehend von der physiologischen Funktion der Genprodukte kann man über ihre putative Beteiligung an der Pathophysiologie der Hypertonie zunächst nur theoretisieren.

Denkbar wäre eine Beteiligung des Gens *NAC3_Rat*, das einen Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) kodiert. Transkripte verschiedener Unterformen dieses Austauschers werden in fast allen Geweben exprimiert. Im Herzmuskel liegt die primäre Funktion des Austauschers im auf die Exzitation folgenden Kalziumausstrom aus der Zelle (Blaustein und Lederer 1999). Membranen kardialer Zellen zeigen höchste Aktivität an $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Transport, und dessen Rolle bei der Zell-erregung ist intensiv dokumentiert worden. Allerdings wird in Herzmuskelzellen vor allem die Unterform 1 exprimiert und nicht die vom Gen *NAC3_Rat* exprimierte Form 3 (Nicoll et al. 1996). Knockout-Mäuse, denen das Gen für den NCX1 fehlt, zeigen in Kardiomyozyten dysorganisierte Myofibrillen und angeschwollene Mitochondrien, jedoch bei unveränderten Konzentrationen an NCX3 (Wakimoto et al. 2003). Sie zeigen außerdem eine Beteiligung des NCX bei der Kardioprotektion nach Infarkt und folgender Reperfusion (Komuro und Ohtsuka 2004).

Das *PlGF*-Gen der Ratte kodiert ein Vorläuferprotein für den Plazenta-Wachstumsfaktor (PlGF) der Ratte. Reine PlGF-Homodimere haben in Zellkultur nur in sehr hohen Konzentrationen einen wachstumsfördernden Effekt auf Endothelzellen gezeigt (DiSalvo et al. 1995). Wahrschein-

lich hat der PlGF physiologisch nur als Heterodimer mit dem durch Hypoxie induzierten, homologen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) einen wachstumsstimulierenden Effekt auf Endothelzellen (DiSalvo et al. 1995). In Ratten, die den homologen VEGF überexprimieren, hat sich ein protektiver Effekt auf eine pulmonale Hypertonie gezeigt (Louzier et al. 2003). Ein Knockout-Mausmodell gibt es bisher nicht für den PlGF, wohl aber für den VEGF-B. Bei diesen Mäusen gibt es im Vergleich zur Kontrolle keine Befunde der pulmonalen Hämodynamik (Louzier et al. 2003).

Eine Funktion dieser identifizierten Gene in Bezug auf eine systemische Hypertonie ist bisher nicht beschrieben worden. Aufgrund der unklaren Rolle der identifizierten Gene dieser Region muss die Möglichkeit ihrer Beteiligung an der Pathogenese der Hypertonie also zunächst rein spekulativ bleiben.

Kommende Aufgabe wird es folglich sein, in Ermangelung polymorpher SSLPs nun in einem nächsten Schritt polymorphe SNPs zu identifizieren und diese Region durch Genotypisierung genauer zu charakterisieren. Dann wäre auch die den QTL enthaltende Region in ihrem Ausmaß näher begrenzt und somit eine Suche nach einem Kandidatengen weiter konzentriert.

Sollte es schließlich gelingen, durch diese weiteren polymorphen Marker die Region auf wiederum weniger als Kandidaten in Frage kommende Gene einzugrenzen, wird man letztere durch vergleichendes Sequenzieren der verschiedenen Stämme auf mögliche Unterschiede zwischen WKY und SHRSP bezüglich putativer Kandidatengene und ihrer Struktur prüfen können.

4.7. Die salzabhängige Entstehung der Hypertonie ist möglicherweise von einer genetischen Prädisposition abhängig

Die Salzaufnahme mit der Nahrung gilt als einer der entscheidenden Umweltfaktoren bei der Entstehung des Bluthochdrucks. In unserer Untersuchung konnten wir einen Einfluss der Salzaufnahme auf die Herzfrequenz und den Herzfrequenzanstieg sowie den systolischen Blutdruck zeigen.

Ein Zusammenhang zwischen Salzhaushalt, BKRB2 und Kallikrein konnte in Arbeiten gezeigt werden, die nach längerer verminderter Salzaufnahme eine Abnahme der BKRB2-Bindungs-

stellen gleichzeitig mit einem verminderten Kallikrein in Niere und Urin nachweisen konnten (Siragy et al. 1984). Auch spätere Studien konnten durch direkte Messung der interstitiellen Kallikreinkonzentration deren Veränderung auf verschiedene Stimuli zeigen (Siragy et al. 1994).

Im distalen Tubulus der Niere sind sämtliche Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems exprimiert und arbeiten hier unabhängig vom plasmatischen Kallikrein-Kinin-System (Katori und Majima 2003). Neuere Studien sowohl an Kininogen-defizienten Brown-Norway Katholik Ratten als auch an Bradykinin-B2-Rezeptor-Knockout-Mäusen zeigen, dass dieses System bei erhöhtem Salzgehalt des Körpers – beispielsweise bei vermehrter Salzaufnahme oder Aldosteronausschüttung – die Diurese und Natriurese induziert (Katori und Majima 2003). Es wirkt somit gewissermaßen als ein Sicherheitsventil gegen die Salzakkumulation im Körper. Diese Annahme wird gestützt im Tiermodell wie beim Menschen durch die Beobachtung verminderter Ausscheidung von Kallikrein mit dem Urin (Margolius 1995, Madeddu et al. 1997). Hypothetisch könnte man also annehmen, dass durch eine genetisch determiniert verminderte renale Kallikreinsekretion eine salzsensitive Hypertonie entsteht.

Ob ein Individuum auf die Belastung mit Salz durch die Nahrungsaufnahme mit der Ausbildung einer Hypertonie reagiert, ist somit möglicherweise von seinem individuellen genetischen Hintergrund abhängig. Die direkte Beteiligung des Kininsystems bei der Entstehung und Salzsensitivität der Hypertonie konnten wir aufgrund der erwähnten statistischen Power unserer Studie zumindest im vorliegenden Hypertoniemodell weitgehend ausschließen.

4.8. Entwicklungseinflüsse bestimmen möglicherweise in ihrem Verlauf die Ausprägung des Blutdrucks

Obwohl wir für unsere Kandidatengene einen relevanten biologischen Einfluss nicht nachweisen konnten, gilt dieses Ergebnis nur für das untersuchte Alter der von uns untersuchten Tiere, für die Entwicklungsstufe 16 Wochen alter Ratten. Zwar zeigen alle hypertensiven Rattenmodelle Abnormalitäten in der Kallikreinexkretion; unklar ist hingegen, ob dies die Ursache oder Konsequenz der Hypertonie darstellt (Margolius 1995).

In einer Studie an neugeborenen Milan Ratten zeigten diese signifikant niedrigere Kallikreinkonzentrationen als der Kontrollstamm (Favaro et al. 1975). Eine weitere Studie wies nach, dass

innerhalb von 12 Stunden nach Geburt die renale Kallikreinaktivität bei SHR-Tieren nur 53 % im Vergleich zur WKY-Kontrolle betrug und ein Unterschied zwölf Wochen lang persistierte, während sich die Enzymkonzentrationen zwischen den Stämmen nicht unterschieden (Praddaude et al. 1989). Dies spricht eher für eine Störung in Prozessierung oder Aktivierung als in der Synthese.

Eine langfristige Blockade von *BKRB2* in Wistar-Ratten pränatal und postnatal führte zwar nicht zu einem Hypertonus, aber doch zu einer Erhöhung der Werte, sodass die Autoren zu dem Schluss kamen, endogen produzierte Kinine tragen zum erwachsenen kardiovaskulären Phänotypen bei (Madeddu et al. 1995).

Bei der Hypertonie handelt es sich zwar um einen erst im Erwachsenenalter voll ausgeprägten Phänotypen; Entwicklungseinflüsse sind hierbei nicht ausgeschlossen (Lever und Harrap 1992). Modellrechnungen haben jedoch gezeigt, dass entwicklungsabhängige QTL wahrscheinlich nur durch zeitlich verschiedene Messungen zu erfassen sind (Schork et al. 1996).

Die Frage, inwieweit Entwicklungseinflüsse in ihrem Verlauf möglicherweise die Ausprägung des Blutdrucks bestimmen, konnten wir aufgrund unseres Studiendesigns nicht beantworten. Hier sind zukünftig longitudinal angelegte Untersuchungen vonnöten.

4.9. Ausblick auf die zukünftige Suche nach den molekularbiologischen Ursachen der Hypertonie

Die Identifikation eines QTL, der bei der Regulierung des Blutdrucks eine Rolle spielt, kann als erster Schritt zur Identifizierung eines zur Hypertonie kausal beitragenden Gens angesehen werden (McBride et al. 2004). Die Lokalisation von QTL durch genetische Kopplung erlaubt zwar die Identifizierung einer Region bzw. eines Locus; aufgrund ihrer Größe können sich hierin aber sehr viele verschiedene Gene bzw. sogar mehrere Loci befinden. Sie ist jedoch die Voraussetzung zur Schaffung kongener Stämme und bahnt durch die Möglichkeit einer hochauflösenden Kartierung der Identifizierung neuer Hypertoniegene den Weg.

Ist ein QTL auf eine beschränkte kongene Region weiter begrenzt, kann durch nachfolgende Kandidatengenuntersuchungen, Genexpressionsanalysen oder Sequenzierung der Region das verantwortliche Gen unter Umständen identifiziert werden. Die Frage der Übertragbarkeit der aus

Tiermodellen gewonnenen Daten auf den Menschen kann durch vergleichende Genomanalyse in ersten Ansätzen beantwortet werden. Hierbei werden *in silico* generierte genetische Karten von in Ratten identifizierten QTL durch Vergleich syntenischer Regionen auf das Genom des Menschen übertragen (Stoll et al. 2000).

Weder die experimentelle noch die klinische Forschung haben bisher den entscheidenden Durchbruch in der Aufklärung der Ätiologie der Hypertonie erbringen können. Die Ursache liegt dabei möglicherweise in der multifaktoriellen Natur dieser Erkrankung. Verschiedene Faktoren koexistieren, interagieren und tragen in verschiedenster Weise zur Entstehung der Hypertonie bei. Dies verdeutlicht die Schwierigkeit eines passenden Modells für diese Erkrankung.

Weiter ist die Einteilung in primäre und sekundäre Hypertonie in der klinischen Praxis zwar sehr sinnvoll, hat jedoch gleichzeitig zu der irrigen Annahme geführt, nur der primäre, nicht aber der sekundäre Bluthochdruck sei genetisch determiniert. Dabei sind primärer und genetischer Hochdruck keinesfalls miteinander gleichzusetzen. Dies ist insofern ein Trugschluss, als dass jeglicher biologischer Zustand, sei er nun als krank oder gesund aufgefasst, vom Zusammenspiel genetischer Faktoren mit der Umwelt herrührt. Wenn auch manche Krankheiten scheinbar vornehmlich durch Umwelteinflüsse verursacht werden, so liegt ihrer Entstehung jedoch stets eine Interaktion dieser Einflüsse mit einem prädisponierenden oder - im Gegenteil – schützenden genetischen Hintergrund zugrunde. Andersherum haben sich in letzter Zeit gerade als sekundär aufgefasste Formen von Bluthochdruck als primär vererblich herausgestellt (Beekman und Robinow 1985).

Trotz der hohen Prävalenz ist jedoch erst wenig über die Ursachen der Hypertonie bekannt. Das mag zum einen an der Komplexität ihrer Pathogenese liegen, zum anderen vielleicht aber auch an den erwähnten traditionellen Betrachtungsweisen bezüglich ihrer Ätiologie und Einteilung. Die Einteilung der Hypertonie stellt eher ein derzeitiges Verständnis von Pathomechanismen dar als den tatsächlichen ätiologischen Hintergrund. Diese Trennung in primäre und sekundäre Hypertonie wird möglicherweise hinfällig werden: Der Fortschritt auf dem Gebiet der Molekulargenetik und Zellbiologie ermöglicht es, umweltorientierte epidemiologische Untersuchungen zur Pathologie des Bluthochdrucks oder der komplexen Erkrankungen allgemein um die Aufklärung der Rolle der kausativen Gene zu ergänzen. Es gilt also, eine Gruppe von Krankheiten mit unter-

schiedlichem genetischen Hintergrund und individueller Interaktion mit der Umwelt sowie oft nur feinen phänotypischen Variabilitäten so exakt wie möglich zu unterscheiden. Entscheidend wird sein, die Effekte und das Zusammenspiel genetischer und umweltbedingter Faktoren zu erkennen (Lindpaintner 1993).

Zwar ist es unwahrscheinlich, dass in den letzten Jahren größere unabhängige Risikofaktoren der klinischen und Grundlagenforschung entgangen sein mögen. Es wird jedoch betont, dass ein größerer Anteil bisher als erblich zugeschriebener Blutdruckvarianz bislang noch nicht erklärt werden konnte (Lindpaintner 1993). Das mag zum einen an der genetischen Heterogenität liegen, die sich herkömmlichen Segregationsanalysen entzieht. Zum anderen können dieser unerklärten Varianz auch komplexe Interaktionen zwischen Genen und Umweltfaktoren zugrunde liegen, die konventionelle theoretische Modelle und Methoden nicht aufzuspüren vermögen. In die Untersuchungen zur Genetik komplexer Erkrankungen sind besagte Effekte und Interaktionen daher immer miteinzubeziehen.

Auch im neuen Jahrtausend ist der Hypertonus noch immer ein herausragendes Problem in Medizin und Public Health. Nach Angaben der WHO liegt die Hypertonie weltweit bei den Todesursachen der über 60-jährigen an siebter Stelle (WHO 2003). Ziel der genetischen Dissektion der Hypertonie in ihren mannigfaltigen Ausprägungen wird die exakte Diagnostik des Individuums auf molekularbiologischer Ebene sein. Dies wird dann der Ausgangspunkt sein, um durch die Aufklärung der Pathophysiologie zu einer mehr auf den individuellen Patienten eingehenden Therapie zu gelangen. Der Weg zum vollständigen Bild der genetischen Ursachen des Bluthochdrucks ist also noch sehr weit und stellt erst die Anfangsstrecke zum Ziel der erfolgreichen Behandlung dar. Oder, wie Professor Ganten in seinem aktuellen Werk (Ganten 2003, p. 355) die postgenomische Ära auf den Punkt bringt:

„Man ist sich einig, dass nun die Arbeit erst richtig anfängt.“